



**LİKİT BİYOPSİLERİN ORAL PREMALİGN VE MALİGN
LEZYONLARDA TANI AMAÇLI KULLANIMI**

Leyla BOZDAĞ

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Leyla BOZDAĞ

30/12/2022

LİKİT BİYOPSİLERİN ORAL PREMALİGN VE MALİGN LEZYONLARDA TANI AMAÇLI KULLANIMI

(Doktora Tezi)

Leyla BOZDAĞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2022

ÖZET

Oral Skuamöz Hücreli Karsinom (OSHK) genetik (delesyon, insersiyon, mutasyon), epigenetik (mikroRNAlardaki düzensizlikler) ve çevresel faktörlere (HPV, sigara, alkol, UV) bağlı olarak gelişen, gen-çevre etkileşimini gösteren en iyi kanser türlerinden biridir. Dünyadaki yıllık baş-boyun kanserinin %30'unu, ağız kanserlerinin %90'ını oluşturmaktadır ve 5 yıllık sağ kalım oranı %35-50'dir. Oral potansiyel malign lezyon (OPML) da tıpkı OSHK gibi gen-çevre etkileşiminden etkilenen kanser öncüsü lezyonların genel adıdır. Çalışma materyalimizi oluşturan kan ve tükürük; minimal invaziv, temini kolay, takibi mümkün kılan biyolojik sıvılardır. Bu hasta gruplarında gerek tanı ve tedavi gerekse prognoz değerlendirmesi için kullanılabilecek biyobelirteçlerin kan ve tükürük gibi likit biyopsi örneklerinde tespit edilmesi oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasının amacı; OSHK hastaları (n=14), OPML (n=14) hastaları ve sağlıklı mukozaya (n=14) sahip kontrol grubu arasında miR-21, miR-208a-3p ve PDCD4'ün tükürük ve kan da ifade seviyelerinde ölçülmesi, OSHK ve OPML açısından biyobelirteçlerin araştırılmasıdır. miRNA ve PDCD4 ifade seviyeleri kantitatif PCR ile incelenmiştir. miRNA ve PDCD4 ifade seviyeleri sırasıyla U6 ve ActB ile normalize edilerek; OSHK hastaları, OPML hastaları ile sağlıklı kontroller karşılaştırılmıştır. Çalışmamız OSHK hastaları ve OPML hastalarının kan ve tükürük örneklerinde miR-208a-3p ve PDCD4 geninin araştırıldığı ilk çalışmadır. Verilerimize göre OSHK hastalarının kan ve tükürük örneklerinde kontrollere göre miR-21 seviyesi daha yüksek bulunurken ($p<0,05$), PDCD4 geni ise düşük ifade edilmiştir ($p<0,05$). OPML hastalarında miR-21 seviyesi OSHK hastalarındaki gibi kontrollerden daha yüksek saptanmış ve PDCD4 ifadesi de düşük çıkmıştır ($p<0,05$). OSHK ve OPML hastalarından elde edilen kan ve tükürük örneklerinde ise miR-208a-3p'nin ifade edilmediği gözlenmiştir. OPML hastalarında miR-21 ve PDCD4 seviyelerinin OPML hastalarında OSHK gelişimi açısından değerlendirilerek takip edilmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir. Hastadan temin edilecek kan veya tükürük örneğiyle çalışan bu biyobelirteçlere spesifik tanı kitlerinin geliştirilmesi hastalığın takibi açısından oldukça önemlidir.

Bilim Kodu : 20326

Anahtar Kelimeler : Oral kanser, oral premalign lezyon, mikroRNA, likit biyopsi

Sayfa Adedi : 142

Danışman : Prof. Dr. Leyla AÇIK

İkinci Danışman : Prof. Dr. Dr. Sibel Elif GÜLTEKİN

DIAGNOSTIC USE OF LIQUID BIOPIES IN ORAL PREMALIGN AND MALIGN LESIONS

(Ph. D. Thesis)

Leyla BOZDAĞ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2022

ABSTRACT

Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) is one of the best cancer types showing gene-environment interaction, which develops due to genetic (deletion, insertion, mutation), epigenetic (irregularities in microRNAs) and environmental factors (HPV, smoking, alcohol, UV). It constitutes 30% of annual head and neck cancers and 90% of oral cancers in the world, and the 5-year survival rate is 35-50%. Oral potential malignant lesion (OPML) is the general name of precancerous lesions that are affected by gene-environment interaction, just like OSCC. The blood and saliva that make up our study material; They are minimally invasive, easy to obtain, biological fluids that enable follow-up. It is very important to detect biomarkers that can be used for diagnosis and treatment and prognosis evaluation in these patient groups in liquid biopsy samples such as blood and saliva. The aim of this thesis study; Measurement of miR-21, miR-208a-3p and PDCD4 in saliva and blood expression levels among OSCC patients (n=14), OPML (n=14) patients, and healthy mucosa (n=14) control group, OSCC and the search for biomarkers in terms of OPML. miRNA and PDCD4 expression levels were examined by quantitative PCR. miRNA and PDCD4 expression levels were U6 and ActB; OSCC patients, OPML patients and healthy controls were compared. in blood and saliva samples of OSCC patients and OPML patients PDCD4 genes. According to our data, the blood and saliva samples of OSCC patients had higher miR-21 levels than controls ($p<0.05$), PDCD4 gene was expressed low ($p<0.05$). MiR-21 level was found to be higher in OPML patients than in controls, as in OSCC patients, and PDCD4 expression was also low ($p<0.05$). It was observed that miR-208a-3p was not expressed in blood and saliva samples obtained from OSCC and OPML patients. miR-21 and PDCD4. It is thought that it would be beneficial to evaluate. The development of specific diagnostic kits for these biomarkers that work with blood or saliva samples to be obtained from the patient is very important for the follow-up of the disease.

Science Code : 20326

Key Words : Oral cancer, oral premalign lesion, microRNA, liquid biopsies

Page Number : 142

Supervisor : Prof. Dr. Leyla AÇIK

Co-Supervisor : Prof. Dr. Dr. Sibel Elif GÜLTEKİN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca benden bilgilerini, tecrübelerini ve desteklerini esirgemeyen, çalışma ahlâkıyla bizlere örnek olan, tez çalışmamda karşılaştığım tüm zorluklarda her zaman yardım ve desteği sağlayan, gerek akademi gerekse akademi dışında kendilerinden çok şey öğrendiğim, tüm yaşamım boyunca da kendilerini minnetle hatırlayacağım iki kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Leyla AÇIK ve Prof. Dr. Dr. Sibel Elif GÜLTEKİN' e teşekkür ve saygılarımı sunarım. Tez çalışmamın materyallerinin toplanmasında özveri ile çalışan Prof. Dr. Nur MOLLAOĞLU'na, Prof. Dr. M. Hakan KORKMAZ'a, Doç. Dr. Ömer BAYIR'a ve Dr. Dt. Halil Erhan ERSOY'a, bilgi birikimleri, manevi destekleri ve sağladıkları huzur ve mutlu çalışma ortamı ile doktora çalışmama sonsuz katkıları olan G.Ü. Dış Hekimliği Fakültesi Oral Patoloji öğretim üyeleri Prof. Dr. Benay YILDIRIM, Doç. Dr. Burcu TOKÖZLÜ, Prof. Dr. Emre BARIŞ'a, Dr. Dt. İpek ATAK SEÇEN'e ve Dr. Dt. Sevinç İNAN'a, doktora çalışmamda deneylerimi yaptığım süreçte benden yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'ndaki arkadaşlarım Dr. Süheyla Pınar ÇELİK, Uzm. Bio. İlayda Sezin YALÇINKAYA, Uzm. Mol. Bio. Damla Nur PARILTI ve laboratuvar asistanımız Dr. Öğr. Gör. Betül AYDIN'a, beni koşulsuz seven, hayatımın her anında varlığını, desteğini ve güçlerini hissettiğim, eğitim hayatımın bu aşamaya gelmesinin ana mimarı olan çok sevgili aileme ve sevgili eşime çok teşekkür ederim. Tez çalışmamı gerçekleştirmemde bana maddi olarak burs desteği sağlayan, 2211-C Öncelikli Alanlar Destek Bursu ile TÜBİTAK-BİDEB'e, Yüksek Öğrenim Kurumu 100-2000 Doktora Bursları Birimi'ne ve TDK-2021-6939 proje kodu ile tez projemde maddi destek sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Oral skuamöz hücreli karsinom	5
2.1.2. OSHK epidemiyolojisi	6
2.1.3. OSHK etiyolojisi ve risk faktörleri.....	7
2.1.4. OSHK moleküler patogenezi.....	8
2.2. Apoptoz	10
2.2.1. Mitokondri (İntrensek yolak) yolağı.....	12
2.3. OSHK Tedavisi ve Prognozu	15
2.4. Oral Premalign Lezyonlar	16
2.4.1. Tanım ve sınıflama	16
2.4.2. OPML epidemiyolojisi	17
2.5. Oral Epitelyal Displazi	18
2.6. OPML'nin Etyolojisi ve Risk Faktörleri.....	20
2.7. OPML ve Displazinin 'nin Moleküler Patogenezi.....	21

	Sayfa
2.8. Likit Biyopsiler	23
2.8.1. Likit biyopsilerin tanımı	23
2.8.2. Likit biyopsi bileşenleri	27
2.8.3. Likit biyopsi çeşitleri	30
2.9. Biyobelirteçler	33
2.10. Kanser Biyobelirteçlerinin Üretimi İçin Kanser Gelişimi ve Mekanizmaları...	34
2.11. Likit Biyopsilerin Farklı Kanselerde Kullanımı	36
2.11.1. Prostat kanseri ve girişimsel olamayan biyobelirteçleri	36
2.11.2. Karaciğer kanseri girişimsel olmayan biyobelirteçleri	37
2.11.3. Meme kanserinde likit biyopsilerin kullanımı	37
2.11.4. Akciğer kanserinde likit biyopsilerin kullanımı	39
2.11.5. Likit biyopsilerin OPML’de kullanımı	40
2.11.6. Likit biyopsilerin OSHK’da kullanımı	47
2.12. MikroRNAlar	49
2.12.1. miRNA biyogenezi	50
2.12.2. miRNA aracılı mRNA baskılanması	51
2.12.3. miRNA’ların kanser gelişimindeki fonksiyonu	53
2.13. OSHK ve Likit Biyopside miRNAlar	53
2.14. Çalışmada Kullanılan Genler	57
2.15. Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Kantitatif PZR-qPZR)	62
3. MATERYAL METOD	65
3.1. Materyal	65
3.1.1. Bireylerin seçimi ve materyallerin toplanması	65
3.2. Kullanılan Kitler	66
3.3. Cihazlar	66
3.4. Kullanılan Yöntemler	67

	Sayfa
3.4.1. Kan örneklerinin toplanması ve ribonükleik asit izolasyonu	67
3.4.2. Tükürük örneklerinin toplanması ve ribonükleik asit izolasyonu	68
3.4.3. cDNA sentezi.....	69
3.4.4. Kullanılan primer dizileri	69
3.4.5. Nanodrop ND100 ile RNA konsantrasyon analizi	70
3.4.6. Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR)	70
3.4.7. OSHK hastaları, OPMH hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarında miR-21 ve <i>PDCD4</i> 'ün ifade seviyelerinin qPZR ile değerlendirilmesi.....	71
3.4.8. İstatistiksel analiz	72
4. BULGULAR	75
4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik ve Klinik Verilerinin Değerlendirilmesi	75
4.2. cDNA miktar ve saflıklarının analizi	79
4.3. OSHK Hastaları, OPML Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-21 İfade Seviyelerinin Değerlendirilmesi.....	80
4.4. OSHK Hastaları, OPML Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-208a İfade Seviyelerinin Değerlendirilmesi.....	82
4.5. OSHK Hastaları, OPML Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında <i>PDCD4</i> İfade Seviyelerinin Değerlendirilmesi.....	82
5. TARTIŞMA	87
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	97
KAYNAKLAR	99
EKLER.....	137
ÖZGEÇMİŞ	141

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Likit biyopsilerde OPML'lerdeki araştırılmış moleküler biyobelirteçlerin özeti.....	47
Çizelge 2.2. Oral kanser patogeneğinde sıkça regülasyonu bozulan mikroRNAlar	54
Çizelge 3.1. Kullanılan kitler	66
Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar.....	66
Çizelge 3.3. MikroRNA cDNA Reaksiyonu.....	69
Çizelge 3.4. Gen cDNA Reaksiyonu (1. Genomik DNA'nın kaldırılması).....	69
Çizelge 3.5. Gen cDNA Reaksiyonu (2. Reverse Transkripsiyon).....	69
Çizelge 3.6. Kullanılan primer dizileri	70
Çizelge 3.7. qPZR reaksiyon karışımı	71
Çizelge 3.8. Kullanılan qPZR programı (<i>PDCD4</i> ve <i>ActB</i>).....	71
Çizelge 3.9. Kullanılan qPZR program (<i>miR-21</i> , <i>U6</i>).....	71
Çizelge 3.10. Elde edilen ct değerlerinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduyla hesaplanmasının gösterimi	72
Çizelge 4.1. Hasta grupları ve sağlıklı kontrol grubunun demografik verilerinin istatistiksel olarak incelenmesi.....	75
Çizelge 4.2. Hasta ve sağlıklı gruplara ait cDNA miktar ve saflık oranları	79
Çizelge 4.3. Kan ve tükürük örneklerinde OSHK ve OPML hastalarının sağlıklı kontrol grubu ile <i>miR-21</i> düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	81
Çizelge 4.4. Gruplara göre kan ve tükürük <i>mir-21/U6</i> ölçümleri arasındaki ilişkinin incelenmesi.....	82
Çizelge 4.5. Kan ve tükürük örneklerinde OSHK, OPML hasta gruplarının sağlıklı kontrol grubuyla <i>PDCD4</i> ifadesinin istatistiksel karşılaştırması	83
Çizelge 4.6. Gruplara göre kan ve tükürük <i>PDCD4/ActB</i> ölçümleri arasındaki ilişkinin incelenmesi.....	84
Çizelge 4.7. Tükürükten alınan <i>miR-21</i> ve <i>PDCD4</i> değerleri için tanı koymada kesim noktalarının incelenmesi	84

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. GLOBACAN 2020 verilerine göre erkeklerde en çok görülen kanserler ve ölüm oranları.....	3
Şekil 2.2. GLOBACAN 2020 verilerine göre kadınlarda en çok görülen kanserler ve ölüm oranları	4
Şekil 2.3. Erkeklerde en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları	4
Şekil 2.4. Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları	5
Şekil 2.5. Ağız kanseri gelişiminin etyolojisi ve risk faktörleri.	8
Şekil 2.6. OSHK gelişiminde etki eden genetik, epigenetik ve çevresel faktörler.....	9
Şekil 2.7. Doku biyopsileri ve likit biyopsilerin avantaj/dezavantajları.....	25
Şekil 2.8. Biyobelirteçlerin sınıflandırılması.....	34
Şekil 2.9. Bhatt ve diğerlerinden modifiye edilmiş karsinogenez sürecinde biyobelirteçlerin tanımlanması.....	35
Şekil 2.10. miRNA yapısı.	49
Şekil 2.11. miRNA isimlendirmesi	50
Şekil 2.12. miRNA biyogenezi	51
Şekil 2.13. miRNA aracılı mRNA Baskılanması.....	52
Şekil 2.14. Ağız kanserinde miRNAlar ve hedef genleri arasındaki ilişki	57
Şekil 2.15. miR-21 ve AKT/mTOR sinyal yolları.....	59
Şekil 2.16. <i>PDCD4</i> protein yapısı ve translasyon başlangıcını düzenleyen mekanizma.....	61
Şekil 2.17. <i>PDCD4</i> , proliferasyon, apoptoz, invazyon ve metastaz gibi translasyonel hedeflerin düzenlenmesinde rol alır.....	62
Şekil 2.18. Prob temelli qPZR mekanizması.	63
Şekil 4.1. Vakalarda gruplara göre ortalama yaş değerlendirmesi	76
Şekil 4.2. Vakalarda gruplara göre cinsiyet dağılımı (%).	76
Şekil 4.3. Vakalarda gruplara göre sigara alışkanlığı (%)	77

Şekil	Sayfa
Şekil 4.4. Vakalarda gruplara göre alkol alışkanlığı (%).....	77
Şekil 4.5. OSHK grubunda anotomik yerleşim yeri dağılımı.....	78
Şekil 4.6. OPML grubunda anotomik yerleşim yeri dağılımı.....	78
Şekil 4.7. OSHK, OPML ve sağlıklı kontrol gruplarının kan ve tükürük örneklerinden elde edilmiş miR-21 miRNA ifade seviyelerinin grafiği.	81
Şekil 4.8. OSHK, OPML ve sağlıklı kontrol gruplarının kan ve tükürük örneklerinden elde edilmiş <i>PDCD4</i> gen ifade seviyelerinin grafiği	83
Şekil 4.9. <i>PDCD4</i> ve miR-21 ROC Curve analizi	85

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. A. OSHK'nın klinik görünümü, B. OSHK'nın histolojik görünümü.....	6
Resim 2.2. Apoptozun mekanizması	12
Resim 2.3. A. Lökoplaki'nin klinik görünümü, B. Düşük dereceli displazinin histolojik görünümü	17
Resim 2.4. Çeşitli tükürük toplama araçları. A. Salivatte, B. Quantisal, C. SCS.....	32
Resim 3.1. Kantitatif PZR'da (qPZR)OSHK hastaları, OPMH hastaları ve sağlıklı kontrol grubu arasında miR-21 ve <i>PDCD4</i> ifade seviyeleri	72

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

μ l

Mikrolitre

ng

Nanogram

Kısaltmalar

Açıklamalar

cDNA

Komplementer deoksiribonükleik asit

cfDNA

Serbest dolaşan DNA

ctDNA

Dolaşan tümör DNA'sı

DTH

Dolaşımdaki tümör hücreleri

eIF4A

Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 1A

FFPE

Formalinle Fikse Edilmiş Parafine Gömülü

GLOBACAN

Küresel Kanser Gözlem Verisi

HPV

Human papilloma virüsü

miR-208a

MikroRNA-208a

miR-21

MikroRNA-21

miRNA

MikroRNA

OED

Oral epitelyal displazi

OEL

Oral epitelyal lezyon

OL

Oral lökoplaki

OPML

Oral potansiyel malign lezyon

OSHK

Oral skuamöz hücreli karsinom

PDCD4

Programmed hücre ölümü 4 geni

PZR

Polimeraz zincir reaksiyonu

qPZR

Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

RNA

Ribonükleik asit

1. GİRİŞ

Dünya üzerinde ciddi bir halk sağlığı sorunu haline gelen kanser, belirli bir zaman aralığında, hücre genomu içinde ard arda gelen mutasyonların (ya da epigenetik modifikasyonların) birikmesi sonucunda ortaya çıkan patolojik bir durumdur. Kanser, çok basamaklı olaylar bütünüdür ve klinik kanser Çizelgesunun ortaya çıkmasında yıllar süren bir latent period gerekmektedir. Son dönemlerde teknoloji ve görüntüleme yöntemlerinin gelişmesi ile hastalara daha erken tanı imkânı sunulmaktadır. Bununla birlikte kişiye özel tedavilerde dâhil olmak üzere, yeni geliştirilen tedavi yöntemlerinin hastaların sağ kalımında ilerleme sağladığı gibi hastalığa bağlı gelişen ölümleri de azaltmayı amaçlamaktadır.

Kanser ilişkili çalışmalarda sıklıkla kullanılan biyopsi materyali, formalin ile tespit edilmiş parafine gömülü (FFPE) doku örnekleridir. Doku biyopsi örnekleri girişimsel işlemler aracılığıyla hastalardan temin edilmektedir. Doku biyopsilerinin sunduğu avantajlar yanında dezavantajları da vardır. Bunlar; yalnızca belli bir bölgeden temin edilebilen doku örneklerinden metastazlar hakkında bilgi edinilmesindeki zorluğun yanı sıra bu doku materyallerinin hazırlanması aşamasında bazı kimyasal ön işlemlere dayalı yöntemlerin uygulanması genomik materyalde kalite düşüklüğüne neden olmakta bu da çalışılan testin sonucunu ve güvenilirliğini etkilemektedir. Kimi zaman da tümörün bulunduğu bölge materyal teminine uygun olmamaktadır. Tedavi altındaki hastalarda ise örneklerin yeniden eldesi bazen mümkün olmamaktadır. Bütün bu problemler, cerrahi işlemleri en aza indirecek yeni bir biyopsi materyali arayışını doğurmuştur.

Son yıllarda öne çıkan likit biyopsiler, herhangi bir vücut sıvısından (kan, idrar, tükürük, plevral efüzyon, beyin-omurilik sıvısı, gözyaşı, ter, sinoviyal sıvı...) elde edilen ve içeriği doku biyopsisi ile aynı özelliklere sahip biyomateryal olarak tanımlanır.

Vücut sıvılarındaki bileşenler analiz edildiğinde, likit biyopsilerin cerrahi işlem gerektirmemesi, hasta ve hekim açısından uygulama kolaylığının olması, gerek hasta açısından gerek tedavinin sürdürülebilirliği açısından pek çok avantaj sağlamaktadır. Cerrahi işlem gerektirmeden elde edilen kan ve tükürük materyali ile çalışmak, mevcut olan primer ve primer ilişkili sekonder tümörlere yönelik geniş kapsamlı veri eldesini, böylelikle de cerrahi girişimi en aza indirmeyi amaçlamaktadır.

Literatürde, tümör biyokimyası ve tümör genetiği ile ilgili yapılmış çok sayıda çalışma yer almaktadır. Son on yılda, bu çalışmalar arasında dikkat çeken biyobelirteçlerden bir tanesi de mikro ribonükleik asitlerdir (mikroRNA). Kodlama yapmayan bu küçük RNA sınıfında yer alan mikroRNAların hücre içindeki işleyişini ve hücreler arası iletişimi düzenlemede son derece önemli rol oynayan bir alt grup oldukları yapılan çalışmalarda oldukça dikkat çekmektedir. Başta prostat kanser, olmak üzere birçok malignitenin tanı ve tedavisinde özellikle likit biyopsilerde mikroRNA ların biyobelirteç olarak yer almaya başladığı görülmektedir.

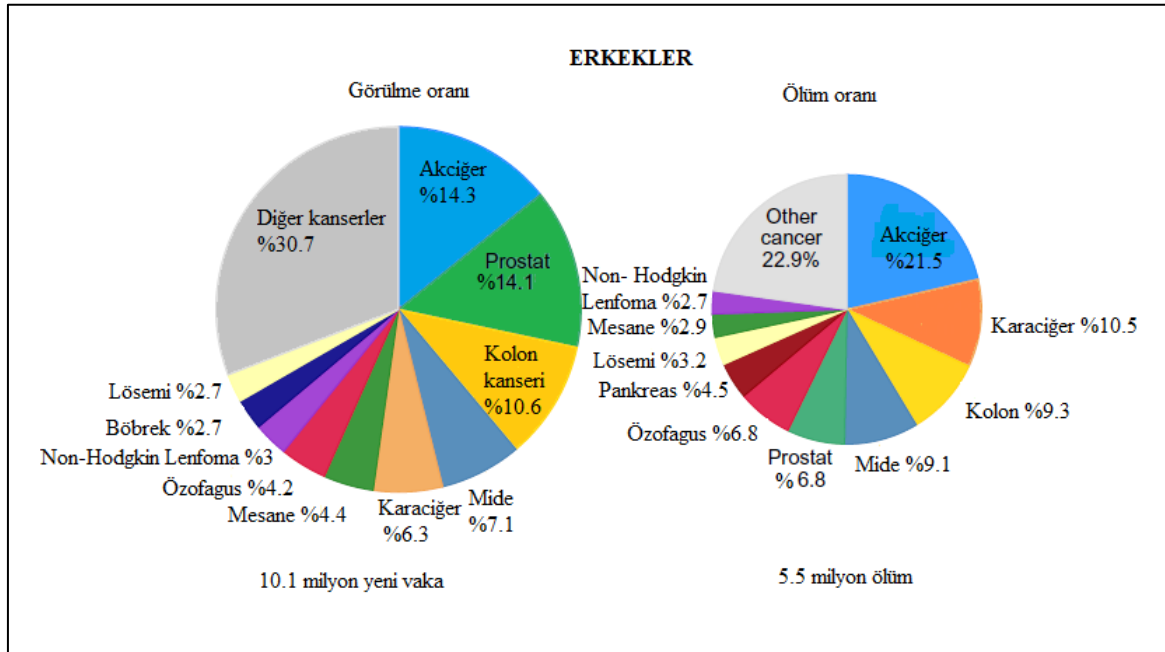
Bu tez kapsamında OSHK’de, kan ve tükürük örneğinde miR-208a-3p ve *PDCD4* geni ile ilgili bir çalışma da bulunamamıştır. Yine aynı şekilde OPML’de de kan ve tükürük örneklerinde miR-208a-3p ve *PDCD4* genleri ile ilgili literatürde bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Literatürdeki bu açığı kapatmak için OPML’nin OSHK’ya malign dönüşümünde önemli olabileceğini düşündüğümüz bu biyobelirteçlerin önemini araştırmak açısından hasta tükürük ve kanlarında erken tanıda kullanılabilirliğini ve klinik önemini değerlendirmek için bu tez çalışması tasarlanmıştır.

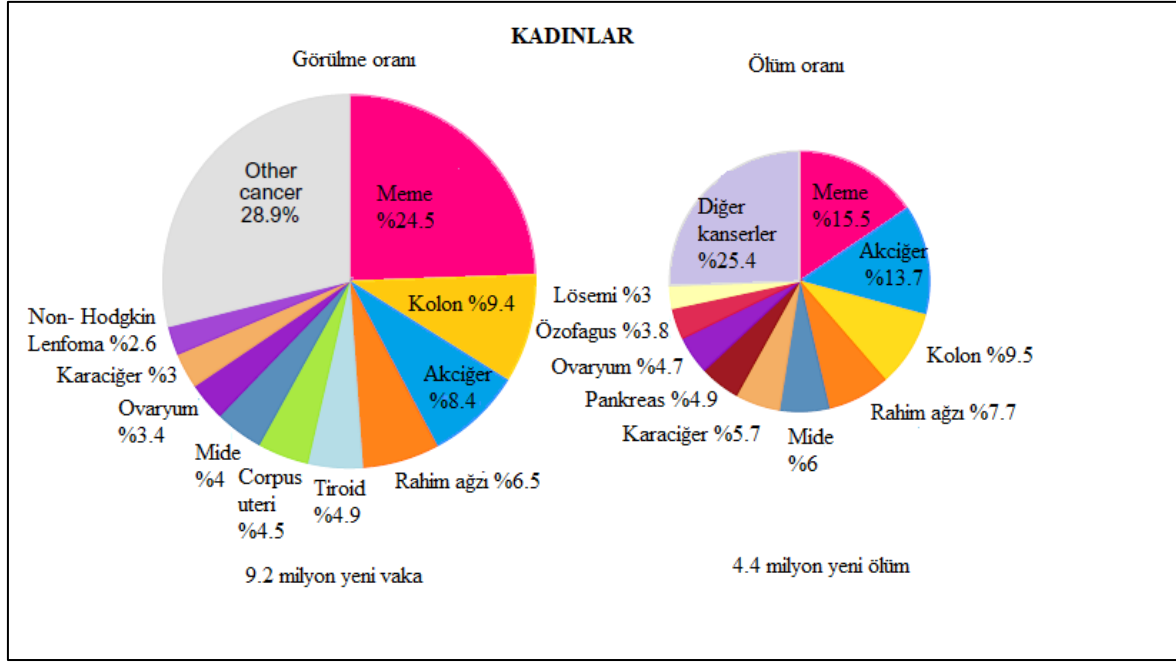
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Global Kanser Gözlem Veri Tabanı (GLOBACAN) 2020 verilerine göre 9,9 milyon ölümle sonuçlanan, kalp-damar hastalıklarından sonra dünya genelinde en sık görülen ikinci ölüm nedeni kanserdir. Akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer kanseri erkeklerde sırasıyla en sık görülen kanser türleri iken; meme, kolorektal, akciğer, rahim ağzı kanseri kadınlarda en sık görülen kanserlerdir [1]. 2040 yılına gelindiğinde sağlıksız beslenme, hareketsiz yaşam, sigara ve alkol gibi zararlı alışkanlıkların tüketimi azaltılmadığı sürece 2020 yılında bildirilen 19,3 milyon yeni vakanın % 47 oranında artacağı ve buna bağlı olarak kansere bağımlı ölümlerde de artış yaşanacağı beklenmektedir [1]. GLOBACAN verilerine göre 2020 yılında toplam 19 292 789 vakanın 9 958 133'ü ölümle sonuçlanmıştır [1]. Erkek ve kadınlarda görülen kanserler ve ölüm oranları sırasıyla Şekil 2.1 ve Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

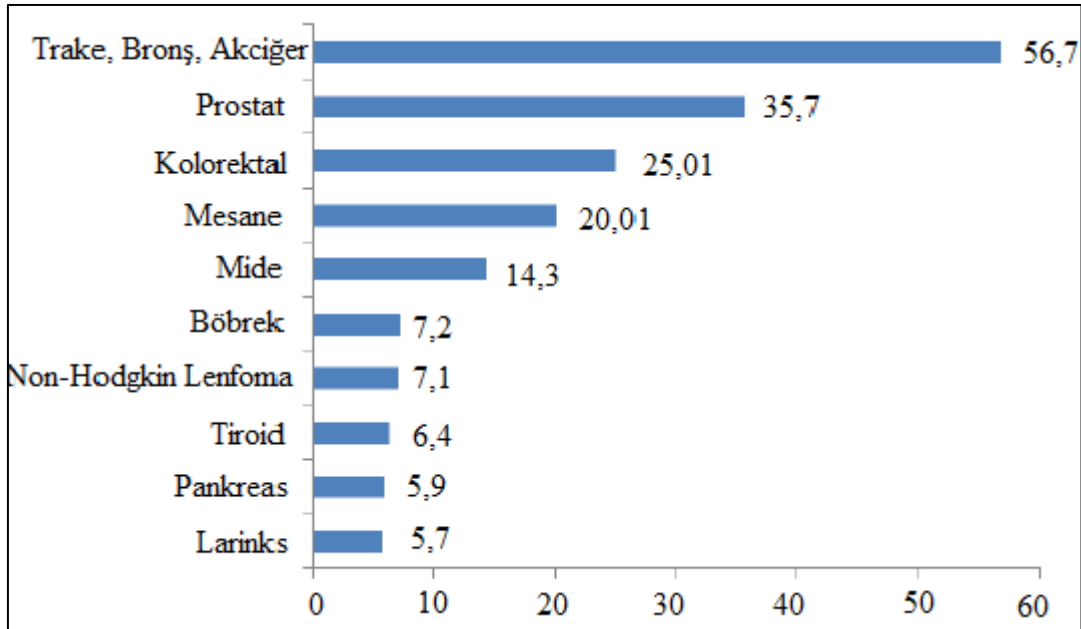


Şekil 2.1. GLOBACAN 2020 verilerine göre erkeklerde en çok görülen kanserler ve ölüm oranları [1].

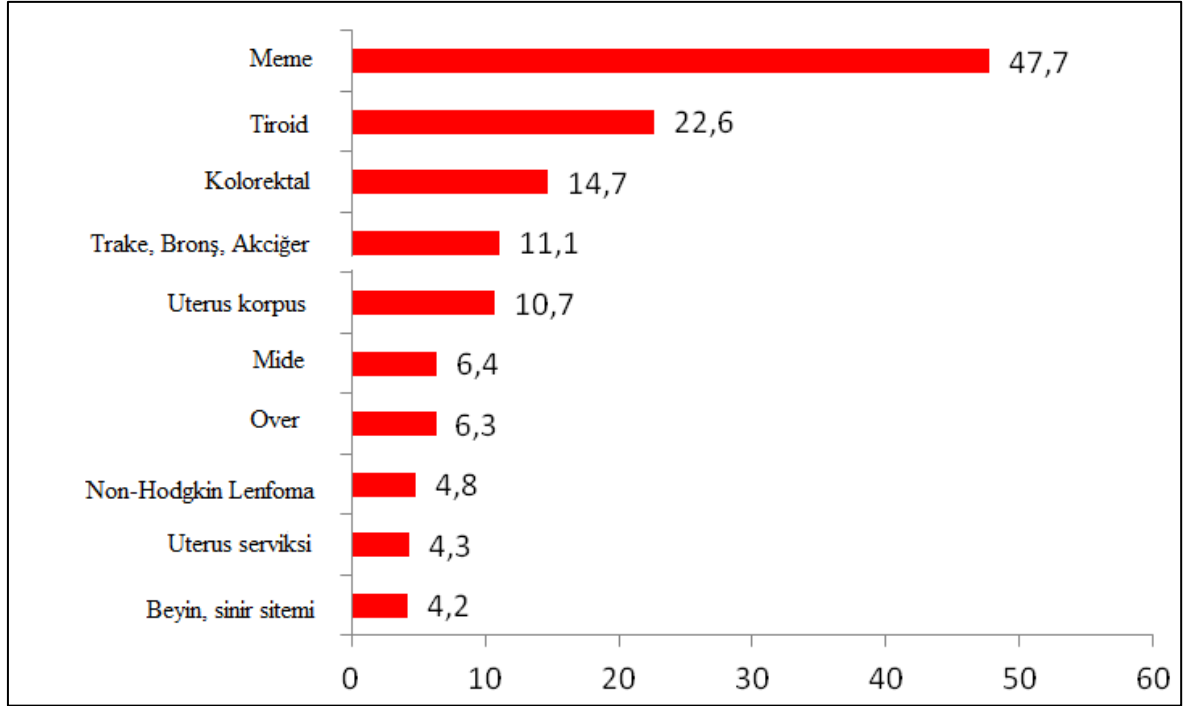


Şekil 2.2. GLOBACAN 2020 verilerine göre kadınlarda en çok görülen kanserler ve ölüm oranları [1]

2017 yılında yapılan “Türkiye Kanser İstatistikleri’ne” göre erkek ve kadınlarda yaşa göre görülen kanserlerin şekli ise sırasıyla Şekil 2.3 ve Şekil 2.4’ de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Erkeklerde en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Türkiye birleşik veri tabanı, 2017) (Dünya standart nüfusu, 100.000 kişide) [2]



Şekil 2.4. Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Türkiye birleşik veri tabanı, 2017) (Dünya standart nüfusu, 100.000 kişide) [2]

2.1.1. Oral skuamöz hücreli karsinom

Oral skuamöz hücreli karsinom (OSHK), oral kavitedeki tüm malign neoplazilerin %90'ını kapsayan oral mukozanın yüzey skuamöz epitelinden kaynaklanan en yaygın malign tümördür [3] (Resim 2.1). OSHK, dünya çapında yüksek morbidite oranları ve kötü prognoz ile ilişkili olmasının yanı sıra [4, 5] servikal lenf nodlarına ve uzak metastazlarla karakterize olan kanserdir [6]. GLOBACAN verilerine göre 2020 yılında toplam 377,713 kişi (264,211 erkek, 113,502 kadın) dudak ve ağız kanseri tanısı almış bunlardan da 177,757 (125,022 erkek, 52,735 kadın) vaka ölümle sonuçlanmıştır [1]. OSHK için geliştirilen kapsamlı tedavi yaklaşımlardaki önemli ilerlemelere rağmen [7, 8], hastalar için beş yıllık sağkalım oranı, yüksek metastaz ve nüks oranı nedeniyle cinsiyet farketmeksizin %50'nin altında kalmıştır [9, 10]. Sağkalım oranındaki düşük oran OSHK'nın oluşumu ve progresyonunun altında yatan moleküler mekanizmaların daha fazla anlaşılmasını zorunlu hale getirmiştir.



Resim 2.1. A. OSHK'nın klinik görünümü, B. OSHK'nın histolojik görünümü (HEX10) (Halil Erhan Ersoy, Sibel Elif Gültekin izniyle koyulmuştur).

2.1.2. OSHK epidemiyolojisi

Oral skuamöz hücreli karsinom, dünya çapında en sık görülen kanserler arasında onuncu sırada yer almaktadır [11]. OSHK indisansı dünyada coğrafik bölgelere göre değişkenlik göstermektedir. İnsidansın yüksek olduğu ülkelerin başında güney doğu asya ülkeleri ve Hindistan gelirken, ülkemizde bu oran batılı ülkelere benzer şekildedir (%2-2.5)[12]. OSHK'nın görülme sıklığı ile ölüm oranı, erkekler (%2,3 ve %1,7 sırasıyla) ve kadınlarla (%1,2 ve %0,8 sırasıyla) kıyaslandığında, erkeklerde 2 kat daha fazla görüldüğü bildirilmiştir [13]. Hastalığın önlenmesi ve tedavide önemli gelişmelerin bulunmasına rağmen tümörün kontrol edilememesi veya nüks etmesi sonucu tekrar ortaya çıkmasına ek olarak, erken tanı için uygun biyobelirteçlerin bulunmaması tanı sonrası 5 yıllık sağkalım oranını ciddi oranda düşürmüştür [14].

OSHK, en sık alt dudak mukozası ve dilin postero lateralinde izlenmekle birlikte , oral kavite içerisinde dilin yanısıra , ağız tabanı, yanak mukozası, diş eti, sert damak, yumuşak damak, ve retromolar bölge dâhil olmak üzere oral kavite kanserlerini içeren baş-boyun kanserinin bir alt kümesini oluşturmaktadır [15].

OSHK'da, yaş, kanserojen alışkanlıkların varlığı (alkol, tütün, çiğnenen tütün kullanımı) veya sosyo-ekonomik durum (yetersiz beslenme) gibi diğer sosyo-demografik faktörler, hayatta kalma oranlarıyla tutarlı bir şekilde ilişkili olduğu bulunmakta [16, 17] ve sağkalım oranları da hastalığa tanı verildiği evreye bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Hastalığın

başlangıç evresinde tanı konulması durumunda tedavi sonrası sağ kalım oranı %80-90 (Evre I) artarken, ileri evrelerde tanı konulduğunda sağkalım oranı %30'lara (Evre IV) kadar düşmektedir [18].

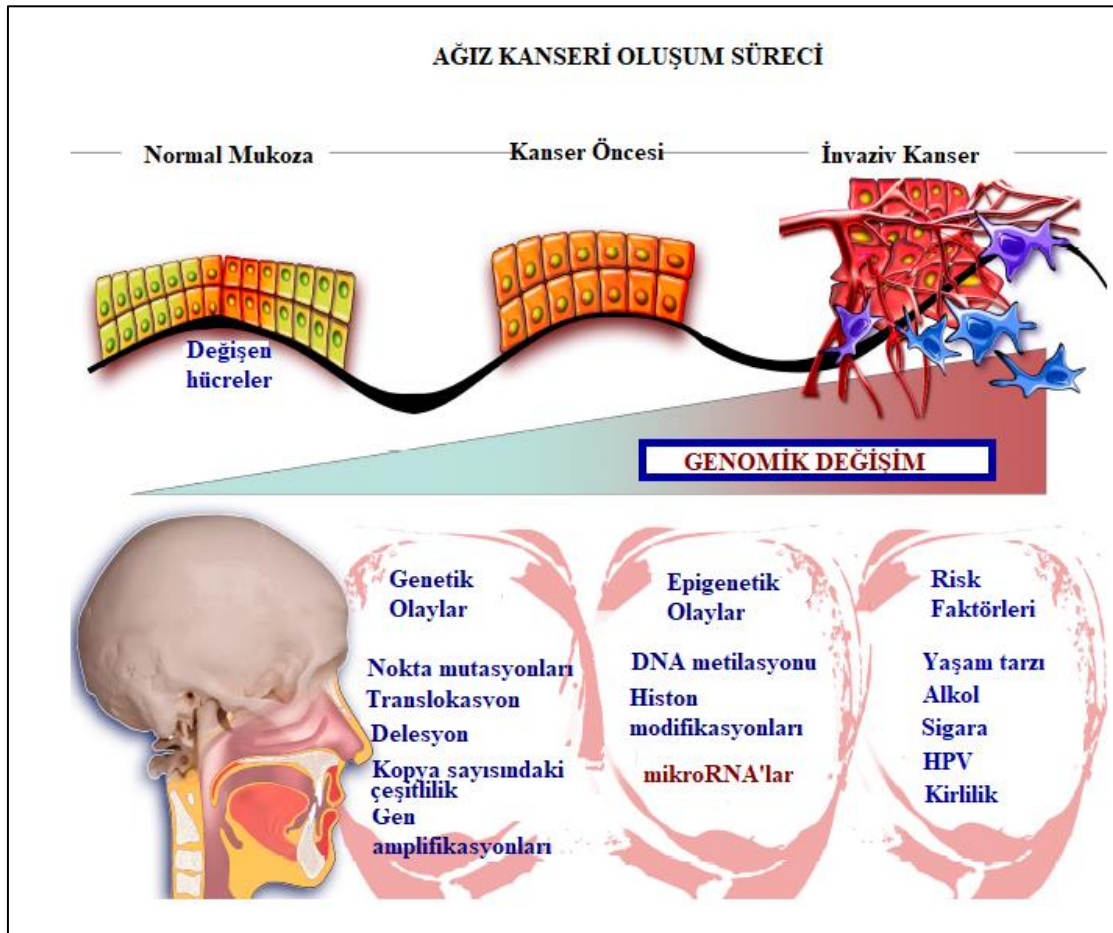
2.1.3. OSHK etiyolojisi ve risk faktörleri

OSHK; yaşlı erkeklerde, düşük sosyo ekonomik gruplarda ve etnik azınlık gruplarında en yaygın görülen kanserdir. OSHK'nın başlıca etiyolojik faktörleri, sinerjik kanserojen etkiye sahip olan tütün kullanımı ve alkol tüketimidir. Alkol, sigara kullanımı ve dumansız tütün kullanımı söz konusu olduğunda, OSHK oluşma olasılığı, bağımlılığı olmayan kişilere kıyasla 16 kattan daha fazla olabilir [19]. Ek olarak, insan papilloma virüsü (HPV) ve Epstein-Barr virüsü (EBV) enfeksiyonları, kötü ağız hijyeni, diyet (kötü beslenme, vitamin ve demir eksikliği) ve genetik faktörler ağız kanseri gelişimi ile ilişkilidir [20-22]. Bu risk faktörlerin yarattığı genetik ve epigenetik değişiklikler ise oral karsinogenezde yer almaktadır [23] (Şekil 2.5).

Sigara kullanımı OSHK'nın en bilinen risk faktörüdür. Sigara kullanmayanların, sigara dumanına maruz kalması bile OSHK riskini %85 oranında arttırmaktadır [14]. Sigara içeriğinde pre-kanserojen olan nitrozaminler, benzopirenler ve aromatik aminler bulunmaktadır. Sigara içeriğinde bulunan bu bileşiklerin ağız epitel hücrelerine mekanik hasar vermesinin yanı sıra hücrelerde oksidatif strestide arttırmaktadır. Oksidatif stres mutasyonların gelişmesine ve DNA'da kırık oluşumuna neden olmaktadır [14]. Tütün ve alkolün birlikte kullanımının OSHK'nın gelişme riskini, tütün ve alkolü birlikte kullanmayanlara göre on beş kat daha fazla arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [17, 23]. Genotoksik ve mutajenik etkilere sahip olan alkol tüketimi de oral mukozanın geçirgenliğini artırarak epitelin lipid bileşenlerini çözer ve epitel atrofisine neden olur. Aynı zamanda karaciğerin toksik ve kanserojen bileşikleri nötrleştirme yeteneğini de etkiler. Alkol ve sigaranın sürekli kullanımı immün sistemi zayıflatarak enfeksiyonlara ve malign neoplazilere karşı artan duyarlılığa yol açar [14, 19]. Bazı topluluklarda kültürel olarak tüketilen çiğnenen tütün (betel sterlini), areca fıstığı, esrar ve ülkemizde özellikle maraş otu kullanımı OSHK gelişim riskini artıran faktörler arasında yer almaktadır [24].

OSHK için risk fatörü olan insan papilloma virüsü (HPV)'de hastalığın gelişiminde öne çıkan önemli bir etkendir. HPV 16 ve 18 in özellikle tonsiller ve orofaringeal kanserlerin

yaklaşık %40'ında etkili olduğu bilinmekte birlikte, oral kanserlerin küçük bir bölümünde etyolojik rolü olduğu bildirilmiştir [25]. HPV varlığının tespiti, lokal olarak ilerlemiş orofarinks kanserlerde iyi bir prognostik biyobelirteçtir. HPV proteinlerinden E6 tümör baskılayıcı protein olan *p53*'ün, E7 ise retinoblastoma proteininin (*pRb*) yıkımını ve *p16* gen ifadesini artırır. Sonuç olarak hücre döngüsünün düzenlenmesi bozulur ve tümör gelişimi kaçınılmaz olur [26] (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Ağız kanseri gelişiminin etyolojisi ve risk faktörleri [27].

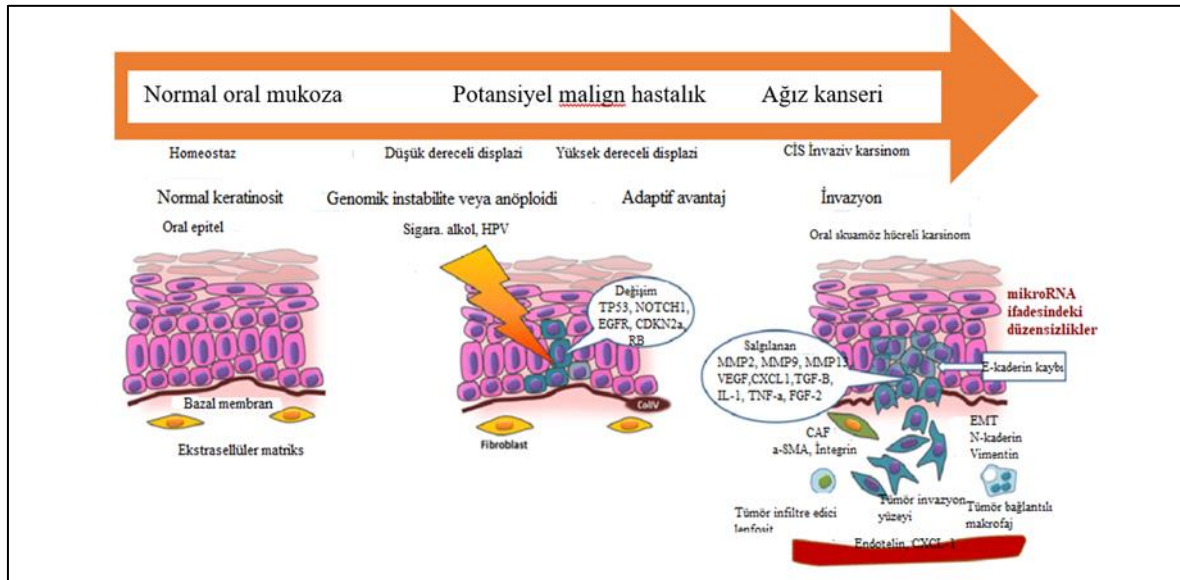
2.1.4. OSHK moleküler patogenezi

Kanser, hücre mutasyonlarının biriktiği ve başlama, ilerleme, proliferasyonun sürdürülmesi, sinyalleşme, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, hücre ölümünün önlenmesi, sürekli replikasyon, anjiyogenez, invazyon ve metastaza yol açan çok aşamalı bir süreçtir [28]. Genetik veya epigenetik faktörler aracılığı ile ortaya çıkan gen ifade farklılıkları sinyal yollarını doğrudan etkilemektedir. Sinyal iletimi mekanizmalarından meydana gelen

değişiklikler; tümör baskılayıcı mekanizmaların inaktivasyonu, onkogenlerin aktivasyonu ile hücre büyümesi, farklılaşması, çoğalması ya da apoptoz gibi moleküler biyolojik olayların dengesini bozmakta ve OSHK'nın moleküler patogenezinde rol oynamaktadır [29].

OSHK, baş boyun kanserlerinin alt tipleri arasında %10'luk kısmı oluşturmaktadır. Ağız kanserinin ilerlemesinde rol oynayan genleri ve bu genlerin ilişkili olduğu yolları ortaya çıkarmak ve anlamak önemlidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, glikojen sentaz kinaz 3 (*GSK-3β*), *c-Myc*, *AKT serine/threonine kinase 1 (AKT)*, *β-katenin*, *p53* ve nükleer faktör kappa B (*NF-κB*) gibi onkojenik sinyal yollarını incelemiş ve OSHK gelişiminde bu yolların önemi üzerinde durmuştur [28].

Bu sinyal yollarında bulunan örneğin *p16ink4a*, *p14ARF*, *pRB* ve *TP53* gibi tümör baskılayıcı genlerin baskılanması ve siklin D1 (*CCND1*), fosfoinositol 3-kinaz (*PI3K*) ve epidermal büyüme faktörü (*EGFR*) gibi onkogenik genlerin aktive edilmesi OSHK tümör oluşumunda oldukça etkilidir. OSHK gelişiminin moleküler düzeyde anlaşılabilmesi için bu sinyal yollarında etkin gen, miRNA ve proteinlerin anlaşılması büyük öneme sahiptir [28] (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. OSHK gelişiminde etki eden genetik, epigenetik ve çevresel faktörler [11]

2.2. Apoptoz

Apoptoz, ökaryotlarda normal gelişimin ve homeostazın sürdürülmesi sürecinde hücrelerin programlı olarak ölümünden sorumlu olan, genetik olarak düzenlenmiş bir hücre ölümü şeklidir [30]. Apoptoz, iki geniş konuda ele alınır:

1). Normal fizyolojik süreçlerin bir parçası olarak (fazla hücrelerin çıkarılması, hormon yoksunluğu üzerine hormona bağımlı dokuların involüsyonu, çoğalan hücre popülasyonlarında hücre döngüsü, potansiyel olarak zararlı reaktif lenfositlerin ortadan kaldırılması, akut inflamatuvar yanıtta nötrofiller ve bir immün yanıtın sonunda lenfositler gibi yararlı amaçlarına hizmet eden konakçı hücrelerin ölümü).

2). Birçok farklı hastalıkta hücre kaybının patofizyolojik mekanizması olarak (DNA hasarı, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi ve enfeksiyonlar gibi) [31].

