



T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**ORAL SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMDA
THIOREDOXIN INTERACTING PROTEIN (TXNIP)
GENİNİN METİLASYON VE EKSPRESYON
SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. İlker Erdiñ ÖZTÜRK

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Murat ULUSAN

İSTANBUL

Ağustos 2019





T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**ORAL SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMDA
THIOREDOXIN INTERACTING PROTEIN (TXNIP)
GENİNİN METİLASYON VE EKSPRESYON
SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. İlker Erdiñ ÖZTÜRK

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Murat ULUSAN

İSTANBUL

Ağustos 2019

ETİK KURUL ONAYI



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



Sayı : 1123

Konu: Doç. Dr. Murat ULUSAN hk.

Tarih : 14.08.2018

Sayın Doç. Dr. Murat ULUSAN

Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Baş Boyun Cerrahisi

İlgi : Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalının 08/08/2018 gün ve 249231 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Dr. İlker Erdiç ÖZTÜRK'ün yürüteceği 2018/1092 dosya numaralı "Oral skuamöz hücreli karsinomda Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) geninin metilasyon ve ekspresyon seviyelerinin incelenmesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 10/08/2018 tarih ve 13 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağz ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

ÖNSÖZ

Tezimin hazırlanma sürecinde beni yönlendiren, tecrübesini paylaşan, ilgisi ve anlayışıyla her daim destekçim olan, tezimin danışmanlığını üstlenen değerli hocam Doç. Dr. Murat Ulusan'a ve İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji'den değerli hocam Prof. Dr. Semra Demokan'a,

Uzmanlık eğitimim süresince eğitim ve öğrenimime verdikleri değerli katkıları ile üzerimde büyük emekleri olan, iş disiplini ve itinalı insan ilişkileriyle bizlere her zaman örnek teşkil eden, öğrencileri olmaktan her zaman onur duyacağım saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. M. Nesil Keleş Türel'e, Prof. Dr. Ö. Erkan Kıyak'a, Prof. Dr. Kemal Değer'e, Prof. Dr. Yahya Güldiken'e, Prof. Dr. İsmet Aslan'a, Prof. Dr. Yusufhan Süoğlu'na, Prof. Dr. K. Serkan Orhan'a, Doç. Dr. Bora Başaran'a, Doç. Dr. Şenol Çomoğlu'na, Doç. Dr. Beldan POLAT'a, Uzm. Dr. Mehmet Çelik'e ve Uzm. Dr. Levent Aydemir'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Asistanlığımın büyük bir kısmında birlikte çalıştığım ve üzerimde büyük emekleri olan ekip arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Serkan Alpaslan, Uzm. Dr. Ercan Çelebi, Uzm. Dr. Necati Enver, Uzm. Dr. Eren Yılmaz, Uzm. Dr. Cömert Şen, Uzm. Dr. İbrahim Yağcı ve benden sonra asistanlığa başlayıp her daim yanımda olan, birlikte çalışmaktan mutluluk ve onur duyduğum ekip arkadaşlarım Dr. Can Doruk, Dr. Berkay Çaytemel, Dr. Erol Bozbora, Dr. Halime Kılıç ve Dr. Yasin Çetinkaya başta olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma ve tüm İstanbul Tıp Fakültesi KBB kliniği çalışanlarına,

Laboratuvar çalışmalarında ve tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndan M.Sc Sena Şen ve M.Sc Metehan Karataş'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, her konuda beni destekleyen ve bu günlere hazırlamak için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel Araştırma Kurulu (TÜBİTAK) tarafından elde edilen TÜBİTAK-SBAG-114S497 numara ile desteklenen bulgulardan üretilmiş olup İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2018-31834 numarası ile desteklenmiştir.

Dr. İlker Erdinç ÖZTÜRK

Ağustos 2019

İÇİNDEKİLER

ETİK KURUL ONAYI.....	II
ÖNSÖZ.....	III
ŞEKİL DİZİNİ	VI
TABLO DİZİNİ	VII
KISALTMALAR.....	VIII
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ	3
2.GENEL BİLGİLER.....	5
2.1.Oral Kavite Anatomisi	5
2.1.1.Arteriovenöz Anatomi	6
2.1.2.Oral Kavite Bölümleri	8
2.1.2.1.Dudaklar.....	8
2.1.2.2.Alveoler Kenar.....	9
2.1.2.3.Dil (Oral Kısım)	9
2.1.2.4.Retromolar Trigon.....	11
2.1.2.5.Ağız Tabanı.....	12
2.1.2.6.Bukkal Mukoza	13
2.1.2.7.Sert Damak.....	13
2.2.Oral Kavite Kanseri	13
2.2.1.Oral Kavite Skuamöz Hücreli Karsinomu Varyantları.....	14
2.2.2.Etiyoloji ve Risk Faktörleri	14
2.3.Oral Kavite Kanserlerinin Anatomik Sınıflandırılması.....	15
2.3.1.Dudak Kanseri.....	15
2.3.2.Alveoler Kenar Kanseri	15
2.3.3.Oral Dil Kanseri	16
2.3.4.Retromolar Trigon Kanseri	16
2.3.5.Ağız Tabanı Kanseri.....	16
2.3.6.Bukkal Mukoza Kanseri.....	17
2.3.7.Sert Damak Kanseri	17
2.4.Oral Kavite Kanserlerinde Evreleme.....	17
2.5.Prognoz	19
2.6.OSCC Moleküler Biyolojisi	19
2.7.Epigenetik.....	20
2.7.1.DNA Metilasyonu	21
2.7.1.1.DNA Hipermetilasyonu	22
2.7.1.2.DNA Hipometilasyonu.....	22
2.7.2.miRNA Regülasyonu	22
2.7.3.Histon Modifikasyonu	22
2.7.4. Kromatin Yeniden Düzenlenmesi	23

2.8.Biyobelirteç	23
2.9.TXNIP (Thioredoxin Interacting Protein) Geni	24
2.9.1.Tioredoxin Sistemi	24
2.9.2.Tioredoxin Sisteminde TXNIP	24
2.9.3.Kanserde TXNIP Fonksiyonu	25
3.GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1.Materyal.....	26
3.1.1.Kullanılan Cihazlar	26
3.1.2.Kullanılan Kimyasallar.....	27
3.1.3.Kullanılan Kimyasal Karışımlar	27
3.2.Yöntem.....	28
3.2.1 Materyal Toplama	28
3.2.1.1 Doku Elde Edilmesi	28
3.2.1.2.Serum Elde Edilmesi.....	28
3.2.2.DNA İzolasyon İşlemleri.....	28
3.2.2.1.Dokudan DNA İzolasyonu.....	28
3.2.2.2.Serumdan DNA Elde Edilmesi	30
3.2.3.RNA İzolasyonu.....	31
3.2.4.Metilasyon Ve Ekspresyon Deneyleri İçin Primer/Prob Tasarımı	31
3.2.5.Metilasyon Analizi	33
3.2.5.1.Bisülfid Dönüşümü	33
3.2.5.2.TXNIP Geninin Relatif Metilasyon Seviyesinin QMSP İle Belirlenmesi	35
3.2.6.Ekspresyon Analizi	36
3.2.6.1.TXNIP Geninin Ekspresyon Seviyelerinin QRT-PCR Yöntemi İle Belirlenmesi	36
3.2.7.Veri Analizi.....	38
4.BULGULAR	39
4.1.OSCC Hastalarına Ait Klinikopatolojik Parametreler ile Sağlıklı Bireylere Ait Demografik Özellikler	39
4.2 TXNIP Geninin Metilasyon Analiz Sonuçları	41
4.3.TXNIP Geninin Ekspresyon Analiz Sonuçları.....	43
4.4.TXNIP Geninin Promoter Bölgesinde Gözlenen Hipermetilasyona Bağlı Ekspresyon Seviyesinde Azalma	47
4.5.Metilasyon Ve Ekspresyon Sonuçlarının Klinikopatolojik Veriler İle Karşılaştırılması.....	48
5.TARTIŞMA.....	49
KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ	64

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Oral kavite anatomisi

Şekil 2: Submandibuler bölge kasları ve gland ile ilişkileri

Şekil 3: Submandibuler bölge nörovasküler anatomisi

Şekil 4: Sert damak anatomisi

Şekil 5: Dudak lenfatik drenajı

Şekil 6: Dil dorsal yüz anatomisi

Şekil 7: Ekstremsel dil kasları

Şekil 8: İntrensek dil kasları

Şekil 9: Dil ve ağız tabanı lenfatik drenajı

Şekil 10: Üst boyun lenfatikleri

Şekil 11: Ağız tabanı anatomisi

Şekil 12: SAM ve DNMT ile DNA metilasyonu

Şekil 13: *TXNIP* geninin primer ve prob tasarımı.

Şekil 14: %100 metile standart ve dilüsyonlarının *ACTB* genine ait amplifikasyon eğrileri

Şekil 15: %100 metile standart ve dilüsyonlarının hedef *TXNIP* genine ait eğrileri

Şekil 16: %100 metile standart ve dilüsyonlarında *ACTB* ve *TXNIP* genlerine ait standart eğri

Şekil 17: OSCC hastalarına ait tümör, eşlenik normal doku ile serum ve tükürük örneklerindeki metilasyon oranları (β -value).

Şekil 18: Sağlıklı bireylere ait normal mukoza ve serum örneklerindeki metilasyon oranları (β -value).

Şekil 19: Hastalara ait örneklerin hedef gen (*TXNIP*) ve referans gendeki (*ACTB*) amplifikasyon eğrileri.

Şekil 20: Sağlıklı bireylerin mukoza ve serum örneklerindeki ekspresyon düzeyleri normalize edilerek $2^{\Delta Ct}$ metodu ile relatif olarak değerlendirilmesi

Şekil 21: OSCC hastalarının tümör/eşlenik normal doku ve serum örneklerinin ekspresyon düzeylerinin normalize edilerek $2^{\Delta Ct}$ metodu ile relatif olarak değerlendirilmesi

Şekil 22: *TXNIP* geninin ekspresyon düzeyleri ile referans genin (*ACTB*) OSCC hastalarına ait tümör (T) ve eşlenik normal (N) doku örneklerindeki ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile relatif olarak hesaplanması

TABLO DİZİNİ

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

Tablo 2: Dokudan DNA elde edilmesi

Tablo 3: Serumdan DNA elde edilmesi

Tablo 4: Dokudan RNA elde edilmesi

Tablo 5: Metilasyon ve ekspresyon profilleri incelenecek olan *TXNIP* geninin primer ve prob tasarımı. (EF: Ekspresyon Forward, ER: Ekspresyon Revers, MF: Metilasyon Forward, MR: Metilasyon Revers)

Tablo 06: Referans *ACTB* geninin primer ve prob tasarımı. (EF: Ekspresyon Forward, ER: Ekspresyon Revers, MF: Metilasyon Forward, MR: Metilasyon Revers)

Tablo 7: Bisülfıt DNA dönüşüm protokolü

Tablo 8: Metilasyon deneyleri için QMSP reaksiyon koşulları

Tablo 9: Metilasyon deneyleri için QMSP reaksiyon karışımı

Tablo 010: cDNA sentezi reaksiyon koşulları

Tablo 11: cDNA sentezi reaksiyon karışımı

Tablo 12: Ekspresyon deneylerinin QRT-PCR reaksiyon karışımı

Tablo 13: Ekspresyon deneylerinin QRT-PCR reaksiyon koşulları

Tablo 14: Sağlıklı bireylere ait demografik parametreler

Tablo 15: OSCC hastalarına ait klinik parametreler

Tablo 16: Metilasyon ve ekspresyon değişikliklerinin gösterimi

KISALTMALAR

DNA:	Deoksiribonükleik asit
RNA:	Ribonükleik asit
cDNA:	Komplementer DNA
SCC:	Skum�z hücreli karsinom
OSCC:	Oral skum�z hücreli karsinom
HNSCC:	Baş boyun skum�z hücreli karsinom
TXNIP:	Thioredoxin interacting protein
Trx:	Tioredoksin
TrxR:	Tioredoksin redüktaz
miRNA:	mikro RNA
ROS:	Reaktif oksijen �r�nleri
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
QMSP:	Kantitatif metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu
QRT-PCR:	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
HPV:	Human Papilloma Virus
UV:	Ultraviyole
BT:	Bilgisayarlı Tomografi
AJCC:	Amerikan Kanser Komitesi
TNM:	Tümör- Lenf nodu- Metastaz
FAM:	6-floroseinamidit
TAMRA:	Karboksitetrametilrodamin

ÖZET

Oral Skuamöz Hücreli Karsinomda *Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP)* Geninin Ekspresyon ve Metilasyon Düzeylerinin İncelenmesi

Amaç: Prof. Dr. Semra Demokan ve arkadaşlarının TÜBİTAK-114S497 nolu projesinin array sonuçlarına göre metilasyona bağlı ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen, bir tümör süpresör gen olan *TXNIP*’nin metilasyon ve ekspresyon seviyeleri daha geniş oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC) hasta grubunda incelendi. Çalışmamızda invaziv/non-invaziv yöntem geliştirilerek oral kavite skuamöz hücreli karsinomunda tanı/erken teşhiste *TXNIP*’nin biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi hedeflendi.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda İstanbul Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Kliniği’nde OSCC tanısı almış ve ameliyat edilmiş 50 hastanın tümör, eşlenik normal doku ve serumunda, 10 adet sağlıklı bireyin normal mukoza ve serumunda DNA izolasyonu yapılarak *TXNIP* geni metilasyon ve ekspresyon oranları incelenip, metilasyona bağlı ekspresyon kaybı incelendi. Metilasyonu göstermek için Kantitatif metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (QMSP) yöntemi kullanılmış olup ekspresyon düzeyinin belirlenmesinde kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (QRT-PCR) yöntemi uygulandı.

Bulgular: Yapılan deneyler sonucunda 30 hastaya (%60) ait tümör dokusunda eşlenik normal dokularına kıyasla *TXNIP* ekspresyon oranlarında azalma gözlemlendi. Genin promoter bölgesinde ise 9 hastaya (%18) ait tümör dokusunda metilasyon saptanırken eşlenik normal dokuda sadece bir hastada bulundu. Metilasyon saptanan 9 hastanın 6’sında (%67) ekspresyon oranında düşme gözlemlendi. Metilasyona bağlı ekspresyonda azalma gözlenen 6 hastanın 1 tanesinde eşlenik normal doku ve serum örneğinde metilasyon saptandı. Sağlıklı bireylerde hem doku hem de sıvı örneklerinde genin metilasyonuna rastlanmadı. Metilasyon gözlenen OSCC hastalarının tümör dokusu örneklerinde sağlıklı bireylere oranla genin ekspresyonunda 89 kat azalma saptandı. Metilasyon görülmeyen OSCC hastalarının tümör dokusunda ise sağlıklı bireylere oranla *TXNIP* gen ekspresyonunda 35 kat azalma saptandı.

Sonuç: Sağlıklı bireylerde metilasyon göstermeyen *TXNIP* geni için OSCC hastalarında yapılacak daha geniş popülasyon içeren çalışmalar ile bu genin OSCC’nin tanı / erken teşhis ve takibinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: oral skuamöz hücreli karsinom, metilasyon, ekspresyon, *TXNIP*, epigenetik

ABSTRACT

Investigation of Expression and Methylation Levels of *Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP)* Gene in Oral Squamous Cell Carcinoma

Objective: In this study, methylation and expression levels of *Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP)* gene, which was determined to show decrease in expression due to methylation by Prof. Dr. Semra Demokan et al. in their project's array results with TÜBİTAK-114S497 number, was studied in a wider group of patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC). By developing an invasive/noninvasive method, we aim to define the usability of *TXNIP* as a biomarker for diagnosis / early diagnosis of oral squamous cell carcinoma

Material and Method: In our study, tumor, normal and serum samples of 50 patients who were diagnosed and operated for OSCC in Istanbul Faculty of Medicine, Department of Otolaryngology & Head and Neck Surgery and normal mucosal tissue and serum samples of 10 healthy volunteers were collected. After isolation of DNA, ratio of methylation and expression of *TXNIP* gene and downregulation of expression ratio due to methylation were investigated. Quantitative Methylation Specific Polymerase Chain Reaction (QMSP) method was used to show methylation and Quantitative Real Time PCR (QRT-PCR) method was used to define the expression levels.

Results: After the analysis, a decrease in *TXNIP* expression levels was found in 30 (60%) patients compared to normal tissue. While methylation in the promoter area was determined in 9 (18%) patients, only one normal tissue was found to have methylation. In 6 of 9 (67%) patients in whom methylation was observed, a decrease in expression levels was also observed. In 1 of 6 patients in whom decrease in expression due to methylation was found, methylation in normal tissue and serum samples was found. No methylation was found in healthy subjects. In OSCC patients with methylation, expression of the gene was found 89 times lower than the healthy population. In OSCC patients without methylation, expression of the gene was found 35 times lower than the healthy population.

Conclusion: For the *TXNIP* gene that shows no methylation in healthy population, after studies with higher volumes of OSCC patients, it is possible to use this gene as a biomarker for OSCC diagnosis/early diagnosis and follow-up.

Key words: oral squamous cell carcinoma, methylation, expression , *TXNIP*, epigenetic

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Baş boyun kanserleri tüm malign tümörlerin %5'ini oluştururken oral kavite tümörleri baş boyun tümörleri içerisinde %14'lük bir orana sahiptir (1). 6/100.000 insidansına sahip olup erkek kadın oranı 2,2/1 olarak bildirilmiştir (2). Oral kavite kanserlerinin mortalite oranı 1,6/100.000 olup kanser ilişkili mortalitenin %0,6'sını oluşturur. Oral kavite kanserlerinin prognozu hastalığın kaynaklandığı bölgeye göre değişkenlik gösterir (2). Oral kavite tümörlerinin en büyük kısmını skuamöz hücreli karsinom oluşturmaktadır (3). Etiyolojide en önemli etken tütün ürünleri kullanımıdır. Alkol ve tütün ürünlerinin beraber kullanımı sinerjistik etki göstererek kanser gelişim oranını 2,5 kat artırır (4).

Çevresel etmenler katkısıyla gelişen genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi kanser gelişiminde önemli rol oynar. Bu etkenler tümör süpresör genlerin inaktivasyonu, protoonkogenlerin aktivasyonuna yol açan mutasyonlar ya da epigenetik değişikliklerin birikimidir (5). DNA'nın promoter bölgesinin CpG adacıklarında epigenetik mekanizmalardan birisi olan metilasyon durumunun gözlenmesi genin fonksiyonunu bozarak birçok farklı kansere neden olmaktadır (6). Prof.Dr. Semra Demokan ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği TÜBİTAK-SBAG-114S497 nolu TÜBİTAK 1001 projesinde oral kavite skuamöz hücreli karsinom (OSCC) hastalarına ait tümör/eşlenik normal dokulardaki ekspresyon ve metilasyon array verilerine göre *Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP)* geninin CpG adacıklarının metillenmiş olduğu ve buna bağlı olarak ekspresyon seviyelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir.

TXNIP hücre içi redoks sistemi üyelerinden biri olup tioredoksinin endojen negatif regülatörü olarak görev yapar (7). Tioredoksini doğrudan veya farklı proteinler üzerinden inhibe eder (8). *TXNIP* tümör süpresör gen olarak işlev görür. Bir başka tümör süpresör gen olan *p53* geninin indüklenmesini sağlar. Hepatosellüler karsinomda *TXNIP* eksikliğinin tek başına hastalığa yol açabileceği gösterilmiştir (9). Küçük hücreli dışı akciğer karsinomunda yapılan çalışmalarda *TXNIP* geninde görülen baskılanma hastalığa yol açmaktadır (10). *TXNIP* mesane kanserinde negatif regülatör olarak rol oynadığı gösterilmiştir (11).

Literatürde *TXNIP* geninin metilasyon ve ekspresyon seviyelerinin oral kavite hastalarında incelendiği tek çalışma (metilasyona bağlı ekspresyon değişiklikleri incelenmemiştir), Demokan ve arkadaşlarının 2013 yılında International Journal of Oncology dergisinde yayınlanan projelerinde baş boyun kanseri hastalarının ekspresyon array datasından elde edilen sonuçlara göre *TXNIP* geninin ekspresyon seviyelerinde azalma üzerinde gerçekleştirildiğini belirlemek için 9'u oral kavite hastası olmak üzere toplam 33 adet baş boyun

kanseri hastasının tümör örneklerinde ve sağlıklı bireylere ait normal mukoza ve tükürük örneklerinde metilasyon seviyeleri incelenmiş. *TXNIP* geninde metilasyon gözlenen 6 hastanın 1'inin oral kavite hastası olduğu bildirilmiştir (12).

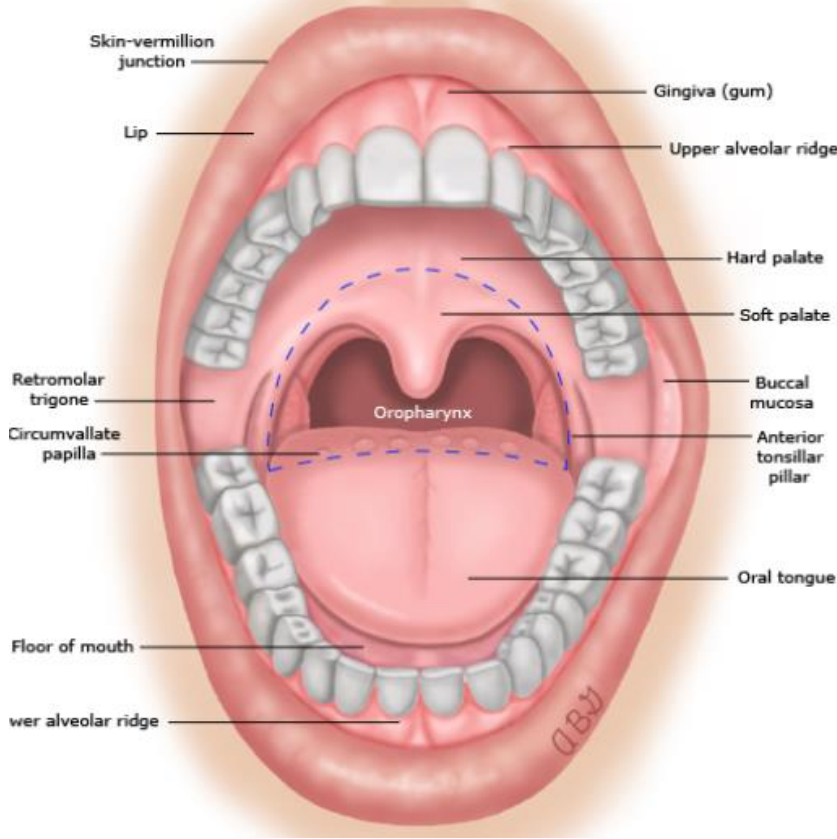
Çalışmamızda, oral kavite skuamöz hücreli karsinom hastalarının eşlenik normal ve tümör doku materyallerinde *TXNIP* geninin metilasyon ve ekspresyon durumları incelenerek ileri validasyon çalışmaları yapıldı. Buna ek olarak oral kavite skuamöz hücreli karsinom hastalarından alınan serum örneklerinde metilasyon varlığı incelendi. Ayrıca çalışmamızda sağlıklı kontrol grubuna ait doku ve serum örnekleri kullanılarak elde edilen veriler skuamöz hücreli karsinom hastalarına ait veriler ile karşılaştırıldı; çalışmanın güvenilirliği test edildi. *TXNIP* geninin promoter metilasyonuna bağımlı ekspresyon değişiklikleri incelendi ve daha geniş hasta grubunda ileri validasyonunun yapılması ile biyobelirteç olarak kullanım potansiyeli değerlendirildi. Böylece bu çalışmada invaziv/non-invaziv yöntem geliştirilerek tanı/erken teşhis te *TXNIP*'nin biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi hedeflendi.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Oral Kavite Anatomisi

Oral kavite; anteriorda dudak vermilyon kenarından başlayarak posterosüperiorda sert damak yumuşak damak bileşkesi, posteroinferiorda sirkümvallat papillalar ve lateralde ise anterior tonsiller plikalar arasında kalan alan olarak sınırları belirlenmiş bölgedir. Dudaklar, dentoalveoler arklar, oral dil, retromolar trigon, ağız tabanı, yanak mukozası ve sert damak olmak üzere 7 bölüme ayrılır (Şekil 1).

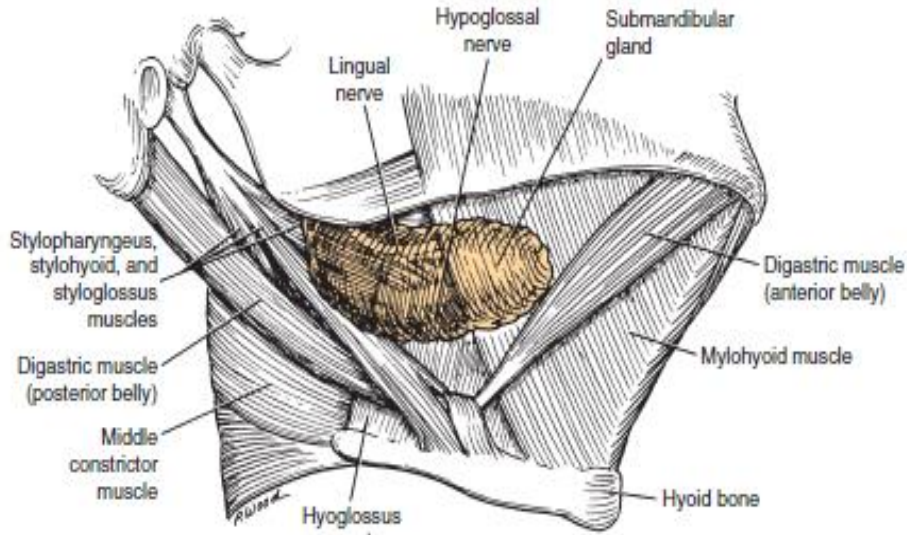
Oral kavite malignitelerinin lokal, rejyonel ve uzak yayılımını lenfatik yollar, nörovasküler anatomi ve baş boyun fasyal planları etkilemektedir. Fasyal planlar tümörün direkt invazyonunun önüne geçer. Nörovasküler ve lenfatik invazyon olması durumunda hastanın prognozu ve sağ kalımı olumsuz olarak etkilenir (13),(14).



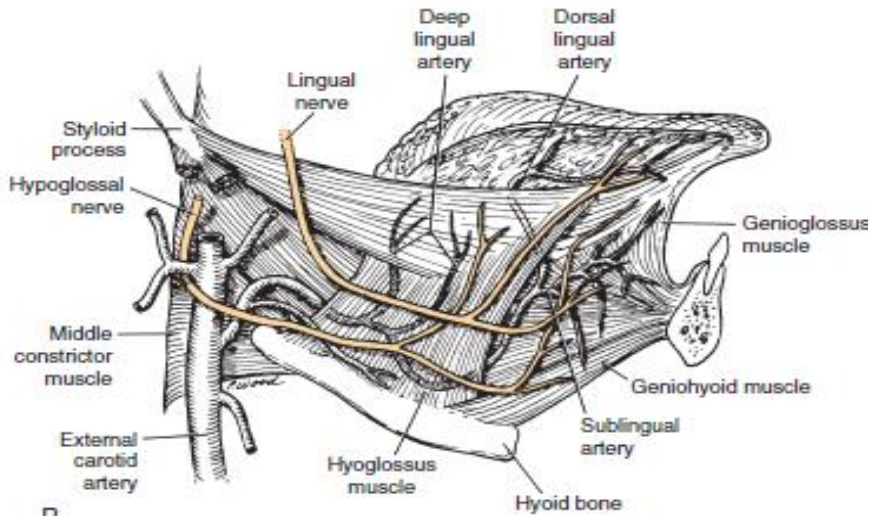
Şekil 1: Oral kavite anatomisi

2.1.1.Arteriovenöz Anatomi

Oral kavitenin beslenmesi eksternal karotis arterin dallarından sağlanır. Dil ve dil kökünün beslenmesini lingual arter sağlar. Arter submandibuler bölgenin tabanında ve hyoglossus kasının derininde yer alır. Hyoglossus kasının yüzeyinde ve mylohyoid kasın derininde n.hypoglossus ve lingual venler bulunur.

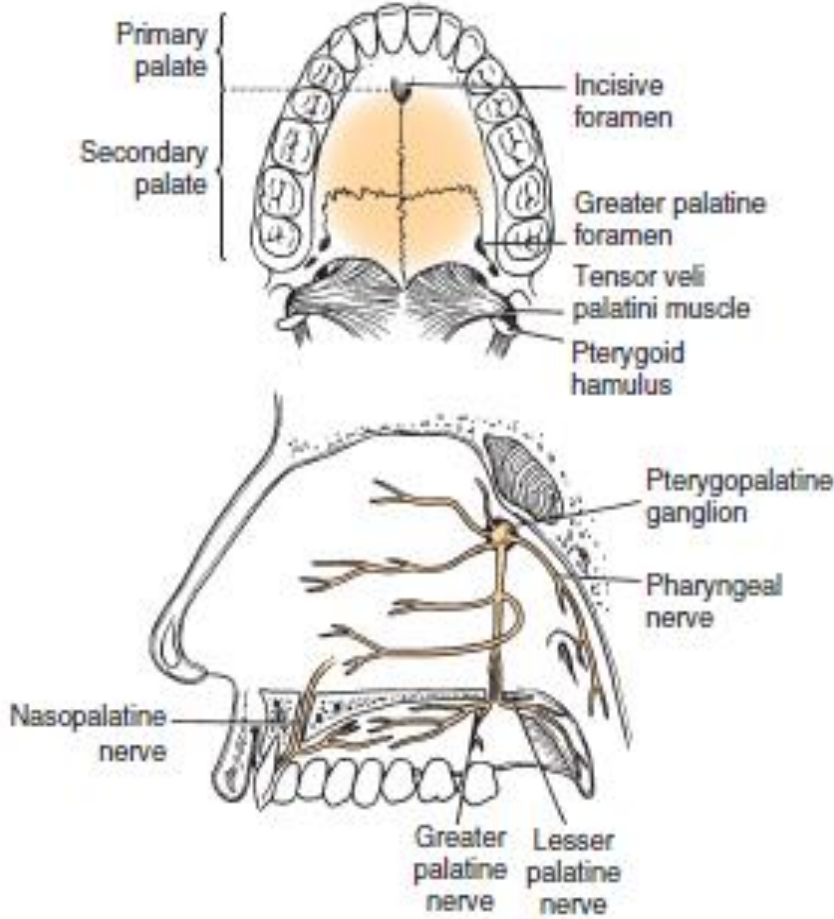


Şekil 2: Submandibuler bölge kasları ve gland ile ilişkileri



Şekil 3: Submandibuler bölge nörovasküler anatomisi

Sert damak greater palatin arter ve süperior alveoler arter tarafından beslenir. Greater palatin arter maksiller 2. Molar diş hizasındaki greater palatin foramenden geçerek sert damak dokusu içerisinde anteromedial olarak ilerler. Venöz drenaj pterygoid pleksusa ve oradan internal juguler sisteme olur. İnternal maksiller arterin terminal dalları olan süperior alveoler arterler; maksiller gingiva, alveoler ark ve dişlerin beslenmesini sağlar.



Şekil 4: Sert damak anatomisi

Fasial arter mandibula ramusun yaklaşık 1 cm anteriorundan mandibula lateralini çaprazlar ve labial arterler olarak oral komissüre doğru ilerler.

Mandibula ve alt dişlerin esas beslenmesini inferior alveoler arter sağlar. İnterior alveoler arter, ven ve sinir ramus mandibulada mandibuler foramene girerek mandibula mediali boyunca seyreder.

Ağız tabanı posterior kısmı ve retromolar trigonun beslenmesi asendan farengeal arter ve palatin arterlerden sağlanır.

2.1.2.Oral Kavite Bölümleri

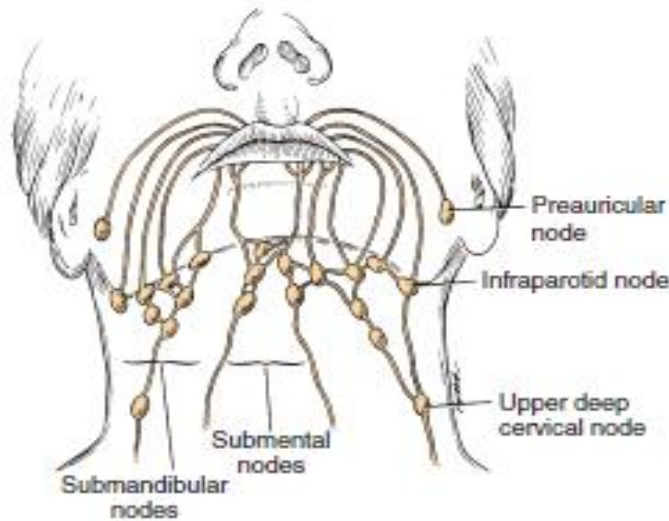
2.1.2.1.Dudaklar

Dudaklar oral kavitenin anterior sınırını oluşturur. Cilt ve mukoza arasında bir geçiş noktasıdır ve bu geçişin olduğu kısım vermilyon olarak adlandırılır.

Üst ve alt dudaklar sfinkter yapısı oluştururlar. Bu sfinkter fonksiyonu altta bulunan orbicularis oris kası sayesinde gerçekleşir. Bu kas çiğneme, yutma ve artikülasyonda önemlidir. Orbicularis oris kası fasial sinir tarafından innerve edilir. Üst dudağa fasial sinirin bukkal dalı ile motor innervasyon sağlanırken alt dudak motor innervasyonu marjinal mandibuler sinir ile sağlanır.

Üst dudak mukoza ve cildinin duyusunu trigeminal sinirin maksiller dalından ayrılan infraorbital sinir sağlar. Alt dudak cilt ve mukozasının duyusunu ise trigeminal sinirin mandibuler dalından ayrılan mental sinir sağlar.

Üst ve alt dudak lenfatikleri öncelikle submandibuler lenf nodlarına drene olur. Alt dudak orta hat lezyonları submental lenfatik yayılım ile ortaya çıkabilir. Üst dudak lenfatikleri infraparotid, preauriküler ve perifasial lenf düğümlerine drene olabilir. Üst dudakta kontralateral drenaj olmazken alt dudakta kontralateral submental ve submandibuler lenfatiklere drenaj olabilir.



Şekil 5: Dudak lenfatik drenajı

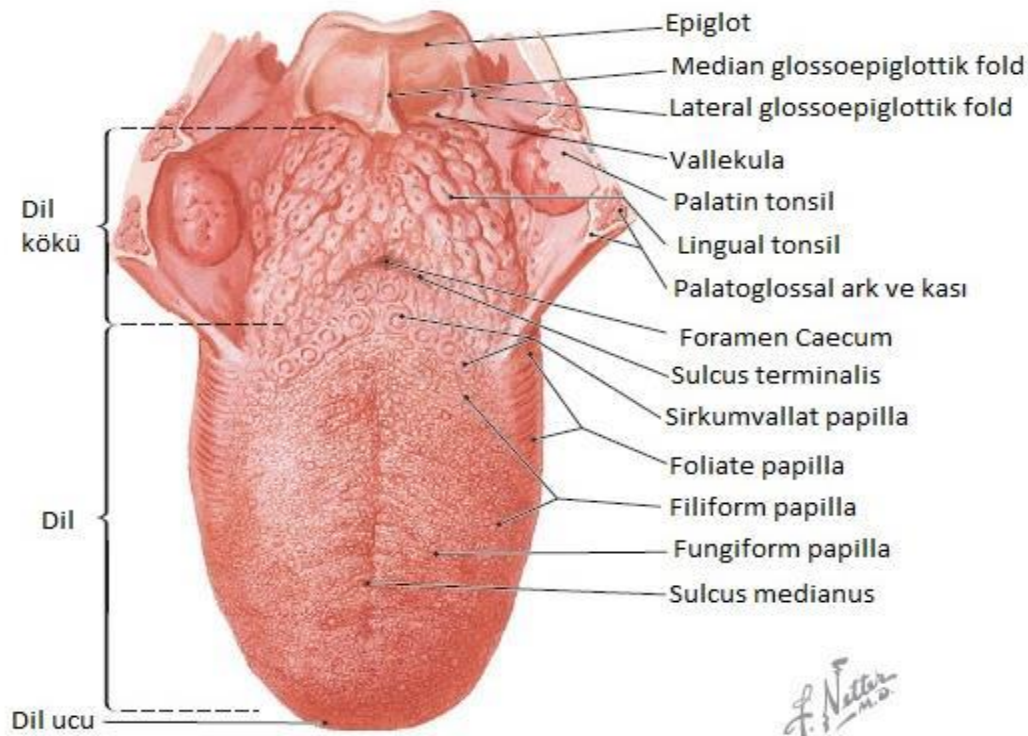
2.1.2.2.Alveoler Kenar

Alveoler çıkıntılar oral kaviteyi vestibulum oris ve cavitas oris propria olmak üzere iki kısma ayırır. Alveoler kenarların lateral yüzü bukkal mukoza ile devam eder. İnferior alveoler kenarın medial kısmı ağız tabanı mukozasına komşu iken süperior alveoler kenar medialde sert damak mukozası ile komşuluk gösterir. Alt alveoler kenarın arka sınırını ramus mandibulanın çıkan kısmı oluştururken üst alveoler kenarın arka kısmını pterygopalatin arkın süperior kısmı oluşturur.

Üst ve alt alveoler kenarların lenfatikleri submandibuler ve submental lenf nodlarına drene olur. Alveoler kenar üzerinde bulunan mukozanın alttaki kemiğe bitişik olması tümörlerin erken dönemde kemik invazyonu yapmasına neden olur.

2.1.2.3.Dil (Oral Kısım)

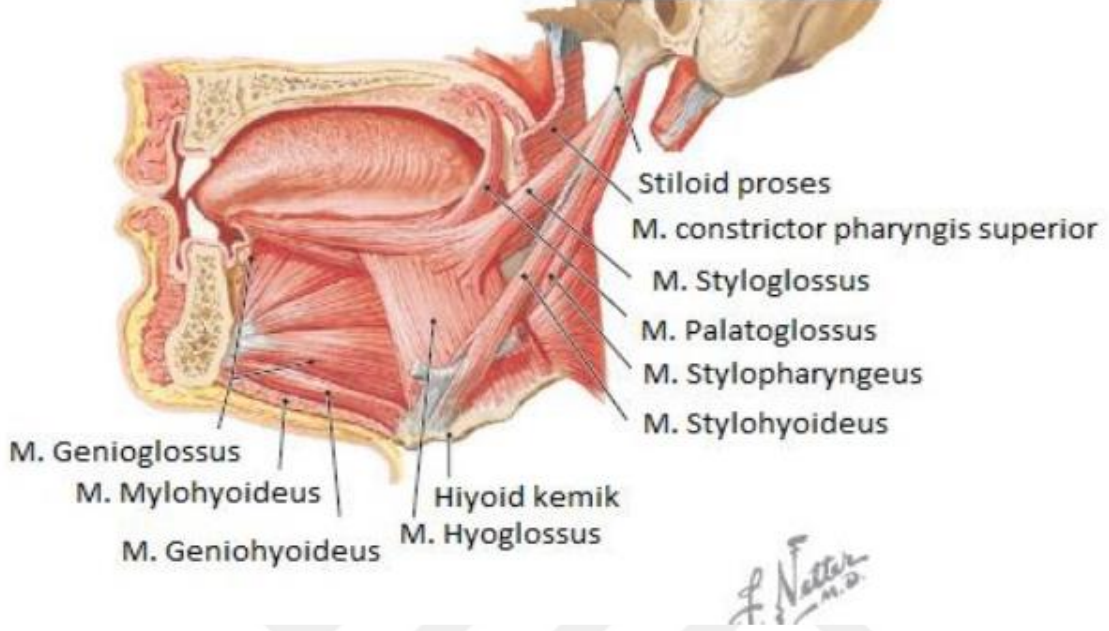
Dilin ağız boşluğu içerisindeki kısmı linea terminalisin anteriorundaki kısım olarak tanımlanır. Dil orta hatta bulunan fibröz bir septum ile ikiye ayrılır. Dil intrensek ve ekstrensek kas gruplarından oluşur.



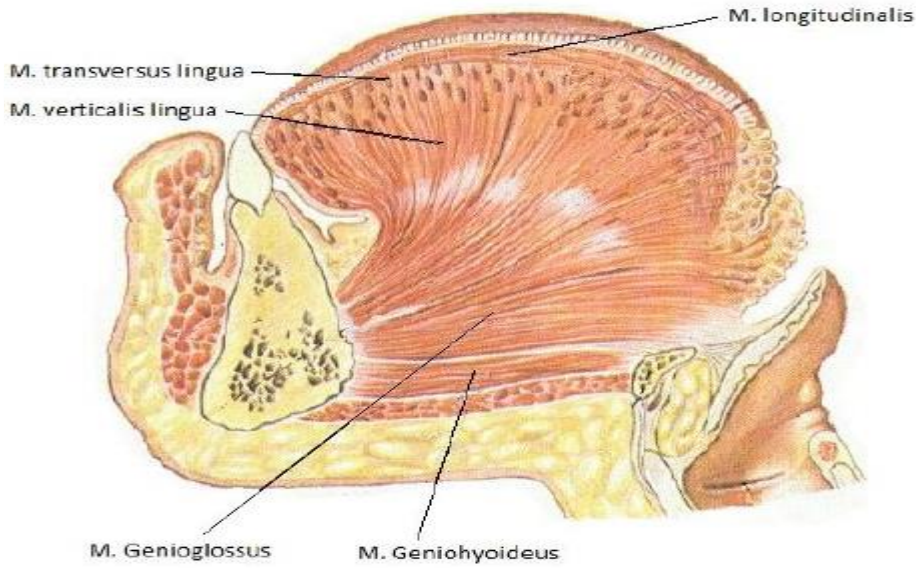
Şekil 6: Dil dorsal yüz anatomisi

Ekstrensek kaslar; hyoglossus, stiloglossus, genioglossus, palatoglossus kaslarından oluşur. Dilde depresyon ve dilin dışarı çıkarılmasını sağlayan kas, dilinde kas kütlesi olarak

büyük kısmını oluşturan genioglossustur. İntrensek kaslar genioglossus kasına göre daha yüzeysel yerleşimli olup dile şeklini verir. Bu kaslar dilde üç farklı yönde seyreder ve aralarında plan yoktur, bu nedenle tümörün diffüz infiltran paternde büyümesine olanak sağlar.