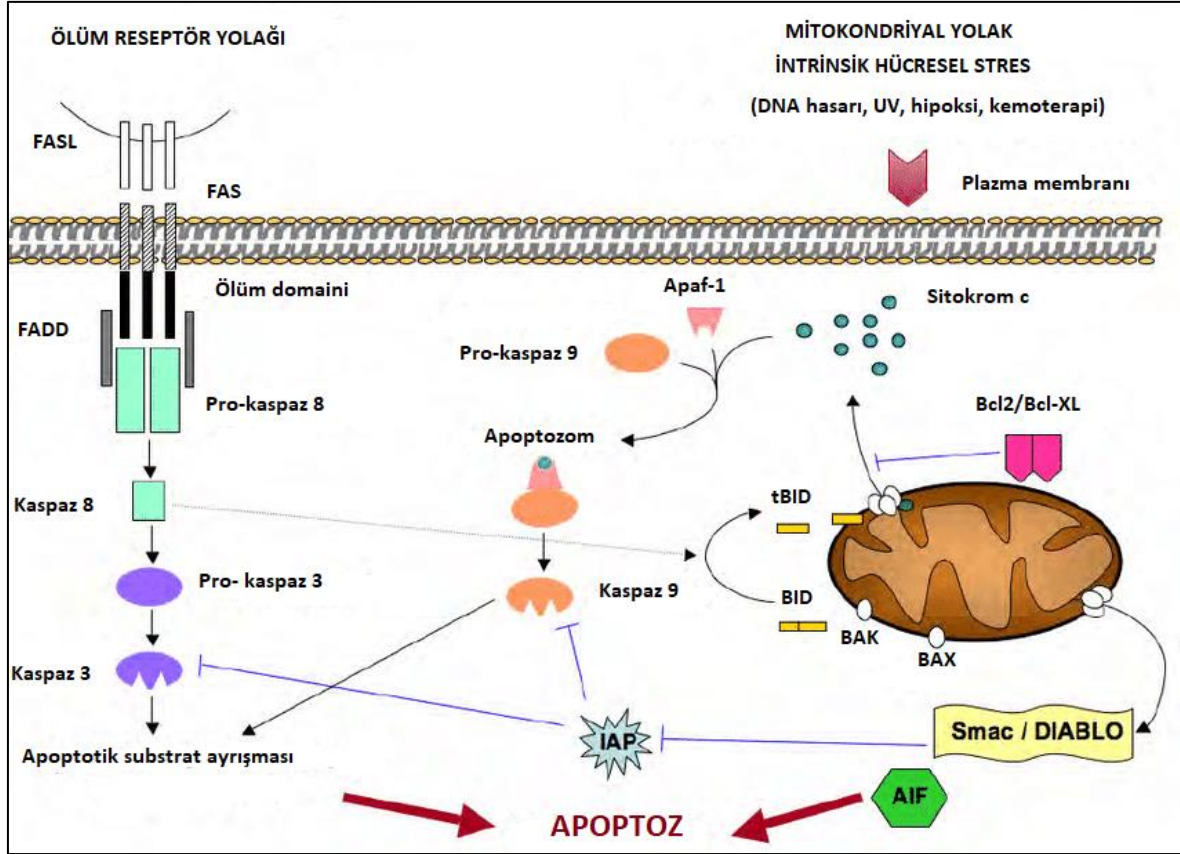
Apoptoz morfolojik bir olgudur ve ışık (veya tercihen elektron) mikroskobu yardımıyla bakıldığında, apoptotik hücrenin özellikleri arasında kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma (piknoz), plazma zarı kabarması ve hücre küçülmesi bulunur. Sonunda hücreler, inflamatuvar bir yanıtı teşvik etmeden fagositozla temizlenen küçük zarla çevrili parçalara (apoptotik cisimler) ayrılır ve fagositler tarafından ölü hücre parçaları, içerik dışarı sızmadan önce hızla yutulur [32]. Bu nedenle apoptoz, bir inflamatuvar reaksiyona neden olmaz. Apoptoz olarak tanıdığımız bu morfolojik değişikliklere ve genellikle bu fenomenle ilişkili biyokimyasal değişikliklere proteaz adı verilen enzimlerin aktivasyonu neden olur. Bu proteazların en bilineni kaspazlardır (aktif bölgelerinde bir sistein içeren ve aspartik kalıntılardan sonra proteinleri parçalayan proteazlar olarak bilinir) [33]. Birçok proteaz gibi, kaspazlar da aktif olmayan proenzimler olarak bulunur ve aktif hale gelmek için enzimatik bölünmeye uğramak zorundadır. Aktif kaspazların varlığı bu nedenle apoptoz geçiren hücreler için bir işarettir. Önemli fizyolojik bir süreç olarak apoptoz, hücreleri seçici olarak temizler ve ölümün düzenlenmesi için çok önemli bir mekanizma olarak kabul edilir. Sadece hücreler hasar gördüğünde veya dış stres altındayken değil, aynı zamanda normal hücre gelişimi ve morfogenez sırasında da ortaya çıkar [34].

Apoptoz mekanizması

Apoptoz genetik olarak kodlanan, hücresel veya dış uyaranlara yanıt olarak ortaya çıkan bir mekanizmadır. Apoptozu karakterize eden 3 özellik vardır. Bunlar; protein yarılanması veya hidrolizi, nükleer DNA'nın parçalanması ve apoptotik hücrenin fagositik hücreler tarafından tanınması olarak tanımlanır [35].

Şimdiye kadar, araştırmacılar iki ana apoptotik yol, yani her ikisi de nihâi hedefi hücre ölümü olan ekzojen ve endojen yollar tanımlamışlardır [35]. Bunlar arasında “ölüm reseptörü” yolu olarak da adlandırılan ekzojen yol hücre dışında proapoptotik uyaranlarla aktive olurken, endojen (mitokondriyal) yol, adından da anlaşılacağı gibi hücrenin kendi intrinsik mekanizmaları tarafından aktive edilir (Resim 2.2.) [35]. Apoptozdan kaçınma, kanser patogenezinde temel olan kanser gelişimine yol açabilir [35].

Apoptoz süreci, bazı kaspazların katalitik olarak aktif hale geldiği ve diğer kaspazların bir dizisini serbest bıraktığı bir başlangıç aşamasına ve bu sırada terminal kaspazların hücresel parçalanmayı tetiklediği bir yürütme aşamasına bölünebilir. Bu enzimlerin düzenlenmesi, proapoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin bolluğu ve aktivitesi arasındaki ince ayarlanmış dengeye bağlıdır [31].



Resim 2.2. Apoptozun mekanizması [36].

2.2.1. Mitokondri (İntrensek yolak) yolağı

Mitokondriyal yolak, DNA hasarı, radikal oksijen türleri, radyasyon, hormon veya büyüme faktörü yoksunluğu, kemoterapötik ajanlar, sitokinler ve glukokortikoidler gibi hücre streslere yanıt olarak hücre içinden başlatılır (Resim 2.2) [37]. Bu yolun başlatılması, kaspaz enzimlerini aktive ederek, apoptozu tetikleyecek olan mitokondrilere pro-apoptotik proteinlerin salınmasıyla sonuçlanır [38-41]. Mitokondri sitokrom c gibi önemli proteinleri içeren hayati bir organel, hücre canlılığını sürdüren enerjiyi (örneğin, ATP) üretmek için gerekli olan, ancak sitoplazmaya salındığında (hücrenin sağlıklı olmadığının bir göstergesi olan) apoptotik ölümü tetikler. Sitokrom c gibi proapoptotik proteinlerin salınımı, dış mitokondriyal membranın bütünlüğü ile belirlenir ve Bcl-2 protein ailesi tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir [31].

Mitokondriyal yolun apoptozu indüklemesindeki başarısı, proteinlerin B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) süper ailesinin proapoptotik ve anti-apoptotik üyeleri arasındaki aktivite dengesine

bağlıdır. Bcl-2 protein süper ailesi, adını foliküler lenfomada bulunan bir dizi proteinin ikinci üyesi olarak alır [42]. Bu aile, belirli B hücreli lenfomalardaki kromozomal translokasyonlar ve diğer anormallikler nedeniyle sıklıkla aşırı eksprese edilen bir gen olan BCL2'nin adını almıştır. BCL ailesinin 20'den fazla üyesi vardır ve Bcl-2 protein ailesi, yapısal benzerliklere ve fonksiyonel kriterlere göre 3 gruba ayrılır. Grup I anti-apoptotik aktiviteye sahipken grup II ve III hücre ölümünü teşvik eder [43].

Anti-apoptotik:

Bcl-2, Bcl-xl ve Mcl1 bu grubun başlıca üyeleridir; dört BH alanına sahiptirler (BH1-4 olarak adlandırılırlar). Bcl-2 ve Bcl-xl gibi anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri, ADP/ATP değişimini uyararak, mitokondriyal iç transmembran potansiyelini stabilize eder ve membranın açılmasını önleyerek mitokondriyal geçirgenlik kontrolünü uygular [44]. Bcl-2 ve Bcl-xL'nin aşırı ifadesinin, bir dizi insan malignitesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu proteinler ayrıca proapoptotik proteinler olan Bax ve Bak'ın etkisini engelleyerek de hareket ederler [38, 45, 46].

Proapoptotik

Bax ve Bak bu grubun iki prototip üyesidir. Bcl-2 ailesinin proapoptotik proteinleri, mitokondriyal bağlanma bölgelerine bağlanarak veya proapoptotik Bax/Bak aktivasyonunu tetikleyerek Bcl-2 ve Bcl-xl'nin anti-apoptotik aktivitesini bloke ederek apoptozu başlatır [47]. Aktivasyonda, Bax ve/veya Bak dış mitokondriyal membran içinde oligomerleşir ve geçirgenliğini artırır. Bax-Bak oligomerlerinin membranları geçirgen hale getirdiği kesin mekanizma henüz anlaşılmamış olmakla birlikte dış mitokondriyal zarı, zarlar arası boşluktan sitokrom c sızıntısına izin veren bir kanal oluşturdıkları düşünülmektedir [31]. Membranın geçirgenliği tehlikeye girdiğinde, sitokrom c salınır ve apoptoz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) adı verilen sitozolik bir molekül ile birleşir. Sitokrom c ve Apaf-1, bu kaspazın aktivasyonu için prokaspaz-9 ile birleşir. Bu üç maddenin bağlanması bir apoptozom oluşturur ve bu daha sonra prokaspaz-3'ü aktive eder. Smac/DIABLO gibi gizli adlara sahip diğer mitokondriyal proteinler, apoptozun fizyolojik inhibitörleri (IAP'ler) olarak işlev gören sitoplazmik proteinlere bağlandıkları ve bunları nötralize ettikleri sitoplazmaya girerler. IAP'lerin normal işlevi, kaspaz-3 gibi yıkıcı kaspazlar da dahil olmak

üzere kaspazların uygunsuz aktivasyonunu engellemek ve hücreleri canlı tutmaktır. Böylece, IAP inhibisyonu, kaspaz kaskadının başlatılmasına izin verir [31].

Düzenlenmiş apoptoz başlatıcılar

Bad, Bim, Bid, Puma ve Noxa dahil olmak üzere bu grubun üyeleri, yalnızca bir BH alanı, dört BH alanının üçüncüsü içerir ve bu nedenle bazen yalnızca BH3 proteinleri olarak adlandırılır. Yalnızca BH3 proteinlerinin aktivitesi, hücresel stres ve hasar sensörleri tarafından modüle edilir; yüksek ifade edilip aktive olduklarında apoptozu başlatabilirler (Robins 10. Baskı).

TP53 tanı anında kanserlerde yaygın olarak mutasyona uğrarken, *TP53* mutasyonlarının sıklığı, muhtemelen genotoksik tedavilere direnç iletmeye yetenekleri nedeniyle, tedaviden sonra nükseden tümörlerde daha da yüksektir. Fosfoprotein P53, hücre döngüsünü düzenleyen ve intrinsek mitokondriyal yolu indükleyebilen bir hücre stres sensörü molekülü olarak işlev gören bir transkripsiyon faktörüdür. İyonize radyasyon, genotoksik gibi DNA'ya zarar veren faktörler, ilaçlar ve serbest radikaller *p53*'ü aktive eder. Aktive edilmiş *p53*, öncelikle Bcl-2 gibi anti-apoptotik faktörlerin transkripsiyonunu baskılama veya Bax, insülin büyüme faktörü bağlayıcı protein-3 ve Fas reseptörünün yüksek ifadesi gibi pro-apoptotik faktörlerin üretimini indüklemeye kabiliyeti yoluyla apoptozu destekler [48, 49].

Bcl-2'nin aşırı ifadesi, tümör hücrelerinin apoptozdan korunmasına yol açan yaygın bir olaydır. Ortaya çıkan Bcl-2 fazlalığı, dönüştürülmüş lenfositleri apoptozdan korur. Bcl-2'yi aşırı ifade eden foliküler lenfomalar, büyük ölçüde hücre proliferasyonu yerine azaltılmış hücre ölümü yoluyla ortaya çıktıklarından, yavaş (yavaş büyüyen) olma eğilimindedirler. Kronik lenfositik lösemi gibi diğer tümörlerde, normalde Bcl-2 seviyelerini sınırlayan spesifik mikro-RNAların kaybı nedeniyle Bcl-2'nin yüksek ifadesi görülmektedir. Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyelerinin aşırı ifadesine yol açan birçok başka mekanizma, çok çeşitli kanserlerde gösterilmiştir [31].

Ölüm reseptörü (Ekstresek yolak) yolağı

Ölüm reseptörü yolağı, hücre yüzeyindeki proapoptotik bir molekül veya o reseptöre özgü ligandlar tarafından aktive edilen proapoptotik reseptörlerle başlar. Bu hücre ölüm

reseptörleri, en yoğun çalışılan üyeler olarak Fas reseptörü ve TNFR1 (Tümör Nekroz Faktör Reseptör 1) ile tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör süper ailesine aittir [50]. Fas, aktive edilmiş B hücreleri ve T hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde bulunur. Proapoptotik reseptörleri aktive eden ligandlar, Fas ligandını (FasL) ve TNF-a içerir [51-57]. FasL, aktive edilmiş T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından ifade edilir [51]. TNF-a, ağırlıklı olarak aktive monosit/makrofajlar ve lenfositler tarafından üretilir [58]. Ölüm reseptörünün hücre içi kısmı, ölüm domaini (ÖD) olarak bilinir ve üç veya daha fazla ölüm reseptör ligand kompleksi bir araya geldiğinde, ölüm domainleri birbirine yakın hale getirilir ve adaptör protein için bir bağlanma bölgesi oluşturulur. Adaptör proteini, o reseptöre özeldir (örneğin, Fas ile ilişkili ölüm domain [FADD] veya TNF reseptörü ile ilişkili dead domain [TRADD]). Bu ligand-reseptör-adaptör protein kompleksine ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) denir ve başlatıcı kaspaz 8 ve 10'un aktifleşmesine yol açar [59-62]. Bu kaspazlar artık kendi kendini işleyebilir ve aktif kaspaz enzim moleküllerini sitozole salabilir. Burada 3, 6 ve 7 efektör kaspazlarını aktive ederler [50, 57, 63] (Resim 2.2).

Apoptozun yıkım fazı

İntrensek ve ekstrinsek yollar, apoptozun son aşamasına aracılık eden bir kaspaz kaskadı aktive etmek için birleşir. İntrensek mitokondriyal yol, başlatıcı kaspaz-9'u aktive ederken, ekstrinsek ölüm reseptörü yolu, kaspaz-8 ve kaspaz-10'u aktive eder. Bu kaspazların aktif formları, daha sonra birçok hücresel bileşen üzerinde hareket eden kaspaz-3 ve kaspaz-6 gibi yıkım kaspazlarının hızlı ve sıralı aktivasyonunu tetikler. Örneğin, bir kez aktive edildiğinde bu kaspazlar bir DNaz inhibitörünü parçalayarak DNaz'ı enzimatik olarak aktif hale getirir ve DNA bozunmasının başlamasına izin verir. Kaspazlar ayrıca nükleer matriksin yapısal bileşenlerini proteolize eder ve böylece çekirdeklerin parçalanmasını destekler. Apoptozdaki diğer adımlar daha az iyi tanımlanmıştır [31].

2.3. OSHK Tedavisi ve Prognozu

OSHK'nın tedavisi, tümörün evresine, hastanın genel sağlığına ve tümör dokusunun lokalizasyonu gibi faktörlere bağlıdır [64]. Erken evrede tanı konulan OSHK hastalarında radyoterapi (RT) tercih edilirken, ileri evrede tanı konulan kanser hastaları için cerrahi ve/veya kemoradyoterapi (KRT) yöntemlerinin ortak kullanımı ile tedavi mümkün

olmaktadır. Günümüzde hastalarda ise OSHK'yı kontrol altına almak için kombine tedavi, tamamlayıcı tedavi ve profilaktik tedavi daha fazla tercih edilmektedir [65].

OSHK'nın kemoterapi ile tedavi yöntemleri arasında, sisplatin [66], karboplatin, 5 - fluorourasil [67], metotreksat [68], taksanlar; paklitaksel [69] [70] ve dosetaksel [70] gibi antikanser ilaçlar yer almaktadır.

Monoklonal antikorlar ve gen terapisi gibi hedefe yönelik moleküler tedaviler de son zamanlarda OSHK'da kullanılmaya başlanmıştır. Bu tedavilerin radyoterapi veya kemoreterapiye göre avantajı yan etkilerinin daha kısıtlı olması ve hedefe yönelik tedavi içeriyor olmasıdır. Moleküler tedavilerde temel olarak *EGFR*, *Siklooksijenaz-2 (COX-2)*, *Peroksizom Proliferatörü* ile *Aktive Olan Reseptör y (PPARy)* ve *Progesteron reseptörü* hedef alınmaktadır. Bu moleküller, OSHK'nin proliferasyonu ve farklılaşmasında önemli rolü olan moleküllerdir [71].

2.4. Oral Premalign Lezyonlar

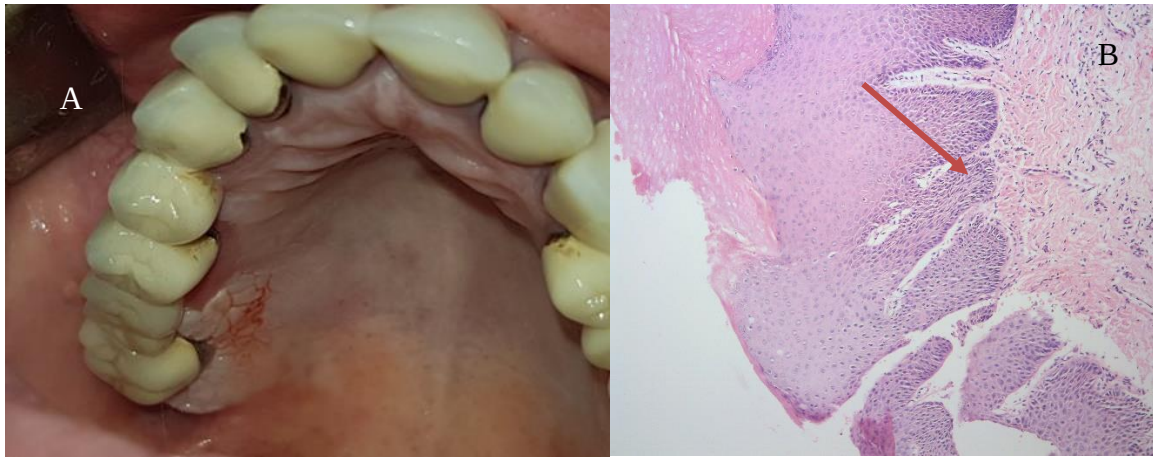
2.4.1. Tanım ve sınıflama

Ağız mukozasında OSHK gelişme ve OSHK'ya ilerleme riski bulunan lezyonlar oral 'pre-malign', 'pre-kanseröz veya oral potansiyel malign lezyon (OPML) olarak tanımlanmaktadır. Birbirinden farklı etyoloji, risk faktörleri, klinik ve histolojik görünimleri bulunan lezyonlar dünya sağlık örgütü (DSÖ) 2020 sınıflamasına göre şu şekilde sınıflanmaktadır.

- ✓ Lökoplaki (OL)
- ✓ Proliferatif verrüköz lökoplaki (PVL)
- ✓ Eritroplaki
- ✓ Oral liken planus (OLP)
- ✓ Oral submuköz fibrozis (OSF)
- ✓ Aktinik keratoz/ Aktinik şelitis
- ✓ Tütün kullanımına bağlı oluşan hiperkeratozlar
- ✓ Oral lupus eritematöz
- ✓ Konjenital diskeratoz

- ✓ Oral likenoid lezyonlar (OLL),
- ✓ Oral greft versus host hastalığı (OGVHH) [72].

Lökoplaki, klinik uygulamada ve popülasyon araştırmalarında karşılaşılan en sık görülen ve en çok çalışma yapılan OPML olma özelliğini taşımaktadır [72]. DSÖ 2007'de lökoplaki tanımını "Kanser için artmış risk taşımayan, bilinen hastalıkları veya bozuklukları dışlayan, şüpheli risk taşıyan ağırlıklı olarak beyaz plak görünümlü" olarak yapmıştır [73]. Klinik bir terim olan lökoplaki, homojen ve homojen olmayan şeklinde başlıca iki gruba ayrılır. Homojen olmayan lökoplakiler içerisinde verrüköz lökoplaki, nodüler lökoplaki, benekli lökoplaki (eritrolökoplaki) yer almaktadır. Resim 2.5'de OL'nin klinik ve histolojik görünümü verilmiştir. Özellikle, proliferatif verrüköz lökoplaki ve eritroplaki ise malign transformasyon potansiyeli en yüksek antiteler içerisinde yer almaktadır.



Resim 2.3. A. Lökoplaki'nin klinik görünümü, B. Düşük dereceli displazinin histolojik görünümü (HEx40). (Halil Erhan Ersoy, Sibel Elif Gültekin izniyle koyulmuştur)

2.4.2. OPML epidemiyolojisi

Oral lökoplaki (OL), yapılmış olan son çalışmalarda, dünya çapında %2,6 [74] veya %4,1 [75] görülme sıklığı bildirilen en yaygın potansiyel malign lezyonlardan biridir. OL'nin rapor edilen malign transformasyon oranı % 0.13 ile % 40.8 arasında değişmektedir ve yıllık malign transformasyon oranı %1 ile %3'tür [76-78]. Birkaç klinik ve histopatolojik özellik, özellikle epitelyal displazinin varlığı, OL'nin prognozunu etkileyebilir. Displazinin varlığı ve derecesi şu anda OL'nin malign dönüşümünü öngören en çok kullanılan prognostik faktörlerdendir [79, 80].

Eritroplaki, %0.02 ile %0.83 görülme sıklığı ile nispeten daha nadir görülür ve genellikle yüksek dereceli displazi veya SHK'yı temsil eder [81]. Eritroplakinin %14 ile %50 arasında malign dönüşüm oranına sahiptir [82].

Oral liken planusun (OLP) malign potansiyel oluşturma kapasitesi ve diğer likenoid koşulları tartışma konusu olmaya devam etmektedir. OLP için, geniş bir metaanaliz çalışmasında, %1,14'lük bir malign transformasyon riski belirlenmiştir [83].

Oral mukozanın sertleşmesi ile ilerleyen inflamatuvar bir hastalık olan oral submuköz fibrozis (OSF), Güneydoğu Asya'da areca fındık ürünleri kullanan hastalarda yaygın olarak görülür [84]. Oral epitelyal displazinin varlığı yaklaşık %25'tir ve malign transformasyon oranı %3 ile %19 arasında değişmektedir [84, 85].

Proliferatif verrüköz lökoplaki (PVL), geleneksel risk faktörlerinden bağımsız olarak, ağırlıklı olarak yaşlı kadınlarda meydana gelen multifokal lökoplaki ile karakterizedir [86]. PVL'li hastalarda malign transformasyon riski yüksektir (% 60 ile %100), total eksizyondan sonra sık nüks (% 87 ile % 100) ve yüksek ölüm oranlarına (% 30 ile % 50) sahiptir [87].

Aktinik şelitis, UV radyasyonundan kaynaklanan, dudaklarda rastlanan ve en sık 50 yaşından büyük erkeklerde görülen potansiyel malign lezyondur. Tahmini malign transformasyon oranı %10 ile %30 arasındadır ve dudakta genellikle SHK gelişiminden önce aktinik şelitis görülür [88, 89].

OPML'lerin maligniteye transformasyonunu belirleyen en önemli özellik mikroskop altında epitelde meydana gelen değişikliklerdir.

2.5. Oral Epitelyal Displazi

Displazi kelimesi genel anlamıyla anormal büyümeyi ifade eder [90]. Epitel dokusu ve epitel hücrelerinde görülen kanserleşme yönündeki değişiklikler ise displazi olarak tanımlanır [90]. Displastik değişiklikler en sık olarak çok katlı yassı epitelde görülür [80]. İlk olarak serviks epitelinde tanımlanmış olan bu değişiklikler daha sonra ağız, farinks, larinks ve bronş mukozalarını döşeyen skuamöz epitel tabakasında da görülmeye başlanmıştır [80]. Ağız mukozasının beyaz veya kırmızı lezyonları epitel hücrelerinde gözlenen displastik

değişiklikler; “Oral epitelyal displazi” olarak tanımlanır ve o oluşumdaki kanserleşme eğilimini gösteren en önemli bulgu olarak değerlendirilir. Displastik değişikliklere neden olan faktörler ortadan kaldırıldığında, displastik değişiklikler normale döner [91]. “Epitelyal displazi” DSÖ tarafından, oral kanserin öncü lezyonu olarak tanımlanmaktadır. Şiddeti arttıkça invaziv karsinoma dönüşme potansiyeli artmaktadır.

Epitel dokusunda görülen displastik değişikliklerin sınıflandırılması, Binary sisteme [92] göre hücresel ve yapısal bozuklukların türüne ve miktarına bağlı olarak; düşük displazi ve yüksek displazi iken, DSÖ’ye göre hafif displazi, orta displazi ve ağır displazi olarak derecelendirilirler.

DSÖ’nün 2022 sınıflamasına göre oral epitelyal displazinin mikroskopik değerlendirilmesinde kullanılan tanı kriterleri aşağıda sıralanmıştır [93].

Hücresel değişiklikler:

- ✓ Nükleusun anormal derecede büyümesi, değişik büyüklükte nükleusların birarada bulunması (Anizonükleozis),
- ✓ Hücrenin anormal derecede büyümesi ve değişik büyüklükte hücrelerin varlığı (Anizositozis),
- ✓ Nükleolusun büyümesi ve sayıca artış göstermesi,
- ✓ Atipik mitozlar,
- ✓ Nükleus/sitoplazma oranının artması,
- ✓ Nükleus şeklinin anormal olması (Nükleer pleomorfizm),
- ✓ Hiperkromazi.
- ✓ Mitotik aktivitede artış,
- ✓ Çekirdek boyutunda artış,
- ✓ Tek hücre keratinizasyonu,
- ✓ Apoptotik mitoz.

Yapısal değişiklikler:

- ✓ Epiteldeki tabakalaşmada düzensizlik,
- ✓ Tek hücrelerde erken keratinizasyon (Diskeratoz),

- ✓ Mitozların artması,
- ✓ Mitotik figürlerin artması,
- ✓ Su damlası görünümünde retelerin varlığı,
- ✓ Retelerde keratin inciler,
- ✓ Bazal hücrelerde kümelenme/yuvalanma
- ✓ Geniş proliferatif alan,
- ✓ Epitelde mitozun artması,
- ✓ Generalize prematür keratinizasyon,
- ✓ Epitelyal hücrelerde kohezyon kaybı,
- ✓ Bölgeye özel farklı keratin paternleri,
- ✓ Verrüköz veya papiller yapılanma,
- ✓ Minör tükürük bezi kanallarına kadar değişikliklerin ulaşması,
- ✓ Keskin sınırla değişikliklerin kesilmesi,
- ✓ Displazinin multipl farklı paternleri,
- ✓ Multifokal veya atlayan lezyonlar.
- ✓ Mitozların artması,
- ✓ Anormal yüzeyen mitoz,
- ✓ Prematür tek hücre keratinizasyonu [94].

Ağız mukozasında görülen değişik derecelerdeki displastik lezyonların OSHK'ya dönüşme riskleri de farklıdır. Düşük derecede displazi tanısı alan vakalarda OSHK'ya dönüşüm oranı %17,7 iken, yüksek derecede displazi gösteren vakalarda ise %57,9 oranında OSHK'ya dönüşme riski bulunmaktadır [95].

2.6. OPML'nin Etyolojisi ve Risk Faktörleri

Oral epitelyal lezyon (OEL) gelişiminde; alkol, tütün kullanımı ve insan papilloma virüsü (HPV) rol oynamaktadır. Tütün kullanımının bırakılmasıyla birlikte OEL lezyonunda gerileme veya tamamen ortadan kaybolma olduğu gözlenmiştir. Bazı çalışmalarda alkol ve tütün kullanımıyla ilgili şüpheli veriler ortaya çıkmaktadır. Bu sonuçlara göre hiç tütün kullanmamış kadınlarda görülen OEL'lerin kansere dönüşme riskinin yüksek olması, tütün ile ilgili bilgilerde şüphe yaratmaktadır [96, 97]. OPML vakalarının çoğunu orta-yaşlı veya yaşlı hastalar, ağırlıklı olarak erkekler oluşturmaktadır [97, 98].

HPV ile yapılan araştırmalarda OEL'de HPV pozitifliği gösterilmiş ancak HPV'nin kansere dnüşmede OEL'nin epitel hücreleri üzerindeki nasıl bir etkiye sahip olduğu ve nasıl bir rol oynadığı tam olarak anlaşılamamıştır [87].

Hindistan'da sigaranın ters içilmesi ve tütünün çiğnenmesi nedeniyle yanak mukozasında ve dudaklarda oluşan oral epitelyal lezyonlar daha yüksek oranda kansere dönüşme riski taşırlar. Uzakdoęu, Avrupa ve ABD'de ise ağız tabanı ve dilde yerleşim gösteren lezyonlar kansere dönüşüm açısından daha yüksek riskli bulunmuştur [99].

2.7. OPML ve Displazinin 'nin Moleküler Patogenezi

OPML'nin gelişmesinde ve maligniteye ilerlemesinde çeşitli genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin varlığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. OPML displazisi ve/veya malign transformasyonun potansiyel belirteçleri olarak birkaç gen/protein ortaya çıkmıştır. En kapsamlı olarak incelenen örnekler arasında *p53*, Cyclin D1 ve podoplanin (*PDPN*) bulunur. Lökoplaki/eritroplaki'nin yaklaşık %50'si *p53*'ü aşırı ifade eder [100] ve artmış *p53* ifadesi ağır displastik lezyonlarda düşük dereceli displastik lezyonlarla kıyaslandığında daha yüksektir [100].

Eritroplakide *p53* mutasyonunun görölme sıklığı %46 sıklıkta rapor edilmiştir [101]. Aynı şekilde kromozomların 7 ve 17 polisomisi, gibi genetik değişiklik veya *Rb*, *p53* veya (*DCC* netrin 1 reseptör (*DCC*) gen bölgesinde 9p, 3p'de alelik kazanç eritroplaki ile ilişkilendirilmiştir [102-104].

Literatürde bulunan araştırmalar, kromozom kolları 3p ve 9p'nin heterozigotluk kaybını (LOH) (lökoplaki'nin %50'sini içerir) [105], oral lökoplaki'de artmış malignite potansiyeli ile ilişkili olduğunu göstermiştir [106]. Heterozigotluk kaybı (LOH), bir fonksiyonel alelin kalan tek kopyasını spesifik olarak etkileyen genomik materyal kaybının bir sonucu olarak somatik bir hücrede meydana gelir. OSHK'da değiştiği bilinen çeşitli kromozomal lokuslarda LOH ve alelik kazanç için oral eritroplaki ve lökoplaki lezyonlarını inceleyen Partridge ve diğerlerinin [103] yaptığı çalışmada, oral eritroplaki lezyonlarının *pRb* geni, *p53* geni veya *DCC* geni içinde 9p, 3p'de heterozigotluk kaybı (LOH) veya alelik kazanıma sahip olabileceğini belirtmişlerdir. Malign dönüşümün, en fazla atrofik veya eroziv tipteki OLP vakalarında gröldeğünü bildirilmiştir [107]. *APC* mutasyonlu LOH, oral kanserlerde

sıklıkla saptanmamış olsa da, birçok çalışma oral skuamöz hücre kanserlerinin %25'inde LOH'yi tanımlamış ve %53,8'i LOH'yi göstererek daha yüksek bir oran ileri sürmüşleridir [108]. Bu nedenle *APC*, *B-katenin* ile etkileşimi yoluyla *Wnt* sinyal yolunun düzenlenmesindeki fonksiyonlarından dolayı OSF-OSHK'nin malign dönüşümünde rol oynadığı bildirilmiştir [109].

Proliferatif verrüköz lökoplaki (PVL), ploidi seviyesinde genetik değişiklik içerir [110]. PVL'nin %89.2'sinde anöploidi bulunur [111]. LOH, PVL'de en sık görülen değişikliktir ve en sık 9p21'in (*INFα*, D9S1748 ve D9S171) allelik kaybı görülmektedir. Hafif ve orta derecede epitel displazisi gösteren PVL vakalarının doku belirteçlerinde artmış p53 ve MCM2'nin yüksek ifadesi rapor edilmiştir bu da artmış G0-G1 hücrelerinin daha yüksek bir oranını yansıtmaktadır [111, 112]. Shin [113] ve Christensen [114] ayrıca oral premalign lezyonlarda *EGFR* ifadesinin arttığını bulmuştur. Ayrıca, PVL'de yüksek TGF-α seviyeleri saptanmıştır [115].

Dönüştürücü büyüme faktörü-α (TGF-α) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), oral keratinositlerin normal büyümesi ve farklılaşmasında rol oynar. EGFR ailesi, reseptör heterodimerleri oluşturma ve aralarında haberleşme özelliğine sahip EGFR (c-erbB1 veya Her1), c-erbB2 (Her2-neu), c-erbB3 (Her3) ve c-erbB4 (Her4) içerir. Hem EGF hem de TGF-α, EGFR'ye bağlanan ligandlardır [116]. Srinivasan ve Jewell [117], malignitenin ara belirteçleri olarak displazili premalign lezyonlarda *EGFR* ve ligandı TGF-α'nın ifadesini değerlendirdi. Ayrıca, displastik olmayan lezyonlarla kıyaslandığında, displazi riskinin artan *EGFR* ifadesi ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir [117].

Bir çalışma, mikro uydu analizi ve *Myc*'e sentromerik bölgenin en az bir yeni değişikliğin varlığını destekleyen karşılaştırmalı genomik hibridizasyon kullanılarak kromozom 8q21-24 üzerinde çoklu değişiklikler göstermiştir ve bu durum epitelyal displazili vakaların %52'sinde bulunmuştur [118].

Rousseau ve diğerleri [119], *siklin D1* geninin hafif displazilerin %41'inde, orta dereceli displazilerin %45'inde ve ağır displazilerin %24'ünde amplifiye edildiğini ve bunların da displazi derecelerine bağlı olarak protein miktarlarında yüksek ifade edildiklerini göstermişlerdir. Ayrıca, *siklin D1* amplifikasyonunun yüzdesinin preneoplastik lezyonların şiddeti ile orantılı olduğu bildirmişlerdir [120]. Bu nedenle, birkaç bağımsız çalışmadan

yapılan çıkarım sonucunda, *siklin D1* ifadesinin epitelde gözlenecek displastik değişimin saptanmasında kullanılacak bir biyobelirteç olduğunu düşündürmektedir [121].

Tümör baskılayıcı protein P53, hücresel etkilerini, yani bir hücre döngüsü kontrol noktası molekülü ve bir apoptoz düzenleyicisi olarak, esas olarak hücre döngüsü durması ve apoptozda yer alan hedeflerin transaktivasyonuna yol açan transkripsiyon fonksiyonu ile ortaya çıkarır [122]. Mutant P53'ün, immünohistokimya yoluyla kolayca saptanabilmesi için uzun bir yarı ömre sahip olduğu düşünülmektedir. P53'ün genetik tutulumunun araştırılmasına ek olarak, oral epitelyal displazide ve ayrıca oral karsinoma yakın displastik epitelde P53 aşırı ifadesini göstermek için yapılan girişimleri içeren çok sayıda çalışma vardır [123-125]. Yine benzer şekilde Niwa ve diğerleri (2001) in vivo yapmış oldukları çalışmada, pRb'nin azalmış fonksiyonunun, özellikle displazilerde malignite öncesi aşamada başlayabileceğini göstermişler ve pRb kaybı hiperplaziden displaziye geçişte rol oynadığını, pRb ve p53 yollarının ise malign fenotipin edinilmesi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

2.8. Likit Biyopsiler

2.8.1. Likit biyopsilerin tanımı

Doku biyopsileri ile çalışmak tümörün tanımlanmasında altın standart olmasına rağmen, bu yöntem hem cerrahi işlem gerektirmesi hem de bazı anatomik bölgelere ulaşımındaki zorluklardan dolayı birçok sınırlama getirmektedir [127]. Tümörler, farklı değişiklikleri barındıran çeşitli hücre alt popülasyonlarını içeren heterojen oluşumlardır [128]. Ek olarak, tümör hücreleri zaman içinde genetik ve epigenetik değişikliklere uğrarlar [129]. Tümör hücresinin bu kadar çok değişikliğe uğraması; tümöral heterojeniteye, primer ve metastatik lezyonlar arasında tutarsızlıklara neden olmaktadır [127]. Bu nedenle, bölgesel ve süresel olarak sınırlı doku biyopsileri, genel tümör profilini temsil etmede, farklı bölgelerdeki değişiklikleri yakalamada ve sonuç olarak hastalığın ilerlemesini izlemede başarısız olabilmektedir [130].

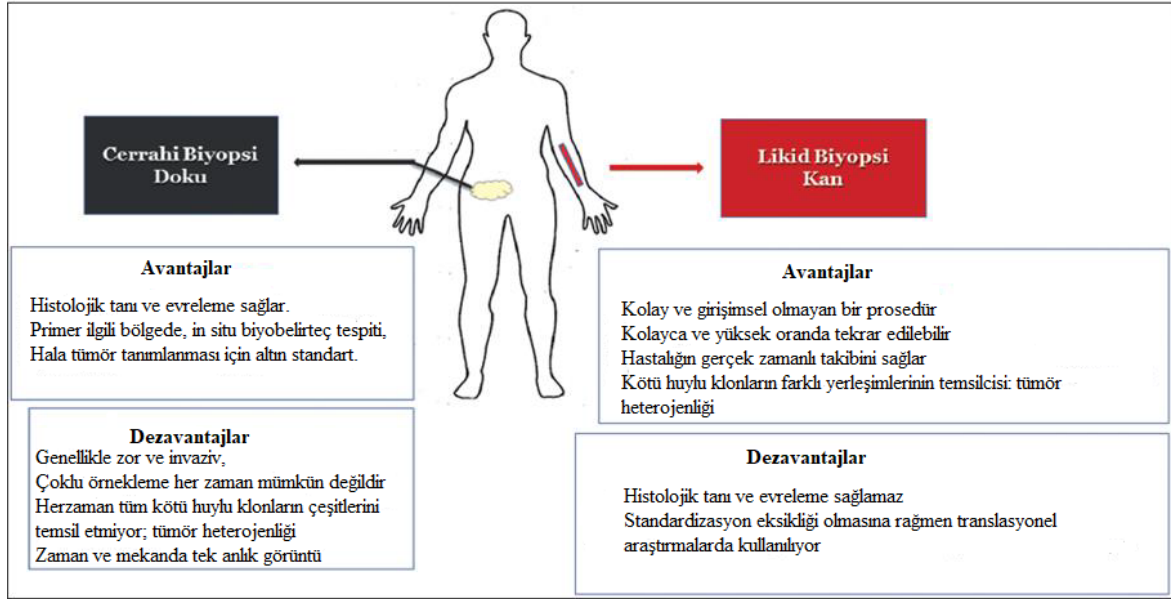
Doku biyopsilerinin elde edilmesindeki zorluklar ve yetersizlikler göz önüne alındığında, son yıllarda onkoloji araştırmaları, dolaşımdaki tümör hücreleri (DTH'ler) dâhil olmak üzere kanser kaynaklı bileşenlerin saptanmasına dayanan likit biyopsilere odaklanmıştır [127, 131-138]. Likit biyopsi (LB), kanser doku biyopsisi yerine kan, tükürük veya idrar gibi

kanseri tespit etme, analiz etme ve izleme olanağı sağlar. Likit biyopsi tekniği, “kan, idrar ve tükürük gibi çeşitli vücut sıvılarından elde edilen ve tümör hücrelerinin dolaşıma saldığı serbest DNA parçalarını tespit etmek amacıyla kullanılan bir test olarak tanımlamaktadır.”

Likit biyopsilerin avantaj ve dezavantajları

Likit biyopsi, geleneksel doku biyopsisi ile kıyaslandığında birkaç belirgin avantaj sağlamaktadır. Bu avantajlardan ilki, likit biyopsi temini minimal girişimseldir ve hatta bir hastadan tekrar tekrar alınacak kadar basit ve uygun maliyetli bir yöntemdir. Bu nedenle, kanser gelişimi, progresyonu ve prognozunun dinamik gözleminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Daha da önemlisi, likit biyopsi, doku biyopsisine kıyasla tümör heterojenliğini daha iyi yansıtmaya özelliğine sahiptir. Farklı zaman aralıklarında kanser teşhisine ve izlenmesine yardımcı olacak birincil ve metastatik kanserler hakkında bize daha ayrıntılı ve kişiselleştirilmiş bilgiler sağlayabilir [139, 140].

Cerrahi doku biyopsileri avantajlarından bahsedecek olursak, histolojik tanı ve evreleme imkânı sunar. Primer bölge için, in situ biyobelirteç tayini sağlar. Doku biyopsisi dezavantajları ise, genellikle zor ve girişimsel olmaları, çoklu örneklemenin her zaman mümkün olmaması, tümör heterojenite sorunu (yani her zaman tüm malign tümörlerin klon çeşitlerini sunmuyor), zamansal ve mekânsal sınırlamalar olarak sıralanabilir. Likit biyopsilerin kolay ve girişimsel olmaması, kolayca ve progresyonun herhangi bir anında tekrarlanabilir olması, hastalığın gerçek zamanlı takibi ve tümör heterojenliği bu biyopsiler için avantaj sağlamaktadır. Dezavantajları ise, histolojik tanı ve evrelemenin sağlanamaması, standardizasyon eksikliği ve maliyetli olması olarak sıralanabilir [141].



Şekil 2.7. Doku biyopsileri ve likit biyopsilerin avantaj/dezavantajları [141].

Likit biyopsi tarihçesi ve uygulama alanları

Likit biyopsi kavramı ilk olarak Mandel P. ve diğerleri tarafından 1948'te ortaya atılmıştır [142]. Stroun, M. ve diğerleri 1989'da kanser hastalarında saptadıkları hücre dışında serbest bulunan nükleik asitlerin kanser hücrelerindeki nükleik asitler ile benzer özellikler taşıdığını savunsa da yeteri kadar çalışma yapılamadığı için likit biyopsi kavramı hakettiği değeri görememiştir [143].

1994 yılına gelindiğinde Vasioukhin V. ve diğerleri kemik iliğinde *RAS* mutasyonları pozitif DNA fragmanlarının varlığından bahsetmiş ve malign tümöre sahip hastalıkların plazmalarındaki serbest DNA miktarının arttığını bildirmişlerdir [144].

Nawroz ve diğerleri (1996), periferik kanda mikroRNA (miRNA) ve mikrosatellit değişimlere sahip serbest DNA'nın daha yüksek miktarda bulunduğunu bildirmişlerdir [145].

Mori ve diğerleri (2006) metastatik melanoma vakalarının serumları ile yürüttükleri çalışmalarında serbest DNAları incelemişler, kanser ilişkili genlerin metillenmiş hallerinin varlığından söz etmişler ve bunların tedavi yanıtı üzerindeki olası etkilerini bildirmişlerdir [146]. Bu bilginin kanser çalışmalarına uyarlanması ile tümör klonalitesi ve metastatik

hücrelerin araştırılması, dolaşımdaki tümör hücrelerinin (DTH) tespiti sonucu kanser araştırmaları için yeni bir dönem başlamıştır.

Eccles ve diğerleri (2007), dolaşıma salınan metastatik hücreleri ve kansere ait klonal hücrelerin varlığını bildirmişler ve mutasyonların saptanması ile de hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin uygulanabileceğini ancak bu alanda yapılacak olan daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir [147].

Pantel ve diğerleri (2008), tarafından, kemik iliğindeki ve dolaşımdaki tümör hücrelerinin (DTH) yeni yöntemlerle tespit edilebilirliği gösterilmiştir [148].

Schwarzenbach ve diğerleri (2011) dolaşıma salınan DNA, mRNA ve miRNAların kanser biyobelirteçleri olarak tümör yüküne sahip olduklarını ve kanser gelişimi ile doğrudan ilişkili olduklarını göstermişlerdir [149].

Crowley ve diğerleri (2013), kanser tanısının verilmesinde, doku biyopsilerine alternatif bir yöntem olarak likit biyopsilerin kullanılmasının avantajlarını anlatmışlar ve hastalığın prognozuna yönelik bilgiler sağlanabileceğini belirtmişlerdir [150]. Aynı yıl Elshimali ve diğerleri kanser vakalarında, parafine gömülü doku blokları ile likit biyopsileri karşılaştırmışlar ve likit biyopsilerin parafin doku çalışmalarına olan üstünlüğünün ve hasta takibindeki avantajları üzerinde durmuşlardır [151].

Gingras ve diğerleri (2015), Qin Z. ve diğerleri (2016), likit biyopsi ile yapılan moleküler çalışmaların parafin doku çalışmalarından daha etkili olabileceğini bildirmişler, sadece primer tümör dokusu değil aynı zamanda metastatik tümör dokularına yönelik bilgiler sunabileceğini de belirterek rutin klinik çalışmalarda likit biyopsi kullanımının uygulanabilirliği savını ortaya atmışlardır.

Bennet ve diğerleri (2016), serbest tümör DNA'sının yeni nesil dizileme tekniği kullanılarak hasta takibi yapılmasının öneminden bahsetmiş, kanser tanı ve tedavi sürecinde kullanılacak olan yöntemlerin standardize edilmesinin gerekliliğini vurgulamışlardır [154].

Vendrell ve diğerleri (2017), akciğer kanserine sahip hastalarda serbest tümör DNA'sını farklı metotlar ile çalışarak karşılaştırmışlardır [155]. Aynı yıl Caswell D. R. ve diğerleri

likit biyopsi materyali ile çalışmanın tümör heterojenite sorununu en aza indirmek için faydalı bir yöntem olabileceğini savunmuşlardır [156].

Bernard ve diğerleri (2019), pankreas kanserli hastaların plazmalarında çalıştıkları eksozom ve ctDNA örneklerinde hastalığın hem önlenbilmesinde hemde prognozunda faydalı olabileceğini göstermişleridir [157].

Cui ve diğerleri (2021), farklı evrelerde olan ağız kanserli 11 hastanın kan ve tükürüklerinde somatik mutasyonların varlığını saptamışlar, bu hastalardan alınacak olan kan ve tükürük örneklerinin hastalığın takibi ve metastazı açısından pratik faydalar sağladığını belirtmişlerdir [158].

Son on yıl içinde likit biyopsi kavramı detaylı olarak açıklanmış ve likit biyopsinin kullanım alanlarına yönelik çalışmalar gittikçe artmaya başlamıştır. Günümüzde likit biyopsi ile çalışmak hem araştırma hem de rutin klinik çalışmalarda klinik laboratuvar uygulamalarına önemli katkılar sağlamaktadır [159].

Klinik materyal olarak likit biyopsilerin kullanılması kanser taramasını [160], tanıyı [137, 161-166] ve prognozu [136, 167, 168], daha heterojen bileşenlerin sınıflandırmasını ve daha iyi hasta görüntülemesi yapmayı, tedaviye yanıtı ve tedaviye dirençli klonları tespit etmeyi ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesini amaçlamaktadır. Bütün bunlar, hastalar için cerrahi işlem gerektirmeden hastalık ilerlemesi boyunca birkaç kez tekrarlanabilen bu minimal invaziv prosedürün tanıtılmasıyla ve daha çok çalışma yapılmasıyla başarılabilir [169].

2.8.2. Likit biyopsi bileşenleri

Nükleik asitlerin kana salınmasının tümör mikroçevresindeki kanser hücrelerinin apoptoz ve nekrozu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Nekrotik ve apoptotik hücreler genellikle makrofajlar veya diğer çöpçü hücreler tarafından fagosite edilir [170]. In vitro hücre kültürü deneyleri, makrofajların DNA salımı sürecinde ya aktive olabildiğini ya da ölebildiğini göstermiştir [170]. Hücrel nükleik asitlerin fragmanları da aktif olarak salınabilir [171, 172]. 3×10^{10} tümör hücresine tekabül eden 100 g ağırlığındaki bir tümörü olan bir hasta için, her gün tümör DNA'sının %3,3'üne kadar kana girebileceği tahmin edilmektedir [103].

Ortalama olarak, bu DNA'nın boyutu, 70 ile 200 baz çiftinden oluşan küçük parçalar ile yaklaşık 21 kilobazlık büyük parçalar arasında değişir. Salgı ayrıca potansiyel bir serbest dolaşan DNA (cfDNA) kaynağı olarak önerilmiştir. Kanda dolaşan tümör hücreleri ve kemik iliği ve karaciğer gibi uzak bölgelerde bulunan mikrometastatik kalıntılar da serbest dolaşan nükleik asit (cfNA) salınımına katkıda bulunabilir [173, 174]. Likit biyopsiler sahip oldukları bileşenlere göre; serbest dolaşan tümör hücreleri (DTH), mikroRNA (miRNA) ve eksozomal veziküller (EV) olmak üzere 3 temel gruba ayrılmaktadır. Özellikle serbest dolaşan tümör DNA'sı (ctDNA) ve mikroRNA (miRNA), tümörden türetildikleri ve tümör hücresi nekrozu ve/veya apoptozu takiben kan dolaşımına döküldükleri için çeşitli teşhis uygulamalarında ilgi konusu hedeflerdir [149].