Şekil 7: Ekstrenek dil kasları

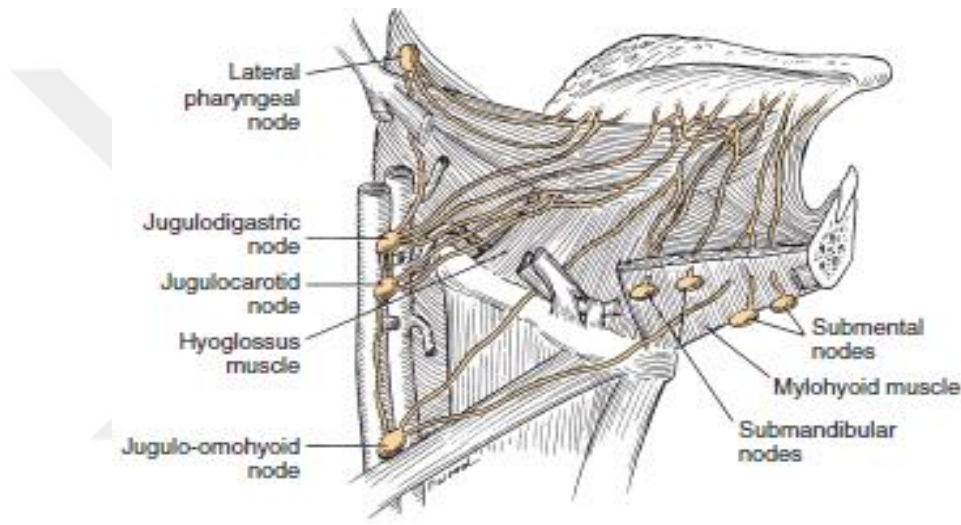


Şekil 8: İntrensek dil kasları

Palatoglossus hariç dilin tüm kasları n.hypoglossus tarafından innerve edilir. Palatoglossus vagusun farengeal dalı tarafından innerve edilir. Dilin ön üçte ikilik kısmının duyusu lingual sinir tarafından sağlanır. Lingual sinir lateral pterygoid kasın derininde ortaya çıkar submandibuler gland kanalı etrafında lateralden mediale döner ve dilin oral kavite

kısımında submukozal olarak dallanır. Dilin tat duyusunu ise korda timpani sağlar ve dilin anterior kısmına lingual sinir ile taşınır. Dil kökünün tad alma duyusu ve duysal innervasyonu n.glossopharyngeus tarafından sağlanır.

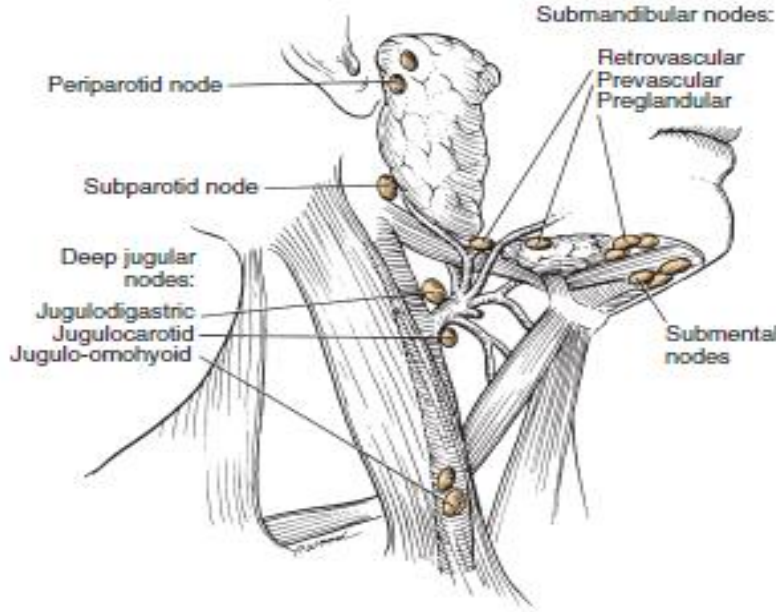
Dilde geniş bir alana lenfatik drenaj mevcuttur. Dilin uç kısmı öncelikle submental alana drene olur. Lateral kısım ilk olarak seviye 1 ve 2'ye drene olur. Lateral kısım lenfatikleri seviye 1 ve 2'yi atlayarak doğrudan seviye 3 ve 4'e de drene olabilir. Dilin anterior kısmında lenfatik anastomoz az olduğu için lateralize dil lezyonları ipsilateral lenf nodlarına drene olur. Dil kökünde ise yaygın lenfatik anastomoz olduğundan bilateral lenfatik drenaj görülür.



Şekil 9: Dil ve ağız tabanı lenfatik drenajı

2.1.2.4.Retromolar Trigon

Bu alan mandibula ramusunun koronoid çıkıntıya uzanan kısmını örten mukozadan oluşur. Lateralde bukkal mukoza ve medialde ön tonsil plikası ile devam eder. Ön sınırı 2. molar diş posterioru yaparken üst sınırı maksiller çıkıntı oluşturur. Alveoler lezyonlardaki gibi bu alanda da mukoza kemiğe yapışık olduğundan tümörün erken dönemde kemik infiltrasyonu yapmasına neden olabilir. Alt dudak parestezisi olması lezyonun mandibuler foramen düzeyinde invazyon yapmış olabileceğini düşündürür. Bu alanda bulunan lezyonlar otalji şikayetinde neden olabilir (9.sinir aracılığı ile). Lenfatik drenaj primer olarak üst servikal-jugulodigastrik nodlara olur.

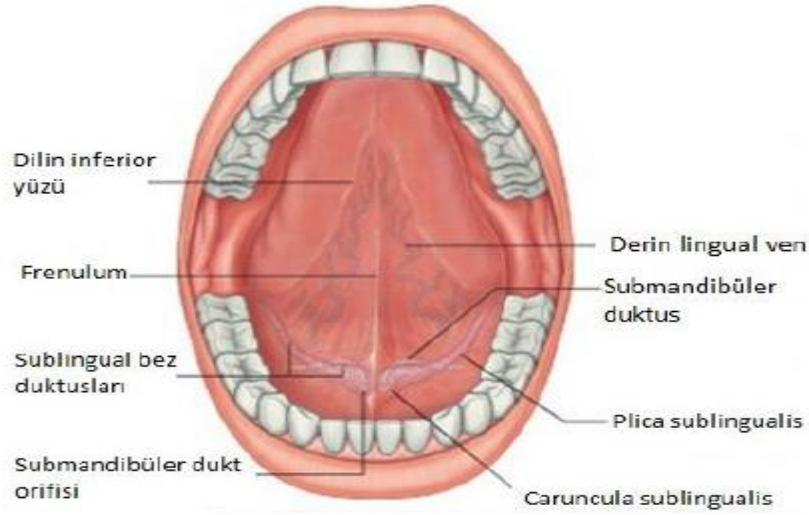


Şekil 10: Üst boyun lenfatikleri

2.1.2.5. Ağız Tabanı

İnferior alveoler arkus ve dil oral kısım ile sınırlandırılan mukozal alan olarak tanımlanır. Posterior sınır anterior tonsiller plika olup anteriorda frenulum ile ikiye ayrılır. Hyoglossus ve mylohyoid kaslar ağız tabanını destekleyen kaslardır. Ağız tabanı, üzerinde bulunduğu anatomik oluşumlar nedeniyle önemlidir. Lingual sinir, nervus hypoglossus disfonksiyonu bu bölgeyi tutan lezyonlarda görülebilir.

Ağız tabanı duyusu lingual sinir tarafından sağlanır. Ağız tabanı anterior kısmının lenfatikleri kontralateral submandibuler ve submental lenfatiklere drene olabilirken posterior kısmında drenaj ipsilateral üst servikal lenf nodlarına olur.



Şekil 11: Ağız tabanı anatomisi

2.1.2.6.Bukkal Mukoza

Bukkal mukoza dudağın arkasından başlayarak medialde alveoler kenara ve posteriorda pterygomandibuler rapheye uzanır. Duyusu trigeminal sinir tarafından sağlanır. Lenfatikleri genelde submandibuler ve submental lenf nodlarına drene olur.

2.1.2.7.Sert Damak

Posteriorda yumuşak damak diğer kenarlarda ise maksiller alveoler kenarlar ile sınırlıdır. Oral kavitenin tavanını oluşturur. Bu alanda invazyon oluşturan tümörler nazal kavite ve maksiller sinüse yayılabilir. Nazopalatin sinir (maksiller sinir dalı) tarafından duyusu sağlanır. Lenfatikleri üst servikal ve lateral retrofarengeal nodlara drene olur.

2.2.Oral Kavite Kanseri

Oral kavite kanserleri tüm baş boyun kanserlerinin %14 ünü oluşturur (1). National Cancer Data Base (NCDB) verilerine göre 1985-96 yılları arasında oral kavite tümörlerine tanı konma yaşı ortalama 64 olarak saptandı ve hastaların % 60'ının erkek olduğu görüldü. Skuamöz hücreli karsinom (SCC) %86.3 oranında, adenokarsinom %5.9, verrüköz karsinom %2, lenfoma %1.5 ve kaposi sarkomu %1.5 oranında görüldü. Tanı esnasında %55 hastada erken evre tümör saptandı. 35 yaş altı hastalarda dil tümörü daha sık izlenirken ağız tabanı tümörü daha seyrek oranda izlendi. Genç yaşta hastalık görülmesi ile kötü prognoz arasında ilişki saptanmadı. Genç hastalarda(35 yaş altı) 5 yıllık sağ kalımın daha yüksek olduğu görüldü (3).

2.2.1.Oral Kavite Skuamöz Hücreli Karsinomu Varyantları

Oral kavitede karşımıza çıkan birkaç SCC varyantı vardır. Sarkomatoid SCC olarak bilinen işçi hücreli SCC oral kavite, larenks ve orofarenkste karşımıza çıkabilir. Lokorejyonel nüks riski oldukça yüksektir. Veriler cerrahi tedavinin etkinliğinin kemoradyoterapiden daha iyi olduğunu göstermektedir (15).

Bazaloid karsinom SCC'nin yüksek dereceli varyantı olarak görülür. 5 yıllık sağ kalım orta ve kötü diferansiye oral kavite SCC'leri ile benzerdir (16).

Verrüköz karsinom SCC'nin düşük dereceli varyantı olarak kabul edilir. Sıklıkla bukkal mukozada görülür(%50). Egzofitik olarak büyür ve lokal invazivdir. Rejyonel yayılım ihtimali düşüktür. Radyoterapi dirençli olarak kabul edilir ve tedavisi cerrahidir.

2.2.2.Etiyoloji ve Risk Faktörleri

Epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir ki oral kavite kanseri gelişme riski sigara kullanımı ile artarken, alkol kanser riski açısından sigara ile sinerjistik etki gösterir. Primer oral kavite kanseri tedavi edildikten sonra sigaraya devam edilmesi durumunda nüks veya diğer baş boyun kanseri gelişme riski %40 oranında artar (4). Sigarayı bırakan bir kişinin sigara içmeyen bir kişideki oral kavite kanseri riskine sahip olabilmesi için 20 sene geçmesi gerekir (17).

Human Papilloma Virüs (HPV)'ün oral kavite SCC etiyolojisinde rol oynayabileceği belirtilmiştir. HPV karsinomlarda daha az olmak üzere oral kavite benign lezyonlarında daha sık olarak izole edilmiştir (18). Baş boyun tümörlerinin %15-25'inde HPV saptanmaktadır. HPV pozitif tümörler genelde genç hastalarda ortaya çıkar ve kötü diferansiye olması ve ileri evrede karşımıza çıkmasına rağmen sağ kalım oranları daha iyidir (19).

Sigara kullanımının kontrol edildiği çalışmalarda alkol ile oral kavite kanseri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Alkol irritan bir madde olduğundan kronik irritasyona bağlı kanser nedeni olarak görülür (17).

Ultraviyole(UV) ışınına maruziyet özellikle alt dudak SCC gelişiminde rol oynar (20).

Baş boyun kanserlerinin genetik komponenti yapılan aile çalışmaları ile desteklenmiştir. Birinci derece akrabalarda kanser riskinin 3-8 kat kadar artmış olduğu gösterilmiştir (21).

Oral kavite kanserlerinde yetersiz beslenme ve mantarlar arasında korelasyon olduğunu gösteren net bir çalışma yoktur (17).

2.3.Oral Kavite Kanserlerinin Anatomik Sınıflandırılması

2.3.1.Dudak Kanseri

Dudak tümörleri daha sık olarak alt dudakta (%88-95) görülürken üst dudak (%2-7) ve komissürde (%1) daha seyrek olarak görülür. Alt dudak tümörlerinde SCC baskın olarak görülür. Bazal hücreli karsinom ise daha sık olarak üst dudakta görülür. Risk faktörleri arasında güneş ışığı maruziyeti, açık ten, sigara kullanımı ve immünsüpresyon bulunur.

Vermilyon veya deri üzerinde ülser lezyon olarak karşımıza çıkar. Hastaların çoğu erken evrede ve boyun metastazı henüz olmadan tedavi edilir. Lezyon komşuluğunda parestezi olması mental sinir tutulumunu düşündürür (22).

Boyun metastazı dudak tümörlerinde sık olarak görülmez (%10). Alt dudak lezyonları her iki boyuna metastaz yapabilir. Perinöral invazyon, üst dudak lezyonları, kemik tutulumu, lenf nodu metastazı, cilt tutulumu ve komissür lezyonları kötü prognostik faktörlerdir (23).

2.3.2.Alveoler Kenar Kanseri

Alveoler kenar tümörleri oral kavite SCC'lerinin %10'unu kapsar. Alt alveoler kenar tümörleri üst alveoler kenar tümörlerinden daha sık olarak karşımıza çıkar.

155 hastanın gözden geçirildiği bir çalışmada hastalığın %63 oranında mandibula gövdesinden kaynaklandığı gösterilmiştir. Lezyonların yarısından çoğu adenokarsinom hastalarda ortaya çıkmış olup %67 hastada erken evre (T1-2) tümör saptanmıştır (24).

Mukozanın altta kemiğe yakın olması nedeniyle tanı esnasında kemik invazyonu sık olarak görülür. Diş soketlerine uzanan tümörler daha fazla kemik invazyonu ile ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda mandibula invazyonu açısından BT'nin spesifik ve duyarlı bir tetkik olduğu belirtilmiştir (25).

Metastatik yayılımı olmayan hastalarda 5 yıllık survi T1-2 tümörlerde %85, T3-4 tümörlerde %65 olarak belirtilmiştir (26).

2.3.3.Oral Dil Kanseri

Oral dil, nonkeratinize skuamöz epitel ile kaplı kas dokusudur. Dil; lateral dil, ventral ve dorsal dil, anterior tip alt bölümlerini içerir. Tümör epitelde ortaya çıkar ve kaslara invaze olur. En sık, ağrılı ülserasyon ve egzofitik kitle olarak karşımıza çıkar.

Genel olarak sigara ve alkol kullananlarda altı ve yedinci dekatlarda ortaya çıkar. Çoğunluk SCC olup dilin genelde posterolateral (%75) kısmında ortaya çıkar. İkinci en sık görülen yer anterolateral ventral yüzdür. Dorsal yüzde tümör nadir görülür (27).

Dil lateral yüz tümörleri ipsilateral seviye 1-2 lenf nodlarına drene olur. Seviye 3-4 lenf nodlarına skip metastaz da olabilir. Anterior tip bölümü ilk olarak submental lenf nodlarına drene olur (28).

5 yıllık survi evre 1-2 tümörlerde %75 iken, evre 3-4 tümörlerde %40 tan azdır (29).

2.3.4.Retromolar Trigon Kanseri

Retromolar trigon tümörleri ileri evre hastalık olarak ortaya çıkma eğilimindedir. Hastaların %50'sinde tanı sırasında lenf nodu metastazı görülür. Trismus olması medial pterygoid kas tutulumu olduğunu gösterir. Tümörün dil kökü ve tonsiller fossaya yayılımı yaygındır. Mandibula tutulumu sık olduğundan erken evre tümörlerde bile mandibulanın bir kısmını rezeke etmek gerekir. T1 hastalıkta 5 yıllık sağ kalım % 76 iken T4 hastalıkta %54 olarak belirtilmiştir (30).

2.3.5.Ağız Tabanı Kanseri

Ağız tabanı kanseri tipik olarak altıncı dekatta erkeklerde ortaya çıkar. Tanı esnasında %35'i ileri evrede (T3-4) saptanır (31). Ağız tabanını destekleyen mylohyoid, genioglossus ve hyoglossus kasları bulunur. Bu kaslar hastalığın yayılmasında bariyer görevi görürler. Ağız tabanı kaslarının tutulması sonucunda dilde hipomobilité ve dizartri veya dilde fiksasyon ile ortaya çıkabilir. Ağız tabanı kanserlerinde 5 yıllık sağ kalım evre 1'de %90, evre 2'de %80, evre 3'te %65 ve evre 4'te %35 olarak bildirilmiştir (28), (32).

2.3.6.Bukkal Mukoza Kanseri

Bukkal mukoza tümörleri tüm oral kavite malignitelerinin %10'unu temsil eder ve erkeklerde 4 kat daha fazla görülür. Tütün ürünlerinin kullanımına bağlı olarak ortaya çıkar. SCC varyantı olan verrüköz karsinom en sık bukkal mukozada görülür. Düşük dereceli bir tümör gibi görülse de farklılaşma ve invazyon noktaları olabilir.

İleri evre hastalıkta tümörün mastikatör boşluğa girmesi ile trismus ortaya çıkabilir. Parotis kanalı tutulumu obstrüktif sialadenite neden olabilir. Anteriorda bulunan lezyonlar submandibuler nodlara metastaz yaparken posterior lezyonlar üst jugulodigastrik nodlara metastaz yapar.

5 yıllık survi evre 1 hastalıkta %75-78, evre 2 %65-66, evre 3 %30-62, evre 4 hastalıkta ise %20-50 olarak bildirilmiştir (33),(34).

2.3.7.Sert Damak Kanseri

SCC sert damağın en sık görülen malignitesidir. SCC dışında minör tükrük bezi karsinomları da görülür. Kaposi sarkomunun oral kavitede en sık olarak görüldüğü yer sert damaktır (35), Damak kemiğinin periostu tümörün yayılımı için bir bariyer görevi görür. Periostun tutulumu kemiğin bir kısmının eksizyonunu gerektirir.

Yapılan bir çalışmada T1 tümörlerde lenf nodu metastazı %4.1, T2 tümörlerde %14.9, T3 tümörlerde %10.3 ve T4 tümörlerde %24.7 olarak belirtilmiştir. Bu nedenle T1 dışındaki tümörlerde boyun disseksiyonu önerilmektedir (36).

2.4.Oral Kavite Kanselerinde Evreleme

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

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

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

2.5.Prognoz

Primer tümör patolojisinin prognostik etkilerini incelemek için birçok çalışma yapılmıştır. Periferik invaziv sınır ve çevre yumuşak doku ilişkisi incelendiğinde; etraf dokuyu iterek büyüyen tümörlerin infiltratif tümörlere göre daha iyi prognozlu olduğu gösterilmiştir (37).

Bunun dışında oral kavite SCC invazyon derinliği ile 5 yıllık sağ kalım ilişkisi ve bölgesel lenf nodu metastazı ilişkisi incelenmiştir. 2 milimetre (mm) den az invazyon derinliği olan lezyonlar için, hastaların %13'ünde bölgesel lenf nodu metastazı gösterilmiş olup 5 yıllık sağkalım %95 oranında görüldü. 2 ila 9 mm invazyon derinliği olan lezyonlar içi ise, hastaların %46'sında bölgesel lenf nodu metastazı görülürken 5 yıllık sağkalım oranı %85 olarak not edildi. İnvazyon derinliği 9 mm'yi geçen lezyonlarda ise bölgesel lenf nodu metastazı %65 olarak izlenirken 5 yıllık sağ kalım %65 olarak görüldü (31).

2.6.OSCC Moleküler Biyolojisi

Kanser gelişimi DNA üzerindeki genetik ve epigenetik değişiklikler ve bu değişikliklerin yol açtığı büyüme faktör ve reseptörlerindeki artış, tümör süpresör genlerde inaktivasyon, protoonkogenlerde oluşan aktivasyon sonucunda ortaya çıkar (38),(39).

Son zamanlarda ortaya çıkan bir çalışma ile beraber kanserin 10 temel özelliği ortaya kondu. Bu özellikler; proliferatif sinyali sürdürmek, büyümeyi baskılayıcılardan kaçınmak, immün sistemden kaçmak, invazyon ve metastazı aktive etmek, tümörün büyümesini teşvik eden enflamasyonu artırmak, ölümsüzlüğü sağlamak, anjiogenezi artırmak, genom kararsızlığı ve mutasyonu sağlamak, hücre ölümüne direnç göstermek, düzensiz enerjiye sahip olmak (40).

Transmembran tirozin kinaz reseptörleri olan *Epidermal Growth Factor (EGF)* ailesinden *Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)* fosforilasyonu, *Human Epidermal Growth Factor Receptor (HER) 2* ve *HER 4*'ün ekspresyonunun OSCC de hastaları kötü sağ kalımı ile arasında korelasyon olduğu görüldü (41),(42),(43). Bir başka transmembran tirozin kinaz reseptörü olan *Matriks Metalloproteinaz (MMP) 1, -2, -9*'un aktivasyonu ile OSCC kötü prognozu arasında ilişki gösterildi (44).

DNA tamiri ve apoptozdan sorumlu olan *p53* gen mutasyonu OSCC'de %60-80 oranında ve displazide %10 oranında görülür (45). *p53* gen mutasyonu derecelendirmesinde yüksek riskli *p53* mutasyonu içeren OSCC'lerde sisplatin direnci, ektranodal yayılım, uzak metastaz ve kötü prognoz arasında ilişki saptandı (46). *p53* geninde mutasyon saptanan baş

boyun tümörü hastalarında 2.4 kat daha fazla oranda servikal lenf nodu metastazı görülür (47). Ek olarak hücre döngüsü düzenleyicisi *p16* ve *p21* genlerinde ekspresyon azalması kötü prognoz ile ilişkili bulundu (48). Bir başka tümör baskılayıcı gen olan PTEN geninin metilasyonu ve sonucunda ekspresyonunun azalması kötü prognoz ile ilişkilidir (49).

Hücrel transmembran proteinleri olan integrinler hücrelerin birbirine bağlanmasında görevlidir. İntegrinlerin aşırı ekspresyonu OSCC’de kötü prognostik faktördür (50).

Enflamatuvar hücreler tümörün büyümesine neden olan sitokinler salgılayarak kanserin gelişimi, ilerlemesi ve metastazını destekler. Enflamatuvar bir sitokin olan IL-6’nın aşırı ekspresyonu OSCC’de kemoterapi ve radyoterapiye yetersiz cevap alınmasına yol açar ve kötü prognoz ile ilişkilidir (51).

Kromozomların uç kısımlarında bulunan telomerler tekrar eden DNA dizilerini içerir. Telomerlerin uzunluğu telomerase tarafından korunur ve etkinliği telomerase’nin katalitik alt birimi olan *Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT)* ekspresyonu ile düzenlenir. Telomer disfonksiyonu OSCC’de radyoterapi direnci ile ilişkilidir. Ayrıca hTERT’in yüksek ekspresyon düzeyleri oral karsinogenezde erken safhalarda prognoz açısından olumsuz sonuçlar doğurur (52),(53),(54).

Vascular endothelial growth factor (VEGF) ailesi tümör anjiogenezi ve lenfanjiogenezinde merkezi rol oynar. OSCC’de VEGF A, -C, -D ekspresyonunun artması kötü sonuçlar ile ilişkili olarak bulunmuştur (55).

Siklin D1; hücre siklusunda G1 fazında görevli bir protoonkogendir. Bu genin ekspresyonunun artması sonucunda mitozun G1 fazı kısalmır. Klinik olarak boyunda lenf nodu pozitifliği saptanmayan hastalarda tümörde *Siklin D1* ekspresyonunda artma mevcut ise boyun disseksiyonu sonrasında pozitif lenf nodu çıkma olasılığı 4 kat artmaktadır (47).

Yukarıda bahsedilen gen ve gen ürünlerinin bir kısmına yönelik monoklonal antikorlar geliştirilmekte olup moleküler hedefli OSCC tedavisinde kullanılan ve deney aşamasında olan moleküller mevcuttur (40).

2.7.Epigenetik

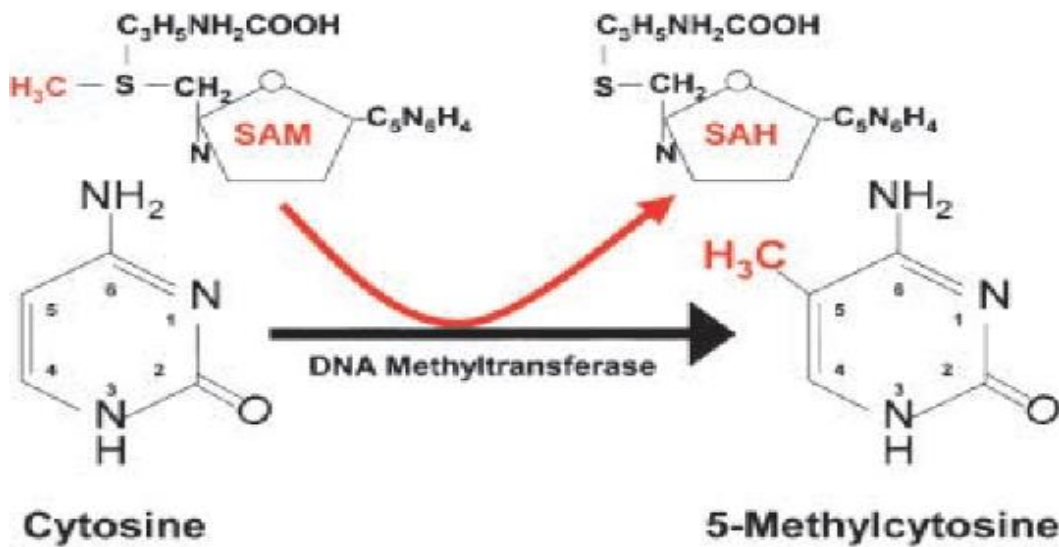
Epigenetik DNA diziliminde değişikliğe yol açmadan genin ifadesini değiştiren ve kalıtılabilen özellikleri inceler (56). Epigenetik mekanizmalar; histon modifikasyonları, DNA metilasyonu, miRNA regülasyonu ve kromatin yeniden düzenlenmesi olarak belirtilmiştir (57).

Bu mekanizmalar içerisinde en iyi anlaşılan metilasyon ve histon proteinlerinin modifikasyonudur. DNA metilasyonu ve histonların posttranslasyonel modifikasyonları birlikte kromatin oluşumunu sağlar. Genomların epigenetik düzenlenmesinin DNA sekansına stabilite kazandırdığı ve genomik bütünlüğün korunmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir. DNA’da instabiliteye yol açan epigenetik anormallikler immün sistem defektleri, zeka geriliği, kanser gelişimi gibi durumlara neden olur (58). Tümör oluşum aşamasında etkili olan onkogenler ve tümör süpresör genler dışında epigenetik değişikliklerde bu oluşumda önemli rol oynar (59).

2.7.1.DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu biyokimyasal bir süreç olup promoter bölgedeki CpG adacıklarında sitozin nükleotidinin 5’ karbon (C) kısmına metil (-CH₃) rezidülerinin eklenmesi ile ortaya çıkan epigenetik bir süreçtir. Metilasyon yalnızca guanin nükleotidinden önce gelen sitozin nükleotidinde meydana geldiğinden CpG adacıklarında görülür. Metil donörü olarak S-Adenozil Metiyonin (SAM) kullanılırken metil transferini DNA Metil Transferaz (DNMT) enzimleri sağlar (Şekil 12) (60).

Promoter bölge dışındaki CpG adacıkları kodlamayan gen bölgesinde bulunduğundan bu bölgelerin metilasyonu genin ifadesinde değişikliğe yol açmaz iken promoter bölgede bulunan CpG adacıklarında meydana gelen metilasyon tümör süpresör genlerin ekspresyonunu azaltıp ve onkogenlerin ekspresyon artışına yol açarak tümör gelişimine zemin hazırlar. DNA metilasyonu hipermetilasyon ve hipometilasyon olarak iki şekilde görülür (61),(62).



Şekil 12: SAM ve DNMT ile DNA metilasyonu

2.7.1.2.DNA Hipermetilasyonu

Tümör süpresör genlerin promoter bölgelerindeki CpG adacıklarının metillenmesi ile bu genlerin fonksiyonlarında kayıp olduğu ve genin sustuğu gösterilmiştir. Bu durum birçok kanser ile ilişkili olarak tespit edilmiştir (63). Hipermetilasyon kanser oluşumunun erken safhalarında DNA tamir genlerinin inaktivasyonuna yol açarak tümör gelişimine zemin hazırlar (63). Bu nedenle DNA metilasyon mekanizmalarını araştırmak ve anlamak birçok kanserin oluşum sürecini öğrenmek açısından oldukça önemlidir (64).

2.7.1.1.DNA Hipometilasyonu

DNA hipometilasyonu, 1983 yılında ilk defa kolon kanseri dokusunda normal kolon dokusuna göre DNA da global hipometilasyon görülmesi ile bildirilmiştir. Bununla beraber metastaz olan tümörlerde olmayanlara göre hipometilasyonun daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir (65).

Yapılan bir çalışmada global hipometilasyon uzak metastaz bulunan diferansiye tiroid karsinomlarında %42 oranında bulunurken metastaz olmayan diferansiye tiroid karsinomlarında hipometilasyona hiç rastlanmadığı belirlendi (66).

DNA hipometilasyonu *IGF-2* baskılanmasını engelleyerek kolorektal kanser ve Wilms tümörü oluşumuna neden olabilir (67). Hipometilasyon kromozomal yeniden düzenlenmelere neden olarak genetik varyasyonlara yol açabilir (68).

2.7.2.miRNA Regülasyonu

mikro RNA (miRNA)'lar apoptoz, proliferasyon, farklılaşmada rol oynayan 21-23 bazlık kodlanmayan dizilerdir (69). miRNA'nın hedef bölgeye bağlanması ile genin ifadesinde azalma meydana gelir (70). Yapılan çalışmalarda miRNA'ların bazı onkogenler üzerinde tümör süpresör gen gibi görev yaptıkları gösterilmiştir. Bazı tümörlerde ise miRNA'ların 5' ucunda meydana gelen hipermetilasyon onkogenin aktivasyonuna neden olarak tümör oluşumuna yol açabilmektedir (71).

2.7.3.Histon Modifikasyonu

Histon kromatinin esas proteinidir. H₂A, H₂B, H₃, H₄ nükleozomu oluşturan protein yapılarıdır. H₁ histon proteini ise nükleozom yapısına katılmaz ve bağlayıcı DNA yardımı ile kromatinin daha organize hale gelmesini sağlar. Nükleozomlar DNA etrafına sarılarak daha

kompleks ve korunaklı bir yapı oluşmasını sağlar (56). Histon modifikasyonu gen ifadesinin düzenlenmesinde, DNA onarımında, DNA replikasyonunda ve kromozomların yeniden düzenlenmesinde etkilidir (72). Histon asetilasyonu transkripsiyon üzerinde etkili iken metilasyon etkilenen aminoasidin türü ve konumuna bağlı olarak etki eder (56).

Kanserli dokularda tümör süpresör genlerde hipermetilasyon ve histon modifikasyonları birlikte görülebilmektedir. Bazı tümör süpresör genlerde (örneğin p21^{WAF1}) hipermetilasyon olmadan histon modifikasyonu olması genin sessiz kalmasına neden olur (73), (74).

2.7.4. Kromatin Yeniden Düzenlenmesi

Kromatin yeniden düzenlenmesini sağlayan proteinlerin genin ifade edilmesinde de önemli rolü vardır (75). *SNF2* ailesi kromatin yeniden düzenlenmesinde görev aldığı gibi replikasyon ve DNA onarımında da rol oynar (76).

SNF2 ailesinden *DDM1* geninde meydana mutasyon sonucunda DNA da metilasyon kaybı ortaya çıkar. Bu durum heterokromatin yapısında bozulma ve kromatinde yeniden düzenlemeye neden olur (77).

Genin ifade edilmesinde metilasyon ve kromatin yeniden düzenlenmesi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.

2.8.Biyobelirteç

Biyobelirteçler konusundaki gelişmeler klinikte önemli etkilere sahiptir. Tümör süpresör genlerin susturulması tümörün erken tanısında fayda sağlayabilir (78). Oral kavite malign tümörlerinde *p53* geninin ifade edilmesinde değişiklikler görülmüş olup meydana gelen bu değişimler kanser tespitinde önemli olabilir. Bu değişikliklerin cerrahi sınırdan uzak alanda da görülmesi nüks açısından bir biyobelirteç olabileceğinden gösterir (79),(80).

Telomeraz normal epitel hücrelerinde sentezlenmez iken oral kavitenin malign tümörlerinde eksprese edilir. Bu durum telomerazın oral kavite malign tümörlerinde biyobelirteç olarak kullanılabileceğini gösterir (81).

Tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu ve mutasyonu vücut sıvılarında da gösterilebilir. Sağlıklı ve oral kavite SCC tanılı hastaların tükürük örneklerindeki RNA'lar incelenmiş olup hasta bireylerde daha yüksek oranda ifade edildiği görülmüştür (82).

2.9.TXNIP (*Thioredoxin Interacting Protein*) Geni

Birinci kromozomun q kolunun 21.1 bandına lokalize olan *TXNIP* geni, alfa arrestin protein ailesinin bir üyesi olan bir tioredoksin bağlayıcı proteini kodlar. Bu protein hücrel redoks sisteminde rol almaktadır.

Oksidatif stres kanser gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir faktördür. Hücrel ve mitokondrial metabolizma reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) oluşumuna yol açar. Normal hücrelerde antioksidan sistem ve reaktif oksijen ürünlerinin oluşumu arasında denge vardır. Mütevazı ROS seviyeleri gen ekspresyonu, hücre proliferasyonu, sinyal iletimi olmak üzere birçok hücrel olayda görev alır (83). Kanser hücreleri normalden daha yüksek hızda metabolik aktivite gösterir ve daha fazla ROS üretimi görülür. Aşırı ROS seviyeleri nükleik asit ve proteinlerin yapısını bozarak hücre ölümüne yol açar (84). Kanser hücreleri artmış ROS seviyelerini dengelemek için antioksidan sistemin aktivitesinde artırır. Redoks dengesi kanser hücreleri için ölümcüldür ve bu tamiri sağlamak kanser tedavisinde kullanılabilir (85),(86).

2.9.1.Tioredoksin Sistemi

Tioredoksin (Trx) ilk olarak 1964 te E.coli bakterilerinde Laurent ve arkadaşları tarafından tanımlandı (87). Trx 2 adet redoks aktif sistein kalıntısı bulundurur ve hücrel ortamın indirgenmesinde rol alır. Trx sistemi; Trx, thioredoxin redüktaz (TrxR), NADPH ve *TXNIP* den oluşur. TrxR okside olmuş Trx'i NADPH'den elektron transfer ederek indirger. Bu sayede Trx hücrede birçok substratı indirgeyebilir (50),(88).

2.9.2.Tioredoksin Sisteminde *TXNIP*

TXNIP endojen Trx inhibitörü olarak görev alır ve Trx sisteminin üyelerinden biri olarak kabul edilir (7). *Tioredoksin Bağlayıcı Protein-2 (TBP-2)* olarakta adlandırılan bu protein ilk olarak 1995 yılında D vitamini ile tedavi edilebilen HL-60 lösemi hücrelerinde tanımlandı (89). Trx fonksiyonunu doğrudan inhibe ederek veya *Apoptoz İlişkili Kinaz-1 (ASK-1)* üzerinden inhibe ederek çalışır (8). Ayrıca promoter bölgesinde bulunan karbonhidrat cevaplı kısmı ile glikoza bağlı olarak *TXNIP* artabilir ve TrxR aktivitesi bu sayede azaltılabilir (90), (91).

Bazı kanser türlerinde *TXNIP* ekspresyonunda azalma izlenir (92). Meme kanserinde prognoz ile ilişkili olan MCF-7 hücrelerinde *TXNIP* ekspresyonunda azalma izlenir (93). Karaciğer karsinogeneğinde *TXNIP* ekspresyonunda azalma gözlenmiştir (94). Özofagus

adenokarsinomu ve pankreas duktal adenokarsinomunda da ekspresyon oranında azalma olduğu izlenmiştir (95),(96).

2.9.3.Kanserde *TXNIP* Fonksiyonu

TXNIP tümör süpresör gen olarak işlev görür. Bir başka tümör süpresör gen olan p53'ün indüklenmesini sağlar. Farelerin denek olarak kullanıldığı çalışmada oksidatif stres altında *TXNIP*'nin p53 yolağını aktive ederek hematopoetik hücrelerin savunma mekanizmalarında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (97).

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada hepatosellüler karsinomun (HCC) başlaması için *TXNIP* eksikliğinin yeterli olduğu gösterilmiştir. *TXNIP* eksikliği bulunan erkek farelerde HCC prevelansının %40 arttığı bildirilmiştir(9). *TXNIP* mesane karsinogenezinde negatif regülatör olarak rol alır. Mesane kanserinde extracellular signal-regulated kinase (ERK) ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. *TXNIP* ERK aktivasyonunu azaltarak negatif regülatör olarak rol alır (11).

Yüksek seviyelerde *TXNIP* hastalığa özgü sağ kalım için bağımsız bir belirteç olarak kabul edilebilir (98).

TXNIP aşırı ekspresyonu anaplastik tiroid kanseri hücrelerinde glikoz alımını inhibe eder ve büyümeyi azaltır. Fare modellerinde tiroid kanserinde büyümeyi azaltıp metastazı azalttığı görülmüştür (99).

TXNIP ekspresyon azalması artmış hücrel proliferatif aktivite ve meme kanseri hücrelerinde büyümeye neden olur (100). *TXNIP* eksikliğinde TGF-beta sinyali artar ve bu durum epitelyal mezenkimal geçişi artırarak tümör oluşumuna zemin hazırlar (101).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi etik kurulundan 2018/1092 numarası ile onayı alınmış çalışmamızda kulak burun boğaz hastalıkları anabilim dalına başvuran ve OSCC tanısı ile tedavi edilen ve sağlıklı kontrol olarak ailesinde malign hastalık öyküsü olmayan diğer nedenler ile tedavileri yapılan sağlıklı bireyler bilgilendirilip rızası alındı ve çalışmaya dahil edilerek doku ve serum örnekleri toplandı.

Toplanan doku örnekleri -80°C’de saklandı. Toplanan tümör dokuları mikrodiseksiyona tabi tutuldu. %70 ve üzeri saflıkta olan materyaller deneye dahil edildi. Hastalardan alınan kan dokusu santrifüj edilerek serum elde edildi ve bu serum -80°C’de saklandı.

3.1.Materyal

3.1.1.Kullanılan Cihazlar

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

3.1.2.Kullanılan Kimyasallar

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

3.1.3.Kullanılan Kimyasal Karışımlar

Parçalama tamponu (1 l):	155 mM NH_4Cl 10 mM KHCO_3 0,1 mM EDTA (pH:8.0)
SE tamponu (1 l):	75 mM NaCl 25 mM EDTA 30 mM Tris-HCl (pH:8.0)
TE tamponu (1 l):	20 mM Tris-HCl (pH:8.0) 1 mM EDTA (pH:8.0)

Fenol için TE tamponu (0,5ml):	0,25 mM Tris (pH:8.0) 0,5 mM EDTA (pH:8.0)
Fenol/Kloroform/İsopropanol:	(1:1):1 (Fenol/Kloroform)/İsopropanol
Proteinaz K:	20 mg/ml
Ribonükleaz A:	10 mg/ml
SDS (%10, pH:7.2) (1 l):	100 g sodyumdodesil sülfat

3.2.Yöntem

3.2.1 Materyal Toplama

3.2.1.1 Doku Elde Edilmesi

Kliniğimizde OSCC tanısı ile ameliyatı yapılan 50 hastanın 0,5 cm boyutunda tümör dokusu örneği ve beraberinde normal doku örneği alındı. Sağlıklı kontrol olarak ta ailesinde malign hastalık öyküsü olmayan kliniğimizde diğer nedenler ile ameliyatı yapılan hastalardan (septoplasti, uvulopalatofaringoplasti) da 0,5 cm boyutunda mukozal doku parçası alınarak DNA ve RNA izolasyonu yapılana kadar -80°C de saklandı.

3.2.1.2.Serum Elde Edilmesi

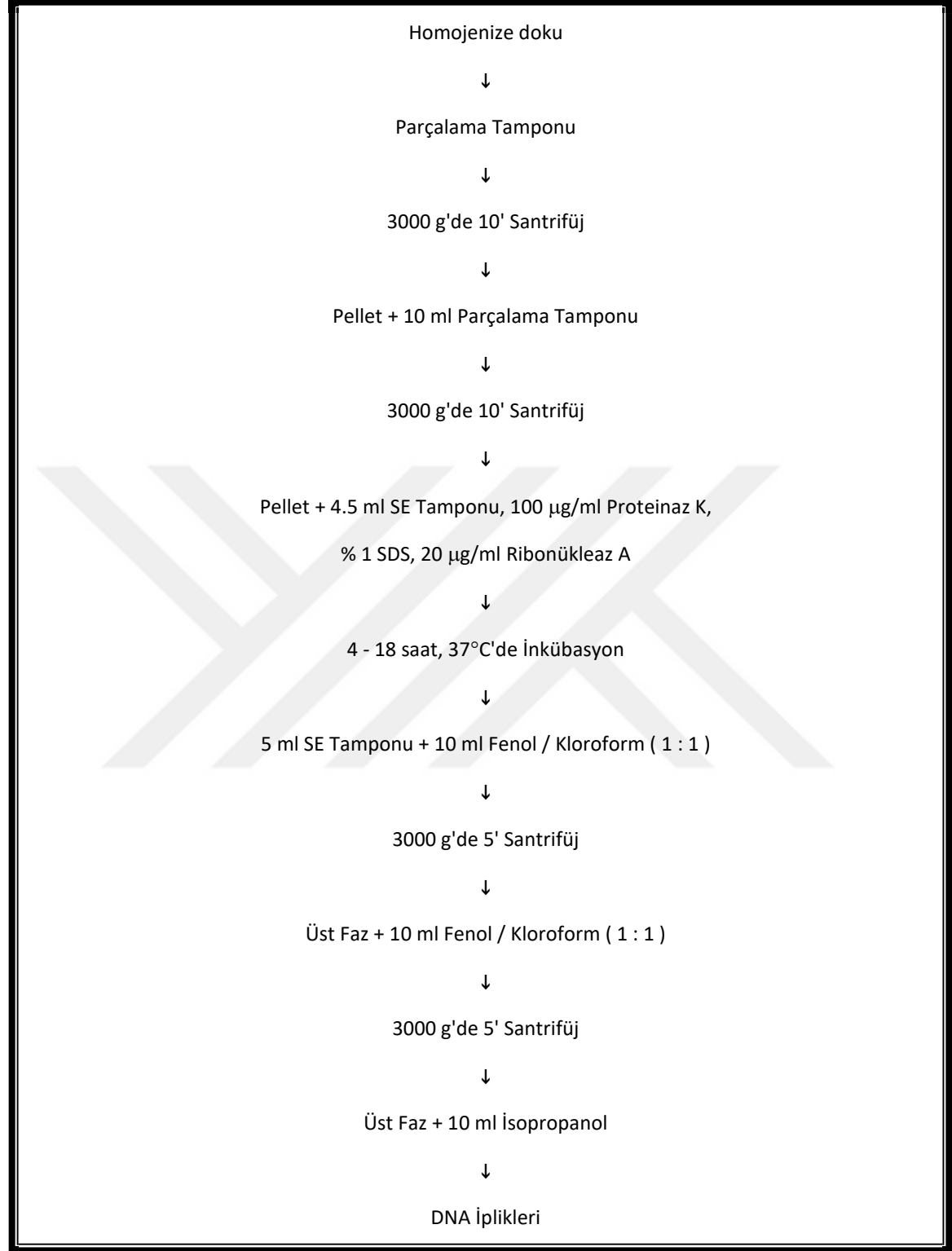
Hastalardan operasyona öncesinde 10 ml kan alındı. Alınan kan laboratuvarında 1950 rpm’de 30 dakika santrifüj edildikten sonra üstte kalan serum toplanarak kriyotüplere dağıtıldı.