Serbest dolaşan DNA (cfDNA)/dolaşıma katılan tümör DNA'sı (ctDNA), serbest dolaşan tümör hücreleri (DTH)

Farklı histopatolojik tipte tümörleri olan hastalarda, mitokondriyal ve viral DNA'nın yanı sıra epigenomik ve genomik DNA'dan oluşan toplam cfDNA'nın artan seviyeleri, farklı floresan bazlı yöntemlerle (PicoGreen boyama ve ultraviyole (UV) gibi) veya kantitatif PCR (SYBR Green ve TaqMan gibi) değerlendirilmektedir. Kanser hastaları sağlıklılardan daha yüksek cfDNA seviyelerine sahip olmalarının yanı sıra kontrol grubunun cfDNA konsantrasyonları, her iki grupta da plazma veya serum numunelerinde önemli ölçüde farklılık göstermektedir [175-177]. Ortalama 180 ng/ml kanda, kanın ml'si başına 0 ile >1.000 ng arasında cfDNA ölçülmüştür [178-181]. cfDNA konsantrasyonunun değerlendirilmesi, diğer kan tümör biyobelirteçleri ile kombinasyon halinde faydalı olabilir. Lokalize hastalığı olan kanser hastalarında cerrahi sonrası cfDNA seviyeleri sağlıklı bireylerde gözlenen seviyelerde görülmektedir [182]. Bununla birlikte, cfDNA seviyesi yüksek kaldığında, kalıntı tümör hücrelerinin varlığını gösterebilir [175]. cfDNA, hem genomik DNA (gDNA) hem de mitokondriyal DNA'dan (mtDNA) oluşur. İlginç bir şekilde, serbest dolaşan mtDNA ve gDNA seviyeleri, dolaşımdaki mtDNA ve gDNA'nın farklı doğasını gösteren bazı tümör tiplerinde korelasyon göstermez [183, 184]. cfDNA ayrıca mikro uydu kararsızlığı, LOH, mutasyonlar, polimorfizmler, metilasyon ve bütünlüğü (boyut) incelemek için kullanılabilen hem kodlayan hem de kodlamayan gDNA'yı içerebilir [185].

miRNA'lar

MikroRNA (miRNA'lar), doğal olarak oluşan küçük kodlamayan RNA moleküllerinin bir sınıfıdır. Olgun miRNA'lar 19 ile 25 nükleotitten oluşur ve 70-100 nükleotitlik saç tokası öncü moleküllerinden türetilir. İnsan miRNAlarının %50'si, tümör gelişimi sırasında DNA amplifikasyonları, delesyonları veya translokasyonları sergileyebilen kırılğan kromozomal bölgelerde lokalize olduğundan, kanserde ifadeleri sıklıkla düzensizdir [186]. Bu nedenle miRNA'lar kanserde gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir [187]. Bugüne kadar, solid kanserler (örneğin yumurtalık, akciğer, meme ve kolorektal kanser) üzerine yapılan çalışmalar, miRNA'ların apoptoz, hücre proliferasyonu, epitelden mezenkimal geçiş ve metastaz gibi farklı hücresel süreçlerin düzenlenmesinde rol oynadığını bildirmektedir. Kanda miRNA'lar oldukça kararlı görünmektedir, çünkü bu miRNA'ların çoğu apoptotik cisimler, mikro veziküller veya eksozomlarda bulunur ve bilinen mRNA bozunma faktörlerine dayanabilir [188, 189]. Kan miRNA'larının ifade profili, kanser hastalarının belirlenmiş risk faktörlerine ve kan örneklerinin tedaviden, ameliyattan veya kemoterapiden önce mi yoksa sonra mı alındığına göre değişebilir [188]. Bununla birlikte, biyolojik rollerinden dolayı, dolaşımdaki miRNA'lar tanısal, prognostik ve öngörücü biyobelirteçler olma potansiyeline sahip olabilir ve ayrıca gelecekteki potansiyel terapötik hedefler olarak kabul edilebilirler [188]. Dolaşımdaki miRNA'ların analizi yeni başlamış olsa da, özellikle de dolaşımdaki miRNA ifadelerindeki düzensizlikler kanser gelişimi ve progresyonu arasında güçlü ilişkiden dolayı umut verici biyobelirteçler haline gelebileceğine dair göstergeler vardır [149].

Eksozomal veziküller

Ekstrasellüler veziküller (EV) özellikle eksozom araştırmaları biyomedikal alanda hızla büyüyen çalışma alanlarından biridir. Bu araştırma alanı son zamanlarda bölgesel ve uzak metastazlar arası iletişimi düzenlemek için yoğun ilgi görmektedir [190]. EV'ler "işlevsel kargo ve biyolojik bilgi" aktarma kapasitesine sahip olduklarından dolayı çeşitli hastalıkların tedavisi için teşhis ve tedavi araçları olarak kullanılmaktadırlar. "EV'ler" terimi, hücreden türetilen heterojen bir gruba kapsar ve bakteriler de dahil olmak üzere herhangi bir hücre tipi tarafından vücut sıvılarına dökülen küçük vezikül olarak tanımlanmaktadır [190]. Boyut dağılımlarına ve oluşumlarına göre EV'ler, eksozomlar içinde mikroveziküller (MV'ler) ve apoptotik cisimler olmak üzere ikiye ayrılır. Eksozomlar, endozomal membranların içe

doğru tomurcuklanmasıyla oluşturulan ve EV'lerde minimum çap büyüklüğüne (neredeyse 30-150 nm) sahip olan en özel alt gruptur. Buna karşılık, MV'ler (100 nm-1 µm) ve apoptotik cisimler (1-5 µm) dışı doğru tomurcuklanma ile oluşurlar [191, 192]. EV'ler üzerinde yapılan çalışmalar, hücre dışı veziküllerin, esas olarak hücreler arası iletişimi teşvik etmek için fonksiyonel kargo görevi gördüğü ve hedeflenen transfer işlevlerini doğrulukla yerine getirdiğini göstermektedir [193]. Eksozomlar, mikro veziküller ve apoptotik cisimlerin tümü zar atıklarından oluşan kesecikler olmasına rağmen, tamamen farklı bir biyogenez modeline sahiptirler. Eksozomlar endositozdan kaynaklanır, bu da plazma zarının vezikülleri yükseltmek için dışarıdan içeriye girdiği anlamına gelir. Sonuç olarak, eksozomlar hücre dışı materyaller ve hücrel membran bileşenleri içerir [193]. MV'ler ve apoptotik cisimler, eksozomların aksine, plazma membran yüzeyinden (içeriden dışarıya) sıkıştırılarak dışı doğru tomurcuklanma yoluyla üretilir. Bu nedenle, MV'ler ve apoptotik cisimler topluca ektozomlar olarak bilinir [194, 195]. EV'lerin genellikle lipidler, proteinler ve genetik materyal dahil olmak üzere spesifik biyoaktif kargolarına dayalı biyofonksiyonları olduğu düşünülmektedir [196]. Genetik materyallerin fonksiyonuna RNA (mRNA, miRNA ve diğer kodlamayan RNA), DNA ve diğer sitozolik moleküller ve bileşenler dahildir. Birkaç çalışma, EV'lerde paketlenmiş genetik materyalin hücreler arasında değiş tokuş edildiğini ve daha sonra EV'lerin hedef hücrelerinin yeniden programlanmasını uyarmak için transkripsiyona uğradığını göstermiştir [197, 198]. EV'lerin patolojik durumlarda RNA içeriğinde meydana gelen değişim insan hastalıklarında tanı ve teşhis için uygulanabilir biyobelirteç kaynağı haline gelmiştir [199].

CtDNA [129, 130, 135], serbest dolaşan tümör RNAsı (ctRNA) [133], ekstrasellüler vezikül (EV) [133, 200], tümör barındıran plateletler [201], hastaların biyolojik sıvılarında, tümörler ve metastatik bölgeler hakkında genomik [202, 203], epigenetik [204], transkriptomik ve proteomik [205] bilgilerin elde edilmesini kolaylaştırmıştır.

2.8.3. Likit biyopsi çeşitleri

Kan

Plazma, kanın sıvı kısmıdır ve vücudun çeşitli organlarına ürünlerin taşınması, hücrelere besin sağlanması ve atık ürünlerin taşınmasında görevli biyolojik sıvıdır. Aynı zamanda normal kan basıncının korunmasında kritik bir role sahiptir [206]. Tam kandaki tüm hücrel

elementler santrifüjleme ile çıkarılırsa elde edilen sıvı plazmadır ve bu da %92'ye karşılık gelmektedir. Plazmadaki çözünmüş katılar esas olarak proteinlerdir (%7) ve kalan %1'lik kısım glikoz, lipidler, enzimler, vitaminler, hormonlar ve üre ve CO₂ gibi atık ürünleri içermektedir [207].

Serum, pıhtılaşmış kandan ayrılan berrak bir sıvıdır. Fibrinojenler dışında bileşimi plazma ile aynıdır. Fibrinojenler kanın pıhtılaşmasında önemli role sahip proteinlerdir. Serum, kanın pıhtılaşmasında kullanılmayan elektrolitler, antikorlar, antijenler, hormonlar gibi tüm proteinleri içerir [208].

Plazma ve serumda dolaşan tümör DNA'sı, kanser tespiti, tümör yükünün ve hastalığa yanıtın izlenmesi için potansiyel biyobelirteç olarak artan bir şekilde incelenmektedir [209].

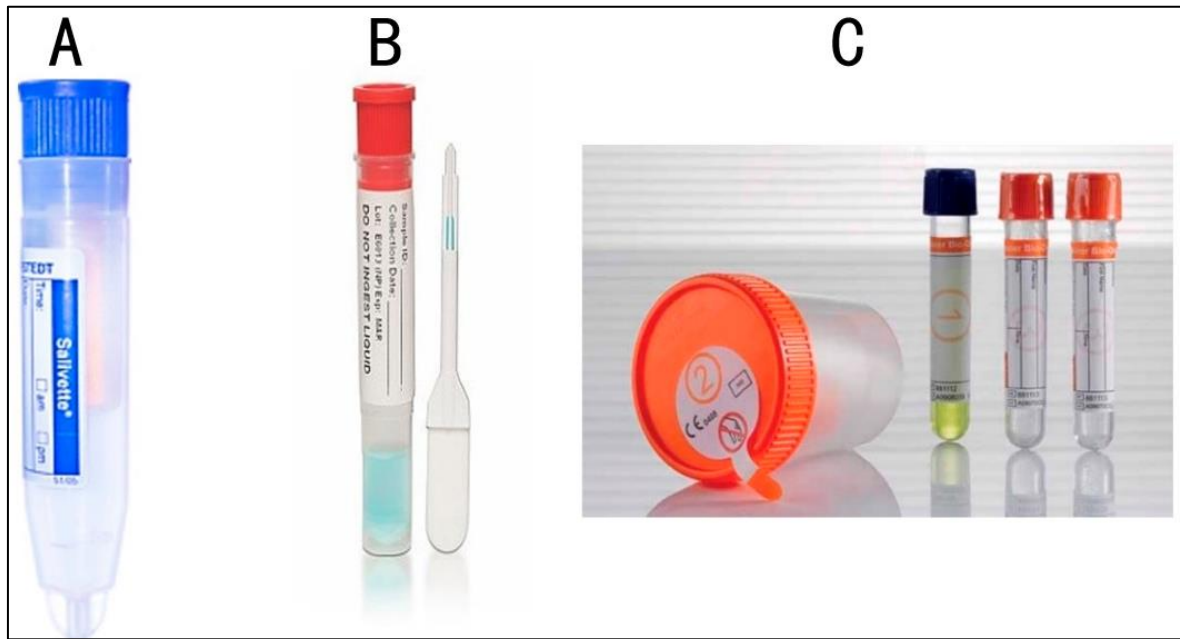
Tükürük

Tükürük pH=6–7' sahip üç büyük tükürük bezinden (parotis, submandibular, sublingual) ve minör bezlerden (labial, bukkal, lingual ve palatal dokular) salınan, dişeti oluşu sıvısı, hücre döküntüleri, plak, bakteri, nazal ve bronşiyal salgıların da bulunduğu asidik biyolojik sıvıdır [210, 211]. Tükürük %99 su, %0,3 protein ve %0,2 inorganik ve organik madde içermektedir [99]. En yaygın inorganik bileşenler: potasyum, sodyum, magnezyum, kalsiyum, klorür ve karbonatlar iken, organik bileşenler ise amilazlar, peroksidaz, lipaz, müsinler, lizozim, laktoferrinler, sistatinler, hormonlar ve büyüme faktörlerini içermektedir [212]. Sağlıklı bir bireyde günlük tükürük salgısı 0,5 ile 1,5 L arasında olduğu tahmin edilmektedir [213].

Tükürük oral duyumların algılanması gibi işlevlerin yanı sıra (yani tat, sıcaklık ve dokunma), çiğneme, yutma ve sindirim gibi birçok hayati role sahip biyolojik sıvıdır. Buna ek olarak, re-mineralizasyonunu arttırarak diş minesini ve mineral kaybını da önlemektedir [214, 215]. Tükürük ayrıca oral mukozayı biyolojik, mekanik ve kimyasal faktörlerin yanı sıra bakteriyel, viral ve fungal enfeksiyonlardan korur, böylece ağız boşluğu ekosisteminin dengede kalmasına yardımcı olmaktadır [216, 217].

Biyolojik sıvı olarak tükürüğün kullanmanın birçok avantajı bulunmaktadır. Bu avantajlar; toplanması hızlı, kolay, ucuz ve cerrahi işlem gerektirmeden temin edilmesidir. Ayrıca, epidemiyolojik araştırmalar için toplanması, saklanması ve taşınması da kolaydır ve hastanın

mevcut fizyolojik durumunun incelenmesinde de kullanıma oldukça uygun bulunmuştur [210]. Tükürük toplamak için çeşitli şirketler farklı özelliklerde tükürük toplama araçları geliştirmiştir (Resim 2.3.). Bir hastadan tükürük toplama yönteminin ilk örneği, tükürük kalsiyumunun (Ca^{+2}) analizi için Wainwright tarafından 19. yüzyılın başlarında (1934) olmuştur. Wainwright yönteminde hastanın başı öne eğilerek ağız dikey olarak aşağıyı gösterir ve tükürüğün ağızdan bir filtre hunisi içine damlamasına izin verilir [218]. Pasif salya akışı sağlanarak ya da plastik tüpe hastaların tükürmesi söylenerek tükürük toplama işlemi yapılır [219].



Resim 2.4. Çeşitli tükürük toplama araçları. A. Salivatte, B. Quantisal, C. SCS (Greiner-BioOne) [220]

İdrar

İdrar içeriğinde, epitel hücreleri, böbrek kaynaklı hücreler, beyaz kan hücreleri (WBC), kırmızı kan hücreleri (RBC) ve ürotelyal hücrelerin yanı sıra genetik materyal, proteinler, peptitler ve inorganik bileşikler de dâhil olmak üzere çeşitli hücre türlerini barındırır. yapılan çalışma sonuçlarında, hücreler tarafından sistemik dolaşıma salınan dolaşımdaki serbest DNA (cfDNA)'nın böbrekler tarafından filtrelenip ve idrarla iletildiği gösterilmiştir [221]. Bu nedenle, bilim adamları ve klinisyenler, kolorektal kanser (KK) [222], mesane kanseri (MK) [223], kronik böbrek hastalığı [224] prostat kanseri (PK) [225], dâhil olmak üzere hastalıkların potansiyel tespiti için idrarı biyopsi materyali olarak kullanmayı tercih

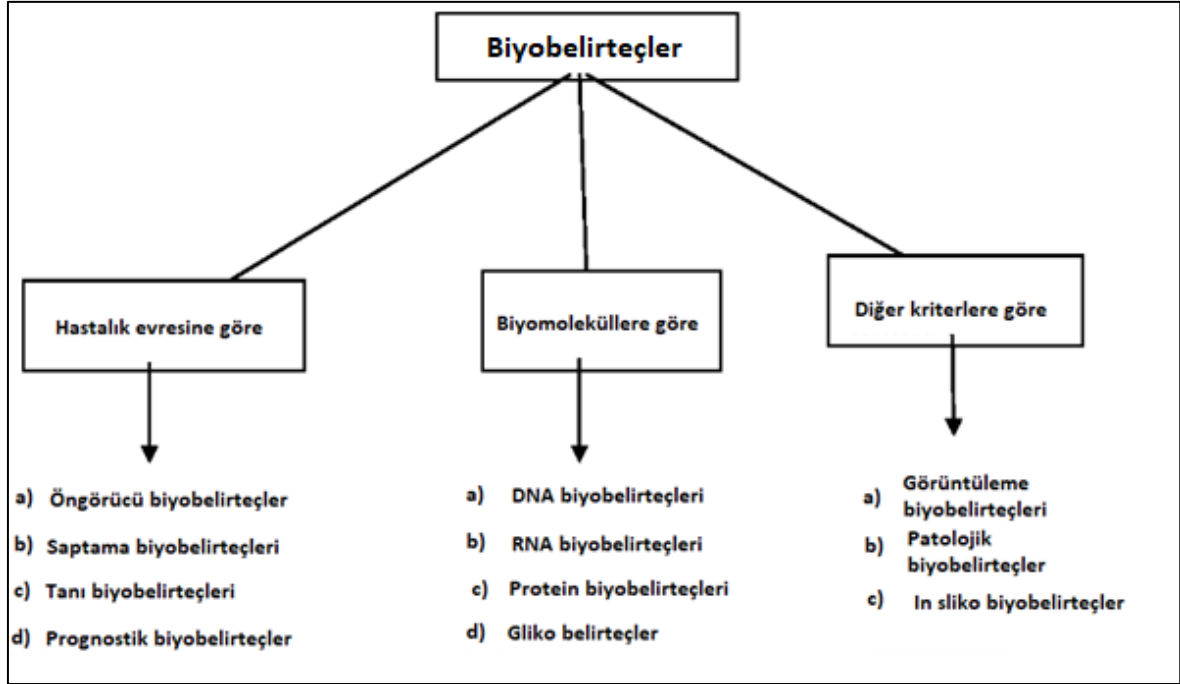
etmektedirler. Ayrıca, böbrek veya genitoüriner sistemi etkileyen hastalığı olan hastalar için de idrar, hastalıkla ilişkili cfDNA için daha konsantre bir örnek kaynağı olarak görev yapabilmektedir [221].

Beyin-omurilik sıvısı

Beyin-omurilik sıvısı (BOS), elde etmek cerrahi tümör biyopsisinden daha az girişimsel olmasına rağmen, klinik risk ve materyal temininin hasta için kolay olmaması, biyopsi alınımını zorlaştıran bir işlem olmaktadır [226]. BOS, primer veya metastatik tümörlerden kaynaklanan merkezi sinir sisteminin (MSS) tümör hücreleri ile yakın temas halindedir. Beyin tümörü hastalarının BOS'unda ctDNA'nın bulunduğu gösterilmiştir [227]. BOS, MSS tümörlerinin seri izlenmesi için uygun olan ve lomber ponksiyonla eldesi sağlanan, tercih edilen biyolojik sıvıdır. Bu nedenle, BOS-ctDNA'nın daha ileri analizi, primer veya metastatik beyin tümörlerine sahip tüm hastalar için faydalı olabileceği düşünülmektedir [228].

2.9. Biyobelirteçler

Ulusal Kanser Enstitüsüne (UKE) göre biyobelirteç; "kanda, diğer vücut sıvılarında veya dokularda bulunan ve normal veya kanser gibi anormal bir sürecin veya hastalığın işareti olan biyolojik bir moleküldür"[229]. Biyobelirteçler, tipik olarak, hastalığı olan kişiyi, hastalığı olmayan bir kişiden ayırt eder. Değişiklikler, germ hattı veya somatik mutasyonlar, transkripsiyonel değişiklikler ve translasyon sonrası değişiklikler dahil olmak üzere bir dizi faktöre bağlı olabilir [229]. Bu değişikliklerin yanı sıra proteinleri (örneğin bir enzim veya reseptör), nükleik asitleri (örneğin bir mikroRNA veya diğer kodlamayan RNA), antikorları ve peptitleri içerebilen çok çeşitli biyolojik belirteçler vardır [229] (Şekil 2.9).

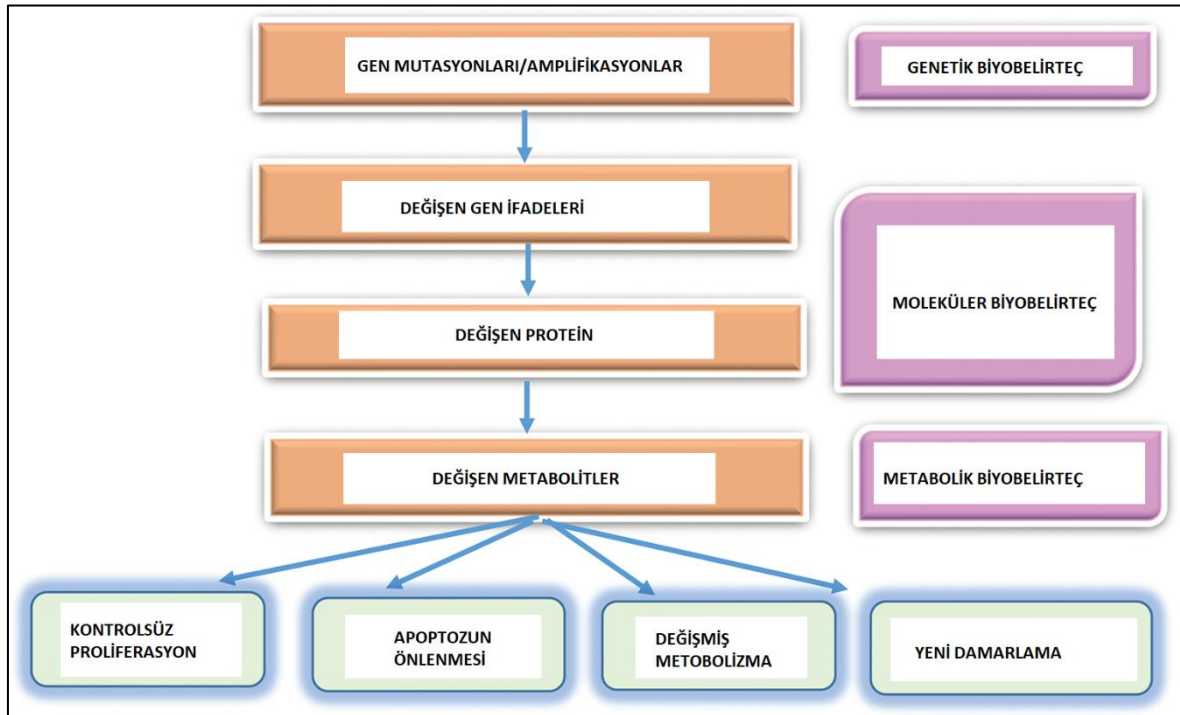


Şekil 2.8. Biyobelirteçlerin sınıflandırılması [230].

2.10. Kanser Biyobelirteçlerinin Üretimi İçin Kanser Gelişimi ve Mekanizmaları

Kanser, normal hücre davranışını değiştiren kontrolsüz hücre büyümesi ve çoğalmasını içeren temel anormalliği yansıtan çok faktörlü bir hastalık kümesidir. Moleküler mekanizmalar, çoklu genlerin ifadesinde değişiklikler sergiler, çoğunlukla (proto) onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve hücre proliferasyon olaylarının düzensizliği durumu ile kanser genotipi ve fenotipinin gelişimine katkıda bulunan DNA onarım genlerini içerir [8]. 2000 yılında Hanahan ve Weinberg tarafından kanser belirteçleri hipotezi öne sürülmüştür. Başlangıçta kanser gelişimi için biyolojik mekanizmaları; proliferatif sinyalleşme, büyüme baskılanmasından kaçınma, hücre ölüm direnci (ölümsüzleştirme), replikatif ölümsüzlüğü sağlama, anjiyogenezin indüklenmesi ve son olarak invazyon ve metastaz aktivasyonu olmak üzere altı sürece ayırmışlardır [8]. Yapılan araştırmalar, kanserin histon modifikasyonu ve metilasyonun DNA değişimi gibi epigenetik değişiklikler tarafından da tetiklenebileceğini ve kromatinin yoğunlaşma durumunda değişikliklere neden olabileceğini düşündürmektedir [231]. Nokta mutasyonu, gen yeniden düzenlenmesi veya amplifikasyonları gibi kanser hücrelerinin genetik değişiklikleri, hücre bölünmesi ve proliferasyonunu takip eden bozukluklar, spesifik bir kanser türüne sahip hastaların çoğunda bu tür değişikliklerin biyobelirteçlerinin salınmasıyla kendini gösterecektir. Bu nedenle, kanser tespiti veya çeşitli tedavilere verilen yanıtların tahmin edilmesi için biyobelirteçler

olarak kullanılabilirler [232-234]. Karsinogenezin veya kanserin ayırt edici özelliklerinin altında yatan değiştirilmiş moleküler mekanizmaların ve hücresel süreçlerin kapsamlı bir şekilde anlaşılması, kanser biyobelirteçlerini ve kanser hastalarındaki klinik faydalarını birbirine bağlayabilir. Genetik, moleküler ve metabolik biyobelirteç, Şekil 2.10'da gösterildiği gibi hücresel çoğalma ve metabolizma üzerindeki etkilerini takiben gen mutasyonundan kanser hücrelerinde meydana gelen olayların sırasının uygulanmasıyla tanımlanabilir.



Şekil 2.9. Bhatt ve diğerlerinden modifiye edilmiş karsinogenez sürecinde biyobelirteçlerin tanımlanması [235].

Onkoloji araştırmaları için en büyük zorluklardan biri, kanser biyobelirteçleri ile kanser patolojisi arasındaki kesin ilişkiyi kurmak ve aynı zamanda tam olarak değiştirilmiş geni veya hücresel süreci hedefleyen hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesinin yanı sıra kanseri erken aşamada tespit etmektir [233].

2.11. Likit Biyopsilerin Farklı Kanselerde Kullanımı

2.11.1. Prostat kanseri ve girişimsel olamayan biyobelirteçleri

Prostat kanseri Prostat kanseri (PKa), 2020 Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) GLOBACAN verilerine göre yılda 1 414 259 yeni vaka tanısı ve yılda 375 000 ölümle birlikte, erkekleri etkileyen ve dünyada en sık görülen ikinci kanserdir [1]. Prostat kanseri risk sınıflandırması ve tedavi yönetimi için doku biyopsileri en güvenilir yöntemdir. Ancak, girişimsel işlemlerin hematüri, enfeksiyon, gibi komplikasyonlarının yanı sıra profilaktik olarak uygulanan antibyotiğe karşı gelişen direnç biyopsi alınımına sınırlamalar getirmektedir. Bu nedenle, doku biyopsi işlemlerine duyulan ihtiyacı azaltabilecek likit biyopsilerin kullanılabilirliği gündeme gelmektedir.

Kan, idrar gibi biyolojik sıvıların likit biyopsi olarak kullanıldığı prostat kanserinde en sık kullanılan belirteç Prostat Spesifik Antijeni (PSA) olarak adlandırılan prostata özgü bir serin proteazdır [169]. PSA taraması, prostat kanserinin erken tespitinde önemli bir rol oynamaktadır ancak spesifitesi düşüktür [166-167]. Prostat kanserine özgü daha spesifik diğer bir belirteç ise kodlama yapmayan bir RNA olan Prostat Kanseri Antijeni 3 (PKA3) ya da diğer adıyla DD3'dür. PKA3'ün hastaların biyopsi işleminden kurtarabilecek bir belirteç olduğu düşünülmeyle beraber, hastalığın agresifliğini veya prognozunu tahmin etmek açısından yapılacak başka çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [170].

PSA'ya ve PKA-3'e alternatif olabilecek yeni tanı ve takip biyobelirteçleri geliştirilmekte olup dolaşımda bulunan DTH'ler özellikle takip sürecinde umut vaatetmektedir [236]. Literatürde yapılmış olan önceki çalışmalardan yola çıkarak, miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-146b-5p ve miR-23a-3p, PKa hücre hatlarında tümör hücresi göçü, invazyonu ve proliferasyonunu etkileme potansiyeline sahip oncomiRler rapor edilmiştir [237-240]. MiR-30a-5p, miR-455-3p, miR-23b-3p, miR-494-3p ve miR-27b-3p ise PKa'daki spesifik genlerin baskılayıcıları olarak rapor edilmiştir [240-242]. Koh ve diğerleri (2022) yaptıkları pilot çalışmada PKa hastalarından alınan idrar, plazma ve FFPE doku örneklerinde kapsamlı bir çalışma yürütmüşler ve bu hastaların örneklerinde serbest dolaşan miR (cfmiR) profili için 42 idrar cfmiR'sini belirlemişlerdir [243]. Belirledikleri bu cfmiR'lerin PKa'yı teşhis etmek için faydalı biyobelirteç olabileceğini yaptıkları çalışma sonucunda öne sürmüşlerdir.

2.11.2. Karaciğer kanseri girişimsel olmayan biyobelirteçleri

Karaciğer kanseri (Hepatoselüler karsinom (HSK)), 2020 GLOBACAN verilerine göre dünya çapında en yaygın görülen beşinci kanser olup, yaklaşık 905 507 yeni vaka 830 000 ölüm ile en sık görülen kanser ölüm nedeni arasındadır [1]. HSK gelişimi için risk faktörleri arasında hepatit B virüsü (HBV) ve / veya hepatit C virüsü (HCV)'nün neden olduğu viral enfeksiyonların sebep olduğu karaciğer sirozu, evre IV primer biliyer siroz, Wilson hastalığı, aşırı alkol alımı, ve aflatoksinlere maruziyet bulunmaktadır [244].

Serum alfa-fetoprotein (AFP) uzun süredir HSK taraması ve sürveyansı için bir kullanılan bir belirteç olmakla birlikte sensitivite veya spesifitesi kesin tanı için yeterli değildir [244].

Son yıllarda, karaciğer kanserinin prognozunu iyileştirmek için birçok araştırmacı, tümör biyobelirteçlerini keşfetmede yoğun çabalar sarfetmektedir. Örneğin, Lu ve diğerleri (2021), HSK'da transkripsiyon faktör-21 (TCF21)'in ifade seviyelerinin önemli ölçüde azaldığını ve hastalığın invaziv ilerlemesi ile negatif korelasyon gösterdiğini öne sürmüşler, TCF21'in, HSK'nın prognozunu tahmin etmek için iyi bir biyobelirteç olabileceğini iddia etmişlerdir [245]. Qiu ve diğerleri (2020), tümör dokularındaki uzun kodlamayan RNA (lncRNA) LOC285194 ifade seviyesinin komşu normal dokulardakinden önemli ölçüde düşük olduğunu ve genellikle HSK'da düşük ifade edildiğini bulmuşlardır [246]. LncRNA LOC285194 ifadesi, tümörlerin oluşumu, gelişimi, invazyonu ve metastazı ile yakından ilişkilidir ve karaciğer kanseri için yeni tedavilerin geliştirilmesi için potansiyel bir hedef olarak kullanılabilen antikanser etkilere sahiptir. Birçok biyobelirteç önerilmiş olmasına rağmen, HSK'nın prognostik değerlendirmesi klinikte oldukça zordur. Ek olarak, bu malign tümör için yeni ve spesifik biyobelirteçlerin belirlenebilmesi için yapılacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır [247].

2.11.3. Meme kanserinde likit biyopsilerin kullanımı

Meme kanseri 2020 GLOBACAN verilerine göre 2 261 4 yeni vaka tanısı ve 685 000 ölüm ile en çok kadınlarda görülen kanser türüdür [1]. Meme kanseri insidansının, özellikle meme bezlerinde somatik mutasyonların birikmesi nedeniyle yaşla arttığı bilinmektedir [248].

Birçok çalışma, semptom öncesi aşamalarda meme kanserinin erken teşhisi için likit biyopsi potansiyelini incelemiştir [248].

Meme kanserli hastaların kan örneklerinde yapılan pek çok çalışmada *PIK3CA* geninin ctDNA'da gözlenen mutasyon oranları ölçülmüş grade III meme tümörlerinde grade I tümörlere göre çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir ve sonuçların doku biopsileri ile uyumlu olduğunu göstermişleridir [249, 250].

Maltoni ve diğerleri (2017), 2002-2010 yılları arasında, ameliyat öncesi 79 meme kanserli hasta ve 10 kontrol olmak üzere serum örnekleri ile çalışma yürütmüşlerdir. *HER2*, *MYC*, *P13KCA* gibi cfDNA'da sürekli değişim gösteren genleri RT-qPCR kullanarak değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, meme kanseri hastalarının, daha fazla bütünlük ve daha düşük apoptotik indekse sahip sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında, daha fazla miktarda cfDNA gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Çalışma, cfDNA'nın likit biyopsi yoluyla analiz edilmesinin klinik ortamlarda prognostik bir biyobelirteç olarak büyük potansiyele sahip olabileceği sonucuna varmıştır [251].

Siravegna ve diğerleri (2017), beyin metastazı olan HER2+ meme kanseri hastasının BOS ve plazmada farklı ctDNA profilleri sunduğunu ve bunun metastazlı meme kanserinin klinik takibini geliştirmek için kullanılabileceğini göstermişlerdir [252].

Beyin omurilik sıvısı (BOS) ve plazmada ctDNA değişikliklerini ölçmek için dijital damlacıklı PZR (ddPZR) ve yeni nesil tam ekzom dizileme (TED) analizini uygulamışlardır. Sonuçları, BOS'den izole edilen ctDNA'da *TP53*, *PIK3CA*, *ERBB2*, *cMYC* genlerinin ifadesinde bir artış olduğunu gösterirken, tedavi sonrası plazma ctDNA'da bahsi geçen genlerin ifadesinin azaldığını bildirmişlerdir [248].

Meme kanserinin karmaşık biyolojik ve klinik yapısı, moleküler arka plan ve hastalığın mekanizmaları hakkındaki bilgilerdeki eksikliklerden dolayı, hastalığın tedavisinde birçok zorluğa neden olmaktadır. Aynı zamanda etkili olan kişiselleştirilmiş ve hedefli tedavilerin geliştirilmesi, tümörlerin heterojenliğinin daha iyi anlaşılmasını gerektirmektedir [248].

2.11.4. Akciğer kanserinde likit biyopsilerin kullanımı

Akciğer kanseri (AK) 2020 GLOBACAN verilerine göre 1 435 943 yeni vaka tanısı ve 1 118 679 ölüm ile en çok erkeklerde görülen kanser türüdür [1]. AK'nin gelişimi, genetik, epigenetik ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimler ve bunun sonucunda tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerin düzensizliği ile başlayıp kanserle ilişkili sinyal yollarının aktivasyonu ile biten çok basamaklı tümör gelişimini içerir [253, 254]. AK gelişimini indükleyen bu mutasyonlar, adenokarsinomlarda daha yaygın olarak saptanmaktadır. Bu nedenle, histopatolojik incelemelerde, hedeflenen moleküler testlerin tümörleri etkili şekilde saptaması adenokarsinomları diğer AK'lerden ayırmak için oldukça önemlidir [253-255]. AK'li hastaların çoğu, kötü prognoza sahip ve bir yıllık sağ kalım oranı % 20'den azdır. İleri bir aşamada, cerrahi rezeksiyon mümkün değildir, çünkü moleküler değişikliklerin teşhisi ve tanımlanması ancak küçük biyopsi materyali veya sitoloji örnekleri incelenerek mümkün olmaktadır [256].

AK'li hastaların serum örneklerinde bakılan, karsino embriyonik antijen (CEA), sitokeratin-19 fragmanları (CYFRA21-1), skuamöz hücreli karsinom antijeni (SCC) ve nöron spesifik enolaz (NSE) dâhil olmak üzere akciğer kanserinin teşhisi için altın standart olmuştur [257, 258].

Kanserle ilişkili miRNA'lar da, akciğer kanseri oluşumu ve gelişiminde önemli roller oynamaktadır. miRNA'ların ifadesi, insan kanserlerini sınıflandırmak, tümör alt tiplerini ayırt etmek ve prognoz ile ilişki kurmak için oldukça önemlidir. Zhao ve diğerleri (2022) miR-205'in akciğer kanserli hastalarda yüksek ifade edildiğini göstermişlerdir. MiR-205-5p, *p21*, *pRB1* ve *siklin D1*'in ifadesini etkileyen yeni bir hedef gen olan *TP53INP1*'i negatif olarak düzenleyerek akciğer kanseri hücre proliferasyonunu ve metastazını desteklediği bildirilmiştir. Bu yüzden miR-205'in yüksek ifadesi akciğer kanseri tanısının konulmasında önemli bir biyobelirteç olduğu ileri sürülmüştür [259].

Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (UKKA), ilgili tüm hedef genleri (*EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *MET*, *NTRK* ve *RET*) test etmek için yeterli doku olmadığında, tanı anında skuamöz olmayan küçük hücre dışı akciğer kanserli (KHDAK) tüm hastalarda geniş moleküler profillemenin bir parçası olarak plazma bazlı moleküler testlerin kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir [260].

2.11.5. Likit biyopsilerin OPML’de kullanımı

Oral premalign lezyonların önlenmesi ve tedavisinde; tanısal, prognostik ve öngörülebilir belirteçlerin keşfedilmesinin yanı sıra, yeni spesifik tedavi temelli hedeflerin tanımlanmasına izin veren moleküler mekanizmaların anlaşılmasının zorunlu olduğu genel olarak kabul edilmektedir. Çalışmalar sonucunda elde edilen güçlü veriler, normal epitelden potansiyel premalign oral epitelyal hastalık (OPML)’lara ve OPML’lerden de invaziv oral skuamöz hücreli karsinoma geçişin, onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin ifadesini ve fonksiyonunu etkileyen genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesinden kaynaklandığını göstermektedir [261]. Başka bir ifadeyle, OPML’lerin varlığını gösteren klinik görünüm (örneğin, oral lökoplaki) ve mikroskopik değişiklikler (örneğin, epitelyal displazi), zamanla biriken ve sonunda malign transformasyon ile sonuçlanan spesifik moleküler değişikliklerdir [261]. Tanım olarak, OPML’ler ve / veya displazinin erken fark edilmesi, maligniteye ilerlemesi için çok önemli olan moleküler değişikliklerin açıklanmasının klinik inceleme ve histopatolojiyle birleştiğinde daha fazla spesifiklik ve hassasiyetle premalignitenin öngörüleceği sonucuna varır. Bu nedenle, bir lezyonun premalign yapısını yansıtabilen moleküler belirteçlerin keşfedilmesi için devam eden bir arayış söz konusudur [261].

Bununla birlikte, OSHK’daki birçok moleküler değişikliğin karakterizasyonunda yapılan önemli çalışmalara rağmen, oral premalignitenin tanı ve prognozunda halen konvansiyonel histopatolojik inceleme kullanılmaktadır [261].

OPML’nin moleküler belirteçleri

Çok aşamalı bir süreç olan oral karsinogenezde çok sayıda genetik ve epigenetik olayın öneminin tanınmasının arttırılması, çok sayıda molekülün OPML’lerde, özellikle oral lökoplakide potansiyel tanı ve prognostik belirteçler olarak yoğun araştırılmasıyla sonuçlanmıştır [261] (Çizelge 2.1).

DNA ploidi durumunu oral displazi varlığı ile karşılaştırmış olan birkaç çalışma literatürde mevcuttur. Ancak bu çalışmaların bazıları displazi ile ilgili DNA anöploidisinde önemli bir artış tespit edememiş olsa da [262-264], literatürün çoğu, materyal tipinden ve analiz yönteminden bağımsız olarak, displazi varlığında OPML’lerde artan bir DNA anöploidi oranı göstermektedir [265]. Displazinin yokluğunda veya varlığında DNA anöploidi

prevalansı sırasıyla %14,3 ile %19 ve %37 ile %44,4 arasında değişmiştir. DNA anöploid lezyonunun DNA diploid lezyonlarına kıyasla displastik olma riski yaklaşık 2,6 kat daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [265-267].

Son 20 yılda, 3p14'te (FHIT geni), 9p21'de ((p16INK4a) /(CDKN2A) geni) ve 17p (TP53 geni) kanserle ilgili genlere karşılık gelen kromozomal lokuslarda polimeraz zincir reaksiyonu yapılmış ve OPML'lerdeki LOH profillerini ele alan birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, displazi varlığında daha yüksek oranda LOH gözlemlendiği bildirilmiştir [268].

Karsinogenez sürecinde, sürekli büyüme aktivitesi, genellikle ilgili düzenleyici mekanizmalardaki işlev bozukluğunu gösterir. OPML'ler için hücre proliferasyon belirteçleri arasında, çoğu çalışma Ki-67, proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA) ve minikromozom bakım proteini 2'ye (MCM2) odaklanmıştır [269]. Ayrıca, birkaç araştırma, hücre döngüsü ve siklin D1, p16INK4, tümör baskılayıcı protein p53 ve retinoblastoma proteini (pRb) gibi hayatta kalma düzenleyici proteinlerin rolünü incelemiştir [270]. Oral displazide, displazinin derecesi ile ki-67 çekirdek ifadesini artırma eğilimi gözlenir [271]. Nükleer histon olmayan bir antijen olan PCNA, bir tümördeki büyüme fraksiyonunun tahmin edilmesini sağlayan bir çoğalma belirtecidir [272]. PCNA'nın suprabazal ifadesi, OPML'lerde özel bir proliferatif hücresel durumu gösteren displastik epitelin bir belirtecidir. MCM2, G0'dan erken G1 fazına girmek üzere ayrılan hücreler de dahil olmak üzere hücre döngüsü boyunca ifade edilir (Ki-67'de bulunmayan bir özellik). İlginç bir şekilde, MCM2/Ki-67 ve geminin/Ki-67 oranlarında bir artış ile birlikte, malign dönüşüm sergileyen oral displazilerde MCM2'nin daha yüksek olduğu bildirilmiştir [273].

Gen amplifikasyonuna karşılık gelen siklin D1 proteininin aşırı ifadesi, tüm derecelerdeki displazilerde ve OSHK'da benzer oranlarda tanımlanmıştır ve OL'de siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4) ve 6 (CDK6)'nın bir inhibitörü olan p16INK4'ün kaybı bildirilmiştir [270].

Tümör proteini p53 (TP53), iyi çalışılmış bir tümör baskılayıcı gendir ve hücresel dengeyi sürdürmek için çeşitli stresörleri algılamada ve bunlara yanıt vermede önemli bir rol oynamaktadır. TP53 mutasyonlarının genellikle kanserojen tütün dumanına maruz kalma ile ilişkili olduğu ve ayrıca potansiyel olarak alkol tüketiminin bir sonucu olduğu düşünülmektedir [274, 275]. Mouse double minute 2 (*MDM2*) geni tarafından kodlanan

TP53 ve negatif regülatörü, baş ve boyun karsinogenezinde çok önemli roller oynar [276, 277]. MDM2 ve TP53'ün birlikte ifadesi, özellikle ileri aşamalarda oral displazi ve OSHK'de gözlenmiştir [278]. *pRB* tümör baskılayıcı genin ürünü olan pRB, hücre döngüsü durması, apoptoz ve farklılaşma ile ilgili genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. Sonuç olarak, ilgili genin düzensizliği, kontrolsüz hücre büyümesi ve karsinogenez ile doğrudan bağlantılıdır [279]. de Oliveira [280] ve diğerleri, oral malign ve premalign lezyonlarda p53 ve pRB ifadesini değerlendirmiştir. OSHK lezyonları, premalign lezyonlarla karşılaştırıldığında, OSHK'nın daha yüksek pRb ifadesi sunduğunu, oysa önceki çalışmalarında daha yüksek p53 ifadesine sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu nedenle, p53 ifadesi, OSHK'de karsinogenezin erken aşamalarıyla ilişkili olabilir. Ancak, pRb ve p53 ifadesinin OSHK'ye ilerlemeyi öngörme yeteneği belirsizliğini korumaktadır [269]. Lo Muzio ve diğerleri [281], derecesi artmış displazilerde survivin proteininin yüksek ifade edildiğini göstermişlerdir (düşük dereceli displazilerde %30, yüksek dereceli displazilerde %94). Meta analizi yapılan 15 çalışmada ise survivin proteininin OSHK için prognostik bir belirteç olduğu bildirilmiştir [282].

Kromozomların uçlarında bulunan özel DNA yapıları olan telomerler, kromozomları bozulmadan korumak için gereklidir. Kritik derecede kısa telomerler, hücresel yaşlanma ve apoptoz ile sonuçlanan bir DNA hasar yanıtını tetikler [261]. İnsan telomeraz ters transkriptaz (hTERT) ve insan telomeraz RNA bileşeni (hTERC), telomerazın temel bileşenleridir ve çeşitli kanser türlerinin tümör ilerlemesinde kritik bir rol oynadığı öne sürülmüştür [283, 284]. Oral karsinogenez ile ilgili çalışmaların sayısı sınırlı olmakla birlikte, Kim ve diğerleri [285], orta ve şiddetli displazi ve invaziv OSHK'da in situ ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu kullanarak hTERT ifadesini göstermişlerdir, ancak normal epitelde ve hafif displazide ifade gözlenmemiştir. Ek olarak, insan telomeraz RNA bileşeni (hTERC) gen kazancını barındıran %90'ında OPML vakasının sadece %5'inde OSHK'ya ilerleme gözlenmiştir [283, 284].

Mikrodamar yoğunluğu (MVD), anjiyogenetik paternlerin nicelenmesi için bir parametredir. Artan MVD, anjiyogenez üzerinde iyi bilinen düzenleyici etkilere sahip olan vasküler endotelial büyüme faktörü-A'nın (VEGF-A) yüksek ifadesi ile önemli ölçüde ilişkilidir [261]. OL klinik tanısı olan lezyonları değerlendiren çoğu retrospektif çalışma, displazi şiddeti ile tek tip bir artış her zaman gözlenmese bile [286, 287], VEGF-A ekspresyonunun

normal epitelden OL'ye, displazi yoluyla OSHK'ya önemli ölçüde arttığını bildirmiştir [286, 288, 289].

Hücre adezyonu ile ilgili moleküller, oral skuamöz epitelde önemli yapısal bir rol oynar. Bu adezyon moleküllerinin ifadesinin azalması, farklılaşma kaybı ve invazyonu kolaylaştıran bir “mezenkimal” fenotip edinim arasındaki ilişkiyi destekleyen güçlü kanıtlar olduğunu göstermektedir [290]. OPML'lerin OSHK'ya ilerlemesinde erken prognostik bir belirteç olarak E-kadherinin etkinliğine ilişkin sınırlı veri bulunmaktadır. von Zeidler ve diğerleri [290], OL'de E-cadherin immünoekspresyon seviyesi ile epitelyal displazi derecesi arasında bir ilişki tanımlamışlardır. OL'de, E-kadherin ifadesi, normal oral mukozada ve hafif dereceli displazide benzer olmasına rağmen, metastatik OSHK'nın yanı sıra orta-yüksek dereceli displazide azalmış veya kaybolmuştur. E-kadherin düşük ifadesi, epitelyal kohezyonun bozulmasını gösteren ve invaziv OSHK'ya ilerlemeyi haber veren erken bir fenomen olduğu öne sürülmüştür. Hücre-hücre etkileşimlerine ve hücre adezyonuna katılan diğer moleküller, oral premalignite bağlamında sporadik olarak incelenmiştir. Örneğin, CD44 adezyon molekülünün ifade kaybının, dil SHK'sı için displastik epitelde düşük ifade eğilimi göz önüne alındığında, dil karsinogenezinde erken bir olay olarak kabul edilebileceği öne sürülmüştür [291]. OL'de, CD44 varyant izoformu v6 (CD44 v6), artan displazi dereceleriyle birlikte azaldığı bulunmuştur [292]. Ancak Rautava ve diğerleri [293], CD44 v6 ifadesinin oral displazi ve bunun sonucu ile anlamlı bir korelasyon göstermediğini ve dolayısıyla OPML için prognostik biyobelirteç olmasının kullanışsız olduğunu ifade etmişlerdir.

Hücre dışı matriks bozulması, tümör invazyonunun temel bir adımıdır ve kanser ilerlemesinin önemli bir özelliğidir [294, 295]. Matriks metalloproteinazların (MMP) yüksek ifadesinin, OSHK'da dâhil olmak üzere birçok malignitede tümör invazyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Birkaç çalışmada, bölgesel lenf nodu ve/veya uzak metastaz ile ilişkili kötü prognoz belirteci olarak potansiyel kullanışlılığı da dahil olmak üzere ağız kanserinde MMP-9'un rolünü vurgulamıştır [294, 296, 297]. Bununla birlikte, az sayıda çalışma MMP değişikliklerini ve bunun OPML'lerdeki rolünü incelemiştir. Jordan ve diğerleri [298], ilerleyen ve ilerlemeyen oral displazide MMP-1, -2 ve -9 mRNA ifade seviyelerindeki değişiklikleri incelemişlerdir. Özellikle, kansere ilerleyen vakalarda MMP-1 ve -9 mRNA seviyeleri önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur, bu durum bu biyobelirteçlerin malign dönüşümde faydalı belirteçler olabileceğini düşündürmüştür.

Siklooksijenazlar (COX-1 ve COX-2) araşidonik asitten prostaglandinlerin sentezini katalize eder [261]. COX-2'nin maligniteye dahil olması, kötü prognoz, agresif klinik davranış, azalmış sağkalım ve tedaviye yanıtızsızlık gibi klinik parametrelerle ilişkisi ile de vurgulanır [299, 300]. COX-2 ifadesi ve OPML'lerdeki fonksiyon arasındaki ilişki, in vitro, hayvan ve insan seviyelerinde çeşitli modellerde doğrulanmıştır. Örneğin, COX-2, oral likenoid hastalığın alt tiplerinde yüksek ifade edilmiştir ve alt tipler arasındaki ifade farklılıklarının daha yüksek premalign potansiyeli olan lezyonları tanımlayabileceği anlamına geldiği tespit edilmiştir [301].

ErbB1 ve HER1 olarak da adlandırılan EGFR, dönüştürücü büyüme faktörü-a dahil olmak üzere epidermal büyüme faktörü (EGF) ve EGF ile ilgili peptitler için spesifik olan bir hücre yüzeyi reseptörüdür. ErbB reseptör tirozin kinaz ailesine aittir. EGFR, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasındaki sinyalleşmeyi düzenler ve fosforile edildikten sonra 3 ana hücre içi sinyal yolu aracılığıyla sinyal verebilir: Bunlar; Ras-Raf-mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolu, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/protein kinaz B (Akt)/rapamisin (mTOR) yolunun memeli hedefi ve Janus-kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (Jak2/STAT3) yolağıdır [261]. 148 displastik OPML'yi ele alan retrospektif çalışmada [302] ve 145 hastayı değerlendiren prospektif çalışmada [303], EGFR'nin yüksek ifadesinin malign transformasyon riskinin bağımsız olmadığı gösterilmiştir [303, 304]. Artan EGFR gen kopya sayısına sahip hastalar, 10 yıl sonra, sırasıyla %67'ye karşı %16'lık önemli ölçüde daha düşük bir oral kanser olmayan bir oran göstermiştir ($P = .0007$) [303]. OL'yi malign transformasyon veya malign transformasyon olmadan karşılaştıran retrospektif bir vaka kontrol çalışması, kansere ilerleyen displastik olmayan OL'de EGFR'nin önemli derecede yüksek ifadesini göstermiştir ($P = .013$), ancak bu ilişki hafif displazili OL'de neredeyse kaybolmuştur ($P = .049$) ve orta-şiddetli displazili OL'de ise EGFR ifadesi ise gözlenmemiştir [305]. EGFR'nin aşağı regülasyonunda veya alternatif mekanizmalar yoluyla etkinleştirilebilen diğer onkojenik sinyal yolları da OPML'lerde ve/veya oral displazide sporadik olarak değerlendirilmiştir. Örneğin, PI3K/Akt/ mTOR yolunun aşağı akış hedefi olan fosforile aktif S6 formunun immünohistokimyasal seviyeleri, normal oral mukoza veya hiperplazilere kıyasla oral displazide bazal ve parabazal hücre katmanlarında oldukça yüksek bulunmuştur [306]. Benzer şekilde, aynı yolun p-Akt ve p-mTOR gibi diğer üyeleri, oral displazi ve OSHK'da displastik olmayan dokularda daha yüksek ifade seviyeleri göstermiştir ve erken OSHK tespiti için potansiyel tanı belirteçleri olarak önerilmiştir [307].

Premalignitenin öngörücü göstergeleri olarak epigenetiği kullanmanın mantığı, epigenomun transkriptom ve proteom üzerinde varlığının kanıtlanmış olmasıdır [308]. Genel olarak, epigenetik DNA yeniden programlamasının kanser evriminin tüm aşamalarında yer aldığı [309-311] ve bu modellemenin DNA metilomunun miktarı, kanser benzeri kök/progenitör hücrelerin başlamasından önce gelmektedir [311]. Bu nedenle, DNA metilasyonunu içeren anormal epigenetik değişiklikleri anlamak ve tanımlamak, erken kanser biyobelirteçlerini ortaya çıkarmak için anahtardır [312]. Epigenetik modifikasyonlar, histon ve DNA metilasyonunu; histon asetilasyonu ve sumoylasyonu; mikroRNA ve uzun kodlamayan RNA transkripsiyon sonrası düzenlemeleri içerir [261]. OSHK için en büyük riski oluşturan alkol ve tütün ve metabolitleri, metiltransferazların ifadesini değiştirerek kanserdeki metilasyon profillerini etkileyebilir [313, 314]. Bugüne kadar, sınırlı sayıda çalışma, OPML'lerde ve/veya displazide hipermetilasyonu araştırmıştır. Kresty ve diğerleri [315], *p16INK4A* geninin hipermetilasyonunun, oral displazi vakalarının yaklaşık %40'ında gözlemlendiğini bildirmişlerdir ve bu metillenmiş displazi vakalarının neredeyse hepsinin OSHK'ya ilerlediğini göstermişlerdir. p16 ve p15 genlerinde artan hipermetilasyon de hafiften ağır displaziye ilerlemede görüldüğünü rapor etmişlerdir [316]. Ayrıca, p16 gen hipermetilasyonunun oral premalign mukozada bulunduğu gösterilmiş ve OSHK'ya ilerlemede artan ifadesi bunun erken evrede kullanılabilecek biyobelirteç olduğunu göstermektedir [317].

Histon değiştirici kompleksler, histon işaretlerinin düzeninin ve seviyelerinin bozulmasıyla bağlantılı olan fonksiyonel değişikliklere maruz kalabilir; kromatin bazlı süreçlerin ardından gelen bozulma, nihayetinde onkogenik transformasyona ve tümör invazyonuna yol açabilir [318]. Histon modifikasyonundaki anormallikler, gen promotörleri seviyelerinde değişiklikler, gen kodlama bölgelerindeki değişiklik, tekrarlayan DNA dizilerindeki ve diğer genomik elementlerdeki dağılımdaki değişiklikler dâhil olmak üzere karsinogenezde sıklıkla meydana gelir [318]. Ağız kanserinde, Lys4, Lys9, Lys18 ve Lys27 spesifik pozisyonlarındaki H3 histonundaki lizin molekülleri metillenir ve/veya asetillenir. Ağız kanserinde histon modifikasyonu üzerine kümülatif çalışmalar da H3 histonunun spesifik lizin molekül pozisyonlarında metilasyonunu göstermiştir. H3 histon üzerinde lizinlerin asetilasyonu oral kanserlerin K4, K9 ve K18 pozisyonlarında rapor edilmiştir [313]. Bununla birlikte, şimdiye kadarki tüm çalışmalar sadece SHK'ları ele almıştır ve OPML'ler veya displazi ile ilgili veriler hâlâ beklenmektedir [261].

Oral premalignite/displazide miRNA profillerinin ilişkisine ilişkin yalnızca sınırlı sayıda rapor bulunmaktadır. Örneğin, epitel displazisine kıyasla ilerleme olasılığı daha düşük olduğu düşünülen hiperkeratotik ve hiperplastik lezyonlar dahil olmak üzere, OPML'lerde miR-31'in arttığı, muhtemelen normal insan keratinositlerini ölümsüzleştirmek veya malign hücrelere dönüştürmek için hTERT ile iş birliği yaptığı ve böylece erken evre oral karsinogeneze katkıda bulunduğu bildirilmiştir [319]. Cervigne ve diğerleri [320], 52 ilerleyici oral displazi ve OSHK ile 5 ilerleyici olmayan displaziden oluşan bağımsız bir çalışma yapmışlardır ve global miRNA ifade profillerinin ilerleyici OL/OSHK'yı ilerleyici olmayan OL/normal dokulardan ayırt ettiğini göstermişlerdir. Yüz dokuz miRNA, yalnızca ilerleyici OL ve invaziv OSHK'da yüksek oranda ifade edilmiştir. miRNA-21, miR-181b ve miR-345'in ifadesi tutarlı bir şekilde arttığı bulunmuş ve OSHK'ya ilerleme sırasında lezyon şiddetindeki artışlarla ilişkilendirilmiştir. miRNA-21, miRNA-181b ve miRNA-345'in yüksek ifadesinin, malign transformasyonda gözlemlendiği öne sürülmüştür. OPML ve ağız kanseri ile ilişkili miRNAların invaziv olmayan değerlendirmelerine göre oldukça hassas ve spesifik olduğu kanıtlanmıştır, bu da yüksek riskli ağız kanserinin, miRNAların ifadesinde meydana gelen değişikliklerle tanımlanabileceğini göstermektedir [321].

Kanser kök hücreleri (KKH), OSHK da dâhil olmak üzere çeşitli solid tümörlerde bulunur. KKH'ler, tümör hücrelerinin küçük bir alt popülasyonunu temsil etmesine rağmen, yüksek kendini yenileme ve farklılaşma kapasitesi ile ilişkili yüksek tümörjenik potansiyel sağlayan çeşitli özellikler ile karakterize edilirler [322]. KKH'lerin biyobelirteç olarak kullanılmasında, podoplanin (PDPN), aldehit dehidrogenaz (ALDH), CD133, MI1, lösün açısından zengin tekrar içeren G-protein bağlı reseptör 5 (LGR5) ve LGR4, gibi çeşitli proteinler tanımlanmıştır [323-325]. Kawaguchi ve diğerleri, 7.5 yıllık bir takip periyodu ile OPML'leri olan 150 hasta üzerinde prospektif bir çalışma gerçekleştirmişler ve PDPN yüksek ifadesi ile malign transformasyon arasında güçlü bir ilişki gözlemlemişlerdir [326].

DNA hasar yanıtı (DHY), hücrenin genomik değişiklikleri düzeltmesini sağlayan bir dizi yolu ve molekülü kapsar [327]. Genomik kararsızlık kanserin ortaya çıkan ayırt edici özelliklerinden biri olduğundan, DHY işlev bozukluğu kanser gelişiminde çok önemli bir rol oynamaktadır [328]. İlerleyen veya ilerlemeyen OPML'lerin (lökoplakiler ve eritroplakiler) retrospektif bir çalışmada, pChk2 pozitif immünoekspresyonu, atipi olmayan vakalar arasında 8.6 kat daha fazla malign transformasyon olasılığı ile korele bulunmuştur. pChk2 boyamasının, sırasıyla %85.2, %74.2 ve %78.2'lik duyarlılık, özgüllük

ve pozitif tahmin edici değerleri ile OPML'den OSHK'ya malign transformasyonunun 3 yıl içinde gerçekleşebileceğini öngördüğü bildirilmiştir [329].

Çizelge 2.1. Likit biyopsilerde OPML'lerdeki araştırılmış moleküler biyobelirteçlerin özeti [261]

Çalışma kategorisi	Spesifik moleküler biyobelirteçler
DNA ploidi LOH Hücre döngüsü, proliferasyon ve apoptoz ilişkili molekül	DNA anöploidi 3p14 (FHIT), 9p21 (p16 INK4a/CDKN2A), 17p (TP53) Ki-67, PCNA, MCM2, siklin D1, p16INK4A, TP53, MDM2, pRb, survivin
İmmortalizasyon Anjiyogenez	Telomeraz, hTERT, hTERC VEGF-A, VEGFR2
Hücre adezyonu	E-kaderin, kateninler, CD44 v6
Matriks Metalloproteinazlar (MMP)	MMP -1, -2, -9, -20
İnflamasyon Sinyal yolları Epigenetik olaylar- DNA metilasyonu Epigenetik olaylar- histon modifikasyonları Epigenetik olaylar-mikroRNAlar Kök hücreler DNA hasarı	COX-2 EGFR/TGF- α , PI3 K/Akt/mTOR/pS6 DNA methylation <i>p16 INK4 A</i> , <i>p15</i> , <i>p14 ARK</i> , <i>FOXM1</i> , <i>MGMT</i> , <i>RARB2</i> , <i>CDH1</i> , <i>COX-2</i> , <i>TSPYL5</i> , <i>CLDN11</i> , <i>NKX2-3</i> , <i>RBP4</i> , <i>CMTM3</i> , <i>TRPC4</i> , <i>MAP6</i> , <i>KIF1 A</i> , <i>EDNRB</i> , <i>HOXA9</i> , <i>DCC</i> , <i>ZNF582 m</i> , <i>PAX1 m</i> , <i>DAPK</i> , <i>GSTP1</i> , <i>LATS1</i> , <i>DBCR1</i> H3 (Lys4, Lys9, Lys18, Lys27, Lys36) miR-21, -31, -146 a, -211, -204, -24, -155, -181 b, -345 (yüksek ifade) miR-125 b, -145, -126, -203, -218, -585, -99 a, -137 (düşük ifade) miR-208b-3 p (ileri lezyonlarda yüksek ifade) miR-204-5 p, 129-2-3p ve 3065-5p (ilerlemiş lezyonlarda düşük ifade) PDPN, ABCG2, ALDH1, CD133 γ -H2 AX, phospho-CBK2 Thr68

2.11.6. Likit biyopsilerin OSHK'da kullanımı

Son zamanlarda, OSHK'nın da dâhil olduğu baş ve boyun kanserlerinde likit biyopsi kullanımı oral onkolojide büyük ilgi görmeye başlamıştır [330-332].

Baş ve boyun skuamöz hücre karsinomlu (BBSHK) hastaların vücut sıvılarında tanısıl ve prognostik belirteçler olarak test edilen mRNAlar, vücut sıvılarında RNaz bozunmasına karşı yüksek duyarlılıkları olması nedeniyle bu belirteçlerin stabilitesi oldukça düşüktür. Buda mRNAların, likit biyopsi belirteçleri olarak etkinliklerini ve tekrarlanabilirliğini engellemekte ve günümüze kadar çok az araştırılmalarına sebep olmuştur. Ancak, Li ve diğerlerinin [333], bu konuya ışık tutmasıyla birlikte tükürük örneklerinde mRNA'yı değerlendirmenin uygulanabilirliği gösterilmiştir. Araştırmacılar, 32 primer OSHK ve 32 sağlıklı bireyden alınan tükürük örneklerinin transkriptomunu değerlendirmişler ve insan

mRNA panelinin tükürükte güvenilir bir şekilde tespit edilebileceğini ortaya koymuşlardır. Yine aynı araştırmacılar, 7 kanser ilişkili mRNA biyobelirteci, kanser hastalarının tükürüğünde yüksek düzeyde ifade edilmiş ve tekrarlanan çalışmalarla tutarlı bir şekilde doğruluğunu ispatlamışlardır [333]. Bu potansiyel tükürük RNA biyobelirteçlerinin, interlökin-8 (*IL8*), interlökin-1beta (*IL1B*), Dual Spesifik fosfataz-1 (*DUSP1*), Hemagglutinin-3 (*HA3*), Ornitin Dekarboksilaze Antizim 1 (*OAZ1*), S100 kalsiyum bağlanma proteini (*S100P*) ve Spermin asetil transferaz (*SAT1*)'ın transkriptleri olduğunu göstermişlerdir [333]. Bu belirteçlerin içerisinde 4 tükürük mRNA'sı (*OAZ*, *SAT*, *IL8* ve *IL1b*) toplu olarak OSHK tespiti için %91 duyarlılık ve özgüllükte olduğu saptanmıştır [333]. Potansiyel biyobelirteçleri ileri süren bu çalışmayı takip eden diğer araştırmalarda da bu sonuçlar doğrulanmaya çalışılmıştır. Yine aynı çalışmada değerlendirilen 7 mRNA'nın (*IL8*, *IL1B*, *DUSP1*, *HA3*, *OAZ1*, *S100P* ve *SAT*), 395 gönüllüden oluşan beş bağımsız vaka kontrol çalışmasında OSHK'lı hastaları sağlıklı gruptan ayırt edip edemediğini değerlendirmişlerdir [333]. Değerlendirilen mRNAların tümünün ifadesi, beş bağımsız vakanın tümünde kontrollerle kıyaslandığında OSHK'da arttığını ve *IL-8* ve *SAT*'deki artışın da istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermişlerdir [334]. Michailidou ve diğerlerinin [335] yaptıkları farklı bir çalışmada ise, primer OSHK'lı 34 hastanın (T1N0M0/T2N0M0), 20 oral lökoplaki ve displazili hastanın ve 31 sağlıklı bireyin tükürüğünde *OAZ*, *SAT*, *IL8* ve *IL1b* varlığı araştırılmıştır. Çalışma bulguları söz konusu mRNA ların OSHK'lı hastalarda %80' oranında tanıda iyi bir biyobelirteç olabileceğini, ancak OPML'ye sahip bireylerde aynı olasılığın söz konusu olmadığını bildirmişlerdir [335].

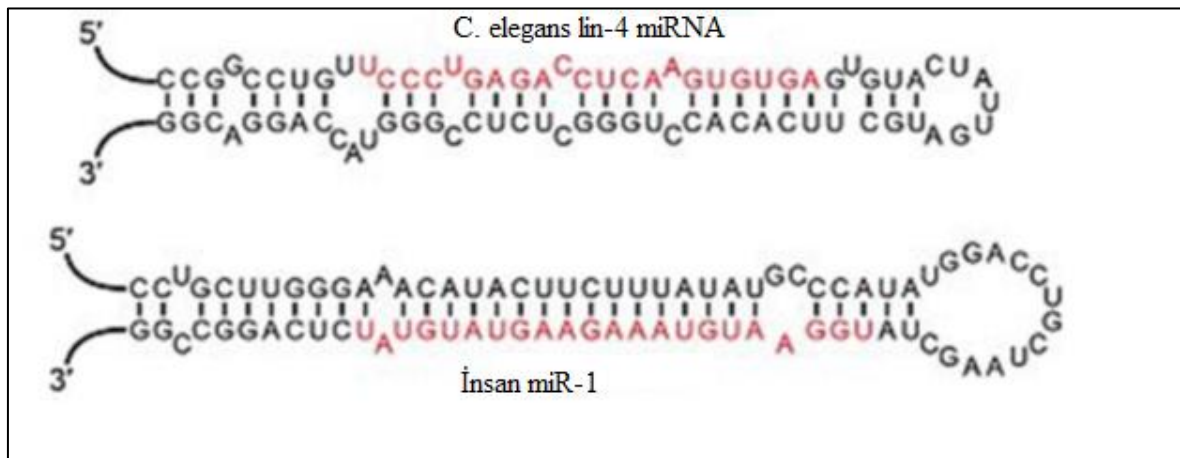
Aggarwal ve diğerleri (2015), OSHK hastalarının serumda ve tümör bölgelerinde kontrollerle kıyasla önemli ölçüde daha yüksek galektin-1 (*gal-1*) ve *gal-3* mRNA seviyeleri ifade ettiğini bulmuşlardır [336]. Ayrıca, daha yüksek tümör yüküne sahip hastalar, sağlıklı grup ile kıyaslandığında hastalar arasında ayırım yapabilen her iki *galektinin* de anlamlı olarak daha yüksek ifade gösterdiğini ve bu sonuçların %80'den fazla duyarlılık ve özgüllük değerine sahip olduğunu da bildirmişlerdir [336]. Bu, J. ve diğerlerinin (2015) OSHK hastalarının ve negatif kontrollerin doku, serum ve tükürüğündeki *transgelin* mRNA'sı ile yaptıkları çalışmaları sonucunda OSHK hastaları ve sağlıklı kontroller arasında serum *transgelin* mRNA ekspresyonunda çok az fark bulmuşlar; bununla birlikte, bu belirteç OSHK hastalarından alınan doku ve tükürükte yüksek ifade edildiğini göstermişlerdir. Bu yüksek ifade, daha kötü genel sağkalım gibi klinikopatolojik parametrelerle korelasyon göstermiştir ve OSHK için bağımsız prognoz faktör olduğunu öne sürmüşlerdir. Bunun

sonucunda *transgelin* mRNA'sının OSHK için umut verici biyobelirteç olarak hizmet edebileceğini savunmuşlardır [337].

Baş ve boyun tümörlerinin ctDNA çalışmalarının çoğu meme, yumurtalık, prostat, kolorektal ve akciğer gibi farklı tümör türlerini içeren daha geniş araştırmaların bir parçası olarak gerçekleştirilmiştir. Lawrence MS ve diğerleri [338] HNSCC'nin moleküler profilini tanımlayarak *TP53* (%72), *PIK3CA* (%21), *FAT1* (%23) ve *CDK2NA*'nın (%22) bu tümörlerde anahtar mutasyonlar olduğunu bildirmiştir.

2.12. MikroRNAlar

MikroRNAlar (miRNAlar), hedef mRNA'nın 3' çevrilmemiş bölgesi (UTR) ile etkileşim yoluyla genlerin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan, yaklaşık 19-25 nükleotid uzunluğunda, küçük tek sarmallı kodlama yapmayan endojen RNAların büyük bir grubunu temsil etmektedir. Translasyonun önlenmesi veya mRNA parçalanmasına neden olarak gen düzenlenmesini sağlayan miRNAlar, farklılaşma, metabolizma, çoğalma, göç, anjiyogenez indüksiyonu ve apoptoz gibi önemli pek çok sürecin etkilenmesine neden olur [339]. 1993 yılında *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilmiş ilk miR olan *lin-4*'ün keşfinden bu yana [340], insan genomundaki genlerin üçte birini düzenleyen 2.500'den fazla miRNA keşfedilmiştir [341, 342]. İnsanda ise ilk belirlenen miRNA hsa-miR-1'dir (Şekil 2.10).

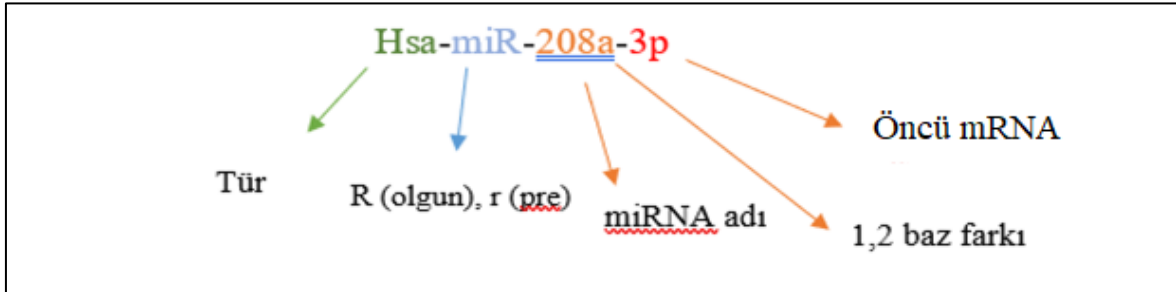


Şekil 2.10. miRNA yapısı [343].

Mirbase veri tabanındaki verilerden yola çıkarak (www.mirbase.org) günümüzde tanımlanmış 271 mikroorganizmadan 38 589 öncü, 48 860 olgun miRNA kaydı bulunmaktadır [344].

miRNA genlerinin büyük çoğunluğu (%61) protein kodlayan genlerin intronik bölgelerine yerleşmişlerdir, ancak genler arası bölgelerde ya da ekzonlarda da bulunan miRNA genleri de gösterilmiştir [345].

miRNAlar isimlendirilirken; ilk olarak ait oldukları türlerin kodu ile (örneğin insan miRNAları hsa (Homo sapiens)) başlar. Tür isminden sonra sırası ile mikroRNA kısaltması (miR) ve o miRNA'ya ait numara (keşfedildiği sıraya göre belirlenmiş) eklenerek miRNA isimlendirmesi yapılır. Eğer aynı miRNA 1-2 bazlık bir fark içeriyorsa numaranın yanına bir harf kodu belirtilir. Bazı durumlarda bir öncül miRNA'dan birden çok olgun miRNA oluşabildiği için bu durum yıldız (*) işareti ile ayrılarak bu farklılık belirtilir. Son olarak miRNA'nın hangi zincirden sentezlendiğini göstermek için de 3p ya da 5p (öncü) eklenerek isimlendirme tamamlanmış olur [344] (Şekil 2.11).

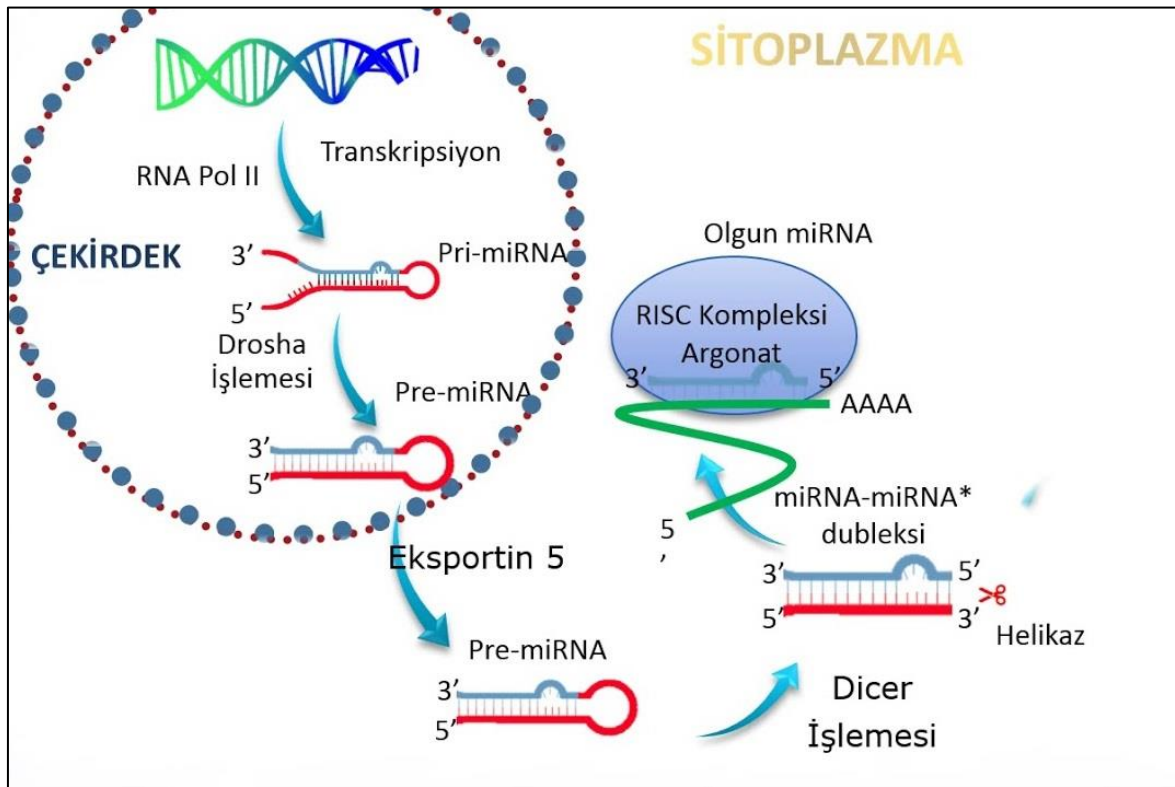


Şekil 2.11. miRNA isimlendirmesi [344]

2.12.1. miRNA biyogenezi

miRNAlar ilk olarak öncül transkript haliyle çekirdekte bulunur ve kesilme aşamasından sonra olgun miRNA formunu alırlar (Şekil 2.12). miRNAlar, 60-70 bp'nden oluşan hairpin (saç tokası) transkriptler halinde RNA polimeraz II tarafından sentezlenirler. Sentezlenen bu ilk miRNA yapısı pri-miRNA olarak isimlendirilir. pri-miRNA Drosha-DGR8 protein kompleksi tarafından; 5' ve 3' uçlarından kesilerek pre-miRNA'ya dönüştürülür. Drosha bir RNaz III türü ve RNaz IIIa ve RNaz IIIb bölgelerini bulundurmaktadır. DGR8'de Drosha'nın miRNA'ya bağlanmasını sağlayan moleküldür. Oluşan pre-miRNA eksportin-5 (GTP-

bağlayıcı protein) ile çekirdekten sitoplazmaya aktarılır. Bu geçiş RNA-GTP bağlantısı GTP'nin GDP'ye hidroliz, ile olur. Sitoplazmaya aktarılan pre-miRNA, Dicer-TRBP (transaktivasyon yanıt elemanı RNA-bağlayıcı protein) kompleksi ile etkileşir. Dicer, RNA'ya bağlanan helikaz altbirimi, kesim gerçekleştiren RNaz III altbirimi ve PAZ (miRNA'nın uçlarına bağlanan bölge) altbirimlerini içerir. Dicer'ın TRBP ile birleşerek kompleks oluşturur. Böylece miRNA'nın uzunluğu belirlenir. Dicer kesimi ile olgun miRNA oluşur. Olgun miRNA, RNA aracılı susturma (RISC) kompleksi ile argonat (AGO) proteinine bağlanarak hedef mRNA yıkılır veya translasyon inhibe edilir [346]. AGO2 proteini, baskılanan mRNA'nın parçalanmasını gerçekleştirir. İnsanlarda üç farklı tipte AGO proteini bulunmaktadır. AGO2 dışındaki AGO proteinleri doğrudan yıkımda görevli değildir, translasyonel baskılama veya deadenilasyon yaparak miRNA'yı yıkıma doğru yönlendirirler [218].

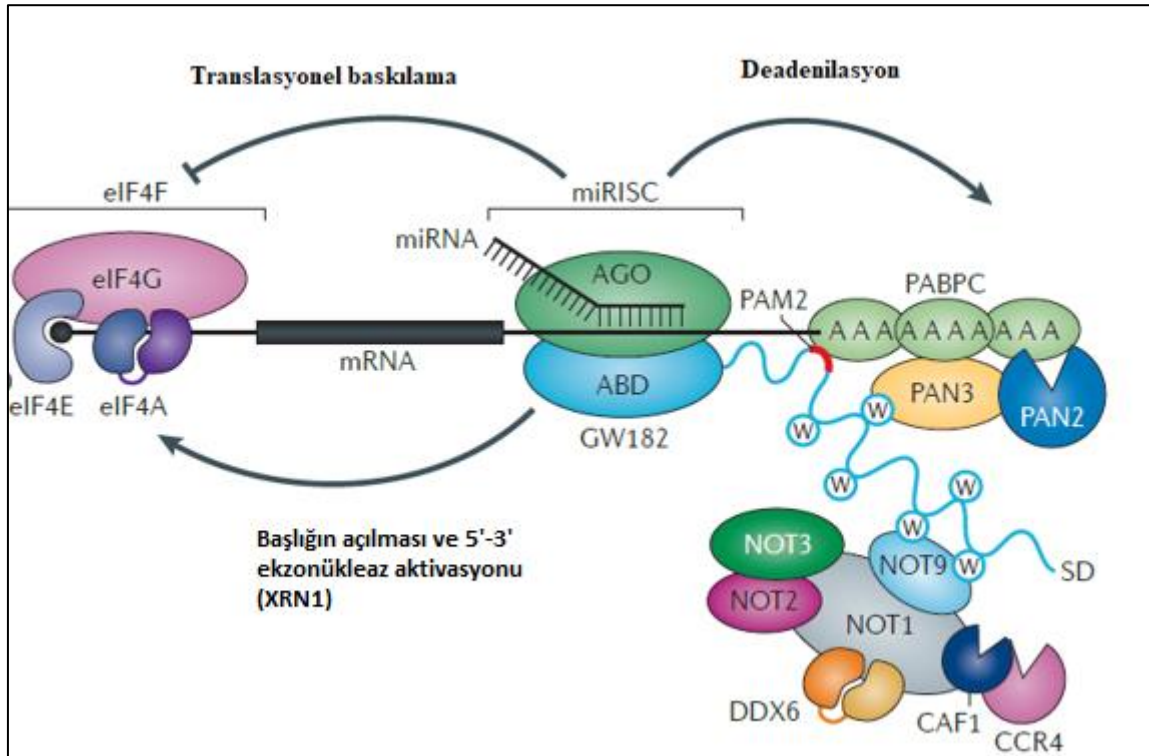


Şekil 2.12. miRNA biyogenezi [347]

2.12.2. miRNA aracılı mRNA baskılanması

miRNAların hedef mRNA'ları baskılama mekanizması Şekil 2.13'te gösterilmiştir.

1. miRNA ile indüklenen susturma komplekslerinde (miRISCler) bir Argonaute (AGO) proteinine bağlanan mikroRNA (miRNAlar), çoğunlukla mRNA'nın 3' çevrilmemiş bölgesinde bulunan kısmen tamamlayıcı bağlanma bölgelerine baz eşleşmesi yaparak mRNA hedeflerini tanır.
2. AGO proteinleri, sırayla sitoplazmik poli(A) bağlayıcı protein (PABPC) ve sitoplazmik deadenilaz kompleksleri PAN2-PAN3 ve CCR4-NOT ile etkileşimde olan bir GW182 proteini ile etkileşime girer. PAN2-PAN3 ve CCR4-NOT kompleksleri, mRNA hedefinin deadenilasyonunu katalize eder (GW182 proteinleri, bir amino terminal AGO-bağlanma alanından (ABD) ve bir susturma alanından oluşur).
3. Hayvan hücre kültürlerinde, deadenile edilmiş mRNAların başlıkları açılır ve 5' ile 3' eksoribonükleaz 1 (XRN1; gösterilmemiştir) tarafından hızla bozunur.
4. Ek olarak, miRNAlar translasyonu baskılar, ancak bunun kesin moleküler mekanizması belirsizliğini korumaktadır. Ortaya çıkan fikir birliği, miRNAların, ökaryotik başlatma faktörü 4F (eIF4F) kompleksinin aktivitesi ve/veya eklenmesine müdahale ederek translasyon başlatmasını inhibe etmesidir [348].



Şekil 2.13. miRNA aracılı mRNA Baskılanması. DDX6, DEAD Box proteini 6; PAM2, PABP etkileşimli motif 2 [348].

2.12.3. miRNA'ların kanser gelişimindeki fonksiyonu

İnsanlarda protein kodlayan genlerin yaklaşık yarısının ifadesinin miRNA'lar tarafından düzenlendiği bilinmektedir. miRNA'lar hücre çoğalması, hücre farklılaşması, hematopoez, apoptoz, otoimmünite ve tümörögenез gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol oynayan küçük kodlama yapmayan moleküllerdir [349]. Tümör gelişimini destekleyen miRNA'lar onko-miR olarak adlandırılırken, tümör baskılayıcı özellikte olan miRNA'lar tümör baskılayıcı-miR olarak adlandırılırlar [350]. Normal şartlarda tümör baskılayıcı ve onkogenik miRNA'lar denge halinde bulunurlar. Tümör baskılayıcı miRNA'lar kanser başlatıcı genlerin baskılanmasında, onkogenik miRNA'lar ise tümör baskılayıcı genlerin baskılanmasında rol oynayarak gen ifadesindeki değişikliğe neden olurlar. Kanserleşme sürecinde tümör baskılayıcı-miRlerin ifadelerinde azalma gözlenirken, onkogenik miRlerin ifadesinde ise artış görülür. İfade seviyelerindeki bu düzensizlikler çeşitli sinyal yollarının da üzerinde etkili olur [351].

miRNA'ların, OSHK' da dâhil olmak üzere, meme kanseri, akciğer kanseri, mide kanseri, kolorektal kanser, hepatosellüler karsinom, glioblastoma, prostat kanseri, baş-boyun kanserleri gibi insan neoplazmalarında sıklıkla anormal şekilde ifade edildiği gösterilmiştir. miRNA ifade seviyelerindeki değişiklikler, sağlıklı hücrelerde bulunan normal sinyal yollarının işlevini bozarak karsinogenез oluşumuna zemin hazırlarlar.

2.13. OSHK ve Likit Biyopside miRNA'lar

Dolaşımdaki miRNA'ların, sağlıklı bireylere kıyasla OSHK hastalarının vücut sıvılarında farklı seviyeler gösterdiği gösterilmiştir [352, 353]. miRNA'lar serum veya plazmada oldukça kararlıdır ve gelecekte kanser biyobelirteçleri olarak kullanımları için artan potansiyele sahiptirler [354]. Dolaşan miRNA'lar RNase tarafından parçalanamaz ve kaynatıldıktan sonra ya da çoklu donma-çözülme döngülerinden sonra yüksek pH'da stabil halde bulunurlar [355, 356]. miRNA'lar argonaute proteine bağlıyken, hücre dışı ortamda yada eksozomlar gibi hücre dışı veziküllerin içinde kapsüllenmiş olsun veya serbestçe dolaşan olsun, stabil durumda bulunurlar [357, 358].

Son birkaç yılda, çeşitli miRNA'larda önemli farklılıklar olmasına rağmen, birkaç tane tanımlanan miRNA'nın, OSHK hastalarının serum veya plazmasında sağlıklı kontrollere

kıyasla farklı ifade seviyeleri gösterdiği bildirilmiştir [139].

OSHK’da ifade farklılığı saptanmış çok sayıda miRNA bulunmaktadır. Bu mikroRNAlar arasında miR-24, miR-21, miR-31, miR-184, miR-211, miR-222, miR-221 OSHK’da ifadesi artış gösterirken, miR-203, miR-100, miR-200, miR-133a, miR-375, miR-133b, miR-138, OSHK’da ifadesi azalan miRNAlara örnektir [139, 359]. Çizelge 2.2’de oral kanser patogenezinde regülasyonu sıklıkla bozulan miRNAların hedefledikleri gen, miRNA’nın türü, kanser hücreleri üzerine etkisi, kullanılan biyomateryal ve biyobelirteç rolleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Oral kanser patogenezinde sıkça regülasyonu bozulan mikroRNAlar [139, 359].

miR	İfade seviyesi	miR Türü	Kanser Hücreleri Üzerine Biyolojik Etkisi	Hedeflediği gen	Kullanılan biyomateryal	Biyobelirteç rolü	Referans
miR-21	↑	onkomiR	Proliferasyon, İnvazyon, Metastaz	<i>PTEN, TMP1, PDCD4</i>	Tümör dokusu, tükürük	Tanı ve prognostik	[360-362]
miR-24	↑	onkomiR	Kemoterapiye direnç, antiapoptotik	<i>FBXW7, PTEN, CDKN1B, DND1, CDKN1C,</i>	Tümör dokusu, plazma, tükürük, plazma	Tanı	[363-366]
miR-31	↑	onkomiR	Proliferasyon, İnvazyon, Farklılaşma, Metastaz	<i>FIH, ARID1A, Ku80, ACOX1, SIRT3</i>	Tümör dokusu, tükürük, plazma	Tanı ve prognostik	[367-371]
miR-184	↑	onkomiR	Proliferasyon, Antiapoptotik	<i>c-MYC</i>	Tümör dokusu, Tükürük, plazma, serum	Tanı	[372]
miR-211	↑	onkomiR	Proliferasyon, İnvazyon, Farklılaşma, Metastaz	<i>CDKN1B, DND1, TCF12, c-MYC</i>	Tümör dokusu	Tanı ve prognostik	[373-375]
miR-221 miR-222	↑	onkomiR	Proliferasyon, İnvazyon, Metastaz	<i>CDKN1B, CDKN1C, PTEN, ABCG2, PUMA</i>	Tümör dokusu, tükürük (sadece miR-221)	Tanı	[376-378]
miR-455	↑	onkomiR	Proliferasyon, Farklılaşma	<i>UBE2B</i>	Tümör dokusu	Tanı ve prognostik	[379]
miR-203	↓	Tümör baskılayıcı miR	Proliferasyon, Kemoterapiye direnç, Antiapoptotik	<i>PI3KCA, YES-1, BMI-1, SEMA6A</i>	Tümör dokusu, tükürük	Tanı ve prognostik	[380-383]
miR-100	↓	Tümör baskılayıcı miR	Proliferasyon, Farklılaşma	<i>ID1, MMP13, EGFR2, FGFR3</i>	Tümör dokusu	Tanı	[384]
miR-200	↓	Tümör baskılayıcı miR	Farklılaşma, İnvazyon, Metastaz	<i>ZEB1, ZEB2</i>	Tümör dokusu, tükürük	Tanı ve prognostik	[385]
miR-133a	↓	Tümör baskılayıcı miR	Farklılaşma, Proliferasyon, Antiapoptotik	<i>PKM2, GSTP1</i>	Tümör dokusu	Tanı	[386]
miR-133b	↓	Tümör baskılayıcı miR	Proliferasyon	<i>PKM2</i>	Tümör dokusu	Tanı	[386, 387]
miR-138	↓	Tümör baskılayıcı miR	Proliferasyon, Antiapoptotik, İnvazyon, Metastaz	<i>PI3KCA, YES-1,</i>	Tümör dokusu	Tanı	[388, 389]
miR-375	↓	Tümör baskılayıcı miR	Proliferasyon, İnvazyon, Metastaz	<i>PDGFA, SLC7A11, CIP2A</i>	Tümör dokusu, tükürük, plazma	Tanı	[390-394]

En sembolik miRNAlardan biri olan miR-21'in oral neoplazide yüksek ifadesi bulunmuştur [395]. Bu miRNA'nın Tropomiyosin (*TPM1*) ve ayrıca Fosfat-Tensin Homolog (*PTEN*) düzeylerini azaltabileceği gösterilmiştir [360, 361]. Fosfatidilinositol 3,4,5 trisfosfatı (PIP3) PIP2'ye defosforile ederek Fosfatidilinositol 3-Kinazın (PI3K) ters etkisi olarak işlev gören *PTEN*, önemli bir tümör baskılayıcı gen olarak kabul edilir. miR-21 tarafından *PTEN*'in düşük ifadesi, Fosfatidilinositol 3-Kinase/AKT Serin-Threonine Kinaz 1 (*PI3K/AKT*) sinyal yolunun yüksek uyarımından doğrudan sorumludur ve bir hücrenin ölüme karşı yüksek direncine ve kontrolsüz çoğalmasına yol açar [396]. Ayrıca, *TPM1*'in ifadesini azaltarak hücre apoptozunu engellediği de açıkça gösterilmiştir [397].

Programlanmış Hücre Ölümü 4 (*PDCD4*), mRNA'nın translasyonel baskılanmasını indükleyerek neoplastik hastalıklara karşı savaşta yer aldığı bilinen bir gendir [398]. *PDCD4* ifadesinin azaltılmasından miR-21'in sorumlu olduğu göz önüne alındığında, bu onkojenik miR'nin yüksek ifadesinin sadece tümör tespitinde bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği değil, bunun aynı zamanda prognostik bir biyobelirteç olarak da kullanılabileceği bildirilmiştir [360].

MiR-24, F-Box ve WD-40 domain proteini 7 geni, *FBXW7*'nin baskılanmasına neden olan neoplastik hastalıklar ve miRNA'lar arasındaki bağlantının, bir başka güçlü örneğidir. *FBXW7* geni, kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalması söz konusu olduğunda, birkaç proto-onkogenin inaktivasyonunu sağlar [366]. Ayrıca miR-24, kemoterapi tedavisine direnç indükleyebilen bir mekanizma olan *PTEN*'in 3'-UTR bölgesini hedefleyebilir. *PTEN* proteini seviyelerindeki bir azalma, *PTEN/AKT* yolunda bir bozulmaya ve hayatta kalma sinyallerinin aktivasyonuna yol açtığı rapor edilmiştir [399].

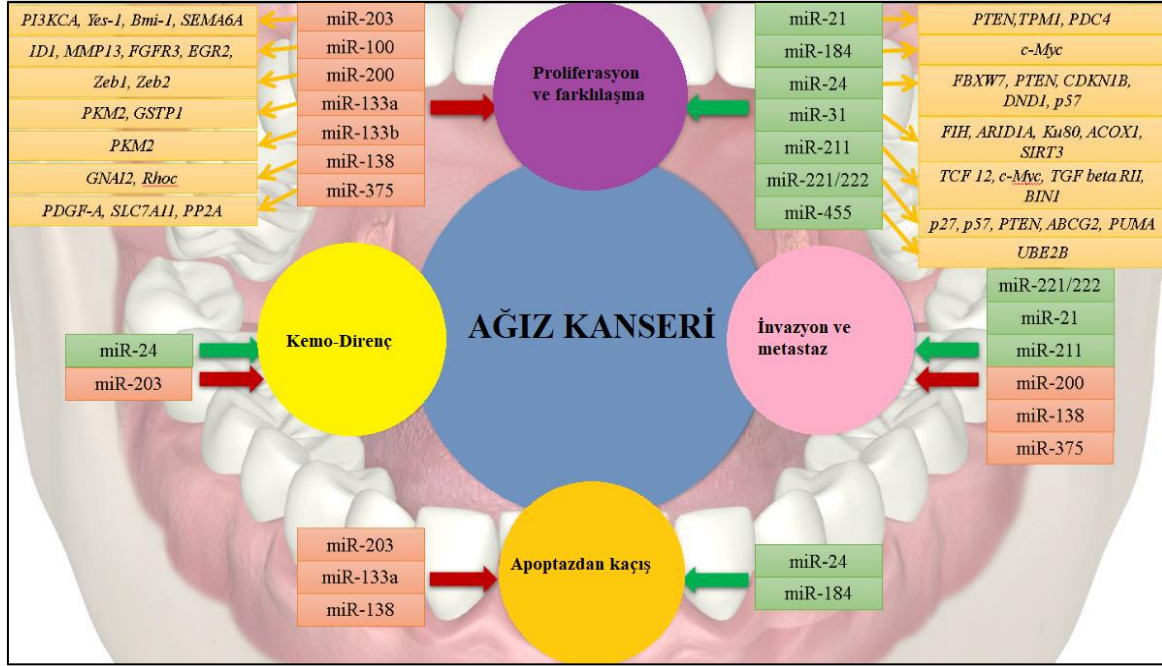
MiR-24 ile karşılaştırıldığında, miR-31'in yüksek ifadesi geç tümör evreleri ile ilişkilendirilmiştir, çünkü miR-31 seviyelerinin OSHK'da metastatik evre olmaksızın erken evrelerde yükseldiği bulunmuştur [400]. MiR-31'in karsinogenezdeki önemi, Faktör İnhibitör Hipoksi ile indüklenebilir faktörün (*FIH*) 3'UTR bölgesini hedefleyebilme kabiliyeti ile ilişkilendirilmiştir [367]. Bu faktör, hem normoksik hem de hipoksik koşullarda HIF katılımı arasındaki dengeyi koruyarak, hipoksi ile indüklenebilir faktörün (HIF) bir inhibitörü görevi görür. Böylece miR-31 tarafından *FIH* üretiminin azaltılması normoksik ortamlarda HIF aktivasyonuna yol açacak ve bu da baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomunun (BBSHK) genişlemesine katkıda bulunacaktır [367].

Diğer yüksek ifade edilmiş miRNAlarla birlikte miR-184, ağız kanserlerinin patogeneze katkıda bulunabilecek önemli bir faktör olarak kabul edilebilir. Bununla birlikte, bu hipotezi kanıtlamak için sınırlı araştırma yapılmıştır. MiR-184'ün apoptozun etkilerinden kaçabilecek proliferatif fonksiyona sahip olabileceği bildirilmiştir [386].

Bir başka yüksek ifadeye sahip miR-211, Transkripsiyon Faktörü 12 (TCF12) [373] ve *c-MYC*'i hedefleyerek, TGF reseptörü II'nin (*TGFBR2*) düşük ifade edilmesine neden olduğu gösterilmiş ve OSHK'nın karsinogenezinin arttırılmasına katkı sağladığı bildirilmiştir [374]. TCF12, baskılayıcı aktiviteleri durdururken, *TGFBR2* mikroçevrede farklılaşmayı ve neoplastik hücrelerin gelişimini desteklediği bildirilmiştir. Ek olarak, OSHK hücre hatlarında gözlemlenen Bridging İntegrator 1 (*BIN1*) geninin azalan ifade seviyeleri, miR-211'in *BIN1* geninin 3'-UTR bölgesi ile etkileşime girerek gen ifade seviyesinde azalmaya neden olduğu düşünülmektedir. Böyle bir davranış için olası bir açıklama, stres tepkileri, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz gibi çeşitli hücresel süreçleri düzenleyen *EGFR/MAPK* yolunun anormal aktivasyonundan kaynaklandığı ifade edilmiştir [375].

Fizyolojik koşullar altında miR-203, tümör baskılayıcı aktivitelerinden dolayı özellikle ilgi çekici olmuştur. MiR-203 aynı anda *YES* Proto-Oncogene 1'in (Src Ailesi Tirozin Kinaz, *YES1*) ifadesini hedeflemekten ve azaltmaktan sorumludur [380]. Ayrıca, OSHK hücre hattında yapılan çalışmalarda miR-203'ün yüksek ifadesi, antiproliferatif etki ile sonuçlandığını göstermiştir. Bu, miR-203'ün Fosfatidilinositol-4,5 Bisfosfat 3-Kinaz Katalitik Alt Birim geninin (*PI3KCA*) 3'-UTR bölgesine bağlanmasının bir sonucu olarak düşünülmektedir; böylece, AKT Serin/Treonin Kinazın ve dolaylı olarak tüm sinyal yolunun aktivitesini etkiler. Bu antiproliferatif etkilere ek olarak miR-203, tümör hücrelerini sisplatin kaynaklı ölüme karşı duyarlı hale getirme yeteneğine de sahiptir [381].

MiR-200 ailesi üyelerine gelince, ağız kanseri patogenezindeki rolleri, epitelyal-mezenkimal geçiş sırasındaki düzensizliklerine bağlanabilir, bu nedenle tümör metastazına ilerlemenin potansiyel belirteçleri olarak hizmet etmektedirler [385]. Buna ek olarak, ağız kanseri kök hücrelerinin yenilenmesi de miR-200 aile üyeleri tarafından düzenlenmektedir ve bu durumun da muhtemelen tümör nüksetmesine neden olduğu düşünülmektedir [401]. Şekil 2.14'te ağız kanseri ile ilgili çalışılan miRNAların hedef genler ile arasındaki ilişki ve oral karsinogenezdeki rolleri gösterilmiştir.



Şekil 2.14. Ağız kanserinde miRNAlar ve hedef genleri arasındaki ilişki [359].

OSHK tanısı, prognozunun takibi, hastanın sağkalımının ve tedaviye tepkisinin tanımlanması gibi birçok alanda mikroRNAların biyobelirteç olarak kullanılabilir olmalarının yanı sıra, çok sayıda hedef geni kontrol ederek önemli hücresel süreçleri düzenlemede rol oynamaları OSHK’da miRNAlara dayalı anti-kanser tedavilerini de gündeme getirmektedir [402].

2.14. Çalışmada Kullanılan Genler

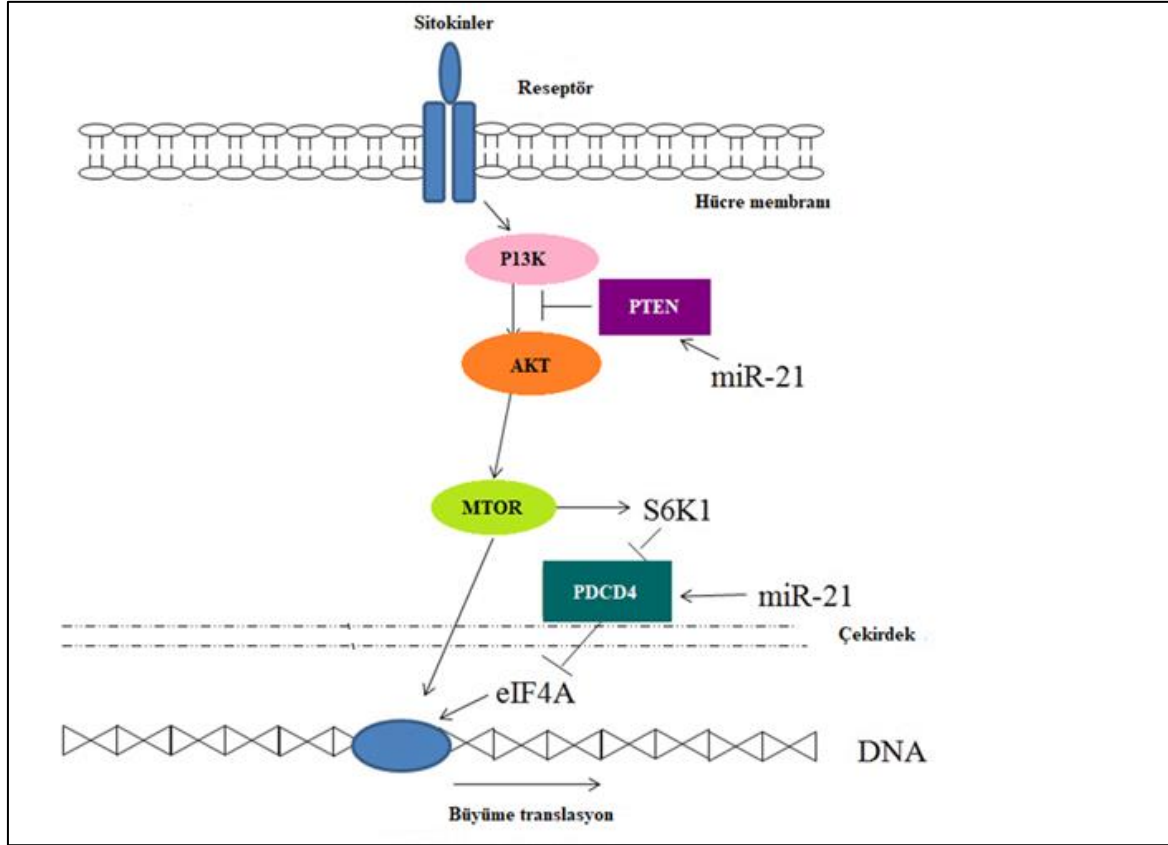
OSHK patogenezinin meydana gelmesinde etken faktörler arasında yer alan ve hücre genomuna direkt zarar veren alkol, HPV, radyasyon, kemoterapötikler ve diğer sitotoksik ajanlara maruziyette serbest radikallerin ve hatalı katlanmış proteinlerin birikmesi sonucunda hücre hasarı meydana gelir [20, 21]. Bu hasarın giderilmesi için apoptotik genlerin düzgün bir şekilde çalışması gerekmektedir. Hem tümör baskılayıcı hem apoptotik görevi olan *PDCD4*’ün OSHK’da metastaz, invazyon ve apoptozun düzenlenmesinde önemli role sahiptir. OSHK’nın gelişiminde ayrıca mikroRNA’lardaki düzensizliklerde saptanmış olup bunlar arasında en dikkat çeken miR-21’in, *PDCD4*’ü hedefleyerek metastazı ve tümör hücre proliferasyonunu artırdığı, apoptoz ifadesini ise azalttığı bilinmektedir [403].