3.2.2.DNA İzolasyon İşlemleri

3.2.2.1.Dokudan DNA İzolasyonu

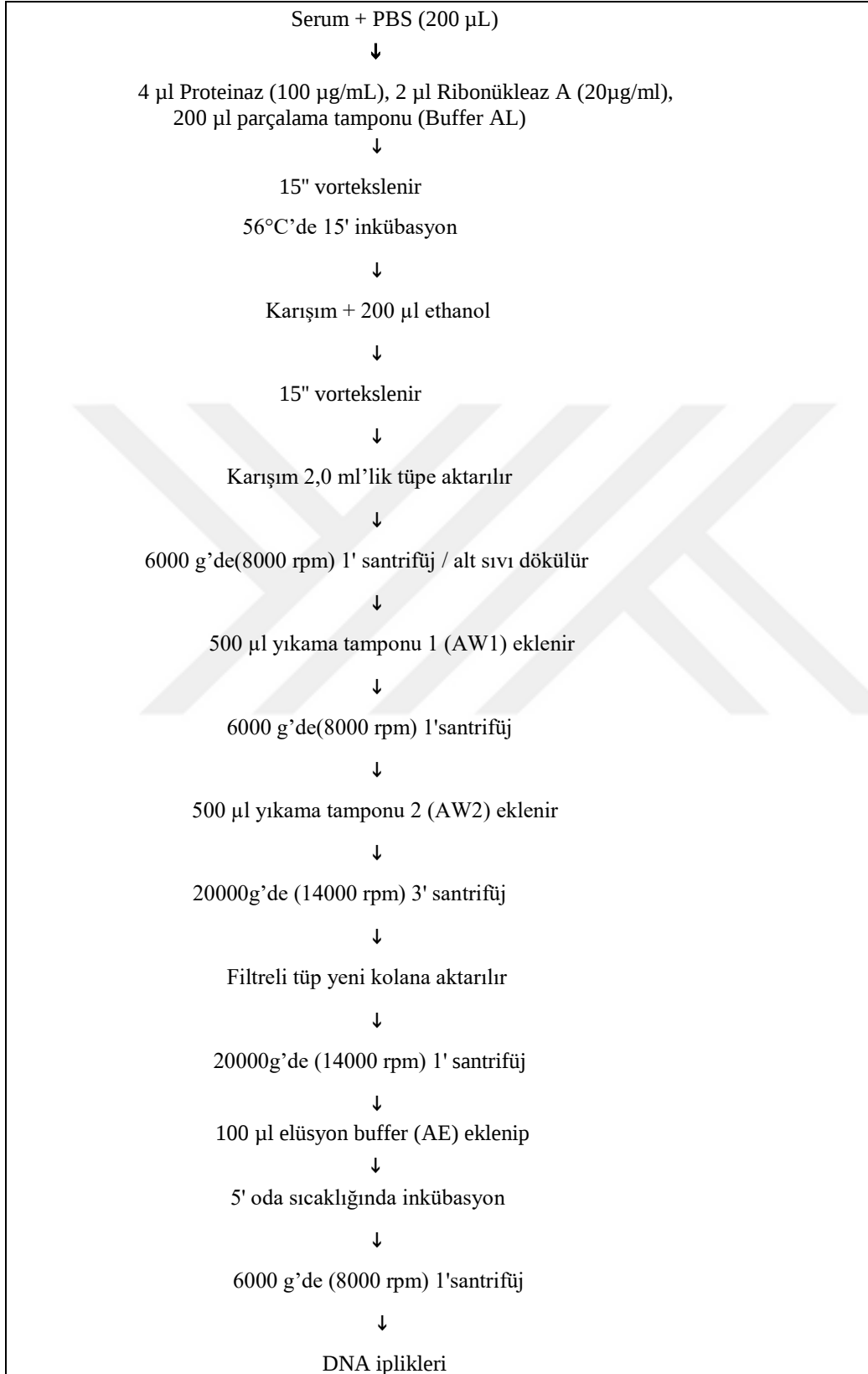
Hastalardan toplanan dokular homojenizatör ile parçalanıp proteinaz K ile 48°C de gece boyunca inkübe edildi. Fenol/Kloroform karışımı ile DNA iplikçikleri elde edildi. DNA miktarlarının ölçümü ve DNA örneklerinin kontrolü %0,8 agaroz gel elektroforezinde gerçekleştirildi. Hazırlanan materyal bisülfid dönüşümünde kullanılmak üzere -20°C de saklandı. (Tablo 2)

Tablo 2: Dokudan DNA elde edilmesi



3.2.2.2.Serumdan DNA Elde Edilmesi

Tablo 3: Serumdan DNA elde edilmesi



Tablo 3'te gösterildiği şekilde serumdan DNA elde edilmesini takiben DNA'lar bisülfite dönüşümünde kullanılmak üzere -20°C de saklandı.

3.2.3.RNA İzolasyonu

Tablo 4: Dokudan RNA elde edilmesi



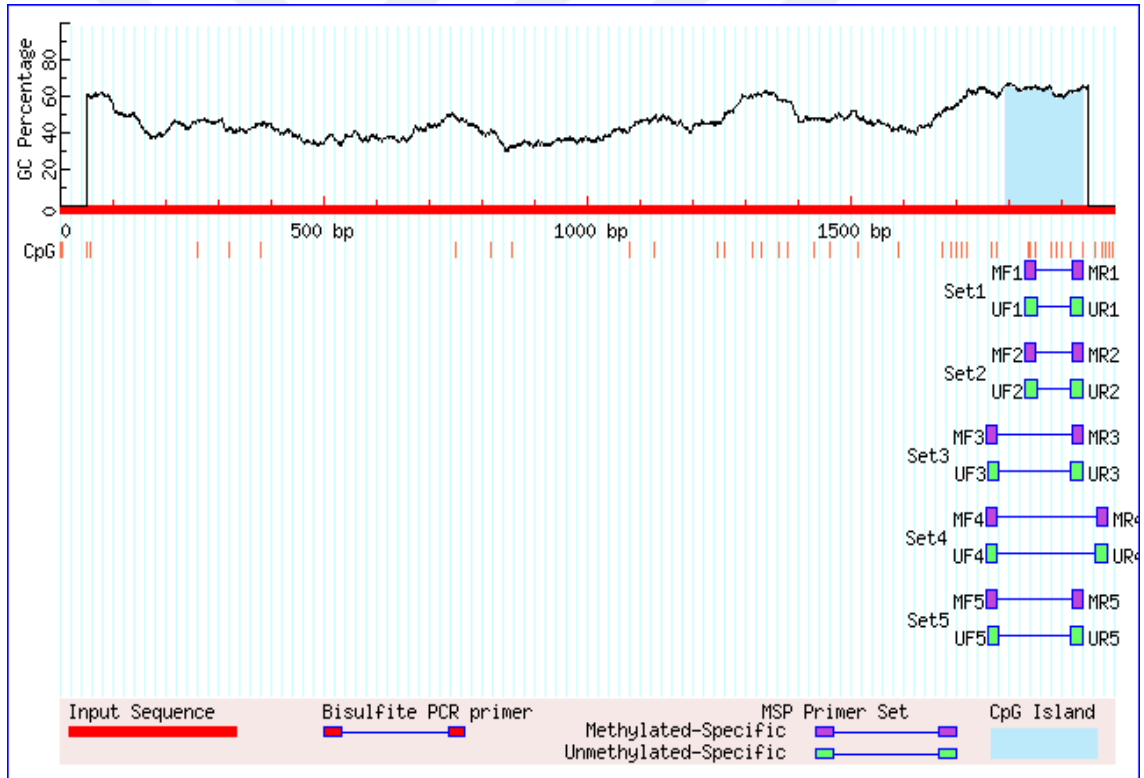
Tablo 4’te gösterildiği gibi RNA elde edildikten sonra Nanodrop 2000© (Thermofisher, ABD) ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. cDNA dönüşümüne kadar -80°C de saklandı.

3.2.4.Metilasyon Ve Ekspresyon Deneyleri İçin Primer/Prob Tasarımı

Çalışmamızda metilasyon ve ekspresyon profilleri incelenecek olan *TXNIP* geninin primer ve prob tasarımları sırasıyla internette kullanıma açık olan Methprimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) ve Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) programları ile tarafımızca tasarlandı (Tablo 5). Ayrıca referans gen olan *ACTB* geninin primer ve prob tasarımları daha önce yapılmış olan çalışmalardan alınmıştır (Tablo 6) (102).

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

<i>TXNIP</i> EF	5' AGTACCTGCGCTATGAAGAC '3
<i>TXNIP</i> ER	5' TAGCCAGCCAACTCAAGAGAC '3
<i>TXNIP</i> MF	5' GCGATTTTATTGATTGGTCGGG '3
<i>TXNIP</i> MF	5'CGTCTCTATATAATAACCCGAACC '3
<i>TXNIP</i> Probe	5'CGAGGGTAGTACGAGTTTTTCGGGT '3



Şekil 13: *TXNIP* geninin primer ve prob tasarımı.

Tablo 06: Referans *ACTB* geninin primer ve prob tasarımı. (EF: Ekspresyon Forward, ER: Ekspresyon Revers, MF: Metilasyon Forward, MR: Metilasyon Revers)

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

3.2.5. Metilasyon Analizi

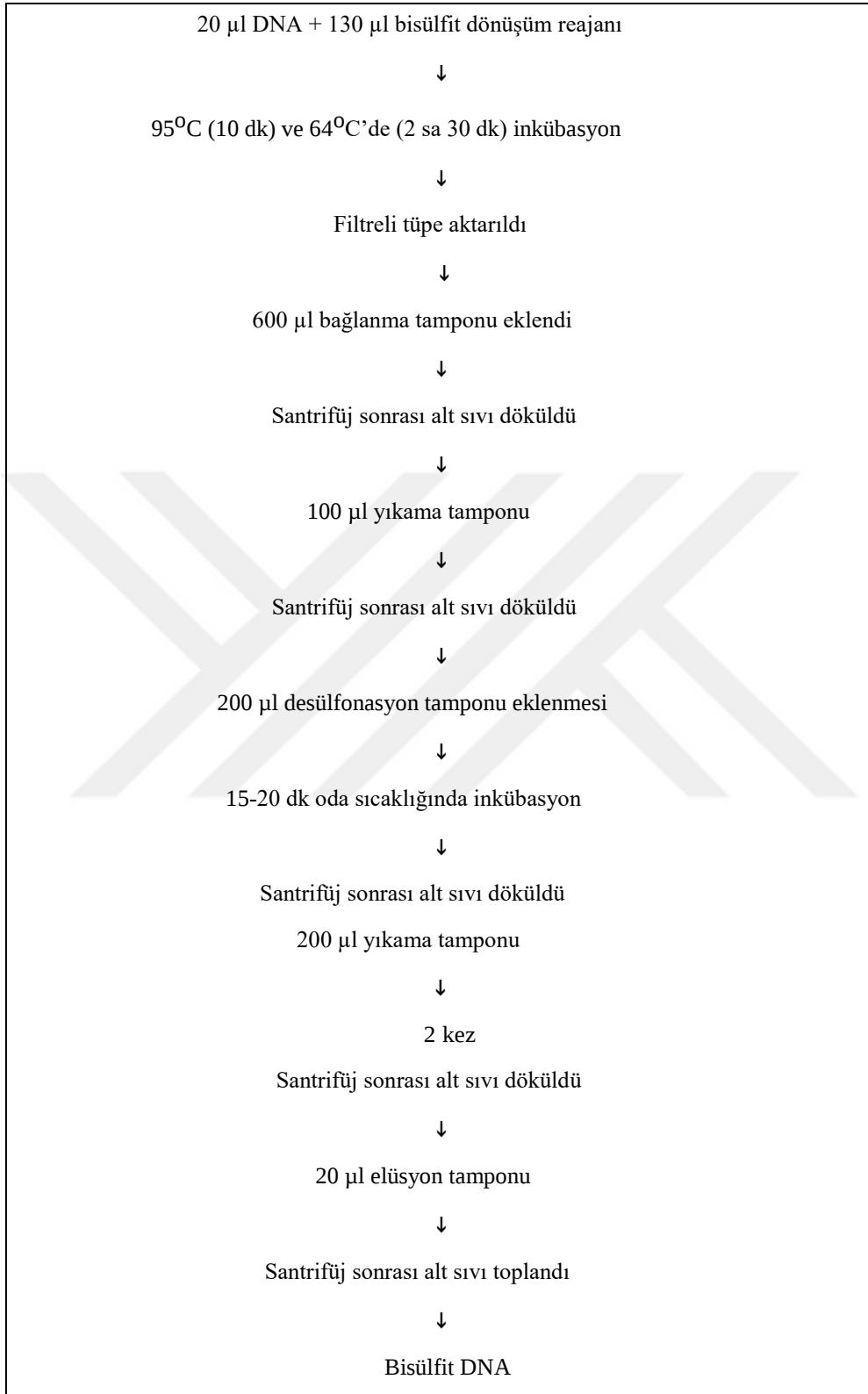
Hastalara ait tümör, normal doku ve serumdan elde edilen DNA'lar ile, sağlıklı bireylerin doku ve serumundan elde edilen DNA örneklerinde LightCycler 480 cihazında PCR yöntemi ile *TXNIP* geninin promoter bölgesindeki metilasyon varlığı değerlendirildi. Bisülfıt dönüşüm protokolünde yazıldığı gibi sodyum bisülfıt ile kimyasal modifikasyon sonrası metile bölgelere özgü primerler ve hibridizasyon problemleri kullanılarak DNA içermeyen örnekler negatif kontrol, sağlıklı kişilerin lenfositlerinden elde edilen DNA örnekleri de *SssI* metiltransferaz muamelesi ve bisülfıt modifikasyonu sonrası pozitif kontrol olarak kullanıldı.

3.2.5.1. Bisülfıt Dönüşümü

Elde edilmiş olan DNA örnekleri Tablo 7'de gösterildiği şekilde bisülfıt dönüşüm protokolüne tabi tutuldu. Protokol "Zymo Methylation Gold Kit" (Zymo research, CA, ABD) ile sağlandı.

Bisülfıt dönüşümü tamamlanan DNA örnekleri Real-time QMSP çalışmasına kadar -20°C'de saklandı.

Tablo 7: Bisülfıt DNA dönüşüm protokolü



3.2.5.2. *TXNIP* Geninin Relatif Metilasyon Seviyesinin QMSP İle Belirlenmesi

TXNIP geninin promoter bölgesinin metilasyon seviyelerinin araştırılmasında kantitatif metilasyon spesifik PCR (QMSP) yöntemi ile metilasyon durumu tespit edildi. Deneylerimizde, 5' ucunda 6-florosein amitid (FAM) ve 3' ucunda FAM inhibe edici (quencher) olan karboksitetrametilrodamin (TAMRA) ile işaretlenmiş TaqMan hidroliz probu kullanıldı.

Metilasyon deneylerinde, pozitif kontrol olarak, sağlıklı insan lenfosit DNA' sı (LN-DNA) SssI metilaz enzimi ile reaksiyona sokularak hazırlanmış %100 metillenmiş standart kullanıldı. Kantitatif sonuç eldesi için standartlar; 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 olacak şekilde dilüe edildi. QMSP deneylerinde kullanılan reaksiyon koşulları ve reaksiyon karışımı tablo 8 - 9'da gösterildi.

Tablo 8: Metilasyon deneyleri için QMSP reaksiyon koşulları

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

Tablo 9: Metilasyon deneyleri için QMSP reaksiyon karışımı

Reaksiyon Karışımı	1 örnek hacmi
10X SensiFAST Probe No-ROX Kit Mix	10 µL
100 µM Primer (F)	1,2 µL
100 µM Primer (R)	1,2 µL
100 µM prob	0,4 µL
dH2O (PCR grade)	2,2 µL
BC-DNA	5,0 µL

Her iki gen için ortak olarak bir eşik değeri belirlendi ve her gen için ayrı olarak kullanılan %100 metile standart ve dilüsyonlarının konsantrasyonları ile Ct değerine (floresan

düzeyinin cihaz tarafından ölçülebilen eşik değeri aştığı döngü) göre, her gen için ayrı standart eğri grafiği program tarafından oluşturuldu. Her bir örnek için kantitatif bir sonuç elde edilip, relatif metilasyon yüzdesi de aşağıda belirtilen formül ile hesaplandı.

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

3.2.6.Ekspresyon Analizi

TXNIP geninin ekspresyon seviyeleri belirlenip OSCC tanısı alan hastalarda tümör, normal doku ve serum örnekleri ile sağlıklı kişilerin mukoza ve serum örnekleri kıyaslandı. Öncelikle RNA izolasyonu yapıldı. Bu RNA lardan ekspresyon analizinde kullanılmak üzere cDNA elde edildi (Tablo 10-11). Hazırlanan cDNA'lar -20°C'de saklandı.

Tablo 010: cDNA sentezi reaksiyon koşulları

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

Tablo 11: cDNA sentezi reaksiyon karışımı

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

3.2.6.1.*TXNIP* Geninin Ekspresyon Seviyelerinin QRT-PCR Yöntemi İle Belirlenmesi

TXNIP geninin ekspresyon seviyeleri SYBR Green temelli kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (QRT-PCR) ile değerlendirildi. PCR için uygun reaksiyon karışımı

hazırlandıktan sonra karışım 96 kuyulu, içinde seçtiğimiz genlere özgü primerleri içeren platelere her bir kuyuda 20 µl olacak şekilde çok kanallı pipet yardımı ile dağıtıldı. Reaksiyon karışımı yüklendikten sonra plate'in üzeri film ile kaplanarak cihazda uygun sıcaklıklarda reaksiyon başlatıldı (Tablo 12-13).

Tablo 12: Ekspresyon deneylerinin QRT-PCR reaksiyon karışımı

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

Tablo 13: Ekspresyon deneylerinin QRT-PCR reaksiyon koşulları

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

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

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

3.2.7. Veri Analizi

İstatistiksel analizlerin hesaplanmasında, IBM SPSS Statistics 20 programı kullanıldı. Klinik bilgiler ile metilasyon ve ekspresyon seviyelerinin kıyaslanmasında ki-kare testleri (Yates ve Fisher) kullanıldı. $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hasta ve sağlıklı bireylerin örneklerinin metilasyon seviyelerinin kıyaslanmasında Wilcoxon Rank Testi kullanıldı.



4.BULGULAR

4.1.OSCC Hastalarına Ait Klinikopatolojik Parametreler ile Sağlıklı Bireylere Ait Demografik Özellikler

Çalışmaya OSCC tanısı alarak opere edilen hastalar ve ailede malign hastalık öyküsü olmayan sağlıklı bireyler dahil edildi. OSCC nedeniyle opere edilen hastalardan alınan tümör ve normal doku örnekleri ile serum örnekleri, sağlıklı bireylerin sağlıklı mukoza ve serum örnekleri incelendi. Hastalara ait bilgiler Tablo 14-15'te verilmiştir. OSCC tanılı hastalarda median yaş 60 olup, sağlıklı bireylerde median yaş 56 olarak hesaplandı. OSCC tanılı hastaların 38'i (%76) erkek iken, 12'si (%24) kadın idi. Oral kavite tümörünün en sık lokalizasyonu 14 hasta (%28) ile dil olarak görüldü. En az görüldüğü lokalizasyon ise 4 hasta ile (%8) sert damak idi. Hastaların 25'i (%50) operasyon esnasında evre 4 olarak görüldü. 24 hastada (%48) postoperatif patoloji raporunda lenf nodu metastazı saptandı. Hastaların büyük kısmında (39-%78) orta derecede diferansiyasyon gösteren SCC saptandı. Takiplerde 16 (%32) hastada nüks saptandı.