Yürüttüğümüz bu çalışmada apoptotik yolakta görevli *PDCD4* geni ve bu genle negatif etkileşim gösterdiği düşünülen miR-21-5p ve miR-208a-3p genlerinin ifadesi araştırılmıştır.

miR-21-5p

miR-21-5p, 17. kromozomda lokalize olmuş, 22 nükleotid uzunluğunda kodlamayan RNA sınıfının bir üyesidir [344]. Gissi ve diğerlerine (2018) göre ağız fırça biyopsisi ile alınan minimal invaziv tükürük biyopsisinde, miR-21'in OSHK'da sağlıklı kontrollere göre yüksek ifade olduğunu belirtmişlerdir [404]. Dahası doku, kan ve hücre hattında yapılan diğer çalışmalarda miR-21'in onkogenik mekanizmaya sahip olduğu da gösterilmiştir. miR-21 tümör baskılayıcı gen olan *PTEN*'i hedeflerken, *PTEN* geninin baskılanmasına neden olur (Şekil 2.15). Böylece tümör ilerlemesini ve hücre bölünmesini arttırmış olur [405]. miR-21 apoptozla da ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. miR-21, prometastatik faktörün inhibitörü olan tümör baskılayıcı *PDCD4*'ün (programlanmış hücre ölümü) ifadesini de azaltmaktadır [403].

Fosfoinositid3-kinaz (PI3K) ve aşağı akış hedefleri olan AKT ve mTOR sinyal yolları, farklılaşma, çoğalma ve hücrenin hayatta kalmasında önemli bir rol oynamaktadır [406]. Tümör hücreleri, PI3K/AKT/mTOR sinyal yollarını aktive ederek hücre çoğalmasını artırır (Şekil 2.15). Tümör baskılayıcı gen olan *PTEN*, PI3K/PTEN/AKT sinyal yollarının negatif düzenleyicisidir ve hücre büyümesi, farklılaşması, çoğalması ve göçü dahil olmak üzere hücre fonksiyonları düzenlemek için AKT'yi hedefleyerek işlev görür [407]. *PTEN*, miR-21-nakavt hücrelerde önemli ölçüde yüksek ifade edilir, bu da miR-21'in *PTEN*'i aşağı yönde düzenlediğini ve *PI3K/PTEN/AKT* sinyal yolu üzerindeki negatif regülasyonunu azalttığını gösterir [408].



Şekil 2.15. miR-21 ve AKT/mTOR sinyal yolları. miR-21, microRNA-21 PI3K, fosfoinositid 3-kinaz; AKT, protein kinaz B; mTOR, rapamisinin memeli hedefi; PTEN, fosfataz ve tensin homologu; S6K1, ribozomal protein S6 kinaz-1; PDCD4, programlanmış hücre ölümü 4; eIF4A, ökaryotik başlatma faktörü [409].

miR-208a-3p

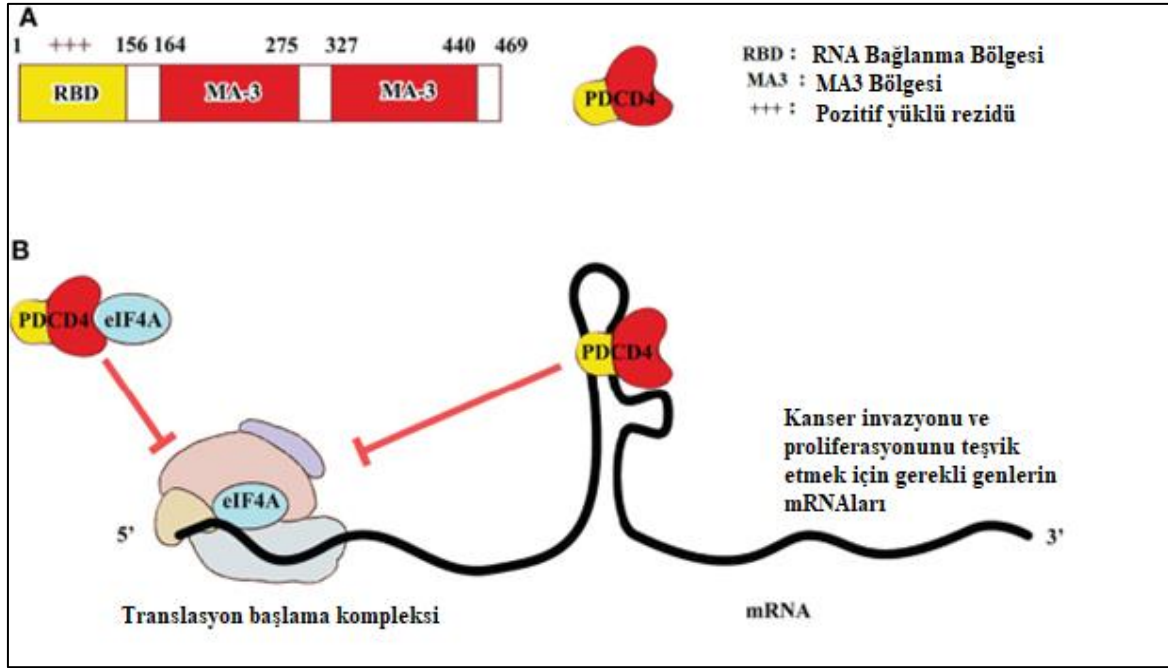
miR-208a-3p, 14. kromozomda lokalize olmuş 22 nükleotid uzunluğunda kodlama yapmayan RNA'dır [344]. miR-208'in kardiyovasküler ve kas hastalıklarının oluşumunda kritik bir rol oynadığı bilinmektedir [410-412]. Bununla birlikte, miR-208'in pankreas kanseri [413], özofagus skuamöz hücreli karsinomu [414], hepatosellüler karsinom [415] ve prostat kanseri de [416] dâhil olmak üzere farklı insan kanserlerinde etkili olduğu bildirilmiştir. Wu ve diğerleri (2019), yaptıkları bir çalışmada miR-208a-3p'nin kolorektal kanserinde *PDCD4*'ü doğrudan hedefleyerek, *PDCD4* ifadesini düşmesine neden olduğunu ve proliferasyon, invazyon ve hücre göçünde artış meydana getirdiğini göstermişlerdir [417].

PDCD4 (Programlanmış hücre Ölümü 4) geni

Shibahara ve diğerleri (1995) tarafından ilk kez keşfedilen *PDCD4* geni, 469 amino asitten meydana gelmiş, iki "MA-3" olarak bilinen domaini, iki fosforilasyon bölgesi, iki pozitif yüklü RNA bağlanma bölgesi ve iki çekirdek dışı aktarma sinyalinin oluştuğu moleküldür [418]. İnsan *PDCD4* geni, ilk olarak bir çekirdek antijen geni olarak tanımlanmış ve 10. kromozomun uzun kolunun 24. bandında (10q24) haritalanmıştır [398]. *PDCD4* geni türler arasında iyi korunmuş özelliğe sahiptir; örneğin, insan ve fare arasındaki homoloji protein düzeyinde %92 oranında aynı diziye sahip olduğu belirlenmiştir [419]. Farelerde *PDCD4* geninin apoptozda ifadesinin arttığı, Camptothecin [420] gibi topoizomeraaz inhibitörleri ile de ifadesinin azaldığı saptanmıştır [421].

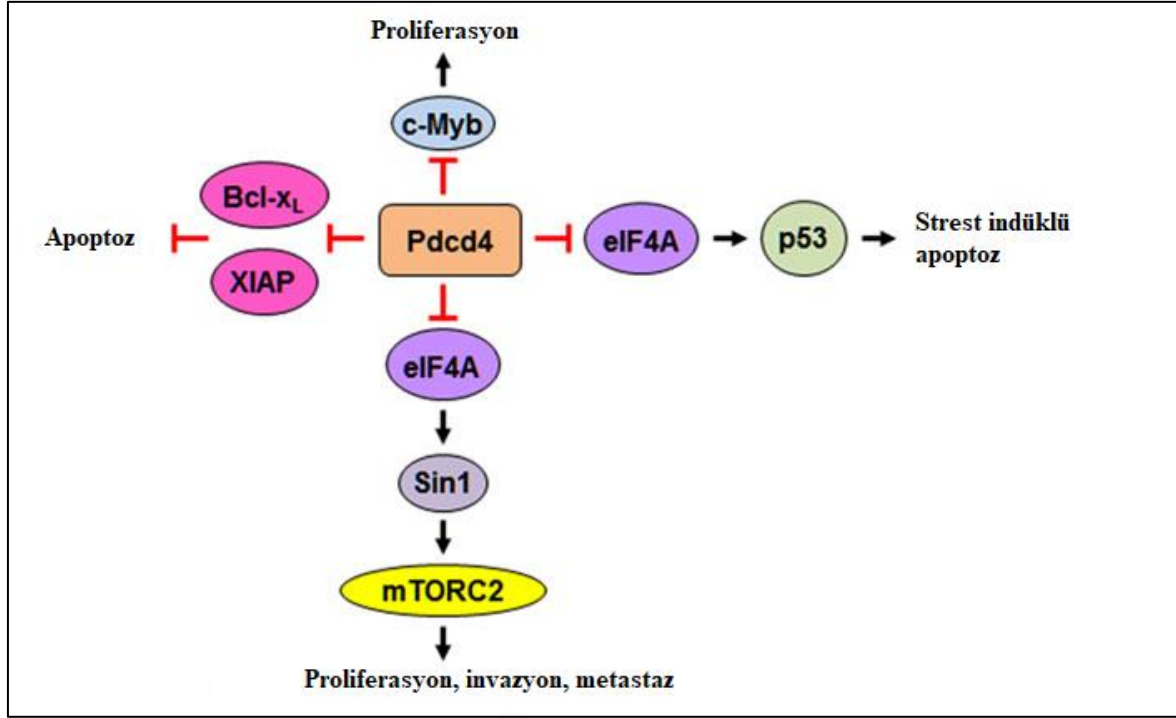
Maya-ikili hibrit yöntemi kullanılarak, *PDCD4*, translasyon başlatma faktörü 4A'nın (eIF4A) [422] bağlayıcı ortağı olarak tanımlanmıştır. *PDCD4*-eIF4A etkileşimi, mutasyon çalışmalarıyla ve kristalografi ile de doğrulanmıştır [423-425]. Bu, *PDCD4*'ün translasyonunun inhibisyonu için eIF4A ile bağlanmasının gerekli olduğunu göstermektedir. *PDCD4*-eIF4A bağlanması protein translasyonunu baskılama mekanizması aşağıdaki şekilde gerçekleşmektedir:

1. *PDCD4*, eIF4A'ya bağlanarak, eIF4A'nın eIF4G'ye bağlanmasını bloke eder. eIF4A'nın RNA helikaz aktivitesini ve başlık bağı translasyonel aktivasyonu inhibe eder ve eIF4A'nın helikaz aktivitesinin baskılanmasıyla protein translasyonu engellenmiş olur [422]. eIF4A, ATP'ye bağımlı bir RNA helikazdır. eIF4A'nın protein translasyon başlangıcındaki işlevi, mRNA'nın yapısını gevşeterek, translasyon başlatma kompleksinin, başlama kodonunu [426] bulmak için mRNA'yı 5' ile 3' ucundan taramasına izin vermektir. Bu nedenle, *PDCD4* tarafından eIF4A aktivitesinin inhibisyonunu, protein translasyonunu, özellikle karmaşık yapıya sahip mRNAların translasyonunu baskılar. *PDCD4* tarafından translasyon engelleme mekanizmaları Şekil 2.17 'de özetlenmiştir.
2. *PDCD4*, eIF4A aktivitesinin inhibisyonuna neden olmasının yanı sıra, Bcl-xl ve XIAP gibi anti-apoptotik proteinlerin de translasyon başlama kompleksini bloke eder [427, 428].



Şekil 2.16. *PDCD4* protein yapısı ve transkripsiyon başlangıcını düzenleyen mekanizma. (A) *PDCD4* proteini, bir RNA bağlama alanı ve iki MA-3 alanı ile 469 amino asit uzunluğundadır. (B) *PDCD4* proteini, IRES'i 5' UTR'de veya eIF4A'yı transkripsiyon başlatma kompleksinde bağlayarak transkripsiyonu başlatmayı bloke edebilir [429].

Şimdiye kadar kanıtlar, *PDCD4*'ün iki olası mekanizma yoluyla tümör oluşumunu inhibe edebileceğini göstermektedir. Yukarıda bahsedildiği gibi, *PDCD4*, eIF4A ile bağlanır ve sarmal aktivitesini inhibe eder. Transkripsiyonun başlatılmasında, ikincil yapılara sahip 5'UTR bölgesinin açılması için eIF4A gereklidir. Genellikle, ikincil yapılara sahip 5'UTR'li mRNA'lar, büyüme faktörlerini, büyümeyi teşvik eden genleri ve proto-onkogenleri kodlar [430]. Bu nedenle, eIF4A'nın *PDCD4* tarafından inhibisyonunun hücre proliferasyonu, göçü ve/veya invazyonunun baskılanmasına neden olması beklenir. Örneğin, *PDCD4*, kolorektal karsinomda hücre invazyonunu azaltmak için *Sin1* transkripsiyonunu inhibe eder [431]. *Sin1*, Akt aktivasyonunu düzenleyen rapamisin kompleksi 2'nin (mTORC2) memeli hedefinin kritik bir bileşenidir. *Sin1* transkripsiyonunun *PDCD4* tarafından inhibisyonu, Akt'nin etkisizleştirilmesi yoluyla invazyonu bastırmak için Snail ifadesinin azalmasına neden olur. eIF4A'ya bağlı mekanizmaya ek olarak, *PDCD4*, eIF4A'dan bağımsız bir mekanizma yoluyla tümör oluşumunu baskılayabilir (Şekil 2.17). Liwak ve diğerleri (2012), *PDCD4*'ün X'e bağlı apoptoz inhibitörünün (XIAP) mRNA'sı ile dâhili bir ribozom bağlama bölgesine doğrudan bağlandığını ve transkripsiyon başlatma kompleksi oluşumunu önleyerek XIAP transkripsiyonunu engellediğini bildirmiştir [428].



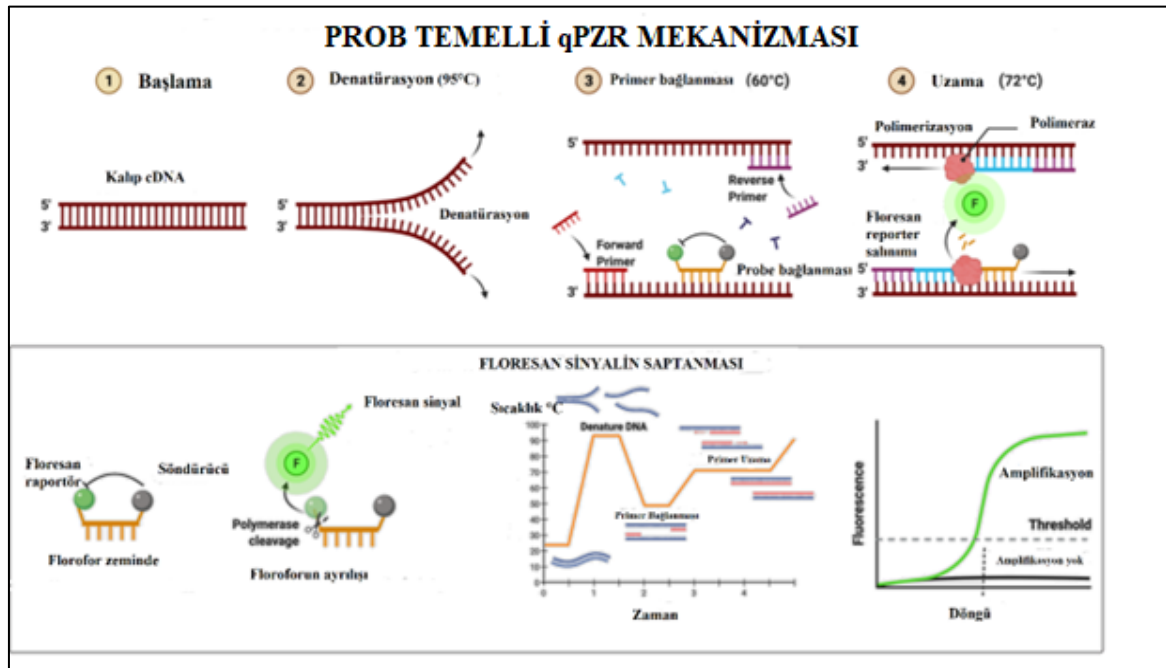
Şekil 2.17. *PDCD4*, proliferasyon, apoptoz, invazyon ve metastaz gibi translasyonel hedeflerin düzenlenmesinde rol alır [418].

PDCD4 ifadesinin; epigenetik, transkripsiyon, transkripsiyon sonrası ve translasyon sonrası seviyelerde düzenlendiği gösterilmiştir [418]. *PDCD4* geni, dokuda her yerde bulunur ve bu gen, çekirdek ya da sitoplazma veya hücre tipine bağlı olarak her ikisinde de aynı yerde lokalizedir. *PDCD4* ifadesinin çeşitli kanserlerde (kolon, OSHK, mide) düşük ifade edildiği gösterilmiştir [432-434]. *PDCD4*'ün yüksek ifadesi apoptozu veya hücre döngüsünün durmasını indükler ve kanser hücresinin invazyonunu, proliferasyonunu ve göçünü engeller. *PDCD4*'ün artmış ifadesi kanser hücrelerinin antineoplastik ilaçlara karşı duyarlılığını artırır [435-438].

2.15. Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Kantitatif PZR-qPZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) in vitro DNA'nın amplifikasyonu için hızlı ve güçlü bir tekniktir [439, 440]. Kantitatif PZR (qPZR) küçük miktarlarda DNA'nın, kantitatif real time PZR (qRT-PCR) mRNA'nın kantitasyonu için kullanılmaktadır [441]. qPZR ve qRT-PZR metodu internal kontrol kullanarak, hedef dizinin amplifikasyonunu sağlar [441]. İnternal kontrol çeşitli yollarla tasarlanabilir. Bunlar; hedef aplikonun mutasyonu, hedef amplikon dizisi içindeki insersiyon veya delesyon, homolog olmayan DNA sekans üzerindeki hedef

dizinin atlaması olarak sayılabilir. Genel bir kural olarak, hedef ve kontrol primerleri aynı kullanmalı, benzer guanin + sitozin (G + C) içeriğine sahip olması, dizinin eşit veya benzer uzunlukta olması gerekmektedir [442]. İnternal kontrolün validasyonunun yapılması oldukça önemlidir, bunun için öncelikle kontrol tasarlanmalıdır. Hedef ile kompetitif kontrolün, eşit etkide ve plato fazına erişmesi gerekir (Şekil 2.15) [443]. Plato fazına erişim reaksiyon ajanlarının tükendiği ve reaksiyonun sonlandığı anlamına gelir ve durur. Yeni ürün oluşu gözlenmez. Oluşan ürünlerin hızla parçalanması artar. Bitiş noktası saptaması yapılır. Bu teknik sayesinde DNA ve RNA moleküllerinin kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analizi sağlanmakta ve çok sayıda örnek yüksek güvenilirlikte çalışılmaktadır. qPZR’de, PZR reaksiyonu sırasında oluşan miktarları görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyalardır. Eş zamanlı olarak oluşan floresan ışıma, sentezlenen DNA ile doğru orantılı olarak artar. Bu artış miktar tayininin yapılmasına olanak sağlar. Çoğaltılacak hedef dizilerin belirlenebilmesi için çeşitli ajanlar geliştirilmiştir. Bunlardan diziye yüksek güvenilirlikte bağlanan özgünlüğü yüksek primer problemler DNA/cDNA üzerinde tanımlanmak istenilen baz dizisine özgün özel olarak tasarlanmış, kimyasal ya da radyoaktif olarak işaretlenmiş olan tek zincirli oligonükleotid molekülleridir. qPZR’de kullanılan probun çalışma mekanizması Şekil 2.19’da gösterilmiştir.



Şekil 2.18. Prob temelli qPZR mekanizması [444].

3. MATERİYAL METOD

3.1. Materyal

Bu bölümde tezin materyal ve metodları ile ilgili bilgi verilecektir.

3.1.1. Bireylerin seçimi ve materyallerin toplanması

Çalışma klinik ve histolojik olarak displazi, oral skuamöz hücreli kanser ve sağlıklı bireylerden oluşan toplam 42 bireyden elde edilen kan ve tükürük örneklerinde yürütülmüştür. Çalışma için gerekli olan etik kurul raporu Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alındı (Onay kodu: E.28270).

Araştırma materyalleri olan 42 kan ve 42 tükürük örneği Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı ile Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'na başvuran hastalardan toplandı. Çalışma grubunu oluşturan bireyler 14 ‘‘ enfeksiyonu olmayan gömülü 20 yaş diş sahibi bireyler’’, 14 ‘‘oral potansiyel malign hastalık’’ tanısı almış bireyler ve 14 ‘‘oral skuamöz hücreli karsinom’’tanısı almış bireyler olmak üzere toplam 42 bireyden oluşmaktadır.

OSHK grubuna dâhil edilecek bireyler için dâhil edilme kriterleri şu şekilde oluşturulmuştur:

- a) Hastalarda dil 2/3 ön kısım, ağız tabanı, bukkal mukoza, gingiva, retromolar bölge, sert damak yerleşimli skuamöz hücreli karsinom tanısı konmuş primer tümörünün bulunması,
- b) Tümör gelişiminde Human Papilomavirüs (viral) etyolojisinin bulunmaması, c) Hastalarda nüks ve başka bir malignitenin bulunmaması, d) Tanıların görüntüleme yöntemlerinin yanı sıra insizyonel biyopsi ile konulmuş olması, e) verrüköz karsinom ve skuamöz hücreli karsinomun diğer alt tiplerinin tanısını almış hastaların çalışma dışı bırakılması, Hastaların risk faktörü ile ilişkileri (sigara kullanımı, sigara-alkol birlikte kullanımı gibi), hastalık öyküsü, yaş, cinsiyet gibi demografik veriler, klinik evreleme, radyolojik değerlendirmeler, kayıt edilecektir.

OPML grubu bireylerini ise oral lökoplaki-eritroplaki klinik ön tanısı olan, histolojik olarak displazi tanısı almış oral mukozal lezyonu olan bireyler oluşturacaktır. Bireylere ait yaş cinsiyet gibi demografik bilgiler, risk faktörleri (sigara kullanımı, sigara-alkol birlikte

kullanımı), lezyonun öyküsü, lezyonun çapı, lezyonun lokalizasyonu, klinik takipleri yapılarak kayıt edilecektir.

Araştırmaya katılan her bireyden “Bilgilendirilmiş Onam Formu” imzalatılarak hastaların izni dâhilinde çalışma sürdürülmüştür.

3.2. Kullanılan Kitler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasalların tümü ve ticari olarak temin edilen kitler tedarikçileriyle birlikte aşağıdaki Çizelge 3.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kitler

PaxGene Blood miRNA İzolasyon Kiti (Qiagen, Almanya)
miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Almanya)
miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, Almanya)
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit (Roche Diagnostics, Almanya)
hsa-miR-208a-3p miRCURY LNA miRNA Probe PCR Assay (Qiagen, Almanya)
hsa-miR-21-5p miRCURY LNA miRNA Probe PCR Assay (Qiagen, Almanya)
hsa- <i>PDCD4</i> QuantiNova LNA Probe PCR (Qiagen, Almanya)
U6 snRNA (Qiagen, Almanya)
miRCURY LNA Probe PCR Kit (Qiagen, Almanya)

3.3. Cihazlar

Tez projesinin deneysel işlemleri gerçekleştirmek için kullanılan cihaz ekipmanı, Çizelge 3.2’de listelenmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar

Kırık Buz Makinesi (Hoshizaki)
Otoklav (Tomy)
Otomatik Mikropipetler (Gilson)
PZR cihazı (Biometra)
Steril kabin (Holten)
-30°C Derin Dondurucu (Sanyo)
-80°C Derin Dondurucu (Sanyo)
+4°C Soğutucu Dolap (Sanyo)
RotorGene (Qiagen)
Nanodrop ND100
Vorteks (Daigger)
Thermoshaker
Mikrospin (Clever Scientific)
Soğutmalı santrifüj (Hettich)
Macro Santrifüj (Hettich)

3.4. Kullanılan Yöntemler

3.4.1. Kan örneklerinin toplanması ve ribonükleik asit izolasyonu

Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi ve Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'ndan toplandı. Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarında toplanan örneklerden RNA izolasyonu yapıldı, RNA örnekleri protokole uygun şekilde gen ve mikroRNA olmak üzere iki farklı cDNA'ya dönüştürüldü. Son aşamada ise Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile gen ve miRNA ifadeleri belirlenerek hesaplandı.

Hasta ve kontrol gruplarından elde edilecek kan örnekleri EDTA'lı tüplere 3 mL olacak şekilde toplandı.

Toplanan örnekler 4000 g'de santrifüj edildi. Süpernatant pipetle atılır ve pellete 4 mL RNase free su eklenir. Pellet gözle görülür şekilde çözülene kadar vortekslendi.

10 dk 4000 xg'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellete 350 µl Buffer BM1 eklendi, vortekslendi.

1. Pellet çözüldükten sonra 1.5mL'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. 300 µl BM2 ve 40 µl Proteinaz K eklenip vortekslendi. 10 dk 55°C'de 1200 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
2. Lila spin kolonuna örnekler aktarıldı ve 3 dk 15 000 g'de santrifüj edildi.
3. Süpernatantın tamamı steril 1.5mL'lik ependorfa aktarıldı ve üzerine 700 µl isopropanol eklenip, vortekslendi.
4. 700 µl örnek kırmızı kapaklı spin kolona aktarıldı ve 15 000g'de 1 dk santrifüj edildi. Alt hazneye toplanan sıvı kısım boşaltıldı, 1 dk 15 000 g'de santrifüj edildi.
5. 350 µl Buffer BM3 eklenip, 15 sn 15 000 g'de santrifüj edildi. Alt hazneye toplanan sıvı kısım boşaltıldı, 10 µl DNaseI stok solüsyonu, 70 µl Buffer RDD eklendi, 25°C'de 15 dk inkübasyona bırakıldı.
6. 350 µl Buffer BM3 eklenip, 15 sn 15 000 g'de santrifüj edildi. Spin kolon yeni toplama tüpüne alındı, 500 µl Buffer BM4 eklendi. 15 sn 15 000 g'de santrifüj edildi.
7. Toplama tüpü boşaltıldı, tekrar 500 µl Buffer BM4 eklendi, 2 dk 15 000 g'de santrifüj edildi, spin kolon yeni toplama tüpüne alındı. 15 000 g'de 1 dk santrifüj edildi.

8. Toplama tüpü atılıp, spin kolon yeni steril 1.5mL'lik ependorfa konuldu. 40 µl Buffer BR5 eklendi, 1dk 15 000 g'de santrifüj edildi. Bu basamak tekrarlandı.
9. 65°C'de 5 dk inkübasyona bırakıldı.
10. İzolasyonu tamamlanan örnek etiketlenip cDNA izolasyonu yapılana kadar -80° muhafaza edildi.

3.4.2. Tükürük örneklerinin toplanması ve ribonükleik asit izolasyonu

Hastalardan alınan tükürük, uyarılmamış tükürük olup tükürük toplanmasından en az 1 saat önce yeme, içme ve ağız hijyeninden kaçınmaları 1 gün öncesinden hastalara söylenmiştir.

1. Tükürükler RNase free 50 mL'lik falkon tüplere 5 mL olacak şekilde toplandı ve 15 dk 4°C'de 2600 g'de santrifüj edildi.
2. Pellete dokunmadan süpernatanttan 200 µl alınarak steril RNase free ependorfa alındı.
3. RNA izolasyonu için miRNeasy mini kit (Qiagen, Almanya) kullanıldı.
4. Protokole göre alınan 200 µl süpernatanta 700 µl Qiazol Lysis Reagent eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
5. 140 µl kloroform eklendi ve 15 sn boyunca şiddetli sallandı.
6. Oda ısısında 3-4 dk inkübe edildi.
7. 15 dk 12000 g'de 4°C'de santrifüj edildi.
8. Üstteki sıvı faz yeni toplama tüpüne alındı (~200 µl), 525 µl %100'lük etanol eklendi.
9. 700 µl örneği RNeasy mini kolona alındı ve 13 000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Alt toplama haznesi boşaltıldı ve bu adım tekrarlandı.
10. 700 µl Buffer RWT eklendi ve 1 dk 13 000 xg'de santrifüj edildi, toplama tüpü boşaltıldı.
11. 500 µl Buffer RPE eklendi, 1 dk 13 000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldı.
12. 500 µl Buffer RPE eklendi, 2 dk 13 000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldı.
13. RNA mini kolon yeni tüpe alındı ve 1 dk en yüksek hızda santrifüj edildi.
14. RNA mini kolon 1.5 mL'lik steril ependorfa alındı ve 40 µl RNase free su eklendi. 13000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
15. adım tekrarlandı.
16. İzole edilen RNA etiketlenerek -80°C'de muhafaza edildi.

3.4.3. cDNA sentezi

İzolasyonu yapılan kan ve tükürük örneklerinden mikroRNA ve gen için ayrı ayrı cDNA sentezi yapılmıştır. mikroRNAlar için miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, Almanya), gen için Quantinova Reverse Transcription Kit (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. cDNA sentezine başlamadan önce reverse transkriptaz hariç kitin tüm içeriği çözöldü buz içine koyuldu. Çalışmanın tamamı buz üzerinde gerçekleştirildi. MikroRNA cDNA reaksiyon koşulları Çizelge 3. 3' de verilmiştir. *PDCD4* için gerekli olan reaksiyonlar ve PZR koşulları da Çizelge 3. 4 ve Çizelge 3. 5' de verilmiştir.

Çizelge 3.3. MikroRNA cDNA Reaksiyonu

Bileşen	1X	PCR Program
5X miRCURY RT reaction buffer	2µl	60 dk 42°C 5 dk 95°C ∞ 4°C
RNase free su	4,9µl	
10X miRCURY RT enzim mix	1µl	
Sentetik RNA spike-in	0,5µl	
Kalıp RNA	1,6µl	

Çizelge 3.4. Gen cDNA Reaksiyonu (1. Genomik DNA'nın kaldırılması)

Bileşen	1X	PCR Program
Random oligodT	1µl	10 dk 65°C'de inkübasyon
Hexamer	2µl	
Kalıp RNA	6µl	
RNase free su	4µl	

Çizelge 3.5. Gen cDNA Reaksiyonu (2. Reverse Transkripsiyon)

Bileşen	1X	PCR Program
Reaksiyon buffer	4µl	30 dk 55°C 5 dk 85°C ∞ 4°C
RNase inhibitör	0,5 µl	
DNTP	2 µl	
Reverse Transcriptase	1 µl	

3.4.4. Kullanılan primer dizileri

Çalışmada kullanılacak olan primerler Quantinova LNA Probe PCR Assays mikroRNA primerleri miR208a-3p, miR-21-5p ve kontrol miR olarak U6 kullanılmıştır. Gen olarak *PDCD4* ve kontrol olarak *ActB* kullanılmıştır. Kullanılan primerler ve dizileri Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Kullanılan primer dizileri

Primer Adı	NCBI Gene ID	Primer Dizisi	Catalog no
hsa-miR-208a-3p	406990	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU	339350
hsa-miR-21-5p	406991	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	339350
U6 snRNA	X59362	CCATGCTAATCTTDTHTGTA	339350
hsa- <i>PDCD4</i>	27250	F: GGGAGTGACGCCCTTAGAAG R: ACCTTTCTTTGGTAGTCCCCTT	249995
hsa-ActB	60	TCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAG	149995

3.4.5. Nanodrop ND100 ile RNA konsantrasyon analizi

RNAların ölçümleri NanoDrop ND1000 cihazına dilüe edilmemiş örneklerden 2 µL yüklenerek yapılmıştır. İzole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki ölçümlerin karşılaştırılması ile belirlendi. Absorbansı 1.8-2.2 OD aralığında olan RNAlar araştırmaya uygun RNA örneği olarak kabul edildi. RNA'nın 260 nm'de vermiş olduğu 1 OD'lik absorbans, 40 µg RNA molekülüne eşittir. NanoDrop ile RNA konsantrasyonu ölçülürken RNA'nın sulandırılmasına gerek yoktur.

NanoDrop ile ölçülen RNA konsantrasyonu şu şekilde hesaplandı:

$$\text{RNA konsantrasyonu } (\mu\text{g/mL}) = \text{OD}_{260} \times \text{Sulandırma Katsayısı (1)} \times 40\mu\text{g}$$

Konsantrasyonu ölçülen RNAların sonraki yapılacak çalışmalarda kullanıldığında konsantrasyonlarının eşit olması gerektiğinden hasta ve sağlıklı kontrol grubuna ait olan RNA örneklerinin 200 ng/µL olacak şekilde sulandırıldı.

3.4.6. Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR)

Total RNA izolasyonu ve miRNA örneklerinin cDNA sentezinden sonra miR-21-5p, miR-208a-3p ve *PDCD4* ifade seviyesini ölçmek için gerçek zamanlı kantitatif PZR (qPZR) reaksiyonları gerçekleştirildi. OSHK, OPML ve sağlıklı kontrol grubu arasında gen ifade farklılıkları değerlendirildi. Kantitatif PZR reaksiyon karışımı ve koşulları Çizelge 3.7, 3.8 ve 3.9'da belirtilmiştir.

Çizelge 3.7. qPZR reaksiyon karışımı

Bileşen	1X
2X Probe PCR Master Mix	10 ul
Primer probe	1 ul
Kalıp cDNA	4 ul
Su	5 ul

Çizelge 3.8. Kullanılan qPZR programı (*PDCD4* ve *ActB*)

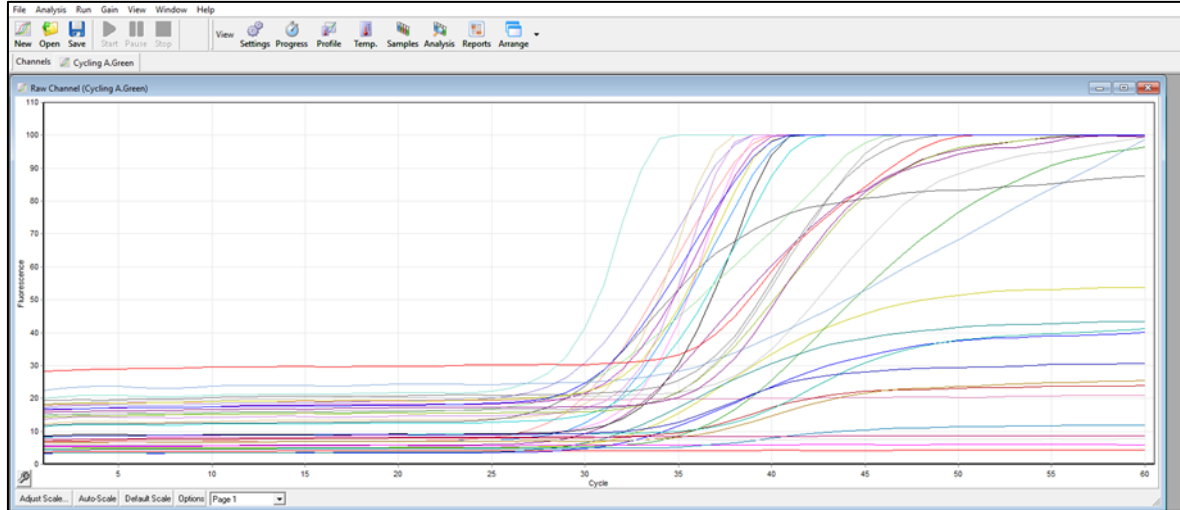
<i>qPZR Programı</i>		
Ön Denatürasyon	95° 5dk	45 Döngü
Denatürasyon	95° 5sn	
Uzama	60° 30sn	
Sonlanma	72° 40sn	

Çizelge 3.9. Kullanılan qPZR program (*miR-21*, *U6*)

<i>qPZR Programı</i>		
Ön Denatürasyon	95° 2dk	45 Döngü
Denatürasyon	95° 5 sn	
Uzama	56° 30sn	
Sonlanma	72° 40sn	

3.4.7. OSHK hastaları, OPMH hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarında *miR-21* ve *PDCD4*'ün ifade seviyelerinin qPZR ile değerlendirilmesi

OSHK hastaları, OPMH hastaları ve sağlıklı kontrol grubu arasında *miR-21* ve *PDCD4* ifade seviyeleri belirlenirken kantitatif PZR'da (qPZR) (Resim 4.1) elde edilen threshold (Ct) değerleri normalizatör olarak kullanılan miRNA'lar için housekeeping gen *U6*, *PDCD4* için *ActB* ile standardize edilerek ifade seviyeleri belirlendi. Hasta ve kontrol grubuna ait Ct değerleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü (Çizelge 4.4.) kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar değerlendirilirken standardize edilmiş ifade seviyeleri dikkate alındı.



Resim 3.1. Kantitatif PZR'da (qPZR) OSHK hastaları, OPMH hastaları ve sağlıklı kontrol grubu arasında miR-21 ve PDCD4 ifade seviyeleri

Çizelge 3.10. Elde edilen ct değerlerinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduyla hesaplanmasının gösterimi

$$\begin{aligned}\Delta Ct &= Ct(\text{hedef gen}) - Ct(\text{referans gen}) \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct(\text{hasta}) - \Delta Ct(\text{sağlıklı kontrol}) \text{ ort} \\ 2^{-\Delta\Delta Ct} &= 2^{-[(Ct \text{ hedef} - Ct \text{ ref}) \text{ hasta} - (Ct \text{ hedef} - Ct \text{ ref}) \text{ sağlıklı kontrol}]}\end{aligned}$$

3.4.8. İstatistiksel analiz

Çalışma verileri 14 OSHK, 14 OPML ve 14 sağlıklı grubu olmak üzere toplam 42 kişiden oluşmaktadır. Analizler IBM SPSS Statistics 28 paket programı üzerinden yapılmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken kategorik değişkenler için sıklıklar (sayı, yüzde), sayısal değişkenler için ise tanımlayıcı istatistikler (ortalama, standart sapma) verilmiştir.

Sayısal değişkenlerin normallik varsayımları Shapiro Wilk normallik testi ile incelenmiş ve değişkenlerin ise normal dağılmadıkları görülmüştür. Hem gruplardaki kişi sayılarının 30'dan az olması hem de Shapiro Wilk normallik testi sonucunda değişkenlerin normal dağılmaması nedeniyle çalışmada parametrik olmayan istatistiksel yöntemlerden yararlanılmıştır.

İki Bağımsız kategorik değişken arasındaki ilişkiler Ki Kare analizi ile yorumlanmıştır. İki'den fazla bağımsız grup arasındaki farklar Kruskal Wallis testi ile incelenmiştir. Kruskal Wallis sonucunda farklılık çıkması durumunda farklılığın kaynaklandığı gruplar Bonferroni

düzeltilmeli sonuçlar üzerinden yorumlanmıştır. İki bağımsız sayısal değişken arasındaki ilişki Spearman's Rho korelasyon katsayısı ile analiz edilmiştir.

Analizlerde istatistiksel anlamlılık 0,05 düzeyinden yorumlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik ve Klinik Verilerinin Değerlendirilmesi

Bu tez çalışması kapsamında 14 OSHK, 14 OPMH (klinik olarak oral lökoplaki histolojik olarak displazi tanısı almış), 14 sağlıklı kontrolden toplanmış kan ve tükürük örnekleriyle çalışıldı.

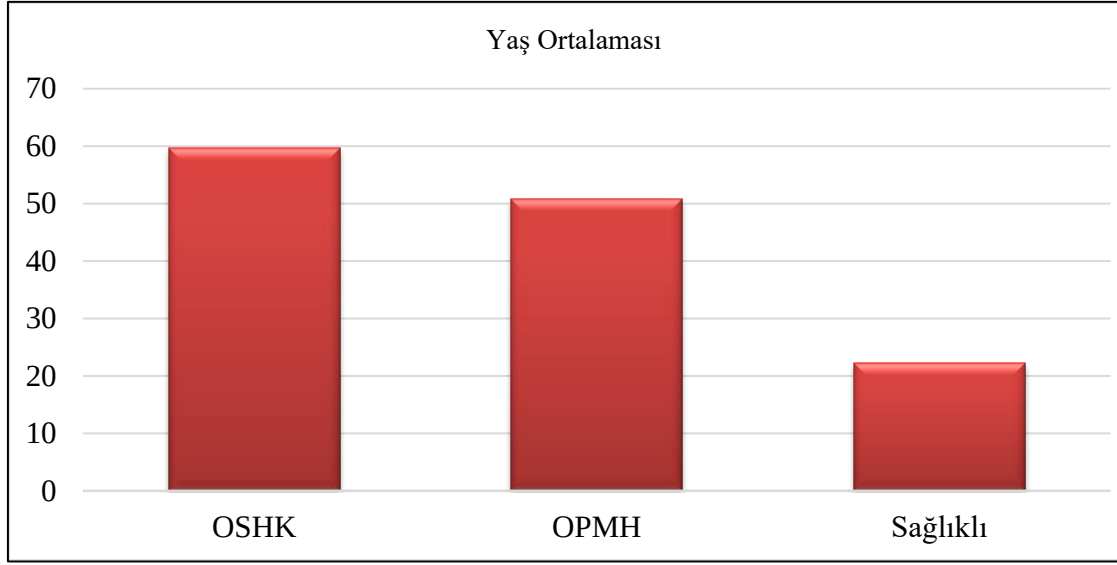
Çalışmamızda dâhil edilen OSHK, OPMH ve sağlıklı kontrol gruplarının demografik verilerin (yaş, cinsiyet, sigara ve alkol kullanımı, lokalizasyonu) gruplara göre incelenmesi Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hasta grupları ve sağlıklı kontrol grubunun demografik verilerinin istatistiksel olarak incelenmesi

	OSHK (n=14)		OPMH (n=14)		Sağlıklı (n=14)		KW	p
	Ort	± SS	Ort	± SS	Ort ±	SS		
Yaş	59,43	13,21	51,00	11,10	22,21	1,85	29,034	<0,001* Fark: 3<1,2
	n		Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Ki Kare	p
Cinsiyet							2,499	0,391
Erkek	8	57,1	7	50,0	4	28,6		
Kadın	6	42,9	7	50,0	10	71,4		
Sigara							3,150	0,303
Var	11	78,6	12	85,7	8	57,1		
Yok	3	21,4	2	14,3	6	42,9		
Alkol							0,257	1,000
Var	3	21,4	4	28,6	3	21,4		
Yok	11	78,6	10	71,4	11	78,6		
Histolojik Sınıflandırma (Binary Sistem)								
Düşük dereceli displazi	--	--	12	85,7	--	--		
Yüksek dereceli displazi	--	--	2	14,2	--	--		

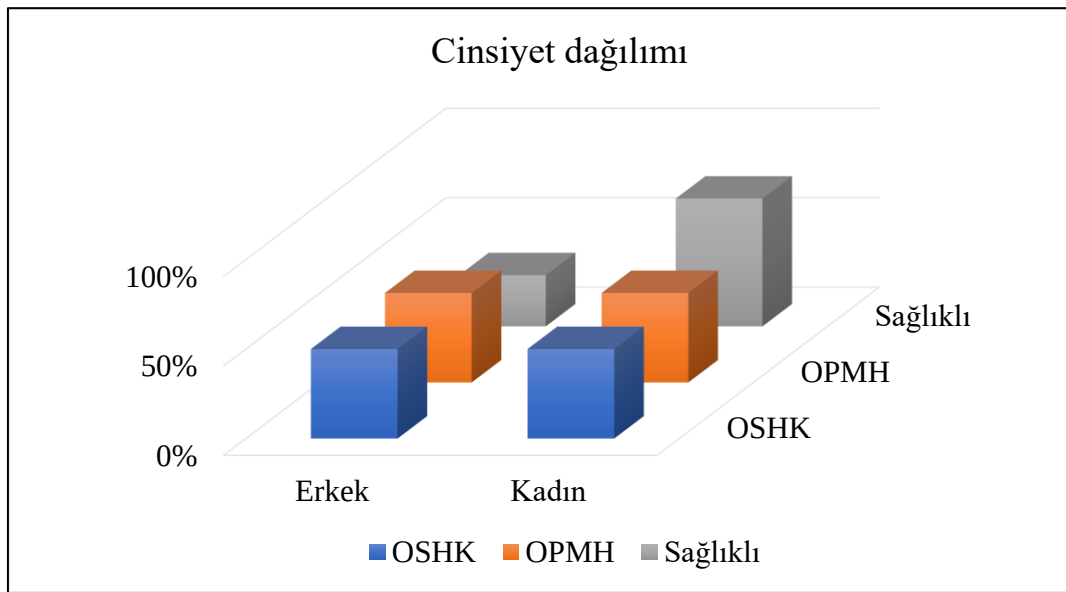
Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, KW: Kruskalwallis, *p<0,05

Şekil 4.1. de gösterildiği gibi en yüksek yaş ortalaması OSHK grubuna ait hastalarda izlenmekte iken (59,43) iken bunu sırasıyla OPMH grubu (51,00) ve sağlıklı grup bireyleri ise (22,21) takip etmektedir (p<0,05).

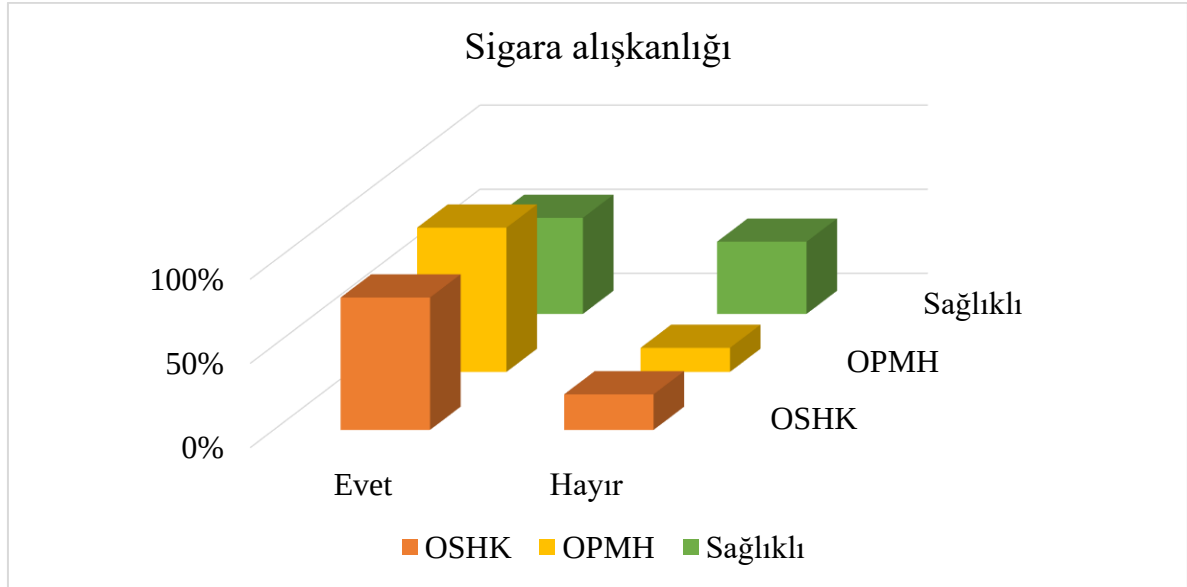


Şekil 4.1. Vakalarda gruplara göre ortalama yaş değerlendirmesi

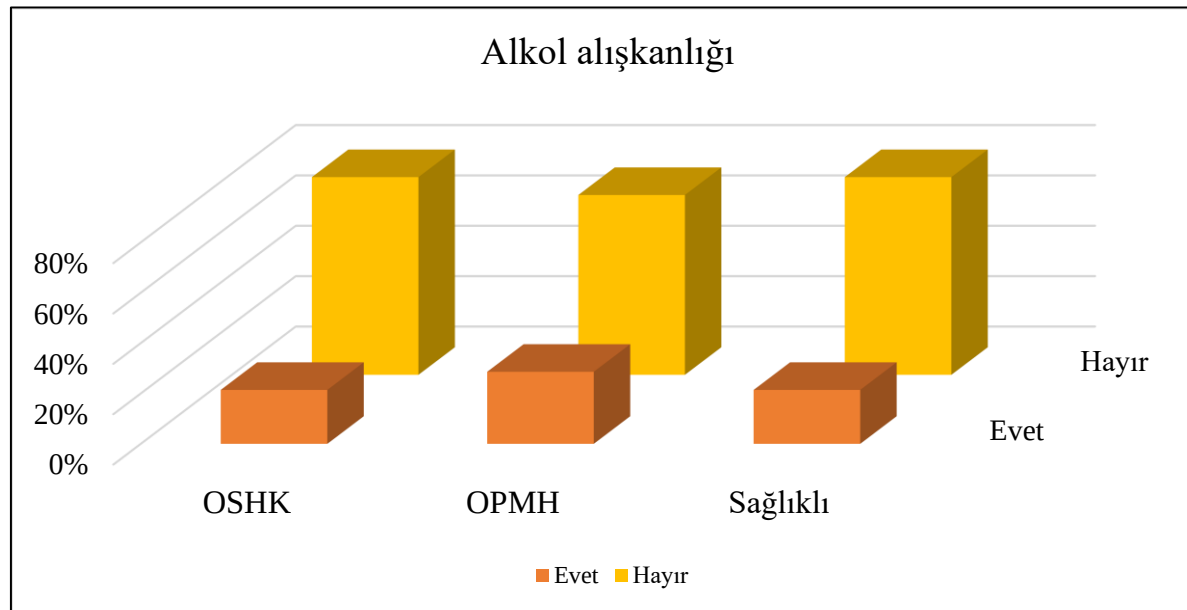
OSHK grubunun %57,1'i OPMH grubunun %50'si ve sağlıklı grubunun ise %28,6'sı erkektir (Şekil 4.2). OSHK grubunda sigara kullananların oranı %78,6 iken OPMH grubunda %85,7 ve sağlıklı grubunda ise %57,1'dir (Şekil 4.3). OSHK grubunda alkol kullanım oranı %21,4 OPMH grubunda bu oran %28,6 ve sağlıklı grubunda ise %21,4'tür (Şekil 4.4). Her üç parametrede gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Uygulanan ki kare analizleri sonucunda gruplar arasında cinsiyet, sigara kullanımı ve alkol kullanımı bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$).



Şekil 4.2. Vakalarda gruplara göre cinsiyet dağılımı (%)

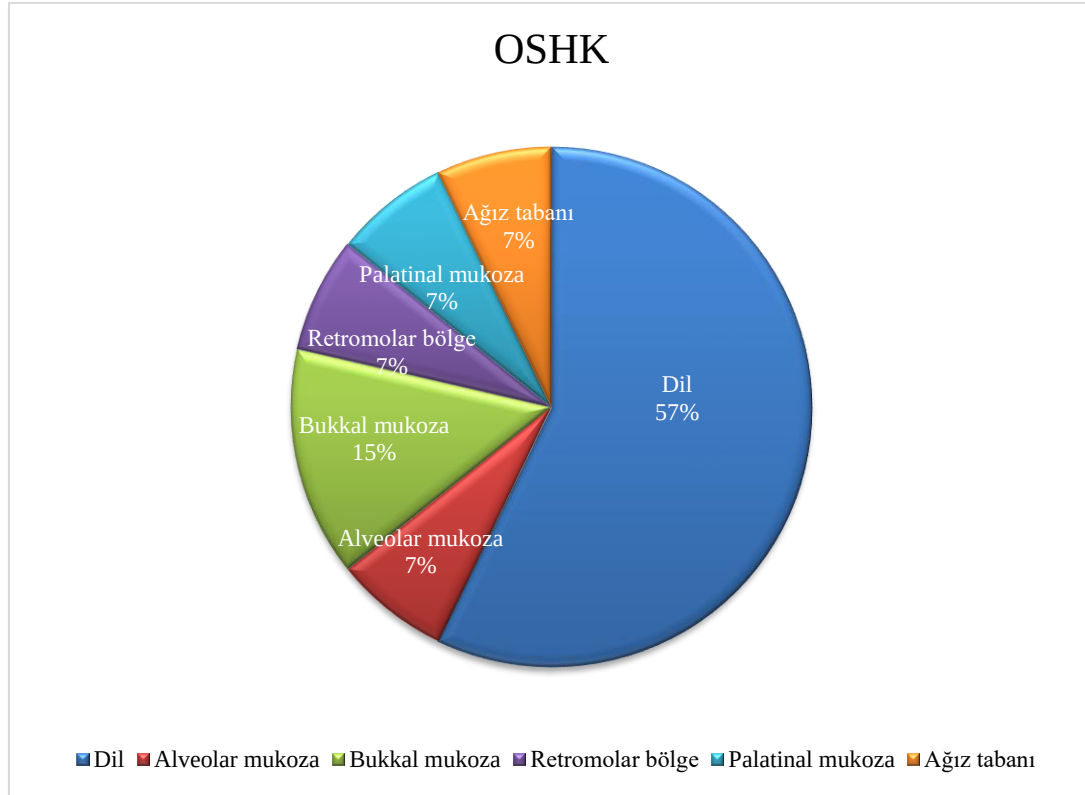


Şekil 4.3. Vakalarda gruplara göre sigara alışkanlığı (%)



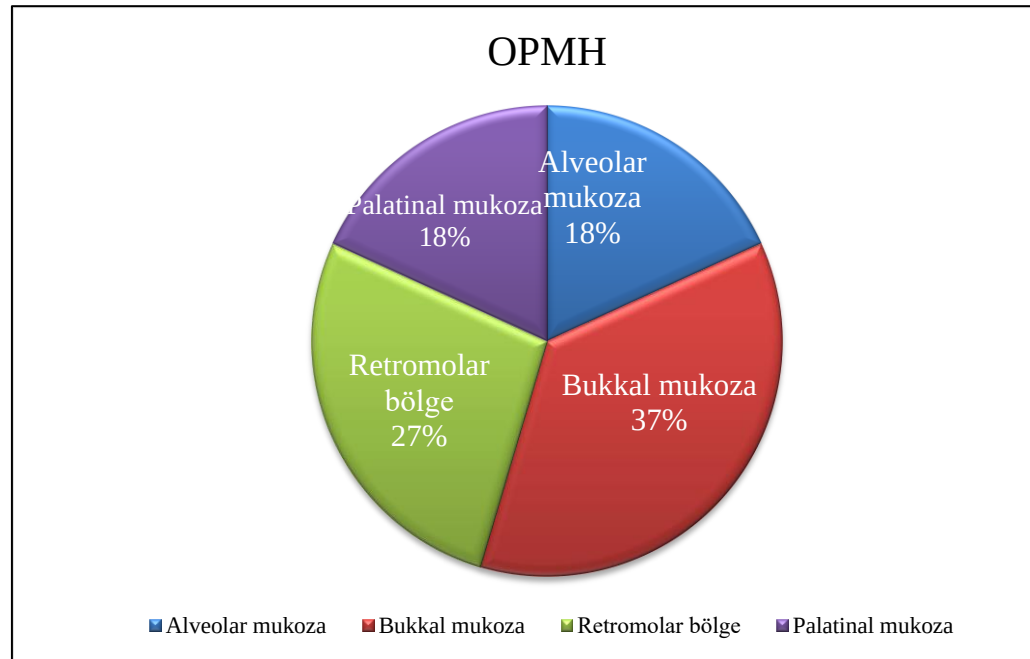
Şekil 4.4. Vakalarda gruplara göre alkol alışkanlığı (%)

OSHK grubunda lezyonların %57'si dilde, %15'i bukkal mukozada, %7 ağız tabanı, % 7 palatinal mukoza, %7 retromolar bölge, %7 alveolar mukozada anatomik yerleşim göstermektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. OSHK grubunda anotomik yerleşim yeri dağılımı

OPML grubunda lezyonların ise, %37'si bukkal mukoza, %27'si retromolar bölge ve %18'inin anatomik yerleşim yeri palatinal mukoza ve alveolar mukozadır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. OPML grubunda anotomik yerleşim yeri dağılımı

4.2. cDNA miktar ve saflıklarının analizi

Hasta ve sağlıklı gruba ait 42 kan, 42 tükürük örneğinden elde edilen cDNA miktarları Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Hasta ve sağlıklı gruplara ait cDNA miktar ve saflık oranları

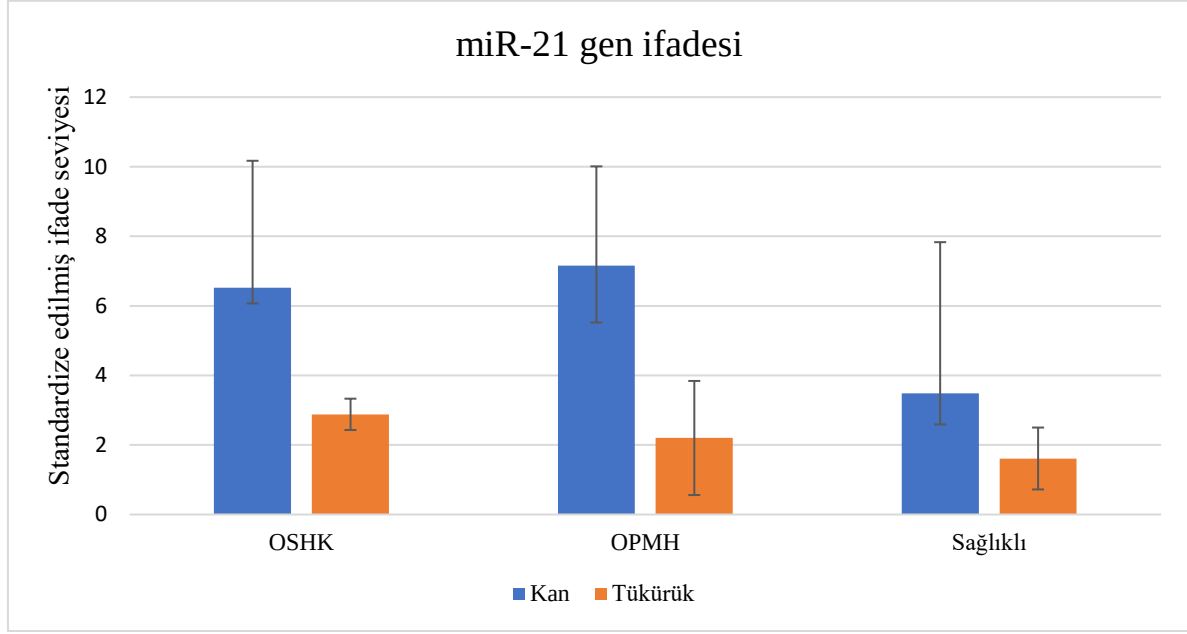
Biyopsi no	OSHK			OPMH			SAĞLIKLI		
	ng/μl	260/ 280	260/ 230	ng/μl	260/ 280	260/ 230	ng/μl	260/ 280	260/ 230
1 (KG)	2092,5	1,85	2,22	2618,9	1,84	2,10	357,2	1,99	0,95
1 (TG)	2856	1,83	2,20	2889,2	1,86	1,79	328,3	2,1	1,55
1 (KM)	410,3	1,85	1,14	231,3	1,86	1,08	2395,6	1,85	1,55
1 (TM)	402,5	1,77	0,92	253,09	1,78	1,15	2341	1,85	1,82
2 (KG)	3428,6	1,81	2,18	2397,6	1,84	2,15	2256	1,84	1,79
2 (TG))	2990,9	1,86	2,19	2375,9	1,83	2,18	2303,8	1,86	1,8
2 (KM)	226,6	1,54	0,6	295,1	1,71	0,85	336,2	1,59	0,66
2 (TM)	204,4	1,65	0,7	299,3	1,74	0,9	213,3	1,61	0,71
3 (KG)	3375,5	1,81	2,20	2274,5	1,84	2,19	2041,9	1,86	1,76
3 (TG)	2994,6	1,82	2,19	1577,8	1,82	2,20	1769,2	1,86	1,73
3 (KM)	487,3	1,78	1,08	334,3	1,86	1,07	562,8	1,82	1,17
3 (TM)	384,6	1,83	1,41	272,5	1,71	1,06	508,6	1,82	1,17
4 (KG)	2322,8	1,9	2,18	2881,2	1,82	2,19	2962,1	1,83	1,74
4 (TG)	2522,5	1,9	2,20	3087,7	1,8	2,20	2777,7	1,85	1,77
4 (KM)	259,7	1,85	1,04	218,3	2,05	1,13	244,2	1,41	0,69
4 (TM)	236,7	1,75	0,9	280,2	2	1,39	202,2	1,53	0,94
5 (KG)	2559,6	1,9	2,18	2902,2	1,82	2,20	3216,5	1,79	1,74
5 TG)	2495	1,9	2,20	2340,8	1,81	2,18	2999,2	1,84	1,78
5 (KM)	239,9	1,81	0,83	323,7	1,74	0,88	140,36	1,67	1,02
5 (TM)	1395,5	1,91	1,62	317,02	1,78	1,03	179,2	1,66	1,25
6 (KG)	2762,0	1,81	2,18	2685,7	1,82	2,19	2995,3	1,83	1,82
6 (TG)	2202,7	1,84	2,20	2690	1,82	2,20	3051,2	1,8	1,83
6 (KM)	294,9	1,84	1,08	241,5	1,77	0,88	431,62	2,08	1,42
6 (TM)	402,5	1,77	0,92	253,09	1,78	1,15	2341	1,85	1,82
7 (KG)	3375,5	1,81	2,18	2630,4	1,82	2,19	2777,8	1,83	1,71
7 (TG)	2994,6	1,84	2,20	2786,4	1,82	2,20	3163,9	1,8	1,86
7 (KM)	487,3	1,88	1,06	306	1,88	1,06	444,74	1,95	0,95
7 (TM)	384,6	1,84	1,08	1314,0	1,85	1,56	264,28	1,76	0,74
8 (KG)	2184,4	1,96	2,20	2029,6	1,83	2,19	3051,3	1,83	1,81
8 (TG)	2228,2	1,85	2,18	2398,8	1,83	2,20	2781,1	1,83	1,8
8 (KM)	334,94	1,65	1,10	316,5	1,44	0,55	439,7	1,92	1,12
8 (TM)	324,6	1,75	1,15	306	1,88	1,06	444,74	1,95	0,95
9 (KG)	3322,8	1,96	2,18	1868,5	1,82	2,19	1753,9	1,83	1,7
9 (TG)	3522,5	1,89	2,20	2302,7	1,82	2,20	2521,6	1,84	1,82
9 (KM)	359,7	1,56	1,23	251,34	1,7	0,78	444,8	1,94	1,1
9 (TM)	336,7	1,65	1,19	234,94	1,73	0,87	297,3	1,82	1,05
10 (KG)	1559,6	1,96	2,18	2361,2	1,82	2,19	1548,1	1,82	1,66
10 (TG)	2495	1,88	2,20	2489,2	1,83	2,20	2968,3	1,82	1,81
10 (KM)	249,9	1,55	1,28	262,8	1,7	0,77	354,4	1,89	0,98
10 (TM)	395,5	1,65	1,17	260,7	1,68	0,8	204,2	1,85	1,03
11 (KG)	3375,5	1,95	2,18	2014,4	1,85	2,19	2682,2	1,88	1,76
11 (TG)	2994,6	1,85	2,20	2836,3	1,77	2,11	2751,7	1,86	1,76
11 (KM)	487,3	1,85	1,23	262,8	1,19	1,10	252	1,91	1

Çizelge 4.2. (devam) Hasta ve sağlıklı gruplara ait cDNA miktar ve saflık oranları

11 (TM)	384,6	1,75	1,15	260,7	1,54	1,18	279,08	1,87	0,95
12 (KG)	3475,4	1,97	2,18	2685,7	1,82	2,19	2250,8	1,9	1,7
12 (TG)	28942	1,96	2,20	2690	1,82	2,20	2618,5	1,88	1,81
12 (KM)	487,5	1,75	1,27	251,34	1,7	0,78	225,3	1,83	0,9
12 (TM)	374,6	1,65	1,10	234,94	1,73	0,87	252,8	1,8	0,99
13 (KG)	1559,6	1,96	2,18	2685,7	1,82	2,19	2523	1,83	1,75
13 (TG)	2495	1,88	2,20	2690	1,82	2,20	2791,3	1,82	1,82
13 (KM)	487,3	1,85	1,23	240	1,77	0,88	315,6	1,86	0,73
13 (TM)	384,6	1,75	1,15	241,5	1,77	0,88	319,3	1,77	0,94
14 (KG)	2762,0	1,81	2,18	2274,5	1,84	2,19	2455,7	1,86	1,66
14 (TG)	2461,0	1,81	2,18	2276,5	1,84	2,19	2874,4	1,84	1,8
14 (KM)	487,5	1,75	1,27	251,34	1,7	0,78	296,6	1,78	0,81
14 (TM)	374,6	1,65	1,10	234,94	1,73	0,87	330,7	1,8	1,03
12 (KG)	3475,4	1,97	2,18	2685,7	1,82	2,19	2250,8	1,9	1,7
12 (TG)	28942	1,96	2,20	2690	1,82	2,20	2618,5	1,88	1,81
12 (KM)	487,5	1,75	1,27	251,34	1,7	0,78	225,3	1,83	0,9
12 (TM)	374,6	1,65	1,10	234,94	1,73	0,87	252,8	1,8	0,99
13 (KG)	1559,6	1,96	2,18	2685,7	1,82	2,19	2523	1,83	1,75
13 (TG)	2495	1,88	2,20	2690	1,82	2,20	2791,3	1,82	1,82
13 (KM)	487,3	1,85	1,23	240	1,77	0,88	315,6	1,86	0,73
13 (TM)	384,6	1,75	1,15	241,5	1,77	0,88	319,3	1,77	0,94
14 (KG)	2762,0	1,81	2,18	2274,5	1,84	2,19	2455,7	1,86	1,66
14 (TG)	2461,0	1,81	2,18	2276,5	1,84	2,19	2874,4	1,84	1,8
14 (KM)	487,5	1,75	1,27	251,34	1,7	0,78	296,6	1,78	0,81
14 (TM)	374,6	1,65	1,10	234,94	1,73	0,87	330,7	1,8	1,03

4.3. OSHK Hastaları, OPML Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-21 İfade Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Kan materyalinden elde edilmiş miR-21 ifade seviyelerinin ortalaması, OSHK hasta grubunda $6,52 \pm 3,65$ OPML hasta grubunda $7,16 \pm 2,85$, sağlıklı kontrol grubunda $3,48 \pm 4,35$ olarak, tükürük materyalinden elde edilmiş miR-21 ifade seviyelerinin ortalaması, OSHK hasta grubunda $2,88 \pm 0,45$ OPML hasta grubunda $2,2 \pm 1,64$, sağlıklı kontrol grubunda $1,61 \pm 0,89$ olarak saptandı. OSHK hastaları, OPML hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının kan ve tükürük örneklerinden standardize edilmiş miR-21 ifade seviyelerinin ortalamalarına ait grafik Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. OSHK, OPML ve sağlıklı kontrol gruplarının kan ve tükürük örneklerinden elde edilmiş miR-21 miRNA ifade seviyelerinin grafiği (ortalama±standart sapma).

Her üç grubun kan örneklerindeki miR-21 ifade düzeyleri karşılaştırıldığında, OPML grubu ile sağlıklı grup arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,05$). Buna göre, sağlıklı grubunun miR-21 düzeyleri OPML grubunun miR-21 düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha azdır ($p=0,007$) (Çizelge 4.3).

OSHK, OPML ve sağlıklı grupları arasında miR-21 seviyesinin tükürükten alınan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ölçümleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$). Buna göre sağlıklı grubunun $2^{-\Delta\Delta Ct}$ düzeyleri OSHK grubunun $2^{-\Delta\Delta Ct}$ düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha azdır ($p=0,002$) (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Kan ve tükürük örneklerinde OSHK ve OPML hastalarının sağlıklı kontrol grubu ile miR-21 düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

	OSHK (n=14) Ort±SS	OPML (n=14) Ort±SS	Sağlıklı (n=14) Ort±SS	p
Kan Ölçümleri miR-21 $2^{-\Delta\Delta Ct}$	6,52±3,65	7,16±2,85	3,48±4,35	0,007*
Tükürük Ölçümleri miR-21 $2^{-\Delta\Delta Ct}$	2,88±0,45	2,20±1,64	1,61±0,89	0,002*

*: $p<0,05$

Çizelge 4.4’de gruplara göre kan ve tükürük miR-21/U6 ölçümleri arasındaki ilişki gösterilmiştir. OPML grubunda kan ölçümlerinde bakılan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ miR-21/U6 düzeyleri ile tükürük ölçümlerinde bakılan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ miR-21 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı %57,8’lik pozitif yönlü ilişki bulunmaktadır ($\rho=0,578$, $p=0,030$).

Çizelge 4.4. Gruplara göre kan ve tükürük mir-21/U6 ölçümleri arasındaki ilişkinin incelenmesi

	Grup		Tükürük Ölçümleri	
Kan Ölçümleri	OSHK miR-21/U6 $2^{-\Delta\Delta C_t}$		r	0,183
			p	0,532
	OPML miR-21/U6 $2^{-\Delta\Delta C_t}$		r	,578*
			p	0,030
	Sağlıklı miR-21/U6 $2^{-\Delta\Delta C_t}$		r	0,029
			p	0,923

r: Spearman’s Rho Korelasyon Katsayısı *: $p < 0,05$

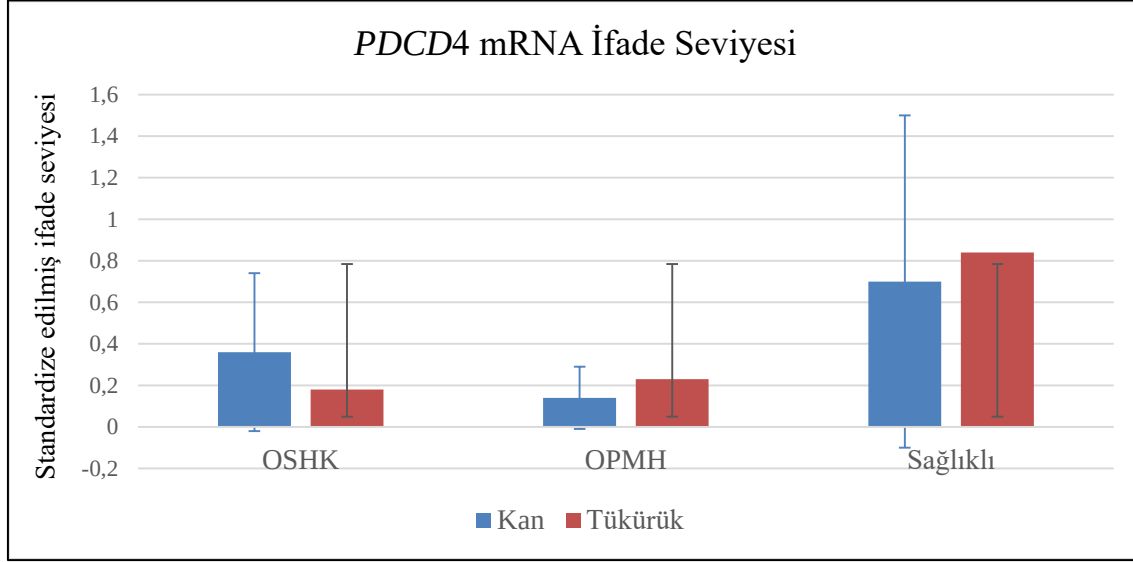
4.4. OSHK Hastaları, OPML Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-208a İfade Seviyelerinin Değerlendirilmesi

OSHK, OPML ve sağlıklı gruplar ile çalışılan kan ve tükürük örneklerinde miR-208a-3p ifadesinde bir sonuç elde edilememiştir. Literatür taraması yapıldığında, miR-208a-3p’nin sadece doku biyopsilerinde ifade edildiğini gösteren ancak, tam kanda veya diğer vücut sıvılarında bulunmadığını gösteren çalışmaların varlığı bizim yaptığımız çalışma sonucu ile uyumludur [445].

4.5. OSHK Hastaları, OPML Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında PDCD4 İfade Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Kan örneklerinden elde edilmiş *PDCD4* ifade seviyelerinin ortalaması, OSHK hasta grubunda $2,97 \pm 4,04$, OPML hastalarında $3,08 \pm 5,06$, sağlıklı kontrol grubunda $14,33 \pm 20,14$ olarak, tükürük materyalinden elde edilmiş *PDCD4* ifade seviyelerinin ortalaması OSHK grubunda $2,44 \pm 1,94$, OPML grubunda $4,79 \pm 5,70$ ve sağlıklı grupta $9,72 \pm 6,94$ olarak saptandı. Şekil 4.8.’de OSHK hastaları, OPML hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının kan ve tükürük

örneklerinden standardize edilmiş *PDCD4* ifade seviyelerinin ortalamalarına ait grafik verilmiştir.



Şekil 4.8. OSHK, OPML ve sağlıklı kontrol gruplarının kan ve tükürük örneklerinden elde edilmiş *PDCD4* gen ifade seviyelerinin grafiği (ortalama±standart sapma).

OSHK, OPML ve sağlıklı grupları arasında kan örnekleri ile çalışılan *PDCD4* gen ifadesinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ölçümü değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$). Buna göre sağlıklı gruptaki *PDCD4* düzeyleri, OSHK ve OPML grupları ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu bulunmuştur ($p=0,016$) (Çizelge 4.5).

OSHK, OPML ve sağlıklı grupları arasında tükürükten alınan *PDCD4*'ün $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ölçümü değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$). Sağlıklı grubunun $2^{-\Delta\Delta Ct}$ *PDCD4* düzeyleri OSHK ve OPML gruplarının $2^{-\Delta\Delta Ct}$ *PDCD4* düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazladır ($p<0,001$) (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Kan ve tükürük örneklerinde OSHK, OPML hasta gruplarının sağlıklı kontrol grubuyla *PDCD4* ifadesinin istatistiksel karşılaştırması

	OSHK (n=14) Ort±SS	OPML (n=14) Ort±SS	Sağlıklı (n=14) Ort±SS	p
Kan Ölçümleri <i>PDCD4</i> $2^{-\Delta\Delta Ct}$	2,97±4,04	3,08±5,06	14,33±20,14	0,016*
Tükürük Ölçümleri <i>PDCD4</i> $2^{-\Delta\Delta Ct}$	2,44±1,94	4,79±5,70	9,72±6,94	<0,001*

* $p<0,05$

OSHK grubunda kan ölçümlerinde bakılan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ *PDCD4/ActB* düzeyleri ile tükürük ölçümlerinde bakılan *PDCD4-ActB* düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı %74,5'lik pozitif yönlü ilişki bulunmaktadır ($\rho=0,745$, $p=0,002$) (Çizelge 4.6).

OPML grubunda kan ölçümlerinde bakılan *PDCD4/ActB* düzeyleri ile tükürük ölçümlerinde bakılan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ *PDCD4/ActB* düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı %63,1'lik pozitif yönlü ilişki bulunmaktadır ($\rho=0,631$, $p=0,016$) (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Gruplara göre kan ve tükürük *PDCD4/ActB* ölçümleri arasındaki ilişkinin incelenmesi

	Grup		Tükürük Ölçümleri	
Kan Ölçümleri	OSHK <i>PDCD4</i> $2^{-\Delta\Delta Ct}$	r p		,745** 0,002
	OPML <i>PDCD4</i> $2^{-\Delta\Delta Ct}$	r p		,631* 0,016
	Sağlıklı <i>PDCD4</i> $2^{-\Delta\Delta Ct}$	r p		-0,134 0,647

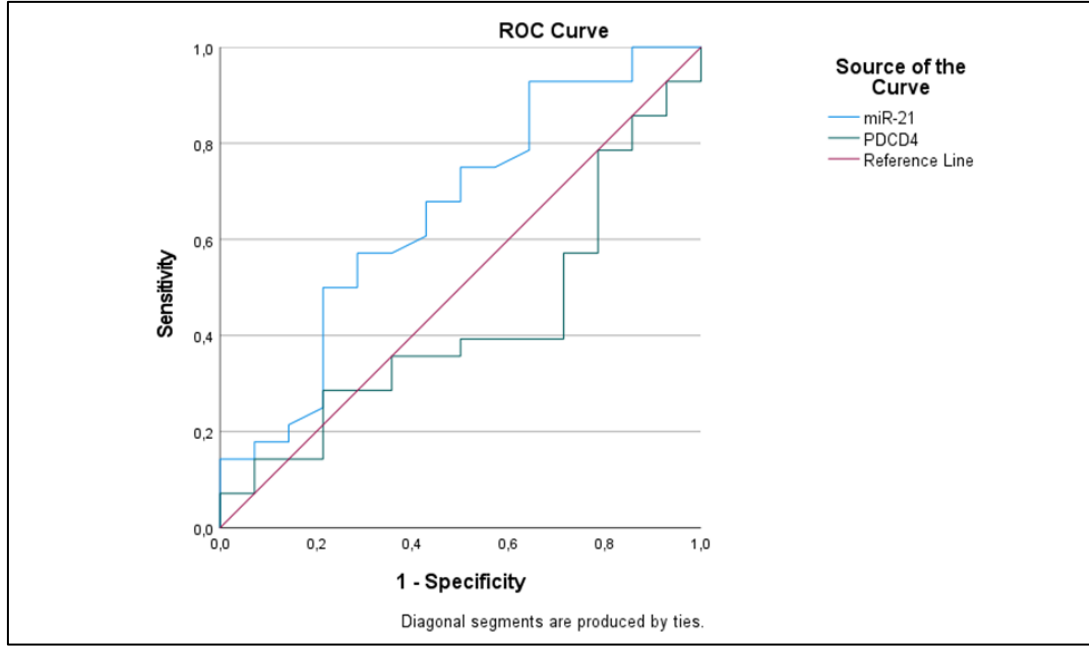
r: Spearman's Rho Korelasyon Katsayısı *: $p<0,05$ **: $p<0,01$

Gruplar arasında klinik veriler ile miR-21 için Spearman'ın sıralama korelasyon analizi yapılmıştır. Buna göre OSHK grubundan alınan kan örneklerindeki miR-21 seviyesi ile alkol kullananlar arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır ($r_{\text{spearman}}=-0,54$, $p=0,4$). OPML grubundan alınan tükürük örneklerinde ise miR-21 ifade seviyesi ile cinsiyet arasında anlamlı ilişki bulunmuştur ($r_{\text{spearman}}=-0,68$, $p=0,007$).

Çizelge incelendiğinde uygulanan ROC analizi sonuçlarına göre tükürükten alınan miR-21 ve *PDCD4* değerlerinin tanı koymada istatistiksel olarak anlamlı bir kesim noktasının olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Sonuçlara ilişki ROC eğrisi aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.7. Tükürükten alınan miR-21 ve *PDCD4* değerleri için tanı koymada kesim noktalarının incelenmesi

Test Değişkeni	Area	Standart Hata	p	95% Güven Aralığı	
				Alt Sınır	Üst Sınır
miR-21	0,657	0,092	0,101	0,476	0,838
<i>PDCD4</i>	0,426	0,093	0,439	0,244	0,608



Şekil 4.9. PDCD4 ve miR-21 ROC Curve analizi

5. TARTIŞMA

Oral skuamöz hücreli karsinom ile ilgili çalışmaların ve yeni tedavilerin geliştirilmesine rağmen, ölüm oranları durdurulamamakta ve hızla artmaya devam etmektedir. Hastaların sağ kalım süreleri, hastalığın evresi ile doğrudan ilişkilidir. Lenf nodu tutulumu olmayan bir hastanın 5 yıllık sağ kalım oranı %66 - %85 arasında değişiklik gösterirken, lenf nodu metastazı olan hastalarda sağ kalım oranı ise % 9'lara kadar düşmektedir [446]. Sigara ve alkol kullanımı, kötü ağız hijyeni, HPV'ye bağlı enfeksiyon, ağız içi iyileşmeyen ülserler, OSHK için risk faktörlerini oluşturmaktadır [447]. Bundan dolayı diğer kanserlerde olduğu gibi OSHK'da da erken tanı ve tedavi, bireyin yaşam kalitesi ve tedavinin sürdürülebilirliği bakımından oldukça önemlidir.

Oral skuamöz hücreli karsinomun prognozunun tayininde tümörün lokal invazyonu, lenf nodu metastazı, uzak metastaz olup olmaması gibi faktörlerin dışında, son yıllarda literatürde hücrel ve moleküler düzeyde farklı prognostik faktörler ve bunlarla ilgili biyobelirteçlerin önemli olabileceği sıklıkla yer almaktadır [139]. Özellikle bu faktörlerin “premalign” dönemdeki lezyonlarda, kansere invazyon sürecinden önce saptanabilmesi hastalığın önlenmesi ve tedavinin takibi açısından oldukça büyük önem taşımaktadır [79]. Tüm bu bilgiler ışığında, çalışmamızı “displazi” tanısı almış OPML ve “skuamöz hücreli kanser” hastalarının materyallerinden yürütmeyi amaçladık.

OSHK'da altın standart olarak kabul edilen doku biyopsilerinin hem girişimsel olması hem de temininin her zaman mümkün olmaması, bu materyalin yerine vücut sıvılarından elde edilen ve içeriği doku biyopsisi ile aynı bileşenlere sahip olan likit biyopsi kavramını gündeme getirmiştir. Dahası likit biyopsi ile yapılan çalışmaların artması, biyobelirteç araştırmalarını öne çıkarmıştır. Bu görüşten yola çıkarak çalışma materyalimizi “displazi tanısı koyulmuş ‘oral potansiyel malign lezyonlar’ ve oral skuamöz hücreli karsinom” tanısı alan bireylerden temin ettiğimiz tükürük ve kan likit biyopsileri oluşturmaktadır.

Son yıllarda birçok bilimsel araştırma başta hematolojik kanserler olmak üzere pek çok kanser türünde doku biyopsileri yerine likit biyopsi kullanımının, uygun olabileceğini göstermiştir. Günümüzde "likit biyopsi" genellikle hasta plazma örneklerinden elde edilen serbest dolaşan DNA'nın (cfDNA) tanımlanması ve analizini ifade eder. cfDNA'lar, hem hücreler hem de ölen hücreler tarafından dolaşıma aktif olarak apoptoz ve/veya nekroz ile

dökülen, serbest dolaşan çıplak DNA molekülleridir [448]. Özetle, ctDNA bulunduran likit biyopsiler, insan kanserlerinin teşhisi ve tedavisinde, hastalığın önlenmesinde, klinik karar vermede yol haritası olan bir yaklaşımlardır. Likit biyopsi ile elde edilecek tüm bu uygulamalar ve daha fazlası hastanın idrar, kan, tükürük ve diğer vücut sıvılarından kolaylıkla elde edilebilir. Likit biyopsi kaynağı sunan ve şimdiye kadar tüm çalışmalarda kullanılmış olan kan örnekleri bizim de çalışma materyalimizin bir kısmını oluşturmaktadır.

Likit biyopsiler içerisinde yer alan tükürük, akciğer, gastrointestinal, pankreas vb. gibi kanserlerin yanı sıra özellikle ağız kanserinin tanısında kanın dışında çalışılan biyolojik materyaldir [449]. Ayrıca tükürüğün, kan ve doku biyopsilerine göre daha az invaziv yöntemle elde edilmesi, kolay ve hızlı şekilde temini ve ekonomik olması, ağız kanserinin teşhisinde bu biyopsileri öne çıkarmaktadır. Guillon ve diğerleri 36 makalede potansiyel biyobelirteç olarak çalışılan 46 molekülün incelenmesini içeren çalışmalarında, tükürük örnekleriyle ağız kanseri teşhisinde uygulanabilir herhangi bir biyobelirteçin henüz bulunmadığını bildirmişlerdir [449]. Biz de bu verilerden yola çıkarak, bir diğer çalışma materyalimizi tükürüğün oluşturmasını tercih ettik.

Diğer taraftan son on yılda özellikle likit biyopsilerde yapılan çalışmalarda kanser ilişkili sinyal yollarının düzenleyicileri olan mikroRNAların karsinogenezde rolü ortaya konmuştur. miRNAların hedefe bağlanmada, miRNA bağlanma bölgesinin merkezi rol oynadığı ve bu özelliği sayesinde de miRNAların hedef bağlanma bölgesine tam olmayan eşleniklik ile bağlandığı da rapor edilmiştir. Tüm bu veriler, miRNAları pek çok kanserin erken tanı, prognoz ve tedavi planlaması için umut verici terapötik seçenekler sunan bir biyobelirteç olduğunu desteklemektedir [139]. Son zamanlarda araştırmacılar, özellikle sıvı biyopsilerde kanserlerde prognostik belirteçler olarak miRNAları veya belirli miRNAların oranlarını kullanmaktadır.

Örneğin, Von Brandestain ve diğerleri (2020), böbrek kanserli hastalardan topladıkları idrar örnekleri üzerinde Mxi2/miR-15a ve Vim3/miR-498 incelemişlerdir. Çalıştıkları idrar örneklerinde Vim3'ün onkositomalı hatalarda diğer renal hücreli karsinomlarda ve sağlıklı kontrole göre önemli derecede arttığını, Mxi2/miR-15a'nın ise diğer renal hücreli karsinomun alt türlerinde önemli ölçüde arttığını saptamışlardır. Bunun yanı sıra miR-498/Vim3, onkositoma hastalarında ağırlıklı olarak aşırı ifade edildiğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak ilgili miRNA ların likit biyopsilerde böbrek kanserlerinin ayırımı ve erken tanısında kullanılabilirliğini kanıtlamışlardır [450].

Yapılan araştırmalarda çoğu oral kanserde miRNA profilinin düzensizliği ortak bir özellik olarak gösterilmiş [261] ve doğru değerlendirildiği takdirde kanserlerde potansiyel tanı, prognostik ve terapötik biyobelirteç olarak kullanımları mümkün olduğu bildirilmiştir. Ries ve diğerleri (2019) miR-494, miR-3651 ve miR-186'nın düzensiz ifadesini ağız kanseri nüksleriyle ilişkilendirmiştir [451]. Tüm bu bilgiler değerlendirildiğinde, oral potansiyel malign lezyonlardan, oral skuamöz hücreli karsinoma geçişte likit biyopsilerdeki miRNA potansiyellerinin araştırılmasının faydalı olacağı düşünülmüş ve çalışmamızda biyobelirteç olarak kullanımına karar verilmiştir.

Çalışmamızda miRNAlarla ilişkili olduğu bilinen apoptotik bir gen olan *PDCD4*'ün kanser öncüsü evreden , oral kansere geçiş sürecinde etkin olabileceğini düşünerek, araştırmamızda inceleyeceğimiz parametreler arasına dâhil ettik. Apoptoz ile ilişkili olduğu bilinen kemirgen hücresel dönüşümün inhibitörü olarak tanımlanan *PDCD4* geninin translasyon başlatma kompleksinin ökaryotik başlatma faktörü 4A (eIF4A) ile doğrudan etkileşime girerek protein sentezini baskıladığı bilinmektedir. Buna ek olarak *PDCD4*'ün, AP-1-aracılı trans aktivasyonu inhibe ettiği ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörü p21'in ifadesini uyardığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca *PDCD4* ifadesinin bazı tümör türlerinde çok az ya da hiç olmadığı da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Sonuç olarak, *PDCD4* ifadesindeki azalmanın ya da hiç olmamanın çeşitli yollarla hücrelerin büyümesi için avantajlar sağladığı ve böylece kanser gelişimini kolaylaştırdığı belirtilmiş aynı zamanda kanser tedavisinde moleküler bir hedef olarak kullanılabileceğine dair görüşler de rapor edilmiştir [434, 452, 453]. Biz de çalışmamızda OPML'den, OSHK'ya geçişte *PDCD4* gen ifadesindeki azalmanın kanser gelişimini kolaylaştırdığı ve olası mekanizmaya katkı sağlamak düşüncesiyle daha önce likit biyopsilerde çalışılmamış olan ilgili geni araştırmayı tercih ettik.

Oral skuamöz hücreli karsinomda kan ve tükürük materyali ile çalışılan mikroRNAlar çok sınırlıdır. Literatüre bakıldığında, likit biyopsilerde OPML'den malign lezyona dönüşümdeki miRNAların ifade düzensizlikleri ise yok denecek kadar az sayıdadır [418].

Bu tez çalışmasında apoptozda görevli tümör baskılayıcı gen olan *PDCD4* geni ile ilişkili olduğu düşünülen miR-208a-3p ve miR-21'in kan ve tükürükteki ifade seviyelerinin RT-qPCR yöntemi ile araştırılarak bu miRNA'lar ve *PDCD4*'ün OSHK gelişim riski yüksek olan OPML hastalarında sağlıklı kontrole kıyaslandığında biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışma planlanırken mikroRNA'lar ve bu mikroRNA'larla ilişkisi olduğu düşünülen mRNA'nın seçimi Targetscan [454] ve miRBase [220] veri tabanları kullanılarak belirlenmiştir. miR-21 ve *PDCD4*'ün qPZR ile 14 OSHK, 14 OPMH ve 14 sağlıklı grup arasında gen ifadelerinin kantitatif olarak değerlendirilebilmesi amacıyla incelenmesi hedeflenmiştir. miRNA ifade analizleri için normalizatör olarak, bir housekeeping gen olan U6 snRNA (hsa) kullanılmıştır. *PDCD4* geni için normalizatör olarak *ActB* kullanılmıştır (hsa). Gen ifade düzeyleri qPZR, "mikro array", gibi modern metodların kullanılarak belirlenmesinin yanısıra "Northern blot" "RNase protection assay" gibi daha eski moleküler yöntemler kullanılarak da belirlenebilmektedir [455]. Aynı anda yüzlerce gendeki ifadenin değerlendirilebilmesine olanak sağlayan mikarray yöntemi en çok kullanılan yöntemdir. Ancak Northern blot ve qPZR ile karşılaştırıldığında, ifade analizindeki küçük değişikliklerin saptanmasında yetersiz kalmaktadır [456]. qPZR yönteminin Northern Blot'a göre daha düşük hassasiyete, ancak daha yüksek özgünlüğe sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [457]. Ayrıca sıvı biyopsiden elde edilen ctDNA'yı karakterize etmek için spektrofotometri, floresan testleri ve YND (Yeni Nesil Dizileme) gibi çeşitli tekniklerin kullanılmasının yanı sıra qRT-PZR'da yaygın olarak kullanılmaktadır [13]. qPZR yöntemi ile daha az miktarlarda DNA kullanılarak daha yüksek özgünlükte gen ve mikroRNA düzeylerinin likit biyopsilerde kantitatif olarak belirlenebilmesi nedeniyle, çalışmamız için bu yöntem tercih edilmiştir.

Çalışma sonuçlarımızdan elde ettiğimiz demografik verileri değerlendirdiğimizde, parametreler içerisinde yaş ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p < 0.001$). OSHK hastalarının yaş ortalaması $59,43 \pm 13,21$ olarak bulunmuş ve bu veriler literatürle de uyumluluk göstermiştir [295]. OSHK grubu ile sağlıklı grup arasındaki farklılık, sağlıklı grubumuzun gömülü 20 yaş dışı operasyonuna gelen bireylerden oluşmasıdır. Bu grup hastaların komplikasyonsuz ve risksiz operasyon dönemin 25 yaşa kadar olduğu bilinmekte olup [458], çalışmamızdaki yaş ortalamaları ile uyumludur ($22,21 \pm 1,85$).

Araştırma sonuçlarımızda, OSHK hastalarının kanında sağlıklı kontrol grubu ile kıyaslandığında yüksek miR-21 ifadesini saptadık ($p<0,05$) [299]. Mohmood ve diğerleri (2019) OSHK hastalarının serum örneklerinde miR-21 ifadesini incelemişler ve serum miR-21 seviyelerinin doku mir-21 ifadesini yansıttığını ve bu nedenle tümör invazyonu ve metastazını tahmin etmek için minimal invaziv bir araç olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir [300]. Literatür araştırması yapıldığında bizde çalışmamızda literatürde bulunan çalışmalara benzer şekilde sonuçlar elde ettik. miR-21 onkogen olarak işlev gördüğünden, sağlıklı grupla kıyaslandığında OSHK da daha yüksek çıkmasının beklenen biyolojik bir sonuç olduğu fikrindeyiz.

miR-21, anti-apoptotik etkisi ile karsinogenez gelişimini destekleyen onkogenik mikroRNAlardan sadece biridir. Genel olarak kanserlerde miR-21'in yüksek ifade olduğu ve baskılandığında tümörün boyutunun küçüldüğü görülmüştür. Ayrıca tümörlerde kemoterapi direncine katkıda bulunduğu da gözlemlenmiştir [459]. Kanserlerin başlangıç evresinde yer alan *PTEN*, *TGF β* , *PDCD4* gibi genlerin kontrolüne katkı sağladığı da yapılan çalışmalarda desteklenmiştir [460]. miR-21'in apoptozu inhibe etme yeteneği yoluyla karsinogenez gelişiminde yer aldığı iddia edilmektedir [461]. miR-21'in OSHK' da dâhil olmak üzere çeşitli tümör tiplerinde yüksek derecede ifade edildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Çalışmamızda düşük dereceli displaziye sahip OPML hastalarının kan örneklerinde miR-21 ifadesinin kontrol grubumuz ile kıyaslandığında yüksek ifade edildiğini tespit ettik ($p<0,05$). Litaratür incelemesi yapıldığında displazilerde mir 21 ifadelerinin doku, hücre kültürü gibi materyallerde gerçekleştiği görülmekle birlikte [139, 362], serum ve plazma örneklerinde incelenmiş miR-21 araştırmasının bulunmadığı görülmüştür. Bu durum, sonuçlarımızın başka çalışmalarla karşılaştırılmasın için sınırlama getirirse de, çalışmamızı özgün kılmıştır.

Çalışmamızda OPML miR-21 seviyesi ($7,16\pm2,85$) OSHK dan ($6,52\pm3,65$) yüksek bulunmuştur. Pek çok çalışmada kandaki mir seviyelerindeki farklılıklardan söz edilmektedir. Bunun başlıca sebebi pıhtılaşma sürecinin mevcut toplam miRNA miktarını etkileyebileceği görüşüdür [462]. Çalışmamızda OPML ile kıyaslandığında, OSHK'da daha yüksek çıkması beklenen miR-21 düzeyinin düşük olması aklımıza bu sorunların yaşandığını getirmektedir. Ayrıca, kit çeşitliliği ve laboratuvar protokollerinin farklılığı da çalışma sonuçlarımıza etki etmiş olabilir [139, 462].

Aynı şekilde OSHK hastalarının tükürük materyallerinde miR-21 ifadesinin de sağlıklı grupla kıyaslandığında dikkat çekici şekilde artmış miR-21 ifadesini belirledik ($p<0,05$). Mehdipour ve diğerleri (2018) OSHK hastalarının tükürük örneklerinde miR-21 ifadesini incelemişler ve ilgili miRNA'nın yüksek ifade edildiğini bildirmişlerdir [463]. Bu sonuçtan yola çıkarak çalışma bulgularımızın literatürle uyumluluk gösterdiğini söyleyebiliriz. Girişimsel olmaması nedeniyle tükürük örneklerinde miR-21 ifadesinin OSHK tanı ve takibinde kullanılabilirliğini bulgularımızda göstermiş bulunmaktayız.

Hung ve diğerleri (2016) OPMH hastalarının tükürüklerinde miR-21 ifadesini araştırmışlar ve sonuçların sağlıklı gruba göre yüksek ifade edildiğini göstermişlerdir [464]. Zahran ve diğerleri (2015) displazili ve displazisiz OPML hastalarında yürüttükleri çalışmalarında miR-21 ifadesinin kontrol grubu ile kıyaslandığında yüksek ifade edildiğini rapor etmişler ve tükürükte miRNA-21'in anormal ifadesinin OSHK patogeneğinde erken bir moleküler olayı yansıtabileceğini öne sürmüşlerdir [465]. Bu görüşten yola çıkarak, çalışma verilerimizden elde ettiğimiz tükürük miR-21 seviyelerinin sağlıklı ($1,61\pm0,89$), OPML ($2,20\pm1,64$) ve OSHK ($2,88\pm0,45$) gruplarındaki seviyeli artışı ($p<0,05$), bize OSHK erken tanısında miR-21'in potansiyel biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuç, Zahran ve diğerleri (2015) nin görüşünü desteklemektedir [465].

Çalışmamıza dahil edilen tüm gruplarda bireylerin tükürük ve kan örneklerini birbirlerine göre kıyasladığımızda kan örneklerinde miR-21 seviyesi, daha yüksek oranda ifade edilmiştir ($p<0,05$) [466]. Bununla birlikte, kanın aksine, tükürük üretimi vücut genelinde gün içerisinde farklılıklar gösterebilir. Tükürük, tükürük bezlerinde biriken ve asiner hücre kanalları yoluyla ağız boşluğuna salgılanan enzimler, hormonlar, antikorlar, nükleik asitler, antimikrobiyal bileşenler ve sitokinler içerir ve dişeti oluşu sıvısı ile de ilişkilidir. Bu nedenle, tükürüğün miktarı ve kalitesi; yaş, cinsiyet, sirkadiyen ritim, diyet, ilaçlar ve çevresel etkenler gibi faktörlerden büyük ölçüde etkilenir [213]. Sonuç olarak, göreceli tükürük miR ekspresyon seviyeleri büyük ölçüde değişebilir. Tüm bu etkenler göz önüne alındığında, çalışmamızda her iki materyaldeki miR-21 seviye farklılıklarındaki sebebin kaynağı ortaya çıkmış olmaktadır.

Nitekim ve diğerlerinin (2021), özefagus kanserlerinde miR-1246 ifade seviyelerini inceledikleri çalışmalarında kanda, idrar ve tükürüğe oranla bahsi geçen miRNA'nın daha

yüksek ifade olduğunu saptamışlardır. Bu bulgular çalışmamızla benzerlik göstermektedir [467].

Çalışmamızda, incelediğimiz diğer bir mikroRNA olan miR-208a-3p, miyokard enfarktüsü için kabul görmüş bir biyobelirteç olarak tanımlanmasına rağmen kanser araştırmaları için yeterince ilgi görmemiştir [468, 469]. Yin ve diğerleri (2016), miR-208a-3p'nin mide kanserinde *PDCD4* gen ifadesini azaltarak hücre apoptozunu baskıladığını ortaya çıkarmışlardır [470]. Tang ve diğerleri (2016), miR-208a'nın insan akciğer kanserinde p21'in ifadesini doğrudan aşağı yönde düzenleyerek proliferasyonu ve radyo direncini desteklediğini bildirmişlerdir [471]. Ancak daha önce oral skuamöz hücreli karsinomda ve oral potansiyel malign hastalıklarda yapılmış bir çalışması bulunmamaktadır. Bunun da ötesinde, miR-208 in akciğer kanseri serum örnekleri hariç diğer kanser türlerinde likit biyopsilerde yapılmış araştırmalara rastlanılmamıştır [471]. OSHK ve OPMH hastaları ile çalıştığımız bu tez çalışmasında kan ve tükürük örneklerinde miR-208a-3p'nin ifade edilmediğini tespit ettik. Bu sonuç, bize miR-208a-3p'nin tüm kanserler için likit biyopsilerde kullanılacak uygun bir biyobelirteç olmadığını göstermektedir.