Tablo 14: Sağlıklı bireylere ait demografik parametreler

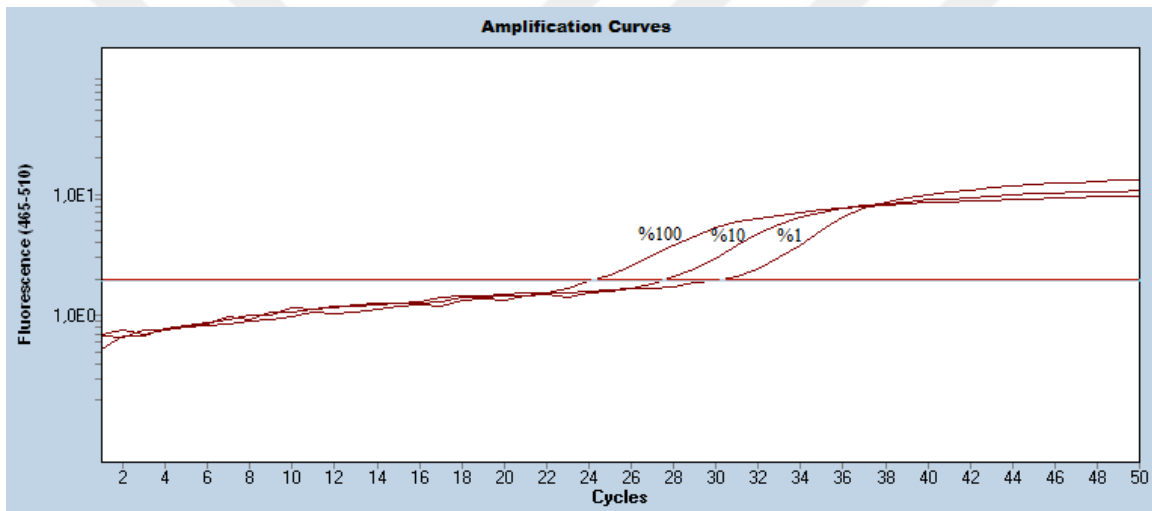
Parametreler	n(%)
Yaş	≤50
	7 (70)
>50	3 (30)
Cinsiyet	Erkek
	10 (100)
Kadın	0
Sigara	Kullanmıyor
	5 (50)
Kullanıyor	5 (50)
Alkol	Kullanıyor
	0
Kullanmıyor	10 (100)

Tablo 15: OSCC hastalarına ait klinik parametreler

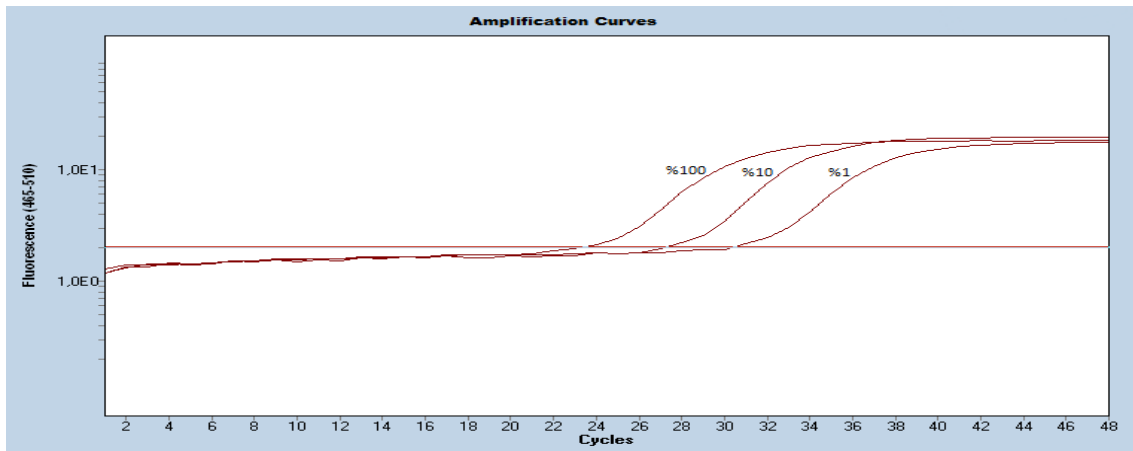
Parametreler		n(%)
Yaş	≤50	8 (16)
	>50	42 (84)
Cinsiyet	Kadın	12 (24)
	Erkek	38 (76)
Anatomik Tutulum Bölgesi		
	Ağız Tabanı	9 (18)
	Bukkal Mukoza	9 (18)
	Sert Damak	4 (8)
	Dil	14 (28)
	İnferior Alveolar Ark	6 (12)
	Retromolar Trigon	8 (16)
Evre	1	5 (10)
	2	9 (18)
	3	11 (22)
	4	25 (50)
Histapotoloji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

4.2 *TXNIP* Geninin Metilasyon Analiz Sonuçları

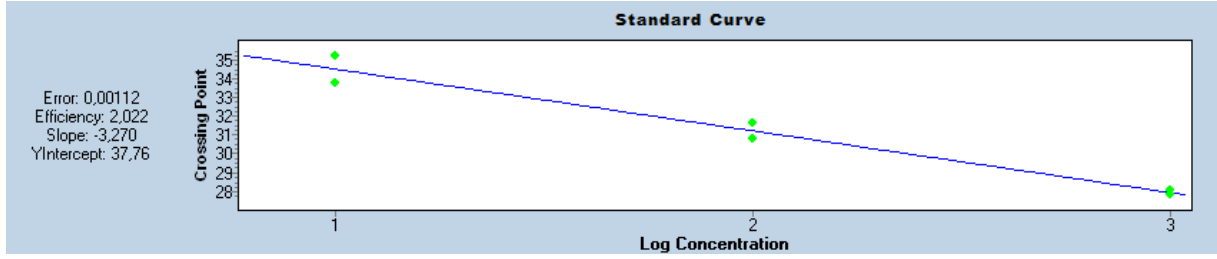
Çalışmamızda OSCC tanısı ile ameliyat edilmiş 50 hastaya ait tümör/eşlenik normal doku ve serum örnekleri ile kendisinde ve ailesinde malign hastalık öyküsü bulunmayan 10 sağlıklı kişiye ait normal mukoza ve serum örneklerinin metilasyon durumu Kantitatif Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi (QMSP) ile incelendi. Kantitatif ölçüm yapılması amacıyla, %100 metillenmiş standart ve konsatrasyonu azaltılmış standart solüsyonları (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000) kullanıldı. Çalışmada negatif kontrol olarak ise distile su ve bisülfite modifiye edilmiş LN-DNA'sı kullanıldı. Sonuçların analizi, LightCycler 480 yazılımında Absolut Hesaplama/Fit Points programı ile gerçekleştirildi. Hedef ve referans gene ait amplifikasyon eğrileri Şekil 14 Şekil 15, standart curve eğrisi Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 14: %100 metile standart ve dilüsyonlarının *ACTB* genine ait amplifikasyon eğrileri

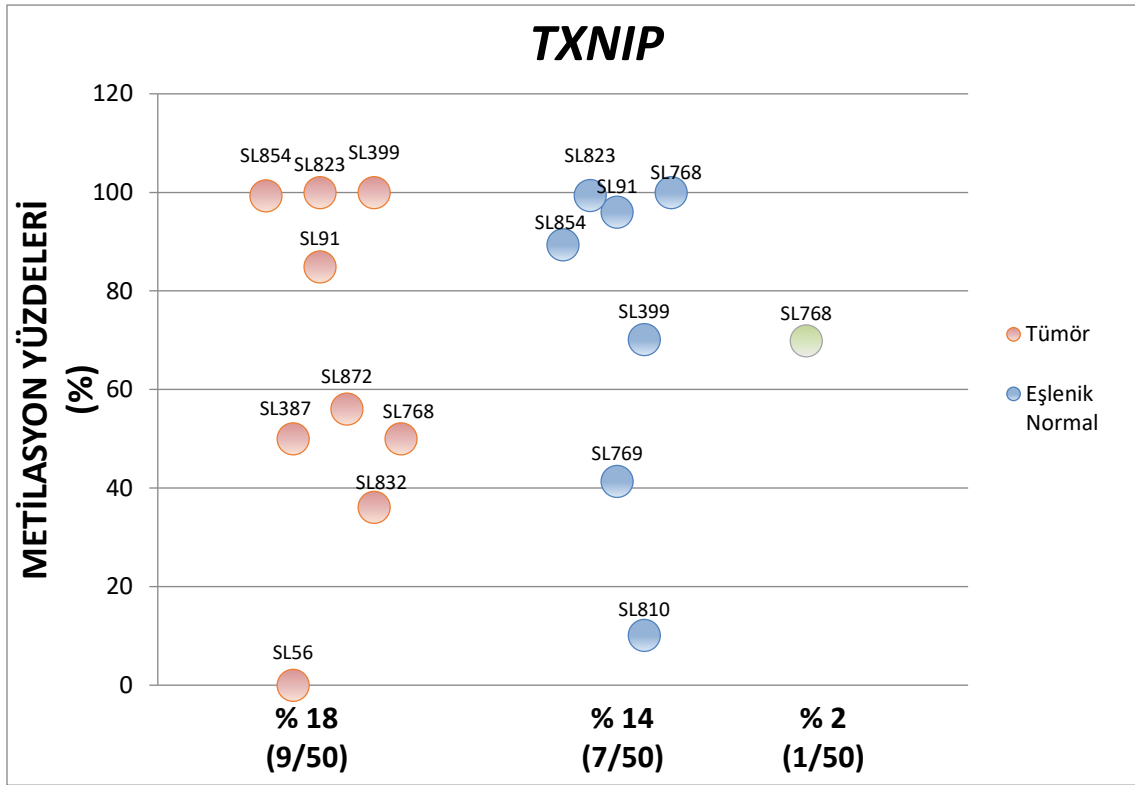


Şekil 15: %100 metile standart ve dilüsyonlarının hedef *TXNIP* genine ait eğrileri



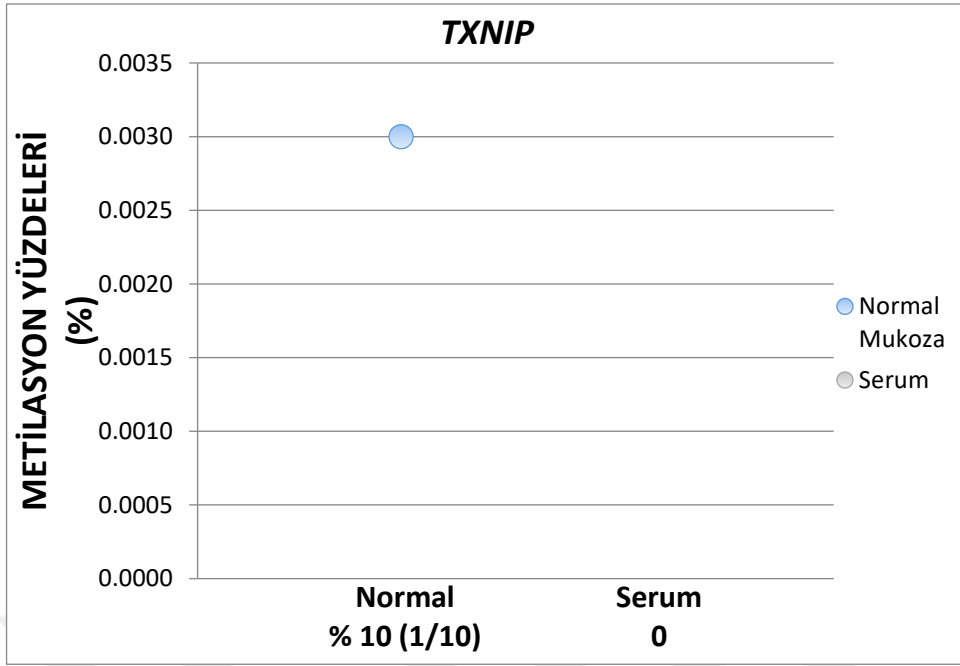
Şekil 16: %100 metile standart ve dilüsyonlarında *ACTB* ve *TXNIP* genlerine ait standart eğri.

Tümör ve normal doku örneklerinde *TXNIP* geninin metilasyon oranları %18 (9) ve %14 (7) saptanmış olup, sadece bir hastanın serum örneğinde metilasyon görüldü (Şekil 17).



Şekil 17: OSCC hastalarına ait tümör, eşlenik normal doku ile serum ve tükürük örneklerindeki metilasyon oranları (β -value).

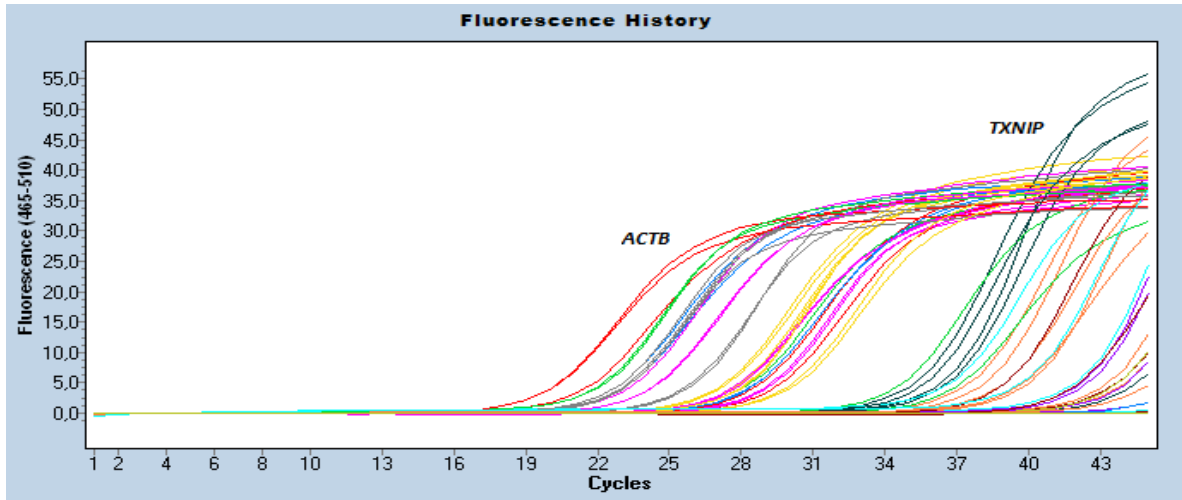
Sağlıklı bireylere ait normal mukoza ve serum tükürük örneklerinde *TXNIP* geninin metilasyon durumu incelenmiş ve sadece bir hastanın normal mukozasında %0,003 oranında metilasyon tespit edildi. Bu değerin anlamlı olmadığı düşünüldü. Sağlıklı bireylerin serum örneklerinde metilasyon gözlenmedi.



Şekil 18: Sağlıklı bireylere ait normal mukoza ve serum örneklerindeki metilasyon oranları (β -value).

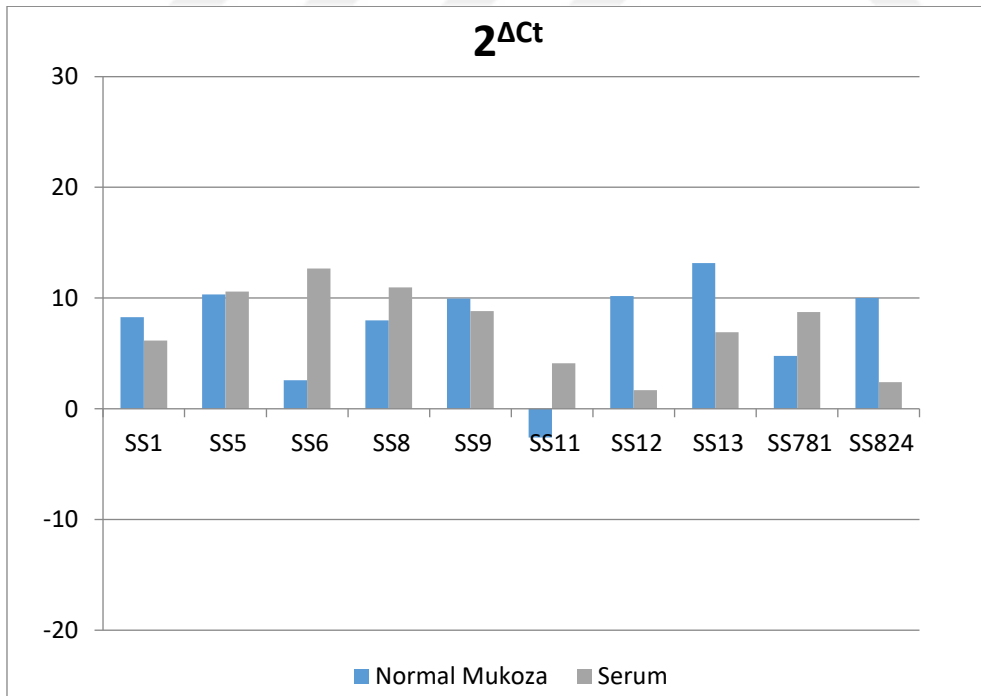
4.3.TXNIP Geninin Ekspresyon Analiz Sonuçları

Hasta ve sağlıklı bireylerin örneklerinde ekspresyon seviyeleri, SYBR Green içeren reaksiyon karışımı ve Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QRT-PCR) tekniği kullanılarak incelendi. Sonrasında hedef gen ve referans (*ACTB*) genlerinin ekspresyon sonuçlarından elde edilen Ct değerleri kullanılarak $2^{\Delta Ct}$ değerleri tüm örnekler için normalize edildi. Sonuçların analizi LightCycler 480 yazılımındaki Temel Relatif Ölçüm (Basic Relative Quantification) programı ile yapılmış olup tümör dokusunun $2^{\Delta Ct}$ değerlerinin normal dokunun $2^{\Delta Ct}$ değerlerine göre kat değişimleri (fold change) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile hesaplandı. Buna göre 2'nin üzerinde olan değerler tümör dokusunda, eşlenik normal ya da sağlıklı mukozaya oranla ekspresyon artışı, 2'nin altındaki değerler ise ekspresyon azalışı olarak değerlendirildi.

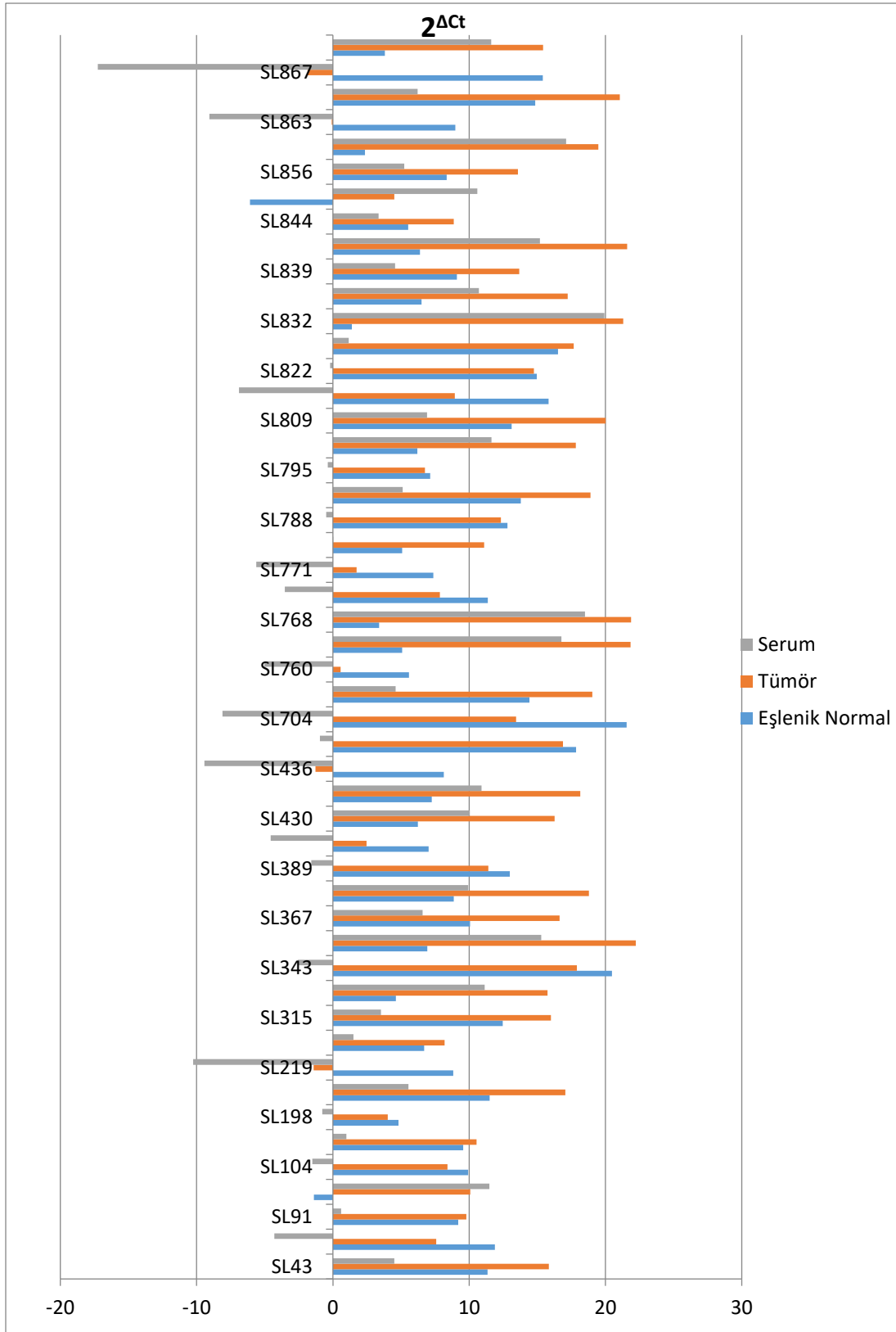


Şekil 19: Hastalara ait örneklerin hedef gen (*TXNIP*) ve referans gendeki (*ACTB*) amplifikasyon eğrileri.