Literatürde OPMH ve OSHK hastalarında *PDCD4* gen ifadesinde meydana gelen değişiklik ile yapılan çalışmalar oldukça kısıtlı olmasının yanı sıra kan ve tükürük materyalinde *PDCD4* ile çalışılmış bir araştırmaya henüz rastlamadık. Likit biyopsilerde *PDCD4* ifadesinin araştırıldığı ilk çalışma olduğunu düşündüğümüz ve buna göre değerlendirdiğimiz bulgularımızda hem kan hem de tükürük örneklerinde sağlıklıya oranla OSHK grubunda *PDCD4* ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma izlenmiştir ($p<0,05$). Literatürde OSHK ve OPML için likit biyopsilerde *PDCD4* ile çalışılmış bir kaynak bulamadığımız için verilerimizi, ancak doku biyopsileri ile yapılmış çalışmalarda karşılaştırabildik. Reis ve diğerleri (2010) doku biyopsilerinde yaptıkları çalışmada OSHK'de *PDCD4*'ün kötü prognoza ve artmış metastaza sahip hastalarda düşük ifade edildiğini ve *PDCD4*'ün bu düşük ifadesinin miR-21 ile düzenlendiğini göstermişlerdir [362]. Yine benzer şekilde Desai ve diğerleri (2017)'nin parafine gömülü dokudan oral epitelyal displazi ve OSHK ile yapmış oldukları çalışmada *PDCD4* sağlıklı mukozaya sahip bireylerde *PDCD4* gen ifadesi maksimum seviyedeysen, OSHK ve OED'ye sahip hastalarda önemli ölçüde düşük ifade edildiğini gözlemlemişlerdir [472]. Sonuçlarımız, yukarıda bahsedilen doku biyopsi çalışma bulguları ile benzerlik göstermektedir. Aynı zamanda bulgularımız, gerek doku biyopsileri gerekse sıvı biyopsilerde biyolojik materyal tipi farketmeksizin kanserli hastalarda *PDCD4*

gen ifadesinin düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Bu da daha az girişimsel olan likit biyopsilerin tanı ve hastalığın progresyonunu takip etmek için elverişli bir biyomateryal olarak kullanılabilirliğinin altını çizmektedir.

OPML hastalarından aldığımız kan örneklerinde *PDCD4* gen ifadesinin sağlıklı grup ile kıyaslandığında oldukça düşük ifade edildiğini gözlemledik. Yine aynı şekilde OPMH hastalarının tükürüklerinde azalmış *PDCD4* gen ifadesini belirttik ($p<0,05$) [473]. Bu bulgular doku biyopsilerinde yapılan çalışma ile uyumluluk göstermektedir [472].

Yapılan çalışmalarda *PDCD4* gen ve protein seviyelerinin miR-21 inhibisyonuyla artışı *PDCD4*'ün miR-21 için önemli bir fonksiyonel hedef olduğuna işaret etmiştir [474, 475]. Asangani ve diğerleri (2008)'nin kolorektal kanserde yapmış oldukları lusiferaz çalışmasında *PDCD4* geninin 3'UTR bölgesine miR-21'in bağlanmasıyla *PDCD4* geninin translasyonunun baskılandığını bildirmişlerdir [403]. Bu da *PDCD4* geni ile miR-21 geninin birbiriyle negatif etkileşime sahip olduğunu göstermektedir. Çalışma bulgularımız, Asangani ve diğerleri (2008) nin yapmış olduğu çalışma bulguları ile uyumludur. Araştırma sonucunda elde ettiğimiz bulgularımızda OPML'den OSHK'ya miR-21 ifade seviyesinde artış, *PDCD4* ifadesindeki azalma, miR-gen negatif etkileşimini açıklamaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalardan elde edilen bilgilerle, karsinogenez sürecinde miRNAların düzenleyici rollerinin kanser öncesi lezyonlar ve kanserle ilgili olduğuna dikkat çekilmiştir [476]. Çalışmamızda, OSHK gelişiminde rol oynayan miRNAların kan ve tükürük materyallerinde ifade düzeylerini inceleyerek, OPMH'deki gen ifade düzeyleriyle karşılaştırdık. Gerçekleştirdiğimiz deneylerden elde ettiğimiz bulgularımızın literatürle uyumlu olduğunu söyleyebiliriz [362, 472]. Ek olarak onkogenik özellikte işlev gören bir takım miRNA ve tümör baskılayıcı özellikte işlev gösteren gen ifadelerinde gözlemlediğimiz değişiklikler, OPMH hastalarında ve OSHK hastalarının likit biyopsi örneklerinde benzer şekilde ifade edilmişlerdir.

miRNAların ilk olarak ortaya çıkışından bu zamana kadar oluşumları ve etki mekanizmalarını anlamak adına çok değerli çalışmalar yapılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmalarda başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın gelişiminde miRNAların düzenlenmesindeki bozuklukların yer aldığı gösterilmiş ayrıca onkogenik, tümör baskılayıcı ya da metastatik özellik gösterdiklerinin de anlaşılması ile kanserin tanı ve tedavideki

önemlerine vurgu yapılmıştır. Ancak yine de işlevsel önemlerinin tam olarak anlaşılması, hedeflerinin tanımlanabilmesi ve tedavi amaçlı kullanımlarının gerçekleştirilmesi için yapılacak olan daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Son olarak çalışmamızın kanser gelişimine katkıda bulunduğu bilinen miRNAların ve bu miRNAlar ile ilişkisinin çok açık olduğu kanıtlanan *PDCD4* geninin geleneksel biyopsi materyali olan doku biyopsisi dışında vücut sıvılarından elde edilen yöntemlerle de aynı şekilde ifade edildiğini ve minimal invaziv bu yöntemin hastanın rahatlığı ve tedavinin sürdürülebilirliği açısından, kolaylık sağladığını görmekteyiz. Bu çalışmayla hedef tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi ve yeni protokollerin geliştirilmesine yönelik çalışmalara öncü bir çalışma olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

OSHK, OPML ve sağlıklı epitel olgularının demografik bulguları literatür bulgularıyla uyumludur.

qPZR ile kan örneklerinden elde edilen artmış miR-21 ifadesi saptanan olgular içinde OSHK grubundaki olguların %85'inde, tükürük örneklerinde ise %100'ünde artış izlenmiştir. Bu oran, kan örneklerinden elde edilen miR-21 ifadesinin OPML olgularında %71,4, tükürük örneklerinde ise %64,2 olarak artmış şekilde saptanırken, sağlıklı kontrol grubundan toplanan kan materyalinde ise %100 azalma saptanmıştır. *PDCD4* gen ifadesi ise OSHK, OPML ve sağlıklı grup için kan örneklerinde değerlendirildiğinde sırasıyla %92, %85 iken tükürük örneklerinde ise sırasıyla %100, %100 azalış saptanmıştır. Sağlıklı kontrollerin tümünde *PDCD4* seviyesi ise beklenildiği gibi artmış olarak ifade edildiği gözlenmiştir.

Çalışma bulgularımız sağlıklı epitelden oral kansere kadar olan gelişimde miR-21 ifadesinde artma, *PDCD4* ifadesinde azalma göstermektedir ($p<0.05$). Bu sonuçlar bize miR-21'in ve *PDCD4* geninin, likit biyopsilerde kanser progresyonunda potansiyel tanı belirteci olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, kansere bağlı ölümlerin sayısı gün geçtikçe artmakta ve geleneksel tedavi yöntemleri yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda miRNAların kanser gelişiminde önemli rol oynadıkları göz önünde bulundurulduğunda, bu küçük moleküllerin teşhis ve tedavide kullanılabileceği fikri gün geçtikçe güçlenmektedir. Buradan yola çıkarak, OPML gibi erken fark edilen hastaların takibi ve OSHK için geliştirilebilecek olan yeni tedavi yaklaşımlarının umut vaadedici olduğunu düşünmekteyiz.

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

KAYNAKLAR

1. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249.
2. Allon, I. and Buchner, A. (2012). Warty dyskeratoma/focal acantholytic dyskeratosis—an update on a rare oral lesion. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 41(3), 261-267.
3. Chaudhary, A. K., Pandya, S., Mehrotra, R., Bharti, A. C., Singh, M. and Singh, M. (2010). Comparative study between the Hybrid Capture II test and PCR based assay for the detection of human papillomavirus DNA in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma. *Virology Journal*, 7(1), 1-10.
4. Rao, S. V. K., Mejia, G., Roberts-Thomson, K. and Logan, R. (2013). Epidemiology of oral cancer in Asia in the past decade-an update (2000-2012). *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(10), 5567-5577.
5. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a Cancer Journal For Clinicians*, 65(2), 87-108.
6. Mupparapu, M. and Shanti, R. M. (2018). Evaluation and staging of oral cancer. *Dental Clinics*, 62(1), 47-58.
7. Kademani, D., Bell, R. B., Schmidt, B. L., Blanchaert, R., Fernandes, R., Lambert, P. and Tucker, W. M. (2008). Oral and maxillofacial surgeons treating oral cancer: a preliminary report from the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Task Force on Oral Cancer. *Journal of Oral and maxillofacial Surgery*, 66(10), 2151-2157.
8. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
9. Diao, P., Wu, Y., Li, J., Zhang, W., Huang, R., Zhou, C. and Cheng, J. (2018). Preoperative systemic immune-inflammation index predicts prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma after curative resection. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 1-11.
10. Zanoni, D. K., Montero, P. H., Migliacci, J. C., Shah, J. P., Wong, R. J., Ganly, I. and Patel, S. G. (2019). Survival outcomes after treatment of cancer of the oral cavity (1985–2015). *Oral Oncology*, 90, 115-121.
11. Rivera, C. (2015). Essentials of oral cancer. *International journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(9), 11884.
12. ERSOY, H. E., İpek, A., Bozdağ, L., Mollaoğlu, N. and Gültekin, S. E. (2020). On yıllık süreçte epitelial displazi tanısı almış hastaların retrospektif olarak incelenmesi. *Osmangazi Tıp Dergisi*, 42(5), 24-28.

13. Lousada-Fernandez, F., Rapado-Gonzalez, O., Lopez-Cedrun, J. L., Lopez-Lopez, R., Muinelo-Romay, L. and Suarez-Cunqueiro, M. M. (2018). Liquid biopsy in oral cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1704.
14. Taghavi, N. (2015). Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: clinical, histologic, genetic and molecular concepts. *Archives of Iranian Medicine*, 18(5), 314-319.
15. Feller, L. L., Khammissa, R. R., Kramer, B. B. and Lemmer, J. J. (2013). Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: pathobiology. *Cancer Cell International*, 13(1), 1-8.
16. Rivera, C. and Venegas, B. (2014). Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, 8(1), 7-11.
17. Warnakulasuriya, S. (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, 45(4-5), 309-316.
18. Nguyen, T. V. and Yueh, B. (2002). Weight loss predicts mortality after recurrent oral cavity and oropharyngeal carcinomas. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 95(3), 553-562.
19. Mello, F. W., Melo, G., Pasetto, J. J., Silva, C. A. B., Warnakulasuriya, S. and Rivero, E. R. C. (2019). The synergistic effect of tobacco and alcohol consumption on oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*, 23(7), 2849-2859.
20. Dhanuthai, K., Rojanawatsirivej, S., Thosaporn, W., Kintarak, S., Subarnbhesaj, A., Darling, M. and Shakib, P. A. (2018). Oral cancer: A multicenter study. *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirugia Bucal*, 23(1), e23.
21. Anwar, N., Pervez, S., Chundriger, Q., Awan, S., Moatter, T. and Ali, T. S. (2020). Oral cancer: Clinicopathological features and associated risk factors in a high risk population presenting to a major tertiary care center in Pakistan. *Plos One*, 15(8), e0236359.
22. Markopoulos, A. K. (2012). Current aspects on oral squamous cell carcinoma. *The Open Dentistry Journal*, 6(2), 126-135.
23. Mehrotra, R. and Yadav, S. (2006). Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian Journal of Cancer*, 43(2), 60.
24. Ko, Y. C., Huang, Y. L., Lee, C. H., Chen, M. J., Lin, L. M. and Tsai, C. C. (1995). Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 24(10), 450-453.
25. Mirghani, H., Amen, F., Moreau, F. and St Guily, J. L. (2015). Do high-risk human papillomaviruses cause oral cavity squamous cell carcinoma?. *Oral Oncology*, 51(3), 229-236.

26. Tanaka, T. and Ishigamori, R. (2011). Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *Journal of Oncology*, 1(3), 26-35.
27. Irimie, A. I., Ciocan, C., Gulei, D., Mehterov, N., Atanasov, A. G., Dudea, D. and Berindan-Neagoe, I. (2018). Current insights into oral cancer epigenetics. *International journal of Molecular Sciences*, 19(3), 670.
28. Lakshminarayana, S., Augustine, D., Rao, R. S., Patil, S., Awan, K. H., Venkatesiah, S. S. and Prasad, K. (2018). Molecular pathways of oral cancer that predict prognosis and survival: A systematic review. *Journal of Carcinogenesis*, 17(2), 26-35.
29. Hema, K. N., Smitha, T., Sheethal, H. S. and Mirnalini, S. A. (2017). Epigenetics in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral And Maxillofacial Pathology: JOMFP*, 21(2), 252.
30. Singh, R., Letai, A. and Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 175-193.
31. Kumar, V., Abbas, A. K. and Aster, J. C. (2017). *Robbins basic pathology e-book*. Amsterdam: Elsevier.
32. Kerr, A. R., Warnakulasuriya, S., Mighell, A. J., Dietrich, T., Nasser, M., Rimal, J. and Johnson, N. W. (2011). A systematic review of medical interventions for oral submucous fibrosis and future research opportunities. *Oral Diseases*, 17, 42-57.
33. Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2), 171.
34. Nikolettou, V., Markaki, M., Palikaras, K. and Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(12), 3448-3459.
35. Campbell, K. J. and Tait, S. W. (2018). Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biology*, 8(5), 180002.
36. Bellance, N., Lestienne, P. and Rossignol, R. (2009). Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 14(11), 4015-4034.
37. Vincent, J. L., Abraham, E., Kochanek, P., Moore, F. A. and Fink, M. P. (2011). *Textbook of critical care e-book*. Amsterdam: Elsevier, 185-206.
38. Coultas, L. and Strasser, A. (2003). The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 13(2), 115-123.
39. Letai, A. (2005). Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(10), 2648-2655.
40. Thornberry, N. A. and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381), 1312-1316.

41. Fulda, S. and Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), 4798-4811.
42. Minn, A. J., Vélez, P., Schendel, S. L., Liang, H., Muchmore, S. W., Fesik, S. W. and Thompson, C. B. (1997). Bcl-xL forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, 385(6614), 353-357.
43. Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776.
44. Adams, J. M. and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281(5381), 1322-1326.
45. Bush, J. A. and Li, G. (2003). The role of Bcl-2 family members in the progression of cutaneous melanoma. *Clinical & Experimental Metastasis*, 20(6), 531-539.
46. Igney, F. H. and Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 2(4), 277-288.
47. Opferman, J. T. and Korsmeyer, S. J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature Immunology*, 4(5), 410-415.
48. Power, C., Fanning, N. and Redmond, H. P. (2002). Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review. *Shock*, 18(3), 197-211.
49. Bauer, J. H. and Helfand, S. L. (2006). New tricks of an old molecule: lifespan regulation by p53. *Aging Cell*, 5(5), 437-440.
50. Ghobrial, I. M., Witzig, T. E. and Adjei, A. A. (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(3), 178-194.
51. Watanabe, N., Ikuta, K., Nisitani, S., Chiba, T. and Honjo, T. (2002). Activation and differentiation of autoreactive B-1 cells by interleukin 10 induce autoimmune hemolytic anemia in Fas-deficient antierythrocyte immunoglobulin transgenic mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(1), 141-146.
52. Golks, A., Brenner, D., Schmitz, I., Watzl, C., Krueger, A., Krammer, P. H. and Lavrik, I. N. (2006). The role of CAP3 in CD95 signaling: new insights into the mechanism of procaspase-8 activation. *Cell Death & Differentiation*, 13(3), 489-498.
53. Gómez-Angelats, M. and Cidlowski, J. A. (2001). Protein kinase C regulates FADD recruitment and death-inducing signaling complex formation in Fas/CD95-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 44944-44952.
54. Imtiyaz, H. Z., Zhang, Y. and Zhang, J. (2005). Structural requirements for signal-induced target binding of FADD determined by functional reconstitution of FADD deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31360-31367.
55. Sandu, C., Gavathiotis, E., Huang, T., Wegorzewska, I. and Werner, M. H. (2005). A mechanism for death receptor discrimination by death adaptors. *Journal of Biological Chemistry*, 280(36), 31974-31980.

56. Wajant, H. (2003). Death receptors. *Essays in Biochemistry*, 39, 53-71.
57. Lavrik, I., Golks, A. and Krammer, P. H. (2005). Death receptor signaling. *Journal of Cell Science*, 118(2), 265-267.
58. Klener, P., Andera, L., Klener, P., Necas, E. and Zivny, J. (2006). Cell death signalling pathways in the pathogenesis and therapy of haematologic malignancies: overview of therapeutic approaches. *Folia Biologica-Praha*-, 52(4), 119.
59. Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H. and Wallach, D. (1995). A Novel Protein That Interacts with the Death Domain of Fas/APO1 Contains a Sequence Motif Related to the Death Domain (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(14), 7795-7798.
60. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M. and Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, 81(4), 505-512.
61. Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H. and Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal*, 14(22), 5579-5588.
62. Wang, J., Chun, H. J., Wong, W., Spencer, D. M. and Lenardo, M. J. (2001). Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13884-13888.
63. Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 420-430.
64. Moubayed, S. P., Machado, R., Osorio, M., Khorsandi, A., Hernandez-Prera, J. and Urken, M. L. (2017). Metastatic squamous cell carcinoma to the superior cervical ganglion mimicking a retropharyngeal lymph node. *American Journal of Otolaryngology*, 38(6), 720-723.
65. Gharat, S. A., Momin, M. M. and Bhavsar, C. (2016). Oral squamous cell carcinoma: current treatment strategies and nanotechnology-based approaches for prevention and therapy. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 33(4), 45-65.
66. Pendleton, K. P. and Grandis, J. R. (2013). Cisplatin-based chemotherapy options for recurrent and/or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *Clinical Medicine Insights: Therapeutics*, 5, CMT-S10409.
67. Freeman, K., Connock, M., Cummins, E., Gurung, T., Taylor-Phillips, S., Saunders, M. and Sutcliffe, P. (2015). Fluorouracil plasma monitoring: systematic review and economic evaluation of the My5-FU assay for guiding dose adjustment in patients receiving fluorouracil chemotherapy by continuous infusion. *Health technology assessment (Winchester, England)*, 19(91), 1-321.
68. Chakraborty, S., Geetha, M., Sujith, K. M., Biji, M. S. and Sateeshan, B. (2014). Palliative low dose fortnightly methotrexate in oral cancers: Experience at a rural cancer centre from India. *South Asian Journal of Cancer*, 3(03), 166-170.

69. Ledwitch, K., Ogburn, R., Cox, J., Graham, R., Fritzsche, A., Gosnell, D. and Manning, T. (2013). Taxol: efficacy against oral squamous cell carcinoma. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(4), 509-521.
70. Perri, F., Scarpati, G. D. V., Caponigro, F., Ionna, F., Longo, F., Buonopane, S. and Solla, R. (2019). Management of recurrent nasopharyngeal carcinoma: current perspectives. *OncoTargets and Therapy*, 12, 1583.
71. Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R. K. and Ang, K. K. (2010). Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *The Lancet Oncology*, 11(1), 21-28.
72. Warnakulasuriya, S., Kujan, O., Aguirre-Urizar, J. M., Bagan, J. V., González-Moles, M. Á., Kerr, A. R. and Johnson, N. W. (2021). Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Diseases*, 27(8), 1862-1880.
73. Warnakulasuriya, S., Johnson, N. W. and Van der Waal, I. (2007). Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 36(10), 575-580.
74. Petti, S. (2003). Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncology*, 39(8), 770-780.
75. Mello, F. W., Miguel, A. F. P., Dutra, K. L., Porporatti, A. L., Warnakulasuriya, S., Guerra, E. N. S. and Rivero, E. R. C. (2018). Prevalence of oral potentially malignant disorders: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 47(7), 633-640.
76. Aguirre-Urizar, J. M., Lafuente-Ibáñez de Mendoza, I. and Warnakulasuriya, S. (2021). Malignant transformation of oral leukoplakia: Systematic review and meta-analysis of the last 5 years. *Oral Diseases*, 27(8), 1881-1895.
77. Arduino, P. G., Bagan, J., El-Naggar, A. K. and Carrozzo, M. (2013). Urban legends series: oral leukoplakia. *Oral Diseases*, 19(7), 642-659.
78. Warnakulasuriya, S. and Ariyawardana, A. (2016). Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 45(3), 155-166.
79. Mehanna, H. M., Rattay, T., Smith, J. and McConkey, C. C. (2009). Treatment and follow-up of oral dysplasia—a systematic review and meta-analysis. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*, 31(12), 1600-1609.
80. Warnakulasuriya, S., Reibel, J., Bouquot, J. and Dabelsteen, E. (2008). Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 37(3), 127-133.
81. Reichart, P. A. and Philipsen, H. P. (2005). Oral erythroplakia—a review. *Oral Oncology*, 41(6), 551-561.

82. Bouquot, J. E. and Ephros, H. (1995). Erythroplakia: the dangerous red mucosa. *Practical Periodontics and Aesthetic Dentistry: PPAD*, 7(6), 59-67.
83. González-Moles, M. Á., Ruiz-Avila, I., Gonzalez-Ruiz, L., Ayen, A., Gil-Montoya, J. A. and Ramos-Garcia, P. (2019). Malignant transformation risk of oral lichen planus: A systematic review and comprehensive meta-analysis. *Oral Oncology*, 96, 121-130.
84. Murti, P. R., Bhonsle, R. B., Pindborg, J. J., Daftary, D. K., Gupta, P. C. and Mehta, F. S. (1985). Malignant transformation rate in oral submucous fibrosis over a 17-year period. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 13(6), 340-341.
85. Arakeri, G., Patil, S. G., Aljabab, A. S., Lin, K. C., Merks, M. A. W., Gao, S. and Brennan, P. A. (2017). Oral submucous fibrosis: an update on pathophysiology of malignant transformation. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 46(6), 413-417.
86. Hansen, L. S., Olson, J. A. and Silverman Jr, S. (1985). Proliferative verrucous leukoplakia: A long-term study of thirty patients. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 60(3), 285-298.
87. Bagan, J. V., Jiménez-Soriano, Y., Diaz-Fernandez, J. M., Murillo-Cortés, J., Sanchis-Bielsa, J. M., Poveda-Roda, R. and Bagan, L. (2011). Malignant transformation of proliferative verrucous leukoplakia to oral squamous cell carcinoma: a series of 55 cases. *Oral Oncology*, 47(8), 732-735.
88. Neto Pimentel, D. R., Michalany, N., Alchorne, M., Abreu, M., Borra, R. C. and Weckx, L. (2006). Actinic cheilitis: histopathology and p53. *Journal of Cutaneous Pathology*, 33(8), 539-544.
89. Gomes, J. O., de Vasconcelos Carvalho, M., Fonseca, F. P., Gondak, R. O., Lopes, M. A. and Vargas, P. A. (2016). CD 1a+ and CD 83+ Langerhans cells are reduced in lower lip squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 45(6), 433-439.
90. Rastogi, V., Puri, N., Arora, S., Kaur, G., Yadav, L. and Sharma, R. (2013). Artefacts: a diagnostic dilemma—a review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 7(10), 2408.
91. Pindborg, J. J. (1977). Epidemiological studies of oral cancer. *International Dental Journal*, 27(2), 172-178.
92. Kujan, O., Oliver, R. J., Khattab, A., Roberts, S. A., Thakker, N. and Sloan, P. (2006). Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncology*, 42(10), 987-993.
93. Odell, E., Kujan, O., Warnakulasuriya, S. and Sloan, P. (2021). Oral epithelial dysplasia: Recognition, grading and clinical significance. *Oral Diseases*, 2(3), 26-35.
94. Muller, S. and Tilakaratne, W. M. (2022). Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Tumours of the Oral Cavity and Mobile Tongue. *Head and Neck Pathology*, 16(1), 54-62.

95. Yang, W. Y., Feng, L. F., Meng, X., Chen, R., Xu, W. H., Hou, J. and Zhang, L. (2020). Liquid biopsy in head and neck squamous cell carcinoma: circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 20(12), 1213-1227.
96. Amagasa, T., Yamashiro, M. and Uzawa, N. (2011). Oral premalignant lesions: from a clinical perspective. *International Journal of Clinical Oncology*, 16(1), 5-14.
97. Napier, S. S. and Speight, P. M. (2008). Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 37(1), 1-10.
98. Speight, P. M., Khurram, S. A. and Kujan, O. (2018). Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral surgery, oral medicine, oral Pathology and Oral Radiology*, 125(6), 612-627.
99. Liu, W., Shi, L. J., Wu, L., Feng, J. Q., Yang, X., Li, J. and Zhang, C. P. (2012). Oral cancer development in patients with leukoplakia—clinicopathological factors affecting outcome. *PLoS One*, 7(4), e34773.
100. Warnakulasuriya, S. (2000). Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral precancer. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 190(4), 407-409.
101. Qin, G. Z., Park, J. Y., Chen, S. Y. and Lazarus, P. (1999). A high prevalence of p53 mutations in pre-malignant oral erythroplakia. *International Journal of Cancer*, 80(3), 345-348.
102. Hittelman, W. N., Voravud, N., Shin, D. M., Lee, J. S., Ro, J. Y. and Hong, W. K. (1993). Early genetic changes during upper aerodigestive tract tumorigenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 53(S17F), 233-236.
103. Partridge, M., Emilion, G., Pateromichelakis, S., A'Hern, R., Lee, G., Phillips, E. and Langdon, J. (1999). The prognostic significance of allelic imbalance at key chromosomal loci in oral cancer. *British Journal of Cancer*, 79(11), 1821-1827.
104. Mithani, S. K., Mydlarz, W. K., Grumbine, F. L., Smith, I. M. and Califano, J. A. (2007). Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Diseases*, 13(2), 126-133.
105. Van Dyke, D. L., Worsham, M. J., Drumheller, T., Benninger, M. S., Krause, C. J., Baker, S. R. and Tilley, B. C. (1994). Recurrent cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 9(3), 192-206.
106. Epstein, J. B., Zhang, L. and Rosin, M. (2002). Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *Journal-Canadian Dental Association*, 68(10), 617-621.
107. Silverman, S. (2000). Oral lichen planus: a potentially premalignant lesion. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 58(11), 1286-1288.

108. Williams, H. K. (2000). Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Molecular Pathology*, 53(4), 165-172.
109. Sierra, J., Yoshida, T., Joazeiro, C. A. and Jones, K. A. (2006). The APC tumor suppressor counteracts β -catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes & Development*, 20(5), 586-600.
110. Klanrit, P., Sperandio, M., Brown, A. L., Shirlaw, P. J., Challacombe, S. J., Morgan, P. R. and Odell, E. W. (2007). DNA ploidy in proliferative verrucous leukoplakia. *Oral Oncology*, 43(3), 310-316.
111. Gouvêa, A. F., Santos Silva, A. R., Speight, P. M., Hunter, K., Carlos, R., Vargas, P. A. and Lopes, M. A. (2013). High incidence of DNA ploidy abnormalities and increased M cm2 expression may predict malignant change in oral proliferative verrucous leukoplakia. *Histopathology*, 62(4), 551-562.
112. Okoturo, E. M., Risk, J. M., Schache, A. G., Shaw, R. J. and Boyd, M. T. (2018). Molecular pathogenesis of proliferative verrucous leukoplakia: a systematic review. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 56(9), 780-785.
113. Shin, D. M., Ro, J. Y., Hong, W. K. and Hittelman, W. N. (1994). Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Research*, 54(12), 3153-3159.
114. Christensen, M. E. (1998). The EGF receptor system in head and neck carcinomas and normal tissues. Immunohistochemical and quantitative studies. *Danish Medical Bulletin*, 45(2), 121-134.
115. Bergler, W., Bier, H. and Ganzer, U. (1989). The expression of epidermal growth factor receptors in the oral mucosa of patients with oral cancer. *Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 246(3), 121-125.
116. Thomas, G. R., Nadiminti, H. and Regalado, J. (2005). Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Experimental Pathology*, 86(6), 347-363.
117. Srinivasan, M. and Jewell, S. D. (2001). Evaluation of TGF- α and EGFR expression in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis by quantitative immunohistochemistry. *Oncology*, 61(4), 284-292.
118. Garnis, C., Coe, B. P., Ishkanian, A., Zhang, L., Rosin, M. P. and Lam, W. L. (2004). Novel regions of amplification on 8q distinct from the MYC locus and frequently altered in oral dysplasia and cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 39(1), 93-98.
119. Rousseau, A., Lim, M. S., Lin, Z. and Jordan, R. C. K. (2001). Frequent cyclin D1 gene amplification and protein overexpression in oral epithelial dysplasias. *Oral Oncology*, 37(3), 268-275.
120. Kövesi, G. and Szende, B. (2006). Prognostic value of cyclin D1, p27, and p63 in oral leukoplakia. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 35(5), 274-277.

121. Pitiyage, G., Tilakaratne, W. M., Tavassoli, M. and Warnakulasuriya, S. (2009). Molecular markers in oral epithelial dysplasia. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 38(10), 737-752.
122. Lane, D. P., Lu, X., Hupp, T. and Hall, P. A. (1994). The role of the p53 protein in the apoptotic response. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 345(1313), 277-280.
123. Slootweg, P. J., Koole, R. and Hordijk, G. J. (1994). The presence of p53 protein in relation to Ki-67 as cellular proliferation marker in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent dysplastic mucosa. *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology*, 30(2), 138-141.
124. Warnakulasuriya, K. A. A. S. and Johnson, N. W. (1992). Expression of p53 mutant nuclear phosphoprotein in oral carcinoma and potentially malignant oral lesions. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 21(9), 404-408.
125. Califano, J., Van Der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S. and Sidransky, D. (1996). Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Research*, 56(11), 2488-2492.
126. Niwa, S., Ueno, S. and Shirasu, R. (2001). Alteration of pRb expression in the development of rat tongue carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Oral Oncology*, 37(7), 579-585.
127. Aaltonen, K. E., Novosadová, V., Bendahl, P. O., Graffman, C., Larsson, A. M. and Rydén, L. (2017). Molecular characterization of circulating tumor cells from patients with metastatic breast cancer reflects evolutionary changes in gene expression under the pressure of systemic therapy. *Oncotarget*, 8(28), 45544.
128. Hong, X., Sullivan, R. J., Kalinich, M., Kwan, T. T., Giobbie-Hurder, A., Pan, S. and Haber, D. A. (2018). Molecular signatures of circulating melanoma cells for monitoring early response to immune checkpoint therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(10), 2467-2472.
129. Shoda, K., Ichikawa, D., Fujita, Y., Masuda, K., Hiramoto, H., Hamada, J. and Otsuji, E. (2017). Monitoring the HER2 copy number status in circulating tumor DNA by droplet digital PCR in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer*, 20(1), 126-135.
130. Xie, F., Li, P., Gong, J., Tan, H. and Ma, J. (2018). Urinary cell-free DNA as a prognostic marker for KRAS-positive advanced-stage NSCLC. *Clinical and Translational Oncology*, 20(5), 591-598.
131. Qi, L. N., Xiang, B. D., Wu, F. X., Ye, J. Z., Zhong, J. H., Wang, Y. Y. and Li, L. Q. (2018). Circulating Tumor Cells Undergoing EMT Provide a Metric for Diagnosis and Prognosis of Patients with Hepatocellular CarcinomaCTCs in Patients with HCC. *Cancer Research*, 78(16), 4731-4744.

132. Vidal Insua, Y., De La Cámara, J., Brozos Vázquez, E., Fernández, A., Vázquez Rivera, F., Villanueva Silva, M. J. and Alonso-Alconada, L. (2017). Predicting outcome and therapy response in mCRC patients using an indirect method for CTCs detection by a multigene expression panel: a multicentric prospective validation study. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1265.
133. Keup, C., Mach, P., Aktas, B., Tewes, M., Kolberg, H. C., Hauch, S. and Kasimir-Bauer, S. (2018). RNA profiles of circulating tumor cells and extracellular vesicles for therapy stratification of metastatic breast cancer patients. *Clinical Chemistry*, 64(7), 1054-1062.
134. Gorges, T. M., Riethdorf, S., von Ahsen, O., Nastały, P., Röck, K., Boede, M. and Pantel, K. (2016). Heterogeneous PSMA expression on circulating tumor cells-a potential basis for stratification and monitoring of PSMA-directed therapies in prostate cancer. *Oncotarget*, 7(23), 34930.
135. He, J., Tan, W. and Ma, J. (2017). Circulating tumor cells and DNA for real-time EGFR detection and monitoring of non-small-cell lung cancer. *Future Oncology*, 13(9), 787-797.
136. Guibert, N., Delaunay, M., Lusque, A., Boubekur, N., Rouquette, I., Clermont, E. and Pradines, A. (2018). PD-L1 expression in circulating tumor cells of advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab. *Lung Cancer*, 120, 108-112.
137. Gao, W., Huang, T., Yuan, H., Yang, J., Jin, Q., Jia, C. and Zhao, J. (2018). Highly sensitive detection and mutational analysis of lung cancer circulating tumor cells using integrated combined immunomagnetic beads with a droplet digital PCR chip. *Talanta*, 185, 229-236.
138. Mastoraki, S., Strati, A., Tzanikou, E., Chimonidou, M., Politaki, E., Voutsina, A. and Lianidou, E. (2018). ESR1 Methylation: A Liquid Biopsy–Based Epigenetic Assay for the Follow-up of Patients with Metastatic Breast Cancer Receiving Endocrine Treatment. *Liquid Biopsy: ESR1 Methylation in CTCs and Paired ctDNA. Clinical Cancer Research*, 24(6), 1500-1510.
139. Mazumder, S., Datta, S., Ray, J. G., Chaudhuri, K. and Chatterjee, R. (2019). Liquid biopsy: miRNA as a potential biomarker in oral cancer. *Cancer Epidemiology*, 58, 137-145.
140. Liu, J. and Duan, Y. (2012). Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncology*, 48(7), 569-577.
141. Fejzullahu, A. and Güney, A. H. M. E. T. (2020). Kanser Yönetiminde Yeni Yöntemler: Likid Biyopsi Tekniği ve Biyobelirteçleri. *Türkiye Klinikleri İç Hastalıkları Dergisi*, 5(2).
142. Mandel, P. and Metais, P. (1948). Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales*, 142(3-4), 241–243.

143. Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C. and Beljanski, M. (1989). Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*, 46(5), 318-322.
144. Vasioukhin, V., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C. and Stroun, M. (1994). Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *British Journal of Haematology*, 86(4), 774-779.
145. Nawroz, H., Koch, W., Anker, P., Stroun, M. and Sidransky, D. (1996). Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nature Medicine*, 2(9), 1035-1037.
146. Mori, T., O'Day, S. J., Umetani, N., Martinez, S. R., Kitago, M., Koyanagi, K. and Hoon, D. S. (2005). Predictive utility of circulating methylated DNA in serum of melanoma patients receiving biochemotherapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(36), 9351.
147. Eccles, S. A. and Welch, D. R. (2007). Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *The Lancet*, 369(9574), 1742-1757.
148. Alix-Panabières, C., Riethdorf, S. and Pantel, K. (2008). Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clinical Cancer Research*, 14(16), 5013-5021.
149. Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. and Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*, 11(6), 426-437.
150. Crowley, E., Di Nicolantonio, F., Loupakis, F. and Bardelli, A. (2013). Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature reviews Clinical oncology*, 10(8), 472-484.
151. Elshimali, Y. I., Khaddour, H., Sarkissyan, M., Wu, Y. and Vadgama, J. V. (2013). The clinical utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18925-18958.
152. Gingras, I., Salgado, R. and Ignatiadis, M. (2015). Liquid biopsy: will it be the 'magic tool' for monitoring response of solid tumors to anticancer therapies?. *Current Opinion in Oncology*, 27(6), 560-567.
153. Qin, Z., Ljubimov, V. A., Zhou, C., Tong, Y. and Liang, J. (2016). Cell-free circulating tumor DNA in cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 35(1), 1-9.
154. Bennett, C. W., Berchem, G., Kim, Y. J. and El-Khoury, V. (2016). Cell-free DNA and next-generation sequencing in the service of personalized medicine for lung cancer. *Oncotarget*, 7(43), 71013.
155. Vendrell, J. A., Taviaux, S., Béganton, B., Godreuil, S., Audran, P., Grand, D. and Solassol, J. (2017). Detection of known and novel ALK fusion transcripts in lung cancer patients using next-generation sequencing approaches. *Scientific Reports*, 7(1), 1-11.

156. Caswell, D. R. and Swanton, C. (2017). The role of tumour heterogeneity and clonal cooperativity in metastasis, immune evasion and clinical outcome. *BMC Medicine*, 15(1), 1-9.
157. Bernard, V., Kim, D. U., San Lucas, F. A., Castillo, J., Allenson, K., Mulu, F. C. and Alvarez, H. A. (2019). Circulating nucleic acids are associated with outcomes of patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 156(1), 108-118.
158. Cui, Y., Kim, H. S., Cho, E. S., Han, D., Park, J. A., Park, J. Y. and Cha, Y. H. (2021). Longitudinal detection of somatic mutations in saliva and plasma for the surveillance of oral squamous cell carcinomas. *PloS One*, 16(9), e0256979.
159. Chu, D. and Park, B. H. (2017). Liquid biopsy: unlocking the potentials of cell-free DNA. *Virchows Archiv*, 471(2), 147-154.
160. Mattox, A. K., Bettegowda, C., Zhou, S., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (2019). Applications of liquid biopsies for cancer. *Science Translational medicine*, 11(507), 26-45.
161. Balaji, S. A., Shanmugam, A., Chougule, A., Sridharan, S., Prabhash, K., Arya, A. and Gupta, V. (2018). Analysis of solid tumor mutation profiles in liquid biopsy. *Cancer Medicine*, 7(11), 5439-5447.
162. Schwaederle, M., Husain, H., Fanta, P. T., Piccioni, D. E., Kesari, S., Schwab, R. B. and Kurzrock, R. (2016). Detection rate of actionable mutations in diverse cancers using a biopsy-free (blood) circulating tumor cell DNA assay. *Oncotarget*, 7(9), 9707-9717.
163. Bohers, E., Viailly, P. J., Becker, S., Marchand, V., Ruminy, P., Maingonnat, C. and Jardin, F. (2018). Non-invasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by cell-free DNA high-throughput targeted sequencing: analysis of a prospective cohort. *Blood Cancer Journal*, 8(8), 1-13.
164. Cheng, T. H., Jiang, P., Teoh, J. Y., Heung, M. M., Tam, J. C., Sun, X. and Lo, Y. D. (2019). Noninvasive detection of bladder cancer by shallow-depth genome-wide bisulfite sequencing of urinary cell-free DNA for methylation and copy number profiling. *Clinical Chemistry*, 65(7), 927-936.
165. Endzeliņš, E., Berger, A., Melne, V., Bajo-Santos, C., Soboļevska, K., Ābols, A. and Linē, A. (2017). Detection of circulating miRNAs: comparative analysis of extracellular vesicle-incorporated miRNAs and cell-free miRNAs in whole plasma of prostate cancer patients. *BMC Cancer*, 17(1), 1-13.
166. Malentacchi, F., Vinci, S., Della Melina, A., Kuncova, J., Villari, D., Nesi, G. and Pinzani, P. (2016). Urinary carbonic anhydrase IX splicing messenger RNA variants in urogenital cancers. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (pp. 292-e9). Amsterdam: Elsevier.
167. Malczewska, A., Oberg, K., Bodei, L., Aslanian, H., Lewczuk, A., Filosso, P. L. and Ćwikła, J. (2019). NETest liquid biopsy is diagnostic of lung neuroendocrine tumors and identifies progressive disease. *Neuroendocrinology*, 108(3), 219-231.

168. Shoda, K., Masuda, K., Ichikawa, D., Arita, T., Miyakami, Y., Watanabe, M. and Otsuji, E. (2015). HER2 amplification detected in the circulating DNA of patients with gastric cancer: a retrospective pilot study. *Gastric Cancer*, 18(4), 698-710.
169. Martins, I., Ribeiro, I. P., Jorge, J., Gonçalves, A. C., Sarmento-Ribeiro, A. B., Melo, J. B. and Carreira, I. M. (2021). Liquid biopsies: applications for cancer diagnosis and monitoring. *Genes*, 12(3), 349.
170. Choi, J. J., Reich III, C. F. and Pisetsky, D. S. (2005). The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology*, 115(1), 55-62.
171. Stroun, M., Maurice, P., Vasioukhin, V., Lyautey, J., Lederrey, C., Lefort, F. and Anker, P. (2000). The origin and mechanism of circulating DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 906(1), 161-168.
172. Gahan, P. B. and Swaminathan, R. (2008). Circulating nucleic acids in plasma and serum: recent developments. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137(1), 1-6.
173. Schwarzenbach, H., Alix-Panabières, C., Müller, I., Letang, N., Vendrell, J. P., Rebillard, X. and Pantel, K. (2009). Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(3), 1032-1038.
174. Schwarzenbach, H., Chun, F. K. H., Lange, I., Carpenter, S., Gottberg, M., Erbersdobler, A. and Pantel, K. (2007). Detection of tumor-specific DNA in blood and bone marrow plasma from patients with prostate cancer. *International Journal of Cancer*, 120(7), 1465-1471.
175. Wimberger, P., Roth, C., Pantel, K., Kasimir-Bauer, S., Kimmig, R. and Schwarzenbach, H. (2011). Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients. *International Journal of Cancer*, 128(11), 2572-2580.
176. Boddy, J. L., Gal, S., Malone, P. R., Harris, A. L. and Wainscoat, J. S. (2005). Prospective study of quantitation of plasma DNA levels in the diagnosis of malignant versus benign prostate disease. *Clinical Cancer Research*, 11(4), 1394-1399.
177. Kamat, A. A., Baldwin, M., Urbauer, D., Dang, D., Han, L. Y., Godwin, A. and Sood, A. K. (2010). Plasma cell-free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker. *Cancer*, 116(8), 1918-1925.
178. Allen, D., Butt, A., Cahill, D., Wheeler, M., Popert, R. and Swaminathan, R. (2004). Role of cell-free plasma DNA as a diagnostic marker for prostate cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1022(1), 76-80.
179. Schwarzenbach, H., Stoecklacher, J., Pantel, K. and Goekkurt, E. (2008). Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137(1), 190-196.

180. Chun, F. K. H., Mueller, I., Lange, I., Friedrich, M. G., Erbersdobler, A., Karakiewicz, P. I. and Schwarzenbach, H. (2006). Circulating tumour-associated plasma DNA represents an independent and informative predictor of prostate cancer. *BJU International*, 98(3), 544-548.
181. Sunami, E., Vu, A. T., Nguyen, S. L., Giuliano, A. E. and Hoon, D. S. (2008). Quantification of LINE1 in circulating DNA as a molecular biomarker of breast cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137(1), 171-174.
182. Catarino, R., Ferreira, M. M., Rodrigues, H., Coelho, A., Nogal, A., Sousa, A. and Medeiros, R. (2008). Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *DNA and Cell Biology*, 27(8), 415-421.
183. Mehra, N., Penning, M., Maas, J., van Daal, N., Giles, R. H. and Voest, E. E. (2007). Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 13(2), 421-426.
184. Ellinger, J., Albers, P., Müller, S. C., Von Ruecker, A. and Bastian, P. J. (2009). Circulating mitochondrial DNA in the serum of patients with testicular germ cell cancer as a novel noninvasive diagnostic biomarker. *BJU International*, 104(1), 48-52.
185. Schulz, W. A., Steinhoff, C. and Florl, A. R. (2006). Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *DNA Methylation: Development, Genetic Disease and Cancer*, 3(2), 211-250.
186. Cedar, H. and Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics*, 10(5), 295-304.
187. Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215-233.
188. Kosaka, N., Iguchi, H. and Ochiya, T. (2010). Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Science*, 101(10), 2087-2092.
189. Asaga, S., Kuo, C., Nguyen, T., Terpenning, M., Giuliano, A. E. and Hoon, D. S. (2011). Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. *Clinical Chemistry*, 57(1), 84-91.
190. Van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A. and Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 676-705.
191. Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S. and Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology*, 113(1), 1-11.
192. Tkach, M. and Théry, C. (2016). Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell*, 164(6), 1226-1232.

193. Hessvik, N. P. and Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(2), 193-208.
194. Colombo, M., Raposo, G. and Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 255-289.
195. Teng, F. and Fussenegger, M. (2021). Shedding light on extracellular vesicle biogenesis and bioengineering. *Advanced Science*, 8(1), 2003505.
196. Kourembanas, S. (2015). Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. *Annual Review of Physiology*, 77, 13-27.
197. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J. and Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654-659.
198. Ekström, K., Valadi, H., Sjöstrand, M., Malmhäll, C., Bossios, A., Eldh, M. and Lötvall, J. (2012). Characterization of mRNA and microRNA in human mast cell-derived exosomes and their transfer to other mast cells and blood CD34 progenitor cells. *Journal of Extracellular Vesicles*, 1(1), 18389.
199. Momen-Heravi, F., Getting, S. J. and Moschos, S. A. (2018). Extracellular vesicles and their nucleic acids for biomarker discovery. *Pharmacology & Therapeutics*, 192, 170-187.
200. Willms, A., Müller, C., Julich, H., Klein, N., Schwab, R., Güsken, C. and Kornek, M. (2016). Tumour-associated circulating microparticles: A novel liquid biopsy tool for screening and therapy monitoring of colorectal carcinoma and other epithelial neoplasia. *Oncotarget*, 7(21), 30867.
201. Ogle, L. F., Orr, J. G., Willoughby, C. E., Hutton, C., McPherson, S., Plummer, R. and Reeves, H. L. (2016). Imagestream detection and characterisation of circulating tumour cells—A liquid biopsy for hepatocellular carcinoma?. *Journal of Hepatology*, 65(2), 305-313.
202. von Felden, J., Garcia-Lezana, T., Schulze, K., Losic, B. and Villanueva, A. (2020). Liquid biopsy in the clinical management of hepatocellular carcinoma. *Gut*, 69(11), 2025-2034.
203. Ou, S. H. I., Nagasaka, M. and Zhu, V. W. (2018). Liquid biopsy to identify actionable genomic alterations. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 38, 978-997.
204. Roy, D. and Tiirikainen, M. (2020). Diagnostic power of DNA methylation classifiers for early detection of cancer. *Trends in Cancer*, 6(2), 78-81.
205. Zhou, B., Xu, K., Zheng, X., Chen, T., Wang, J., Song, Y. and Zheng, S. (2020). Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1-14.

206. Wei, J. A., Han, L., Lu, C. J., Zhao, R. Z., Sun, J., Lu, Y. and Lin, H. J. (2016). Formula PSORI-CM01 eliminates psoriasis by inhibiting the expression of keratinocyte cyclin B2. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1-10.
207. Silver, N., Cotroneo, E., Proctor, G., Osailan, S., Paterson, K. L. and Carpenter, G. H. (2008). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in the adult rat submandibular gland under normal, inflamed, atrophic and regenerative states. *BMC Molecular Biology*, 9(1), 1-15.
208. Wang, W. K., Chen, S. Y., Liu, I. J., Chen, Y. C., Chen, H. L., Yang, C. F. and Chang, S. C. (2004). Detection of SARS-associated coronavirus in throat wash and saliva in early diagnosis. *Emerging Infectious Diseases*, 10(7), 1213.
209. Nie, K., Jia, Y. and Zhang, X. (2015). Cell-free circulating tumor DNA in plasma/serum of non-small cell lung cancer. *Tumor Biology*, 36(1), 7-19.
210. Kaufman, E. and Lamster, I. B. (2002). The diagnostic applications of saliva—a review. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(2), 197-212.
211. Lee, Y. H. and Wong, D. T. (2009). Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *American Journal of Dentistry*, 22(4), 241.
212. Chiappin, S., Antonelli, G., Gatti, R. and Elio, F. (2007). Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*, 383(1-2), 30-40.
213. Mese, H. and Matsuo, R. (2007). Salivary secretion, taste and hyposalivation. *Journal of Oral Rehabilitation*, 34(10), 711-723.
214. Hicks, J., Garcia-Godoy, F. and Flaitz, C. (2004). Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 28(1), 47-52.
215. García-Godoy, F. and Hicks, M. J. (2008). Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *The Journal of the American Dental Association*, 139, 25S-34S.
216. Amerongen, A. N. and Veerman, E. C. I. (2002). Saliva—the defender of the oral cavity. *Oral Diseases*, 8(1), 12-22.
217. Jankowska, A. K., Waszkiel, D., Kobus, A. and Zwierz, K. (2007). Saliva as a main component of oral cavity ecosystem. Part II. Defense mechanisms. *Wiadomosci Lekarskie*, 60(5-6), 253-257.
218. Wainwright, W. W. (1934). Human saliva: ii. A technical procedure for calcium analysis. *Journal of Dental Research*, 14(6), 425-434.
219. Michishige, F., Kanno, K., Yoshinaga, S., Hinode, D., Takehisa, Y. and Yasuoka, S. (2006). Effect of saliva collection method on the concentration of protein components in saliva. *The Journal of Medical Investigation*, 53(1, 2), 140-146.