TXNIP geninin ekspresyon düzeyleri referans genin OSCC hastalarının tümör/eşlenik normal doku ve serum örneklerindeki ekspresyon düzeyleri ile sağlıklı bireylere ait normal mukoza ve serum örneklerindeki ekspresyon düzeyleri $2^{\Delta Ct}$ metodu ile relatif olarak hesaplandı (Şekil 20).

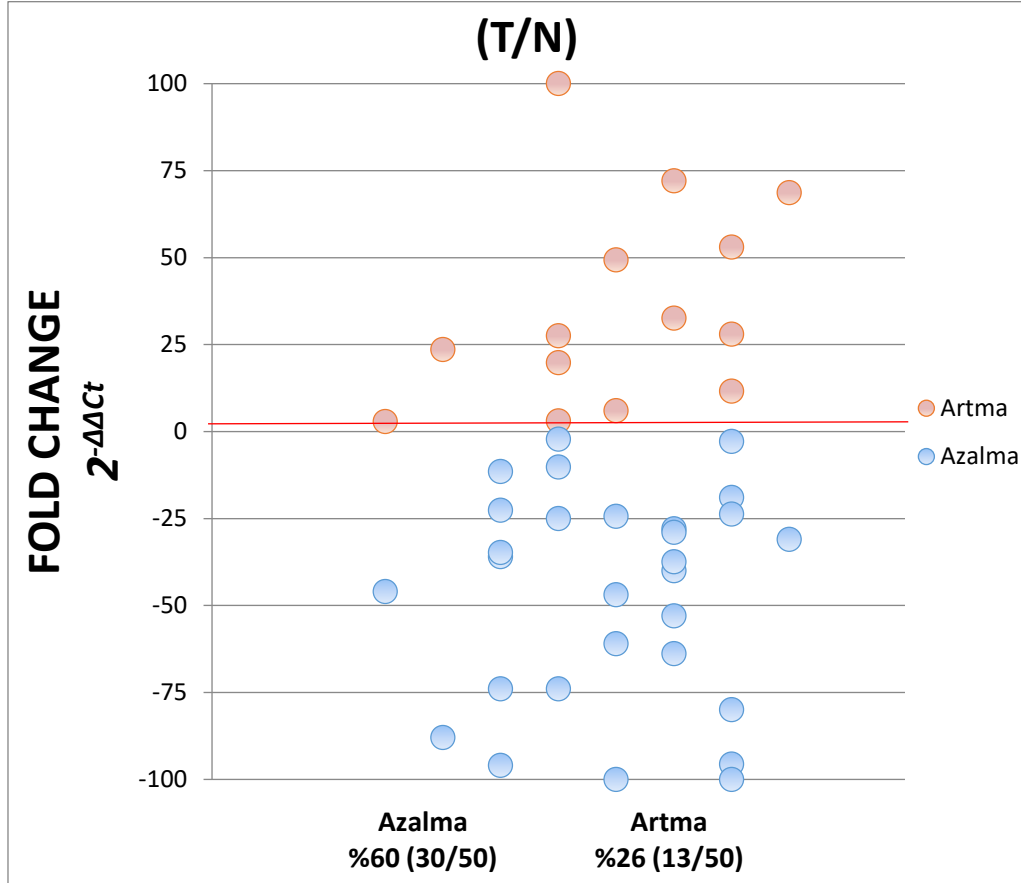


Şekil 20: Sağlıklı bireylerin mukoza ve serum örneklerindeki ekspresyon düzeyleri normalize edilerek $2^{\Delta Ct}$ metodu ile relatif olarak değerlendirilmesi



Şekil 21: OSCC hastalarının tümör/eşlenik normal doku ve serum örneklerinin ekspresyon düzeylerinin normalize edilerek $2^{\Delta C_t}$ metodu ile relatif olarak değerlendirilmesi

TXNIP geninin ekspresyon düzeyleri OSCC hastalarına ait tümör ve eşlenik normal dokularındaki ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile relatif olarak hesaplandı (Şekil 21). OSCC hastaların %60'ında (30 hasta) tümör dokusunda eşlenik normal dokuya oranla ekspresyon seviyesinde azalma ve %26'sında (13 hasta) ekspresyon seviyesinde artma gözlenirken 7 hastanın ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlenmedi.



Şekil 22: *TXNIP* geninin ekspresyon düzeyleri ile referans genin (*ACTB*) OSCC hastalarına ait tümör (T) ve eşlenik normal (N) doku örneklerindeki ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile relatif olarak hesaplanması

Hastaların tümör dokularına ait Ct değerlerinin ortalamaları ile sağlıklı bireylerin normal mukozalarına ait Ct değerlerinin ortalamaları kıyaslanarak foldchange değeri hesaplandı. Hastalarda sağlıklı bireylere göre *TXNIP* geninin ekspresyon seviyesinde 35 kat azalma tespit edildi. Sadece metilasyon gözlenen hastaların tümör dokularının Ct değerleri ile sağlıklı bireylerin normal mukozalarının Ct değerlerinin ortalamaları karşılaştırılıp foldchange değeri hesaplandı ve metilasyon gözlenen hastalarda 89 kat ekspresyon seviyesinde azalma olduğu gözlemlendi.

4.4.TXNIP Geninin Promoter Bölgesinde Gözlenen Hipermetilasyona Bağlı Ekspresyon Seviyesinde Azalma

Tümör dokusunda *TXNIP* geninin promoter bölgesinde metilasyon gözlenen 9 hastanın %66,6'sında (6/9) tümör dokusunda eşlenik normal dokusuna göre ekspresyon seviyesinde azalma olduğu tespit edildi. Hem tümör hem de eşlenik normal dokusunda metilasyon 5 hastada gözlenirken 5 hastanın 3'ünde tümör dokusunda eşlenik normale göre ekspresyon seviyesinde azalma belirlendi. Metilasyon gözlenen hastaların %33,3'ünün (3/9) anatomik tutulum bölgesinin ağız tabanı olduğu gözlemlendi. Ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen hastaların %30'unda (9/30) anatomik tutulum bölgesinin dil olduğu tespit edildi. Tümör dokusunda metilasyon gözlenen bir hastanın hem eşlenik normal hem de serum örneğinde metilasyon tespit edilirken hastanın tümör dokusunda eşlenik normal dokuya oranla ekspresyon seviyesinde azalma gözlemlendi. Tümör dokusunda metilasyon gözlenmeyen %29,2'sinde (12/41) ekspresyon seviyesinde artma, %56'sında (23/41) ise ekspresyon seviyesinde azalma gözlemlendi (Tablo 16).

Tablo 16: Metilasyon ve ekspresyon değişikliklerinin gösterimi

HASTA GRUPLARI	Ekspresyon azalış (n=30)	Ekspresyon artış (n=13)	Değişiklik Gözlenmeyen (n=7)
Metilasyon Gözlenen (n=9)	%66,7 (6/9)	%22,2 (2/9)	%11,1 (1/9)
Metilasyon Gözlenmeyen (n=41)	%56,1 (23/41)	%29,3 (12/41)	%14,6 (6/41)

4.5. Metilasyon Ve Ekspresyon Sonuçlarının Klinikopatolojik Veriler İle Karşılaştırılması

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

Ekspresyon ve metilasyon durumu ile hastaların klinikopatolojik verileri karşılaştırıldığında sigara ve alkol kullanımı, lenf nodu tutulumu, anatomik tutulum bölgeleri ile anlamlılık bulunamadı ($p>0,05$).

Tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre ekspresyon seviyesinde azalma ile hastalarda nüks gözlenmesi arasında istatistiksel anlamlılık bulundu ($p=0,044$). Sadece tümör dokusunda metilasyon gözlenen hastalarda, differansiyasyon derecesi ile ekspresyon seviyesinde azalma arasında istatistiksel anlamlılık tespit edildi ($p=0,023$).

%95 güven aralığında yapılan ANOVA (F-testi) testine göre diferansiyasyon derecesi ve TNM evresi (I-II-III-IV) ile *TXNIP* geninin ekspresyon seviyesinde artma/azalma ve promoter metilasyon durumları incelendiğinde istatistiksel anlamlılık tespit edilmedi ($p>0,05$).

Wilcoxon Rank testi ile yapılan analizde metilasyon gözlenen hastalarda, ekspresyon seviyesinde artma ve ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen gruplar arasındaki kat değişim oranları istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,008$). Metilasyon gözlenmeyen hastalarda, ekspresyon seviyesinde artma ve ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen gruplar arasındaki kat değişim oranları ileri derecede istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen hasta grubu incelendiğinde metilasyon gözlenen ve gözlenmeyen gruplar arasında istatistiksel anlamlılık gözlemlendi ($p<0,001$). Ekspresyon seviyesinde artma gözlenen hastalarda metilasyon gözlenen ve gözlenmeyen grupların dağılımı arasında istatistiksel anlamlılık gözlemlendi ($p=0,01$).

5.TARTIŞMA

Oral kavite kanserleri tüm baş boyun kanserlerinin %14'ünü oluşturmaktadır. Verilere göre ortalama tanı konma yaşı 64 olup hastaların çoğunluğu erkeklerden oluşmaktadır. En sık görülen histopatoloji skuamöz hücreli karsinomdur. Çalışmamızda hastaların tamamı skuamöz hücreli karsinom tanılı idi.

Etiyolojide en önemli etkenler tütün kullanımı ve alkoldür (17). Karsinogenez de çevresel etkenlerin yanı sıra genetik / epigenetik faktörlerde rol oynar.

Epigenetik DNA dizilimde değişikliğe yol açmadan genin ifadesini değiştiren ve kalıtılabilen özellikleri inceler (56). Epigenetik mekanizmalar; histon modifikasyonları, DNA metilasyonu, mi RNA regülasyonu ve kromatin yeniden düzenlenmesi olarak belirtilmiştir (57).

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

DNA da meydana gelen metilasyon tümörün başlangıç ve ilerlemesinde önemli bir role sahiptir. Tümör süpresör genlerin promoter bölgelerinde meydana gelen metilasyon durumu genin baskılanmasına neden olur. Bu durum biyobelirteç arayışı açısından erken tanı ve taramada umut vaat etmektedir.

TXNIP hücrel antioksidan sisteminin bir parçası olup bu sistemde inhibitör rol üstlenir. Tioredoksin fonksiyonunu doğrudan veya ASK-1 gibi proteinler üzerinden dolaylı olarak inhibe eder.

Tümör süpresör gen olarak işlev gören *TXNIP* 'nin birçok farklı kanser türünde rol aldığı bildirilmiştir.

Literatürde, *TXNIP* geninin metilasyon ve metilasyona bağlı ekspresyon seviyesini OSCC hastalarında inceleyen çalışma bulunamamıştır. Ancak baş boyun SCC'lerinde metilasyonu inceleyen bir adet çalışma bulunmuştur (12). Demokan ve arkadaşlarının 2013 yılında yayınlanan çalışmalarında 5-aza-2'-deoksisitidin ile muamele edilmiş baş boyun skuamöz hücreli karsinomlu (HNSCC) hücre soylarında soyları ile insan tümör ve sağlıklı dokularında gen ekspresyon profillemeye yaklaşımı ile ekspresyonları baskılanan genler tanımlandı. Array sonuçlarına göre ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen 126 genin bisülfıt

dizileme işlemi tamamlandıktan sonra anlamlı derecede azalma gözlenen 7 gende (*MAP3K3*, *MAP2K3*, *GNG7*, *GALNT10*, *PPFIBP2*, *TUSC2* ve *TXNIP*) azalmanın metilasyon mekanizması üzerinden gerçekleştiğini tespit etmek için genlerin promoter bölgelerinin metilasyon durumları QMSP yöntemi ile incelendi. 9'u oral kavite hastası olmak üzere toplam 33 adet HNSCC hastasının tümör dokularında ve sağlıklı bireylere ait normal mukoza (n=14) ve tükürük (n=22) örneklerinde metilasyon seviyeleri incelendi. Tümör örneklerinin %18'inde (6/33) %10'un üzerinde ve sağlıklı tükürük örneklerinin %18,75'inde (6/16) %1'in altında oranlarda metilasyon gözlenirken sağlıklı bireylere ait normal mukoza örneklerinde metilasyon gözlenmediği bildirilmiştir. Metilasyon gözlenen 6 adet HNSCC hastasında sadece bir hastanın oral kavite tümörüne sahip olduğu belirtilmiştir (12).

Tümör süpresör gen olarak işlev gören *TXNIP* 'nin birçok farklı kanser türünde rol aldığı bildirilmiştir. Ikarashi ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmada gastrointestinal sistem kanseri olan 52 hastanın (40 tanesi kolorektal kanser, 12 mide kanseri) örnekleri (tümör ve normal doku) QRT-PCR yöntemi ile incelendi ve kanserli dokuda normal dokuya göre ekspresyonda anlamlı azalma olduğu gösterildi. İleri evre hastalıkta ekspresyon oranlarının daha da azaldığı bildirildi (103). Jennifer ve ark. (2014) yaptığı çalışmada ise fare modeli üzerinde (ortotopik tümör nakli) tiroid karsinomunda *TXNIP* ekspresyonu incelendi. Çalışma sonucunda *TXNIP* ekspresyonunda artışın tümörün büyümesinde yavaşlama ve metastaz oranında azalmaya neden olduğu görüldü (99). Cho ve ark. (2019) hepatosellüler karsinom ve oksidatif stres arasındaki ilişkiyi incelediği bir çalışmada karaciğer rezeksiyonu yapılan 367 hasta ve sağlıklı kontroller arasında mRNA ve protein seviyelerindeki değişiklikler gen ekspresyon array yöntemi ile analiz edildi. Oksidatif stres altında *TXNIP* geninde artan ekspresyon seviyesinin tümör oluşumuna yol açan diğer onkogenlerin inhibisyonuna neden olduğu görüldü (104). Miligy ve ark. (2018) yaptığı çalışmada 1015 hasta üzerinden *TXNIP* 'nin insitu / invaziv duktal meme karsinomundaki rolü incelendi. İnsitu ve invaziv tümör örnekleri mikroyarray yöntemi ile incelendi ve ekspresyon seviyesinde anlamlı değişiklik olduğu gözlemlendi. *TXNIP* 'nin azalan ekspresyonu yüksek nükleer atipi, östrojen reseptör negatifliği, nekroz varlığı içeren agresiflik özellikleri ile ilişkili bulundu (105). Goldberg ve ark. (2003) yaptığı çalışmada ise melanom da *TXNIP* ekspresyonu ile metastaz arasında ters korelasyon olduğu bildirildi (106).

Birçok kanser türünde tümör süpresör genlerin promoter bölgesinde metilasyon görüldüğü bildirilmiştir (107). Dutta ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada *TXNIP* geni promoter bölgesinde meydana gelen metilasyon ile renal hücreli kanser arasında ilişki

olduğu saptandı (108). Carvalho ve ark. (2008) yaptığı çalışmada baş boyun kanseri olan hastaların tümör, serum ve tükürük örneklerinde belirlemiş oldukları 21 adet tümör süpresör gende promoter bölgede QMSP yöntemi kullanılarak metilasyon düzeyleri incelendi. Bu genlerin bir kısmında metilasyon oranlarının yüksek düzeyde artmış olduğu gözlemlendi. Bu genlerin serum ve tükürükte metilasyon oranlarının yüksek saptanmasının hastalığın taraması ve hastalığın takibinde kullanılabileceği öngörüldü (107).

Çalışmamızda OSCC tanısı almış 50 hastanın tümör / eşlenik normal doku ve serum örnekleri ile sağlıklı bireylere ait normal doku ve serum örneklerinin ekspresyon seviyesi QRT-PCR yöntemi ile incelendi. Hastaların 30'unda (%60) normal dokuya göre ekspresyon azalışı gözlemlendi. 13 hastada (%26) ekspresyon seviyelerinde artış görülürken 7 hastada (%14) ekspresyon seviyelerinde değişiklik izlenmedi. Ekspresyon oranları ile hastaların verileri (yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, alkol kullanımı, lenf nodu tutulumu) değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı. Tümörün anatomik lokalizasyonuna göre ekspresyon oranlarına bakıldığında en yüksek ekspresyon oranı ağız tabanı bölgesinde izlendi (%78). Ekspresyonun en az görüldüğü lokalizasyon ise retromolar trigon olarak izlendi (%38).

Çalışmada *TXNIP* genine ait promoter bölgede meydana gelen metilasyon durumu ve buna bağlı olarak ortaya çıkan gen ekspresyon düzeyinde ortaya çıkacak değişikliklerin incelenmesi amaçlandı. 9 tümör dokusunda (%18) metilasyonda artış izlenirken 7 hastanın (%14) eşlenik normal dokusunda metilasyonda artış saptandı. 1 hastanın serum örneğinde metilasyon oranında artış görüldü. Kontrol grubu sağlıklı bireylerin serum örneklerinde metilasyonda artış izlenmez iken sadece 1 hastanın normal mukoza örneğinde %0.003 oranında metilasyonda artış saptandı. Bu durum anlamlı olarak görülmedi. Metilasyon oranında artış görülen 9 hastanın 6 tanesinde (%67) *TXNIP* gen ekspresyon oranında azalma görüldü. Hem tümör hem eşlenik normal dokuda metilasyon 5 hastada görüldü. 1 hastanın tümör, eşlenik normal doku ve serumunda metilasyonda artış görülürken tümör dokusunda normal dokuya oranla ekspresyon seviyelerinde azalma saptandı. Ekspresyon ve metilasyon durumu klinikopatolojik veriler ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca varılamadı. Ancak tümör dokusunda ekspresyon seviyelerinde azalma olan hastalar ile nüks görülmesi arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi ($p=0.044$). Tümör dokusunda metilasyon saptanan hastalarda ekspresyon azalması ve diferansiyasyon derecesi arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi ($p=0.023$). Hastalar anatomik tutulum bölgelerine göre değerlendirildiğinde her anatomik alan için hasta sayısı yetersiz olduğundan istatistiksel

analiz yapılamadı. Ağız tabanı tümörü olan 9 hastanın 4 tanesinde metilasyon izlenirken bu 4 hastanın 3'ünde *TXNIP* gen ekspresyon oranlarında da azalma izlendi.

Çalışmamızda metilasyon görülen hastalarda, ekspresyon artışı olan ve ekspresyon azalışı olan hastalar arasında yapılan analizde kat değişim oranları istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.008$). Metilasyon gözlenmeyen hastalar arasında da ekspresyon artışı olan ve ekspresyon azalışı olan hastalar arasındaki kat değişim oranları istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p<0.001$).

Ekspresyon oranında azalma görülen hastalarda metilasyon gözlenen ve metilasyon gözlenmeyen hastaların dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlendi ($p<0.001$). Ekspresyon oranında artma saptanan hastalarda ise metilasyon gözlenen ve metilasyon saptanmayan hastaların dağılımında istatistiksel olarak anlamlılık izlendi ($p=0.01$). OSCC hastalarına ait daha geniş gruplarda yapılacak çalışma ile istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçlar elde edilecektir.

Ayrıca çalışmamızda hastalarda sağlıklı kişilere oranla gen ekspresyonunda 35 kat düşme izlendi. Sadece metilasyon görülen hastalar ile sağlıklı bireyler kıyaslandığında *TXNIP* gen ekspresyon seviyesinde 89 kat azalış olduğu görüldü. Mevcut durum tümör hastalarında metilasyona bağlı ekspresyon oranlarında ciddi azalma olduğunu gösterirken metilasyonun görülmediği hasta popülasyonunda da ekspresyonda önemli oranda azalma olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum tümör hastalarında ekspresyon azalmasında metilasyon dışında mekanizmalar (mutasyon) olduğunu düşündürmektedir. İleride yapılacak çalışmalara bu açıdan ışık tutmaktadır.

TXNIP geninin ekspresyonunda azalma ile karsinogenez arasındaki ilişkinin yanısıra genin aktivasyonunun artırılmasının kanser tedavisinde rolü olduğunu gösteren çalışmalarda bulunmaktadır. Hoshikawa ve ark. yaptığı çalışmada hücre kültürü ve ksenograft fareler üzerinde yapılan deneyde D-alloz verilmesi ile birlikte *TXNIP* ekspresyon artışı gösterilmiş ve bu durumun tümörün büyüme potansiyelini azalttığı gösterilmiştir. *TXNIP* ekspresyonunu artıran bu ilacın kanser tedavisinde kullanılabileceği belirtilmiştir (109). Hücre kültürü ortamında yapılan bir başka çalışmada baş boyun kanserlerinde, radyoterapi ile beraber tedavide *TXNIP* ekspresyonunu artıran D-alloz verilmesinin kanser tedavisinde radyoterapi etkinliğini artırdığı belirtilmiştir (110).

Yukarıda bahsi geçen çalışmalarda *TXNIP* geninin yalnızca metilasyon veya yalnızca ekspresyon değişimleri incelenmiştir. Çalışmamız OSCC'de *TXNIP* geninin ekspresyon ve

metilasyon oranları incelenmiş ve bununla beraber metilasyona bağı ekspresyon değışikliklerini araştırılmıştır. Bu özelliğı ile literatürdeki ilk çalışma olma özelliğini göstermektedir. Yapılacak daha geniş hasta popölasyonlu çalışmalar ile *TXNIP* geninin OSCC’de tarama, tanı ve takipte kullanılabilecek bir biyobelirteç olarak rolü incelenecektir.



KAYNAKLAR

1. Hoffman HT, Karnell LH, Funk GF, Robinson RA, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. Arch Otolaryngol - Head Neck Surg. 1998;
2. Ries L, Melbert D, Krapcho M, Stinchcomb D, Howlader N, Horner M, et al. SEER Cancer Statistics Review 1975-2001 National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1975-2001. SEER Cancer Stat Rev 1975-2005, Natl Cancer Institute Bethesda, MD,. 2004;
3. Funk GF, Karnell LH, Robinson RA, Zhen WK, Trask DK, Hoffman HT. Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: A national cancer data base report. Head Neck. 2002;
4. Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Biörklund A, et al. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: A population-based case-referent study in Sweden. Cancer. 1998;
5. Balmain A, Barrett JC, Moses H, Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? implications from human cancer data. Mol Carcinog. 1993;
6. Jones PA, Baylin SB. P.A. Jones, S.B. Baylin, The fundamental role of epigenetic events in cancer, Nat. Rev./Genet. 3 (2002) 415–428. Nat Rev/Genet 3 415–428. 2002;
7. Mahmood DFD, Abderrazak A, El Hadri K, Simmet T, Rouis M. The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease. Antioxid Redox Signal. 2013;
8. Yamawaki H, Pan S, Lee RT, Berk BC. Fluid shear stress inhibits vascular inflammation by decreasing thioredoxin-interacting protein in endothelial cells. J Clin Invest. 2005;
9. Sheth SS, Bodnar JS, Ghazalpour A, Thippavong CK, Tsutsumi S, Tward AD, et al. Hepatocellular carcinoma in Txnip-deficient mice. Oncogene. 2006;
10. Zhang C, Wang H, Liu X, Hu Y, Ding L, Zhang X, et al. Oncogenic microRNA-411 promotes lung carcinogenesis by directly targeting suppressor genes SPRY4 and TXNIP. Oncogene. 2019;
11. Nishizawa K, Nishiyama H, Matsui Y, Kobayashi T, Saito R, Kotani H, et al.

- Thioredoxin-interacting protein suppresses bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2011;
12. Demokan S, Chuang AY, Chang X, Khan T, Smith IM, Pattani KM, et al. Identification of guanine nucleotide-binding protein γ -7 as an epigenetically silenced gene in head and neck cancer by gene expression profiling. *Int J Oncol*. 2013;
 13. Lee KJ, Abemayor E, Sayre J, Bhuta S, Kirsch C. Determination of perineural invasion preoperatively on radiographic images. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2008;
 14. Salama JK, Saba N, Quon H, Garg MK, Lawson J, McDonald MW, et al. ACR appropriateness criteria® adjuvant therapy for resected squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology*. 2011.
 15. Spector ME, Wilson KF, Light E, McHugh JB, Bradford CR. Clinical and pathologic predictors of recurrence and survival in spindle cell squamous cell carcinoma. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2011;
 16. De Sampaio Góes FCG, Oliveira DT, Dorta RG, Nishimoto IN, Landman G, Kowalski LP. Prognoses of Oral Basaloid Squamous Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma: A Comparison. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2004;
 17. Baden E. Prevention of Cancer of the Oral Cavity and Pharynx. *CA Cancer J Clin*. 2008;
 18. Elamin F, Steingrimsdottir H, Wanakulasuriya S, Johnson N, Tavassoli M. Prevalence of human papillomavirus infection in premalignant and malignant lesions of the oral cavity in U.K. subjects: A novel method of detection. *Oral Oncol*. 1998;
 19. Hafkamp HC, Manni JJ, Speel EJM. Role of human papillomavirus in the development of head and neck squamous cell carcinomas. In: *Acta Oto-Laryngologica*. 2004.
 20. Ju DMC. On the etiology of cancer of the lower lip. *Plast Reconstr Surg*. 1973;
 21. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-albright LA, Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst*. 1994;
 22. Weber RS, Palmer JM, El-Naggar A, McNeese MD, Guillamondegui OM, Byers RM. Minor Salivary Gland Tumors of the Lip and Buccal Mucosa. *Laryngoscope*. 2006;

23. ZITSCH RP, PARK CW, RENNER GJ, REA JL. Outcome analysis for lip carcinoma. *Otolaryngol - Head Neck Surg* (United States). 1995;
24. Eicher SA, Overholt SM, El-Naggar AK, Byers RM, Weber RS. Lower gingival carcinoma: Clinical and pathologic determinants of regional metastases. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg*. 1996;
25. Close LG, Burns DK, Merkel M, Schaefer SD. Computed tomography in the assessment of mandibular invasion by intraoral carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1986;
26. Overholt SM, Eicher SA, Wolf P, Weber RS. Prognostic factors affecting outcome in lower gingival carcinoma. *Laryngoscope*. 1996;
27. Goldenberg D, Ardekian L, Rachmiel A, Peled M, Joachims HZ, Laufer D. Carcinoma of the dorsum of the tongue. *Head Neck*. 2000;
28. Shack RB. Carcinoma of the tongue and tonsil (oropharynx). *Surg Clin North Am*. 1986;
29. Lydiatt DD, Robbins KT, Byers RM, Wolf PF. Treatment of stage I and II oral tongue cancer. *Head Neck*. 1993;
30. Huang CJ, Clifford Chao KS, Tsai J, Simpson JR, Haughey B, Spector GJ, et al. Cancer of retromolar trigone: Long-term radiation therapy outcome. *Head Neck*. 2001;
31. Shaha AR, Spiro RH, Shah JP, Strong EW. Squamous carcinoma of the floor of the mouth. *Am J Surg*. 1984;
32. Rodgers LW, Stringer SP, Mendenhall WM, Parsons JT, Cassisi NJ, Million RR. Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth. *Head Neck*. 1993;
33. Jing J, Li L, He W, Sun G. Prognostic Predictors of Squamous Cell Carcinoma of the Buccal Mucosa With Negative Surgical Margins. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006;
34. Diaz EM, Holsinger FC, Zuniga ER, Roberts DB, Sorensen DM. Squamous cell carcinoma of the buccal mucosa: One institution's experience with 119 previously untreated patients. *Head Neck*. 2003;
35. Beckhardt RN, Weber RS, Zane R, Garden AS, Wolf P, Carrillo R, et al. Minor salivary gland tumors of the palate: Clinical and pathologic correlates of outcome.

- Laryngoscope. 1995;
36. Lin HW, Bhattacharyya N. Survival impact of nodal disease in hard palate and maxillary alveolus cancer. *Laryngoscope*. 2009;
 37. Edge, S., Byrd, D.R., Compton, C.C., Fritz, A.G., Greene, F.L., Trotti A. *AJCC Cancer Staging Manual* | Stephen Edge | Springer. Springer. 2010.
 38. Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*. 2014.
 39. Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology*. 2000.
 40. Sasahira T, Kirita T. Hallmarks of Cancer-Related Newly Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2018;
 41. V.F. B, F.O. G-N, S.F. S, T.A. S, M.C.F. A. Clinical significance of EGFR, Her-2 and EGF in oral squamous cell carcinoma: A case control study. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;
 42. Monteiro LS, Ricardo S, Delgado ML, Garcez F, do Amaral B, Lopes C. Phosphorylated EGFR at tyrosine 1173 correlates with poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Oral Dis*. 2014;
 43. Silva SD, Alaoui-Jamali MA, Hier M, Soares FA, Graner E, Kowalski LP. Cooverexpression of ERBB1 and ERBB4 receptors predicts poor clinical outcome in pN+ oral squamous cell carcinoma with extranodal spread. *Clin Exp Metastasis*. 2014;
 44. Lim YC, Han JH, Kang HJ, Kim YS, Lee BH, Choi EC, et al. Overexpression of c-Met promotes invasion and metastasis of small oral tongue carcinoma. *Oral Oncol*. 2012;
 45. Sasahira T, Kuniyasu H. Molecular biology of the oral cancer. In: *Oral Cancer: Diagnosis and Therapy*. 2015.
 46. Neskey DM, Osman AA, Ow TJ, Katsonis P, McDonald T, Hicks SC, et al. Evolutionary action score of TP53 identifies high-risk mutations associated with decreased survival and increased distant metastases in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2015;
 47. Bello IO, Soini Y, Salo T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: Means, markers

- and perspectives (II). *Oral Oncology*. 2010.
48. Zhang M, Li J, Wang L, Tian Z, Zhang P, Xu Q, et al. Prognostic significance of p21, p27 and survivin protein expression in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2013;
 49. Zhao J, Chi J, Gao M, Zhi J, Li Y, Zheng X. Loss of PTEN Expression Is Associated With High MicroRNA 24 Level and Poor Prognosis in Patients With Tongue Squamous Cell Carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2017;
 50. Zeng X-S, Geng W-S, Chen L, Jia J-J. Thioredoxin as a Therapeutic Target in Cerebral Ischemia. *Curr Pharm Des*. 2018;
 51. Jinno T, Kawano S, Maruse Y, Matsubara R, Goto Y, Sakamoto T, et al. Increased expression of interleukin-6 predicts poor response to chemoradiotherapy and unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2015;
 52. Benhamou Y, Picco V, Pagès G. The telomere proteins in tumorigenesis and clinical outcomes of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2016.
 53. McCaul JA, Gordon KE, Minty F, Fleming J, Parkinson EK. Telomere dysfunction is related to the intrinsic radio-resistance of human oral cancer cells. *Oral Oncol*. 2008;
 54. Chen HH, Yu CH, Wang JT, Liu BY, Wang YP, Sun A, et al. Expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein is significantly associated with the progression, recurrence and prognosis of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncol*. 2007;
 55. Sasahira T, Kirita T, Kurihara M, Yamamoto K, Bhawal UK, Bosserhoff AK, et al. MIA-dependent angiogenesis and lymphangiogenesis are closely associated with progression, nodal metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2010;
 56. Esteller M, Manel E. (REVIEW) Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008;
 57. Shinjo K, Kondo Y. Targeting cancer epigenetics: Linking basic biology to clinical medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015.
 58. Putiri EL, Robertson KD. Epigenetic mechanisms and genome stability. *Clinical Epigenetics*. 2011.

59. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*. 2004.
60. DeSantis CE, Siegel RL, Sauer AG, Miller KD, Fedewa SA, Alcaraz KI, et al. Cancer statistics for African Americans, 2016: Progress and opportunities in reducing racial disparities. *CA Cancer J Clin*. 2016;
61. Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: Linking basic biology to clinical medicine. *Cell Research*. 2011.
62. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development*. 2002.
63. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*. 2010.
64. Jones PA. Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*. 2012.
65. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983;
66. Hesselink ENK, Zafon C, Villalmanzo N, Iglesias C, Van Hemel BM, Hesselink MSK, et al. Increased global DNA hypomethylation in distant metastatic and dedifferentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;
67. Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, Hutcheon DF, Kafonek DR, Brandenburg S, et al. Loss of IGF2 imprinting: A potential marker of colorectal cancer risk. *Science* (80-). 2003;
68. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*. 2003.
69. L H, GJ H. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;
70. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*. 2006.
71. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sánchez-Céspedes M, Blanco D, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A. 2008;
72. Mack GS. Epigenetic cancer therapy makes headway. *J Natl Cancer Inst.* 2006;
 73. Ballestar E, Paz MF, Valle L, Wei S, Fraga MF, Espada J, et al. Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *EMBO J.* 2003;
 74. Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;
 75. Geiman TM, Robertson KD. Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation - How does it all fit together? *Journal of Cellular Biochemistry.* 2002.
 76. Havas K, Whitehouse I, Owen-Hughes T. ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2001.
 77. Jeddeloh JA, Stokes TL, Richards EJ. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat Genet.* 1999;
 78. Van Houten VMM, Snijders PJF, Van Den Brekel MWM, Kummer JA, Meijer CJLM, Van Leeuwen B, et al. Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer.* 2001;
 79. Warnakulasuriya S. Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral precancer. *Journal of Pathology.* 2000.
 80. Bilde A, Von Buchwald C, Dabelsteen E, Therkildsen MH, Dabelsteen S. Molecular markers in the surgical margin of oral carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2009;
 81. Luzar B, Poljak M, Marin IJ, Eberline A, Klopčič U, Gale N. Human telomerase catalytic subunit gene re-expression is an early event in oral carcinogenesis. *Histopathology.* 2004;
 82. Li Y, St. John MAR, Zhou X, Kim Y, Sinha U, Jordan RCK, et al. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin Cancer Res.* 2004;
 83. Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene.* 2003.

84. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*. 2002.
85. Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: Initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nature Reviews Cancer*. 2014.
86. Polimeni M, Gazzano E. Is redox signaling a feasible target for overcoming multidrug resistance in cancer chemotherapy? *Front Pharmacol*. 2014;
87. MOORE EC, REICHARD P, THELANDER L. ENZYMATIC SYNTHESIS OF DEOXYRIBONUCLEOTIDES.V. PURIFICATION AND PROPERTIES OF THIOREDOXIN REDUCTASE FROM ESCHERICHIA COLI B. *J Biol Chem*. 1964;
88. Williams CH, David Arscott L, Müller S, Lennon BW, Ludwig ML, Wang PF, et al. Thioredoxin reductase: Two modes of catalysis have evolved. *European Journal of Biochemistry*. 2000.
89. Chen KS, DeLuca HF. Cloning of the human 1 α ,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *BBA - Gene Struct Expr*. 1995;
90. Yu F-X, Goh S-R, Dai R-P, Luo Y. Adenosine-Containing Molecules Amplify Glucose Signaling and Enhance Txnip Expression. *Mol Endocrinol*. 2009;
91. Spindel ON, World C, Berk BC. Thioredoxin Interacting Protein: Redox Dependent and Independent Regulatory Mechanisms. *Antioxid Redox Signal*. 2011;
92. Zhou J, Yu Q, Chng WJ. TXNIP (VDUP-1, TBP-2): A major redox regulator commonly suppressed in cancer by epigenetic mechanisms. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2011.
93. Cadenas C, Franckenstein D, Schmidt M, Gehrmann M, Hermes M, Geppert B, et al. Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;
94. Kwon H-J, Won Y-S, Suh H-W, Jeon J-H, Shao Y, Yoon S-R, et al. Vitamin D3 Upregulated Protein 1 Suppresses TNF- α -Induced NF- κ B Activation in Hepatocarcinogenesis. *J Immunol*. 2010;
95. Feingold PL, Surman DR, Brown K, Xu Y, McDuffie LA, Shukla V, et al. Induction of

- Thioredoxin-Interacting Protein by a Histone Deacetylase Inhibitor, Entinostat, Is Associated with DNA Damage and Apoptosis in Esophageal Adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2018;
96. Zhu G, Zhou L, Liu H, Shan Y, Zhang X. MicroRNA-224 promotes pancreatic cancer cell proliferation and migration by targeting the TXNIP-mediated HIF1 α pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2018;
 97. Jung H, Kim MJ, Kim DO, Kim WS, Yoon SJ, Park YJ, et al. TXNIP maintains the hematopoietic cell pool by switching the function of p53 under oxidative stress. *Cell Metab.* 2013;
 98. Woolston CM, Madhusudan S, Soomro IN, Lobo DN, Reece-Smith AM, Parsons SL, et al. Thioredoxin interacting protein and its association with clinical outcome in gastro-oesophageal adenocarcinoma. *Redox Biol.* 2014;
 99. Morrison JA, Pike LA, Sams SB, Sharma V, Zhou Q, Severson JJ, et al. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) is a novel tumor suppressor in thyroid cancer. *Mol Cancer.* 2014;
 100. Park JW, Lee SH, Woo GH, Kwon HJ, Kim DY. Downregulation of TXNIP leads to high proliferative activity and estrogen-dependent cell growth in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;
 101. Masaki S, Masutani H, Yoshihara E, Yodoi J. Deficiency of Thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) enhances TGF- β signaling and promotes epithelial to mesenchymal transition. *PLoS One.* 2012;
 102. Demokan S, Chuang A, Suoğlu Y, Ulasan M, Yalnâz Z, Califano JA, et al. Promoter methylation and loss of p16INK4a gene expression in head and neck cancer. *Head Neck.* 2012;
 103. Ikarashi M, Takahashi Y, Ishii Y, Nagata T, Asai S, Ishikawa K. Vitamin D 3 up-regulated protein 1 (VDUPI) expression in gastrointestinal cancer and its relation to stage of disease. *Anticancer Res.* 2002;
 104. Cho SY, Kim S, Son MJ, Rou WS, Kim SH, Eun HS, et al. Clinical Significance of the Thioredoxin System and Thioredoxin-Domain-Containing Protein Family in Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis Sci.* 2019;

105. Miligy IM, Gorringer KL, Toss MS, Al-Kawaz AA, Simpson P, Diez-Rodriguez M, et al. Thioredoxin-interacting protein is an independent risk stratifier for breast ductal carcinoma in situ. *Mod Pathol*. 2018;
106. Goldberg SF, Miele ME, Hatta N, Takata M, Paquette-Straub C, Freedman LP, et al. Melanoma metastasis suppression by chromosome 6: Evidence for a pathway regulated by CRSP3 and TXNIP. *Cancer Res*. 2003;
107. Carvalho AL, Jeronimo C, Kim MM, Henrique R, Zhang Z, Hoque MO, et al. Evaluation of promoter hypermethylation detection in body fluids as a screening/diagnosis tool for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;
108. Dutta KK, Nishinaka Y, Masutani H, Akatsuka S, Aung TT, Shirase T, et al. Two distinct mechanisms for loss of thioredoxin-binding protein-2 in oxidative stress-induced renal carcinogenesis. *Lab Investig*. 2005;
109. Hoshikawa H, Mori T, Mori N. In vitro and in vivo effects of D-allose: Up-regulation of thioredoxin-interacting protein in head and neck cancer cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2010;
110. Hoshikawa H, Indo K, Mori T, Mori N. Enhancement of the radiation effects by d-allose in head and neck cancer cells. *Cancer Lett*. 2011;

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: İlker Erdiñ ÖZTÜRK

Doğum Tarihi: 30.06.1990

Doğum Yeri: Elbistan

Medeni Durumu: Bekar

Yabancı Dil: İngilizce

İş Adresi: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi KBB & Baş ve Boyun Cerrahisi
ABD Fatih/İstanbul.

Ev Adresi: Mevlanakapı Mah. Dingil Sokak No:24/12 Şehremini-Fatih/İstanbul

Cep Telefonu: 0544 594 00 42

e-mail: ilkererdincozturk@gmail.com

Öğrenim Bilgileri

Uzmanlık Eğitimi: İstanbul Üniversitesi-İstanbul Tıp Fakültesi KBB & Baş ve Boyun Cerrahisi ABD (Ocak 2014-Ağustos 2019).

Lisans: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi (Eylül 2007- Temmuz 2013).

Lise: Kayseri Fen Lisesi (2004-2007)

İlk öğretim: Doğansite İlköğretim Okulu (1996-2003), Özel Ceyhan İlköğretim Okulu (2003-2004)

Yayınlar

1. ÖZTÜRK, E., ÇOMOĞLU, Ş., Enver, N., ÖZTÜRK, İ. E., Celik, M., Polat, B., ... & DEĞER, K. INVERTED PAPILLOMA: A COMPREHENSIVE CLINICAL ANALYSIS. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, 79(4), 157-162.

2. Ozturk Sari, S., Ozluk, Y., Taskin, O. C., Polat, B., Ozturk, I., Ekenel, M., ... & Bilgic, B. (2016). Papillary renal cell carcinoma arising in a lymph node metastasis of a testicular teratoma: a very rare occurrence. *International journal of surgical pathology*, 24(5), 468-472.
3. Öztürk, E., Yılmaz, E., Öztürk, İ. E., Polat, B., & Orhan, K. S. (2017). Posttraumatic Intramuscular Hemangioma Arising from Scalene Muscles in Supraclavicular Region. *Turkish archives of otorhinolaryngology*, 55(2), 87.
4. Öztürk, İ. E., Doruk, C., Urla, I., Önder, S., & Başaran, B. UNUSUAL THYROID MASS: ISOLATED TUBERCULOSIS IN THYROID GLAND.

Bildiriler

1. Sönmez S., Öztürk E., Öztürk İ.E., Yılmaz E., Çomoğlu Ş., Orhan K.S., "Case Report: A Rare Case Of Sinonasal Glomangiopericytoma" Turkey, 22-25 September 2016, no.37, ss.0-0
2. Sönmez S., Öztürk E., Öztürk İ.E., Yılmaz E., Polat B. , Orhan K.S., " Posttraumatic Intramuscular Hemangioma Arising from Scalene Muscles in Supraclavicular Region", 38th Turkish National Congress Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery. 2016, Antalya, Turkey, 26-30 October 2016, ss.1-1
3. Öztürk İ.E., Öztürk E., Yağcı İ., Çomoğlu Ş., "Acil KBB Polikliniği: Rinolojik Aciller" 13th National Rinology, 5th National Otology and 1nd National Head and Surgery Congress. Antalya, Turkey, 4-7 May 2017, ss.1-1
4. Yağcı İ.E., Öztürk İ.E., Çomoğlu Ş., "Late complication after septoplasty: CSF rhinorrhea at 6 years" 13th National Rinology, 5th National Otology and 1nd National Head and Surgery Congress. Antalya, Turkey, 4-7 May 2017, ss.1-1
5. Öztürk İ.E., Doruk C., Çaytemel B., Çelik M., Orhan K.S., " Marjinal Timpanik Membran Perforasyonlarında Kolesteatom İnsidansı: Migrasyon Teorisinin Doğrulanması" 39th Turkish National Congress Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery. 2017, Antalya, Turkey, 8-12 November 2017
6. Öztürk İ.E., Yağcı İ., Baaşaran B., " Dil tümörlerinin nadir metastazı: Perine metastazı" 40th Turkish National Congress Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery. 2018, Antalya, Turkey, 7-11 November 2018