220. Khurshid, Z., Zohaib, S., Najeeb, S., Zafar, M. S., Slowey, P. D. and Almas, K. (2016). Human saliva collection devices for proteomics: an update. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 846.
221. Bryzgunova, O. E., Skvortsova, T. E., Kolesnikova, E. V., Starikov, A. V., Rykova, E. Y., Vlassov, V. V. and Laktionov, P. P. (2006). Isolation and comparative study of cell-free nucleic acids from human urine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1075(1), 334-340.
222. Normanno, N., Cervantes, A., Ciardiello, F., De Luca, A. and Pinto, C. (2018). The liquid biopsy in the management of colorectal cancer patients: Current applications and future scenarios. *Cancer Treatment Reviews*, 70, 1-8.
223. Togneri, F. S., Ward, D. G., Foster, J. M., Devall, A. J., Wojtowicz, P., Alyas, S. and Bryan, R. T. (2016). Genomic complexity of urothelial bladder cancer revealed in urinary cfDNA. *European Journal of Human Genetics*, 24(8), 1167-1174.
224. Mischak, H., Delles, C., Vlahou, A. and Vanholder, R. (2015). Proteomic biomarkers in kidney disease: issues in development and implementation. *Nature Reviews Nephrology*, 11(4), 221-232.
225. Rzhevskiy, A. S., Razavi Bazaz, S., Ding, L., Kapitannikova, A., Sayyadi, N., Campbell, D. and Zvyagin, A. V. (2019). Rapid and label-free isolation of tumour cells from the urine of patients with localised prostate cancer using inertial microfluidics. *Cancers*, 12(1), 81.
226. Stewart, C. M., Kothari, P. D., Mouliere, F., Mair, R., Somnay, S., Benayed, R. and Tsui, D. W. (2018). The value of cell-free DNA for molecular pathology. *The Journal of pathology*, 244(5), 616-627.
227. Segal, M. B. (1993). Extracellular and cerebrospinal fluids. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 16(4), 617-638.
228. Huang, W. T., Lu, N. M., Hsu, W. Y., Chang, S. E., Atkins, A., Mei, R. and Javey, M. (2018). CSF-ctDNA SMSEQ analysis to tailor the treatment of a patient with brain metastases: a case report. *Case Reports in Oncology*, 11(1), 68-74.
229. Henry, N. L. and Hayes, D. F. (2012). Cancer biomarkers. *Molecular oncology*, 6(2), 140-146.
230. Internet: Joshi, G., R. Kaur, and H. Kaur. (2016). *Biomarkers in cancer*. Web: <https://www.semanticscholar.org/paper/Biomarkers-in-cancer-Joshi-Kaur/43729b7aec647c2825391f4459e9a1fef424d45f>, Son Erişim tarihi: 06/07/2022.
231. Baylin, S. B. and Ohm, J. E. (2006). Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanism for early oncogenic pathway addiction?. *Nature Reviews Cancer*, 6(2), 107-116.
232. Weissleder, R. and Ntziachristos, V. (2003). Shedding light onto live molecular targets. *Nature Medicine*, 9(1), 123-128.
233. Sidransky, D. (2002). Emerging molecular markers of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2(3), 210-219.

234. Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10(8), 789-799.
235. Bhatt, A. N., Mathur, R., Farooque, A., Verma, A. and Dwarakanath, B. S. (2010). Cancer biomarkers-current perspectives. *Indian Journal of Medical Research*, 132(2), 129-149.
236. Hoey, C. and Liu, S. K. (2019). Circulating blood miRNAs for prostate cancer risk stratification: miRroring the underlying tumor biology with liquid biopsies. *Research and Reports in Urology*, 11, 29.
237. Lin, Y., Cao, H., Tian, Y., Yang, X., Zhou, C. and Zhang, Q. (2018). miR-24-3p stimulates migration, invasion and proliferation of prostate cancer cells by targeting suppressor of cytokine signaling 6. *International Journal of Clinical And Experimental Pathology*, 11(3), 1803.
238. Prigol, A. N., Rode, M. P., Silva, A. H., Cisilotto, J. and Creczynski-Pasa, T. B. (2021). Pro-angiogenic effect of PC-3 exosomes in endothelial cells in vitro. *Cellular Signalling*, 87, 110126.
239. Man, Y. G., Fu, S. W., Liu, A. J., Stojadinovic, A., Izadjoo, M. J., Chen, L. and Gardner, W. A. (2011). Aberrant expression of chromogranin A, miR-146a, and miR-146b-5p in prostate structures with focally disrupted basal cell layers: an early sign of invasion and hormone-refractory cancer?. *Cancer Genomics & Proteomics*, 8(5), 235-244.
240. Zhou, C., Chen, Y., He, X., Zheng, Z. and Xue, D. (2020). Functional implication of exosomal miR-217 and miR-23b-3p in the progression of prostate cancer. *OncoTargets and Therapy*, 13, 11595.
241. Zhao, Y., Yan, M., Yun, Y., Zhang, J., Zhang, R., Li, Y. and Jiang, H. (2017). MicroRNA-455-3p functions as a tumor suppressor by targeting eIF4E in prostate cancer. *Oncology Reports*, 37(4), 2449-2458.
242. Shen, P. F., Chen, X. Q., Liao, Y. C., Chen, N., Zhou, Q., Wei, Q. and Zeng, H. (2014). MicroRNA-494-3p targets CXCR4 to suppress the proliferation, invasion, and migration of prostate cancer. *The Prostate*, 74(7), 756-767.
243. Koh, Y., Bustos, M. A., Moon, J., Gross, R., Ramos, R. I., Ryu, S. and Hoon, D. S. (2022). Urine Cell-Free MicroRNAs in localized prostate cancer patients. *Cancers*, 14(10), 2388.
244. Forner, A., M. Reig, and J. Bruix (2018). Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 391(10127), 1301-1314.
245. Lu, W., Yang, C., Du, P., Zhang, J. L. and Zhang, J. C. (2020). Expression tendency and prognostic value of TCF21 in hepatocellular carcinoma. *Artificial Cells*, 47(1), 1466-1470.

246. Qiu, J., Pan, G. and Li, M. (2020). Decreased expression of long non-coding LOC285194 predicts tumour progression and poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Postgraduate Medical Journal*, 96(1132), 79-83.
247. Ding, Y., Yao, J., Wen, M., Liu, X., Huang, J., Zhang, M. and Zuo, J. (2022). The potential, analysis and prospect of ctDNA sequencing in hepatocellular carcinoma. *PeerJ*, 10, e13473.
248. Alimirzaie, S., Bagherzadeh, M. and Akbari, M. R. (2019). Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. *Clinical Genetics*, 95(6), 643-660.
249. Board, R. E., Wardley, A. M., Dixon, J. M., Armstrong, A. C., Howell, S., Renshaw, L. and Dive, C. (2010). Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 120(2), 461-467.
250. Beaver, J. A., Jelovac, D., Balukrishna, S., Cochran, R. L., Croessmann, S., Zabransky, D. J. and Park, B. H. (2014). Detection of cancer DNA in plasma of patients with early-stage breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 20(10), 2643-2650.
251. Maltoni, R., Casadio, V., Ravaioli, S., Foca, F., Tumedei, M. M., Salvi, S. and Bravaccini, S. (2017). Cell-free DNA detected by “liquid biopsy” as a potential prognostic biomarker in early breast cancer. *Oncotarget*, 8(10), 16642.
252. Siravegna, G., Geuna, E., Mussolin, B., Crisafulli, G., Bartolini, A., Galizia, D. and Montemurro, F. (2017). Genotyping tumour DNA in cerebrospinal fluid and plasma of a HER2-positive breast cancer patient with brain metastases. *Esmo Open*, 2(4), e000253.
253. Rothschild, S. I. (2015). Targeted therapies in non-small cell lung cancer—beyond EGFR and ALK. *Cancers*, 7(2), 930-949.
254. Lewis, D. R., Check, D. P., Caporaso, N. E., Travis, W. D. and Devesa, S. S. (2014). US lung cancer trends by histologic type. *Cancer*, 120(18), 2883-2892.
255. Yano, T., Miura, N., Takenaka, T., Haro, A., Okazaki, H., Ohba, T. and Maehara, Y. (2008). Never-smoking nonsmall cell lung cancer as a separate entity: clinicopathologic features and survival. *Cancer*, 113(5), 1012-1018.
256. Beck, K. S., Kim, T. J., Lee, K. Y., Kim, Y. K., Kang, J. H. and Han, D. H. (2019). CT-guided coaxial biopsy of malignant lung lesions: are cores from 20-gauge needle adequate for histologic diagnosis and molecular analysis?. *Journal of Thoracic Disease*, 11(3), 753.
257. Chu, X. Y., Hou, X. B., Song, W. A., Xue, Z. Q., Wang, B. and Zhang, L. B. (2011). Diagnostic values of SCC, CEA, Cyfra21-1 and NSE for lung cancer in patients with suspicious pulmonary masses: a single center analysis. *Cancer Biology & Therapy*, 11(12), 995-1000.
258. Rijavec, E., Coco, S., Genova, C., Rossi, G., Longo, L. and Grossi, F. (2019). Liquid biopsy in non-small cell lung cancer: highlights and challenges. *Cancers*, 12(1), 17.

259. Zhao, Y. L., Zhang, J. X., Yang, J. J., Wei, Y. B., Peng, J. F., Fu, C. J. and Xie, S. Y. (2022). MiR-205-5p promotes lung cancer progression and is valuable for the diagnosis of lung cancer. *Thoracic Cancer*, 13(6), 832-843.
260. Ettinger, D. S., Wood, D. E., Aggarwal, C., Aisner, D. L., Akerley, W., Bauman, J. R. and Hughes, M. (2019). NCCN guidelines insights: non-small cell lung cancer, version 1.2020: featured updates to the NCCN guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 17(12), 1464-1472.
261. Nikitakis, N. G., Pentenero, M., Georgaki, M., Poh, C. F., Peterson, D. E., Edwards, P. and Sauk, J. J. (2018). Molecular markers associated with development and progression of potentially premalignant oral epithelial lesions: Current knowledge and future implications. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 125(6), 650-669.
262. Brouns, E., Bloemena, E., Belien, J. A. M., Broeckaert, M. A. M., Aartman, I. H. A. and Van der Waal, I. (2012). DNA ploidy measurement in oral leukoplakia: different results between flow and image cytometry. *Oral Oncology*, 48(7), 636-640.
263. Bremmer, J. F., Brakenhoff, R. H., Broeckaert, M. A., Beliën, J. A., Leemans, C. R., Bloemena, E. and Braakhuis, B. J. (2011). Prognostic value of DNA ploidy status in patients with oral leukoplakia. *Oral Oncology*, 47(10), 956-960.
264. Seoane, J., Bascones, A., Asenjo, J. A., Garcia-Pola, M. and Varela-Centelles, P. I. (1998). Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in oral leukoplakia. *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences*, 23(2), 136-140.
265. Giaretti, W., Pentenero, M., Gandolfo, S. and Castagnola, P. (2012). Chromosomal instability, aneuploidy and routine high-resolution DNA content analysis in oral cancer risk evaluation. *Future Oncology*, 8(10), 1257-1271.
266. Giaretti, W., Monteghirfo, S., Pentenero, M., Gandolfo, S., Malacarne, D. and Castagnola, P. (2013). Chromosomal instability, DNA index, dysplasia, and subsite in oral premalignancy as intermediate endpoints of risk of cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 22(6), 1133-1141.
267. Pentenero, M., Giaretti, W., Navone, R., Demurtas, A., Rostan, I., Bertolusso, G. and Gandolfo, S. (2009). DNA aneuploidy and dysplasia in oral potentially malignant disorders: association with cigarette smoking and site. *Oral Oncology*, 45(10), 887-890.
268. Mao, L., Lee, J. S., Fan, Y. H., Ro, J. Y., Batsakis, J. G., Lippman, S. and Hong, W. K. (1996). Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nature Medicine*, 2(6), 682-685.
269. Lingen, M. W., Pinto, A., Mendes, R. A., Franchini, R., Czerninski, R., Tilakaratne, W. M. and Woo, S. B. (2011). Genetics/epigenetics of oral premalignancy: current status and future research. *Oral Diseases*, 17, 7-22.

270. Nasser, W., Flechtenmacher, C., Holzinger, D., Hofele, C. and Bosch, F. X. (2011). Aberrant expression of p53, p16INK4a and Ki-67 as basic biomarker for malignant progression of oral leukoplakias. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 40(8), 629-635.
271. Maheshwari, V., Sharma, S. C., Narula, V., Verma, S., Jain, A. and Alam, K. (2013). Prognostic and predictive impact of Ki-67 in premalignant and malignant squamous cell lesions of oral cavity. *International Journal of Head and Neck Surgery*, 4(2), 61-5.
272. Mallick, S., Agarwal, J., Kannan, S., Pawar, S., Kane, S. and Teni, T. (2010). PCNA and anti-apoptotic Mcl-1 proteins predict disease-free survival in oral cancer patients treated with definitive radiotherapy. *Oral Oncology*, 46(9), 688-693.
273. Torres-Rendon, A., Roy, S., Craig, G. T. and Speight, P. M. (2009). Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas. *British Journal of Cancer*, 100(7), 1128-1134.
274. Perez-Ordóñez, B., Beauchemin, M. and Jordan, R. C. K. (2006). Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Clinical Pathology*, 59(5), 445-453.
275. Oh, Y. and Mao, L. (1997). Biomarkers in head and neck carcinoma. *Current Opinion in Oncology*, 9(3), 247-256.
276. Denaro, N., Lo Nigro, C., Natoli, G., Russi, E. G., Adamo, V. and Merlano, M. C. (2011). The role of p53 and MDM2 in head and neck cancer. *International Scholarly Research Notices*, 3(3), 45-85.
277. Lothaire, P., de Azambuja, E., Dequanter, D., Lalami, Y., Sotiriou, C., Andry, G. and Awada, A. (2006). Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*, 28(3), 256-269.
278. Agarwal, S., Mathur, M., Srivastava, A. and Ralhan, R. (1999). MDM2/p53 co-expression in oral premalignant and malignant lesions: potential prognostic implications. *Oral Oncology*, 35(2), 209-216.
279. Uchida, C. (2016). Roles of pRB in the regulation of nucleosome and chromatin structures. *Biomed Research International*, 3(2), 26-36.
280. De Oliveira, M. G., Ramalho, L. M. P., Gaiao, L., Pozza, D. H. and De Mello, R. A. (2012). Retinoblastoma and p53 protein expression in pre-malignant oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, 6(1), 163-166.
281. Lo Muzio, L., Pannone, G., Leonardi, R., Staibano, S., Mignogna, M. D., De Rosa, G. and Altieri, D. C. (2003). Survivin, a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa. *Journal of Dental Research*, 82(11), 923-928.

282. Xie, S., Xu, H., Shan, X., Liu, B., Wang, K. and Cai, Z. (2015). Clinicopathological and prognostic significance of survivin expression in patients with oral squamous cell carcinoma: evidence from a meta-analysis. *PloS One*, 10(2), e0116517.
283. Dorji, T., Monti, V., Fellegara, G., Gabba, S., Grazioli, V., Repetti, E. and Foschini, M. P. (2015). Gain of hTERC: a genetic marker of malignancy in oral potentially malignant lesions. *Human Pathology*, 46(9), 1275-1281.
284. Hopman, A. H. N., Theelen, W., Hommelberg, P. P. H., Kamps, M. A. F., Herrington, C. S., Morrison, L. E. and Ramaekers, F. C. S. (2006). Genomic integration of oncogenic HPV and gain of the human telomerase gene TERC at 3q26 are strongly associated events in the progression of uterine cervical dysplasia to invasive cancer. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 210(4), 412-419.
285. Kim, H. R., Christensen, R., Park, N. H., Sapp, P., Kang, M. K. and Park, N. H. (2001). Elevated expression of hTERT is associated with dysplastic cell transformation during human oral carcinogenesis in situ. *Clinical Cancer Research*, 7(10), 3079-3086.
286. Gandolfo, M., Keszler, A., Lanfranchi, H. and Itoiz, M. E. (2011). Increased subepithelial vascularization and VEGF expression reveal potentially malignant changes in human oral mucosa lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 111(4), 486-493.
287. Astekar, M., Joshi, A., Ramesh, G. and Metgud, R. (2012). Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in oral tumorigenesis. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 16(1), 22.
288. Thiem, D. G., Schneider, S., Venkatraman, N. T., Kumar, V. V., Brieger, J., Frerich, B. and Kämmerer, P. W. (2017). Semiquantifiable angiogenesis parameters in association with the malignant transformation of oral leukoplakia. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 46(9), 710-716.
289. Michailidou, E. Z., Markopoulos, A. K. and Antoniadis, D. Z. (2012). VEGF expression from human dysplastic or malignant oral epithelium may be related to mast cell density and the subsequent angiogenetic phenomena. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 41(12), 1467-1473.
290. von Zeidler, S. V., de Souza Botelho, T., Mendonça, E. F. and Batista, A. C. (2014). E-cadherin as a potential biomarker of malignant transformation in oral leukoplakia: a retrospective cohort study. *BMC Cancer*, 14(1), 1-7.
291. González-Moles, M. A., Bravo, M., Ruiz-Ávila, I., Esteban, F., Bascones-Martínez, A. and González-Moles, S. (2004). Adhesion molecule CD44 expression in non-tumour epithelium adjacent to tongue cancer. *Oral Oncology*, 40(3), 281-286.
292. Godge, P. Y. and Poonja, L. S. (2011). Quantitative assessment of expression of cell adhesion molecule (CD44) splice variants: CD44 standard (CD44s) and v5, v6 isoforms in oral leukoplakias: an immunohistochemical study. *Indian Journal of Dental Research*, 22(3), 493.

293. Rautava, J., Soukka, T., Inki, P., Leimola-Virtanen, R., Saloniemi, I., Happonen, R. P. and Heikinheimo, K. (2003). CD44v6 in developing, dysplastic and malignant oral epithelia. *Oral Oncology*, 39(4), 373-379.
294. Vilen, S. T., Salo, T., Sorsa, T. and Nyberg, P. (2013). Fluctuating roles of matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *The Scientific World Journal*, 6(2), 85-92.
295. Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 200(4), 448-464.
296. Kosunen, A., Pirinen, R., Ropponen, K., Pukkila, M., Kellokoski, J., Virtaniemi, J. and Kosma, V. M. (2007). CD44 expression and its relationship with MMP-9, clinicopathological factors and survival in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 43(1), 51-59.
297. Katayama, A., Bandoh, N., Kishibe, K., Takahara, M., Ogino, T., Nonaka, S. and Harabuchi, Y. (2004). Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clinical Cancer Research*, 10(2), 634-640.
298. Jordan, R. C., Macabeo-Ong, M., Shiboski, C. H., Dekker, N., Ginzinger, D. G., Wong, D. T. and Schmidt, B. L. (2004). Overexpression of matrix metalloproteinase-1 and-9 mRNA is associated with progression of oral dysplasia to cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(19), 6460-6465.
299. Dursun, P., Yuce, K. U. N. T. E. R., Usubutun, A. and Ayhan, A. (2007). Cyclooxygenase-2 expression in cervical intraepithelial neoplasia III and squamous cell cervical carcinoma, and its correlation with clinicopathologic variables. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 17(1).
300. Rizzo, M. T. (2011). Cyclooxygenase-2 in oncogenesis. *Clinica Chimica Acta*, 412(9-10), 671-687.
301. Cortés-Ramírez, D. A., Rodríguez-Tojo, M. J., Gainza-Cirauqui, M. L., Martínez-Conde, R. and Aguirre-Urizar, J. M. (2010). Overexpression of cyclooxygenase-2 as a biomarker in different subtypes of the oral lichenoid disease. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 110(6), 738-743.
302. Nankivell, P., Williams, H., McConkey, C., Webster, K., High, A., MacLennan, K. and Mehanna, H. (2013). Tetraspanins CD9 and CD151, epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 expression predict malignant progression in oral epithelial dysplasia. *British Journal of Cancer*, 109(11), 2864-2874.
303. Taoudi Benchekroun, M., Saintigny, P., Thomas, S. M., El-Naggat, A. K., Papadimitrakopoulou, V., Ren, H. and Mao, L. (2010). Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in the risk of oral cancer. *Cancer Prevention Research*, 3(7), 800-809.

304. Poh, C. F., Zhu, Y., Chen, E., Berean, K. W., Wu, L., Zhang, L. and Rosin, M. P. (2012). Unique FISH patterns associated with cancer progression of oral dysplasia. *Journal of Dental Research*, 91(1), 52-57.
305. Ries, J., Vairaktaris, E., Agaimy, A., Bechtold, M., Gorecki, P., Neukam, F. W. and Nkenke, E. (2013). The relevance of EGFR overexpression for the prediction of the malignant transformation of oral leukoplakia. *Oncology Reports*, 30(3), 1149-1156.
306. Amornphimoltham, P., Patel, V., Sodhi, A., Nikitakis, N. G., Sauk, J. J., Sausville, E. A. and Gutkind, J. S. (2005). Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Research*, 65(21), 9953-9961.
307. Martins, F., de Sousa, S. C., Dos Santos, E., Woo, S. B. and Gallottini, M. (2016). PI 3K–AKT–mTOR pathway proteins are differently expressed in oral carcinogenesis. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 45(10), 746-752.
308. Teh, M. T., Gemenetzidis, E., Patel, D., Tariq, R., Nadir, A., Bahta, A. W. and Hutchison, I. L. (2012). FOXM1 induces a global methylation signature that mimics the cancer epigenome in head and neck squamous cell carcinoma. *PloS One*, 7(3), e34329.
309. Baylin, S. B. and Jones, P. A. (2011). A decade of exploring the cancer epigenome—biological and translational implications. *Nature Reviews Cancer*, 11(10), 726-734.
310. Tsai, H. C. and Baylin, S. B. (2011). Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. *Cell Research*, 21(3), 502-517.
311. Yamada, Y. and Watanabe, A. (2010). Epigenetic codes in stem cells and cancer stem cells. *Advances in Genetics*, 70, 177-199.
312. Hwang, S., Mahadevan, S., Qadir, F., Hutchison, I. L., Costea, D. E., Neppelberg, E. and Teh, M. T. (2013). Identification of FOXM1-induced epigenetic markers for head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer*, 119(24), 4249-4258.
313. D'Souza, W. and Saranath, D. (2015). Clinical implications of epigenetic regulation in oral cancer. *Oral Oncology*, 51(12), 1061-1068.
314. Breitling, L. P., Yang, R., Korn, B., Burwinkel, B. and Brenner, H. (2011). Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication. *The American Journal of Human Genetics*, 88(4), 450-457.
315. Kresty, L. A., Mallery, S. R., Knobloch, T. J., Song, H., Lloyd, M., Casto, B. C. and Weghorst, C. M. (2002). Alterations of p16 INK4a and p14 ARF in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Research*, 62(18), 5295-5300.
316. Saito, M., Tanaka, R., Arishima, S., Matsuzaki, T., Ishihara, S., Tokashiki, T. and Tanaka, Y. (2013). Increased expression of OX40 is associated with progressive disease in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Retrovirology*, 10(1), 1-15.

317. Saatci, C., Caglayan, A. O., Ozkul, Y., Tahiri, S., Turhan, A. B. and Dundar, M. (2009). Detection of p16 promotor hypermethylation in “Maras powder” and tobacco users. *Cancer Epidemiology*, 33(1), 47-50.
318. Kurdistani, S. K. (2011). Histone modifications in cancer biology and prognosis. *Epigenetics and Disease*, 4(2), 91-106.
319. Hung, P. S., Tu, H. F., Kao, S. Y., Yang, C. C., Liu, C. J., Huang, T. Y. and Lin, S. C. (2014). miR-31 is upregulated in oral premalignant epithelium and contributes to the immortalization of normal oral keratinocytes. *Carcinogenesis*, 35(5), 1162-1171.
320. Cervigne, N. K., Reis, P. P., Machado, J., Sadikovic, B., Bradley, G., Galloni, N. N. and Kamel-Reid, S. (2009). Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Human Molecular Genetics*, 18(24), 4818-4829.
321. Yap, T., Seers, C., Koo, K., Cheng, L., Vella, L. J., Hill, A. F. and McCullough, M. (2019). Non-invasive screening of a microRNA-based dysregulation signature in oral cancer and oral potentially malignant disorders. *Oral Oncology*, 96, 113-120.
322. Méry, B., Guy, J. B., Espenel, S., Wozny, A. S., Simonet, S., Vallard, A. and Magné, N. (2016). Targeting head and neck tumoral stem cells: From biological aspects to therapeutic perspectives. *World Journal of Stem Cells*, 8(1), 13.
323. Shah, A., Patel, S., Pathak, J., Swain, N. and Kumar, S. (2014). The evolving concepts of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *The Scientific World Journal*, 26(2), 126-135.
324. Patel, S. S., Shah, K. A., Shah, M. J., Kothari, K. C. and Rawal, R. M. (2014). Cancer stem cells and stemness markers in oral squamous cell carcinomas. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(20), 8549-8556.
325. Chinn, S. B., Darr, O. A., Owen, J. H., Bellile, E., McHugh, J. B., Spector, M. E. and Prince, M. E. (2015). Cancer stem cells: mediators of tumorigenesis and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head & Neck*, 37(3), 317-326.
326. Kawaguchi, H., El-Naggar, A. K., Papadimitrakopoulou, V., Ren, H., Fan, Y. H., Feng, L. and Mao, L. (2008). Podoplanin: a novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy. *Journal of Clinical Oncology*, 26(3), 354-360.
327. Iyama, T. and Wilson III, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*, 12(8), 620-636.
328. Jackson, S. P. and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071-1078.
329. Yoon, A. J., Shen, J., Santella, R. M., Zegarelli, D. J., Chen, R. and Weinstein, I. B. (2007). Activated checkpoint kinase 2 expression and risk for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 16(12), 2768-2772.

330. Mali, S. B. and Dahivelkar, S. (2021). Liquid biopsy= Individualized cancer management: Diagnosis, monitoring treatment and checking recurrence and metastasis. *Oral Oncology*, 123, 105588.
331. de Oliveira, T. B., Braun, A. C., Nicolau, U. R., Abdallah, E. A., da Silva Alves, V., de Jesus, V. H. F. and Chinen, L. T. D. (2021). Prognostic impact and potential predictive role of baseline circulating tumor cells in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 121, 105480.
332. Jonas, H., Simnica, D., Bußmann, L., Zech, H., Doescher, J., Laban, S. and Binder, M. (2022). Early relapse detection by monitoring of circulating cell-free DNA in patients with localized head and neck squamous cell carcinoma: A subgroup analysis of the multicenter randomized clinical trial IMSTAR-HN. *Oral Oncology*, 126, 105733.
333. Li, Y., St. John, M. A., Zhou, X., Kim, Y., Sinha, U., Jordan, R. C. and Wong, D. T. (2004). Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clinical Cancer Research*, 10(24), 8442-8450.
334. Elashoff, D., Zhou, H., Reiss, J., Wang, J., Xiao, H., Henson, B. and Wong, D. T. (2012). Prevalidation of Salivary Biomarkers for Oral Cancer Detection Salivary Biomarkers for Oral Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 21(4), 664-672.
335. Michailidou, E., Tzimagiorgis, G., Chatzopoulou, F., Vahtsevanos, K., Antoniadis, K., Kouidou, S. and Antoniadis, D. (2016). Salivary mRNA markers having the potential to detect oral squamous cell carcinoma segregated from oral leukoplakia with dysplasia. *Cancer Epidemiology*, 43, 112-118.
336. Aggarwal, S., Sharma, S. C. and Das, S. N. (2015). Galectin-1 and galectin-3: plausible tumour markers for oral squamous cell carcinoma and suitable targets for screening high-risk population. *Clinica Chimica Acta*, 442, 13-21.
337. Bu, J., Bu, X., Liu, B., Chen, F. and Chen, P. (2015). Increased expression of tissue/salivary transgelin mrna predicts poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) surgery. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 21, 2275.
338. Cancer Genome Atlas Network. (2015). Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, 517(7536), 576.
339. Jiang, M., Liu, F., Yang, A. G., Wang, W. and Zhang, R. (2022). The role of long non-coding RNAs in the pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Therapy-Oncolytics*, 24, 127-138.
340. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. and Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5), 843-854.
341. Hammond, S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87, 3-14.

342. Sidhu, K., Kapoor, N. R., Pandey, V. and Kumar, V. (2015). The “macro” world of microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 5, 68.
343. Begum, S., Cao, D., Gillison, M., Zahurak, M. and Westra, W. H. (2005). Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 11(16), 5694-5699.
344. Kozomara, A., Birgaoanu, M. and Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D155-D162.
345. Kehl, T., Backes, C., Kern, F., Fehlmann, T., Ludwig, N., Meese, E. and Keller, A. (2017). About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways. *Oncotarget*, 8(63), 107167.
346. Huang, Z. P., Espinoza-Lewis, R. and Wang, D. Z. (2012). Determination of miRNA targets in skeletal muscle cells. In *Myogenesis* (pp. 475-490). Totowa: Humana Press,.
347. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
348. Jonas, S. and Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, 16(7), 421-433.
349. Cao, M., Zheng, L., Liu, J., Dobleman, T., Hu, S., Go, V. L. W. and Xiao, G. G. (2018). MicroRNAs as effective surrogate biomarkers for early diagnosis of oral cancer. *Clinical Oral Investigations*, 22(2), 571-581.
350. Koshizuka, K., Hanazawa, T., Fukumoto, I., Kikkawa, N., Okamoto, Y. and Seki, N. (2017). The microRNA signatures: aberrantly expressed microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Human Genetics*, 62(1), 3-13.
351. Peng, Y., Zhang, X., Feng, X., Fan, X. and Jin, Z. (2017). The crosstalk between microRNAs and the Wnt/β-catenin signaling pathway in cancer. *Oncotarget*, 8(8), 14089.
352. MacLellan, S. A., Lawson, J., Baik, J., Guillaud, M., Poh, C. F. Y. and Garnis, C. (2012). Differential expression of mi RNAs in the serum of patients with high-risk oral lesions. *Cancer Medicine*, 1(2), 268-274.
353. Ayaz, L., Görür, A., Yaroğlu, H. Y., Özcan, C. and Tamer, L. (2013). Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 139(9), 1499-1506.
354. Blondal, T., Nielsen, S. J., Baker, A., Andreasen, D., Mouritzen, P., Teilum, M. W. and Dahlsveen, I. K. (2013). Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods*, 59(1), S1-S6.
355. Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D. and Galas, D. J. (2010). Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 38(20), 7248-7259.

356. Chakraborty, C. and Das, S. (2016). Profiling cell-free and circulating miRNA: a clinical diagnostic tool for different cancers. *Tumor Biology*, 37(5), 5705-5714.
357. Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F. and Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), 5003-5008.
358. Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A. and Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research*, 39(16), 7223-7233.
359. Osan, C., Chira, S., Nutu, A. M., Braicu, C., Baciut, M., Korban, S. S. and Berindan-Neagoe, I. (2021). The connection between MicroRNAs and oral cancer pathogenesis: emerging biomarkers in oral cancer management. *Genes*, 12(12), 1989.
360. Li, J., Huang, H., Sun, L., Yang, M., Pan, C., Chen, W. and Song, E. (2009). MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clinical Cancer Research*, 15(12), 3998-4008.
361. Zhu, S., Si, M. L., Wu, H. and Mo, Y. Y. (2007). MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *Journal of Biological Chemistry*, 282(19), 14328-14336.
362. Reis, P. P., Tomenson, M., Cervigne, N. K., Machado, J., Jurisica, I., Pintilie, M. and Kamel-Reid, S. (2010). Programmed cell death 4 loss increases tumor cell invasion and is regulated by miR-21 in oral squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer*, 9(1), 1-13.
363. Zhao, J., Hu, C., Chi, J., Li, J., Peng, C., Yun, X. and Zheng, X. (2016). miR-24 promotes the proliferation, migration and invasion in human tongue squamous cell carcinoma by targeting FBXW7. *Oncology Reports*, 36(2), 1143-1149.
364. Zhao, J., Chi, J., Gao, M., Zhi, J., Li, Y. and Zheng, X. (2017). Loss of PTEN expression is associated with high microRNA 24 level and poor prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 75(7), 1449-e1.
365. Liu, X., Wang, A., Heidbreder, C. E., Jiang, L., Yu, J., Kolokythas, A. and Zhou, X. (2010). MicroRNA-24 targeting RNA-binding protein DND1 in tongue squamous cell carcinoma. *FEBS letters*, 584(18), 4115-4120.
366. Lin, S. C., Liu, C. J., Lin, J. A., Chiang, W. F., Hung, P. S. and Chang, K. W. (2010). miR-24 up-regulation in oral carcinoma: positive association from clinical and in vitro analysis. *Oral Oncology*, 46(3), 204-208.
367. Liu, C. J., Tsai, M. M., Hung, P. S., Kao, S. Y., Liu, T. Y., Wu, K. J. and Chang, K. W. (2010). miR-31 ablates expression of the HIF regulatory factor FIH to activate the HIF pathway in head and neck carcinoma. *Cancer research*, 70(4), 1635-1644.

368. Lu, W. C., Liu, C. J., Tu, H. F., Chung, Y. T., Yang, C. C., Kao, S. Y. and Lin, S. C. (2016). miR-31 targets ARID1A and enhances the oncogenicity and stemness of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 7(35), 57254.
369. Tseng, S. H., Yang, C. C., Yu, E. H., Chang, C., Lee, Y. S., Liu, C. J. and Lin, S. C. (2015). K14-EGFP-miR-31 transgenic mice have high susceptibility to chemical-induced squamous cell tumorigenesis that is associating with Ku80 repression. *International Journal of Cancer*, 136(6), 1263-1275.
370. Lai, Y. H., Liu, H., Chiang, W. F., Chen, T. W., Chu, L. J., Yu, J. S. and Tan, B. C. M. (2018). MiR-31-5p-ACOX1 axis enhances tumorigenic fitness in oral squamous cell carcinoma via the promigratory prostaglandin E2. *Theranostics*, 8(2), 486.
371. Kao, Y. Y., Chou, C. H., Yeh, L. Y., Chen, Y. F., Chang, K. W., Liu, C. J. and Lin, S. C. (2019). MicroRNA miR-31 targets SIRT3 to disrupt mitochondrial activity and increase oxidative stress in oral carcinoma. *Cancer Letters*, 456, 40-48.
372. Fang, Z., Zhao, J., Xie, W., Sun, Q., Wang, H. and Qiao, B. (2017). LncRNA UCA1 promotes proliferation and cisplatin resistance of oral squamous cell carcinoma by sunppressing miR-184 expression. *Cancer Medicine*, 6(12), 2897-2908.
373. Chen, Y. F., Yang, C. C., Kao, S. Y., Liu, C. J., Lin, S. C. and Chang, K. W. (2016). MicroRNA-211 Enhances the Oncogenicity of Carcinogen-Induced Oral Carcinoma by Repressing TCF12 and Increasing Antioxidant ActivitymiR-211-TCF12-FAM213A Activation in OSCC. *Cancer Research*, 76(16), 4872-4886.
374. Chu, T. H., Yang, C. C., Liu, C. J., Lui, M. T., Lin, S. C. and Chang, K. W. (2013). miR-211 promotes the progression of head and neck carcinomas by targeting TGF β RII. *Cancer Letters*, 337(1), 115-124.
375. Zheng, J., Wang, J., Jia, Y., Liu, T., Duan, Y., Liang, X. and Liu, L. (2019). microRNA-211 promotes proliferation, migration, and invasion ability of oral squamous cell carcinoma cells via targeting the bridging integrator 1 protein. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(3), 4644-4653.
376. Yang, C. J., Shen, W. G., Liu, C. J., Chen, Y. W., Lu, H. H., Tsai, M. M. and Lin, S. C. (2011). miR-221 and miR-222 expression increased the growth and tumorigenesis of oral carcinoma cells. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 40(7), 560-566.
377. Zhou, L., Jiang, F., Chen, X., Liu, Z., Ouyang, Y., Zhao, W. and Yu, D. (2016). Downregulation of miR-221/222 by a microRNA sponge promotes apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells through upregulation of PTEN. *Oncology Letters*, 12(6), 4419-4426.
378. Jiang, F., Zhao, W., Zhou, L., Zhang, L., Liu, Z. and Yu, D. (2014). miR-222 regulates the cell biological behavior of oral squamous cell carcinoma by targeting PUMA. *Oncology Reports*, 31(3), 1255-1262.
379. Cheng, C. M., Shiah, S. G., Huang, C. C., Hsiao, J. R. and Chang, J. Y. (2016). Up-regulation of miR-455-5p by the TGF- β -SMAD signalling axis promotes the proliferation of oral squamous cancer cells by targeting UBE2B. *The Journal of Pathology*, 240(1), 38-49.

380. Lee, S. A., Kim, J. S., Park, S. Y., Kim, H. J., Yu, S. K., Kim, C. S. and Kim, D. K. (2015). miR-203 downregulates Yes-1 and suppresses oncogenic activity in human oral cancer cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(4), 351-358.
381. Lin, J., Lin, Y., Fan, L., Kuang, W., Zheng, L., Wu, J. and Tan, J. (2016). miR-203 inhibits cell proliferation and promotes cisplatin induced cell death in tongue squamous cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473(2), 382-387.
382. Kim, J. S., Choi, D. W., Kim, C. S., Yu, S. K., Kim, H. J., Go, D. S. and DO KYUNG, K. I. M. (2018). MicroRNA-203 induces apoptosis by targeting Bmi-1 in YD-38 oral cancer cells. *Anticancer Research*, 38(6), 3477-3485.
383. Lim, H. S., Kim, C. S., Kim, J. S., Yu, S. K., Go, D. S., Lee, S. A. and DO KYUNG, K. I. M. (2017). Suppression of oral carcinoma oncogenic activity by microRNA-203 via down-regulation of SEMA6A. *Anticancer Research*, 37(10), 5425-5433.
384. Henson, B. J., Bhattacharjee, S., O'Dee, D. M., Feingold, E. and Gollin, S. M. (2009). Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral cancer cells contributes to malignancy. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 48(7), 569-582.
385. Arunkumar, G., Deva Magendhra Rao, A. K., Manikandan, M., Prasanna Srinivasa Rao, H., Subbiah, S., Ilangovan, R. and Munirajan, A. K. (2018). Dysregulation of miR-200 family microRNAs and epithelial-mesenchymal transition markers in oral squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, 15(1), 649-657.
386. Wong, T. S., Liu, X. B., Chung-Wai Ho, A., Po-Wing Yuen, A., Wai-Man Ng, R. and Ignace Wei, W. (2008). Identification of pyruvate kinase type M2 as potential oncoprotein in squamous cell carcinoma of tongue through microRNA profiling. *International Journal of Cancer*, 123(2), 251-257.
387. Mutallip, M., Nohata, N., Hanazawa, T., Kikkawa, N., Horiguchi, S., Fujimura, L. and Seki, N. (2011). Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) suppresses cell apoptosis and its regulation by miR-133 α in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *International Journal of Molecular Medicine*, 27(3), 345-352.
388. Jiang, L., Dai, Y., Liu, X., Wang, C., Wang, A., Chen, Z. and Zhou, X. (2011). Identification and experimental validation of G protein alpha inhibiting activity polypeptide 2 (GNAI2) as a microRNA-138 target in tongue squamous cell carcinoma. *Human Genetics*, 129(2), 189-197.
389. Islam, M., Sharma, S. and Teknos, T. N. (2014). RhoC regulates cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma by overexpressing IL-6 and phosphorylation of STAT3. *PLoS One*, 9(2), e88527.
390. Cao, Z. H., Cheng, J. L., Zhang, Y., Bo, C. X. and Li, Y. L. (2017). MicroRNA-375 inhibits oral squamous cell carcinoma cell migration and invasion by targeting platelet-derived growth factor-A. *Molecular Medicine Reports*, 15(2), 922-928.
391. Jia, L., Huang, Y., Zheng, Y., Lyu, M., Zhang, C., Meng, Z. and Yu, G. (2015). miR-375 inhibits cell growth and correlates with clinical outcomes in tongue squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, 33(4), 2061-2071.

392. Hui, A. B., Bruce, J. P., Alajez, N. M., Shi, W., Yue, S., Perez-Ordenez, B. and Liu, F. F. (2011). Significance of dysregulated metadherin and microRNA-375 in head and neck cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(24), 7539-7550.
393. Wu, Y., Sun, X., Song, B., Qiu, X. and Zhao, J. (2017). MiR-375/SLC7A11 axis regulates oral squamous cell carcinoma proliferation and invasion. *Cancer Medicine*, 6(7), 1686-1697.
394. Jung, H. M., Patel, R. S., Phillips, B. L., Wang, H., Cohen, D. M., Reinhold, W. C. and Chan, E. K. (2013). Tumor suppressor miR-375 regulates MYC expression via repression of CIP2A coding sequence through multiple miRNA-mRNA interactions. *Molecular Biology of The Cell*, 24(11), 1638-1648.
395. Shah, S., Jadhav, K., Shah, V., Gupta, N. and Dagrur, K. (2016). miRNA 21: diagnostic prognostic and therapeutic marker for oral cancer. *Microna*, 5(3), 175-179.
396. Hoxhaj, G. and Manning, B. D. (2020). The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 20(2), 74-88.
397. Pan, H., Gu, L., Liu, B., Li, Y., Wang, Y., Bai, X. and Tang, Z. (2017). Tropomyosin-1 acts as a potential tumor suppressor in human oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 12(2), e0168900.
398. Matsushashi, S., Manirujjaman, M., Hamajima, H. and Ozaki, I. (2019). Control mechanisms of the tumor suppressor PDCD4: expression and functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2304.
399. Zheng, X., Li, J., Peng, C., Zhao, J., Chi, J., Meng, X. and Li, Y. (2015). MicroRNA-24 induces cisplatin resistance by targeting PTEN in human tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 51(11), 998-1003.
400. Siow, M. Y., Karen Ng, L. P., Vincent Chong, V. K., Jamaludin, M., Abraham, M. T., Abdul Rahman, Z. A. and Zain, R. B. (2014). Dysregulation of mi R-31 and mi R-375 expression is associated with clinical outcomes in oral carcinoma. *Oral Diseases*, 20(4), 345-351.
401. Wiklund, E. D., Gao, S., Hulf, T., Sibbritt, T., Nair, S., Costea, D. E. and Kjems, J. (2011). MicroRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 6(11), e27840.
402. Liu, J., Zheng, M., Tang, Y. L., Liang, X. H. and Yang, Q. (2011). MicroRNAs, an active and versatile group in cancers. *International Journal of Oral Science*, 3(4), 165-175.
403. Asangani, I. A., Rasheed, S. A., Nikolova, D. A., Leupold, J. H., Colburn, N. H., Post, S. and Allgayer, H. (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, 27(15), 2128-2136.

404. Gissi, D. B., Morandi, L., Gabusi, A., Tarsitano, A., Marchetti, C., Cura, F. and Scapoli, L. (2018). A noninvasive test for MicroRNA expression in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1789.
405. Yang, Y., Guo, J. X. and Shao, Z. Q. (2017). miR-21 targets and inhibits tumor suppressor gene PTEN to promote prostate cancer cell proliferation and invasion: An experimental study. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(1), 87-91.
406. Zhang, Z., Chen, Q., Zhang, J., Wang, Y., Hu, X., Yin, S. and Wei, M. (2017). Associations of genetic polymorphisms in pTEN/AKT/mTOR signaling pathway genes with cancer risk: A meta-analysis in Asian population. *Scientific Reports*, 7(1), 1-11.
407. Hu, S. L., Chang, A. C., Huang, C. C., Tsai, C. H., Lin, C. C. and Tang, C. H. (2017). Myostatin promotes interleukin-1 β expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through inhibition of miR-21-5p. *Frontiers in Immunology*, 8, 1747.
408. Chen, B., Chen, X., Wu, X., Wang, X., Wang, Y., Lin, T. Y. and Lin, R. J. (2015). Disruption of microRNA-21 by TALEN leads to diminished cell transformation and increased expression of cell–environment interaction genes. *Cancer Letters*, 356(2), 506-516.
409. Wang, Y., Zhou, S., Fan, K. and Jiang, C. (2019). MicroRNA-21 and its impact on signaling pathways in cervical cancer. *Oncology Letters*, 17(3), 3066-3070.
410. Paulin, R., Sutendra, G., Gurtu, V., Dromparis, P., Haromy, A., Provencher, S. and Michelakis, E. D. (2015). A miR-208–Mef2 axis drives the decompensation of right ventricular function in pulmonary hypertension. *Circulation Research*, 116(1), 56-69.
411. Huang, Y., Shen, X. J., Zou, Q., Wang, S. P., Tang, S. M. and Zhang, G. Z. (2011). Biological functions of microRNAs: a review. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 67(1), 129-139.
412. Montgomery, R. L., Hullinger, T. G., Semus, H. M., Dickinson, B. A., Seto, A. G., Lynch, J. M. and Van Rooij, E. (2011). Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation*, 124(14), 1537-1547.
413. Liu, A., Shao, C., Jin, G., Liu, R., Hao, J., Song, B. and Hu, X. (2014). miR-208-induced epithelial to mesenchymal transition of pancreatic cancer cells promotes cell metastasis and invasion. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 69(2), 341-346.
414. Li, H., Zheng, D., Zhang, B., Liu, L., Ou, J., Chen, W. and Yang, J. (2014). Mir-208 promotes cell proliferation by repressing SOX6 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 1-9.
415. Yu, P., Wu, D., You, Y., Sun, J., Lu, L., Tan, J. and Bie, P. (2015). miR-208-3p promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion through regulating ARID2 expression. *Experimental Cell Research*, 336(2), 232-241.
416. Guo, H., Xu, Y. and Fu, Q. (2017). Curcumin inhibits growth of Prostate carcinoma via miR-208-mediated CDKN1A activation. *Tumor Biology*, 36(11), 12-26.

417. Wu, H., Xu, L., Chen, Y. and Xu, C. (2019). MiR-208a-3p functions as an oncogene in colorectal cancer by targeting PDCD4. *Bioscience Reports*, 39(4).
418. Wang, Q. and Yang, H. S. (2018). The role of Pdc4 in tumour suppression and protein translation. *Biology of the Cell*, 110(8), 169-177.
419. Soejima, H., Miyoshi, O., Yoshinaga, H. and Masaki, Z. (1999). Assignment of the programmed cell death 4 gene (PDCD4) to human chromosome band 10q24 by in situ hybridization. *Cytogenetic and Genome Research*, 87(1/2), 113.
420. Onishi, Y., Hashimoto, S. and Kizaki, H. (1998). Cloning of the TIS gene suppressed by topoisomerase inhibitors. *Gene*, 215(2), 453-459.
421. Shibahara, K., Asano, M., Ishida, Y., Aoki, T., Koike, T. and Honjo, T. (1995). Isolation of a novel mouse gene MA-3 that is induced upon programmed cell death. *Gene*, 166(2), 297-301.
422. Yang, H. S., Jansen, A. P., Komar, A. A., Zheng, X., Merrick, W. C., Costes, S. and Colburn, N. H. (2003). The transformation suppressor Pdc4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Molecular and Cellular Biology*, 23(1), 26-37.
423. Chang, J. H., Cho, Y. H., Sohn, S. Y., Choi, J. M., Kim, A., Kim, Y. C. and Cho, Y. (2009). Crystal structure of the eIF4A–PDCD4 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3148-3153.
424. Loh, P. G., Yang, H. S., Walsh, M. A., Wang, Q., Wang, X., Cheng, Z. and Song, H. (2009). Structural basis for translational inhibition by the tumour suppressor Pdc4. *The EMBO Journal*, 28(3), 274-285.
425. Yang, H. S., Cho, M. H., Zakowicz, H., Hegamyer, G., Sonenberg, N. and Colburn, N. H. (2004). A novel function of the MA-3 domains in transformation and translation suppressor Pdc4 is essential for its binding to eukaryotic translation initiation factor 4A. *Molecular and Cellular Biology*, 24(9), 3894-3906.
426. Rogers Jr, G. W., Komar, A. A. and Merrick, W. C. (2002). eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 72(2), 307-331.
427. Basu, A. and Sridharan, S. (2017). Regulation of anti-apoptotic Bcl-2 family protein Mcl-1 by S6 kinase 2. *PLoS One*, 12(3), e0173854.
428. Liwak, U., Thakor, N., Jordan, L. E., Roy, R., Lewis, S. M., Pardo, O. E. and Holcik, M. (2012). Tumor suppressor PDCD4 represses internal ribosome entry site-mediated translation of antiapoptotic proteins and is regulated by S6 kinase 2. *Molecular and Cellular Biology*, 32(10), 1818-1829.
429. Cai, Q., Yang, H. S., Li, Y. C. and Zhu, J. (2022). Dissecting the Roles of PDCD4 in Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 12(2), 45-82.

430. De Benedetti, A. and Harris, A. L. (1999). eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(1), 59-72.
431. Wang, Q., Zhu, J., Wang, Y. W., Dai, Y., Wang, Y. L., Wang, C. and Yang, H. S. (2017). Tumor suppressor Pdc4 attenuates Sin1 translation to inhibit invasion in colon carcinoma. *Oncogene*, 36(45), 6225-6234.
432. Chen, Y., Knösel, T., Kristiansen, G., Pietas, A., Garber, M. E., Matsushashi, S. and Petersen, I. (2003). Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 200(5), 640-646.
433. Zhang, H., Ozaki, I., Mizuta, T., Hamajima, H., Yasutake, T., Eguchi, Y. and Matsushashi, S. (2006). Involvement of programmed cell death 4 in transforming growth factor- β 1-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 25(45), 6101-6112.
434. Gao, F., Wang, X., Zhu, F., Wang, Q., Zhang, X., Guo, C. and Zhang, L. (2009). PDCD4 gene silencing in gliomas is associated with 5' CpG island methylation and unfavourable prognosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(10), 4257-4267.
435. Jansen, A. P., Camalier, C. E., Stark, C. and Colburn, N. H. (2004). Characterization of programmed cell death 4 in multiple human cancers reveals a novel enhancer of drug sensitivity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(2), 103-110.
436. Jia, L. F., Wei, S. B., Gan, Y. H., Guo, Y., Gong, K., Mitchelson, K. and Yu, G. Y. (2014). Expression, regulation and roles of miR-26a and MEG3 in tongue squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 135(10), 2282-2293.
437. Wang, Y., Liu, Z. and Shen, J. (2019). MicroRNA-421-targeted PDCD4 regulates breast cancer cell proliferation. *International Journal of Molecular Medicine*, 43(1), 267-275.
438. Liy, W. and Wu, X. (2018). PDCD4 suppresses proliferation, migration, and invasion of endometrial cells by inhibiting autophagy and NF- κ B/MMP2/MMP9 signal pathway. *BiolReprod*, 99(2), 360-372.
439. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (pp. 263-273). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
440. Gibbs, R. A. (1990). DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry*, 62(13), 1202-1214.
441. Ferre, F. (1992). Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *Genome Research*, 2(1), 1-9.
442. Gibson, U. E., Heid, C. A. and Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6(10), 995-1001.

443. Raeymaekers, L. (1995). A commentary on the practical applications of competitive PCR. *Genome Research*, 5(1), 91-94.
444. Dutta, D., Naiyer, S., Mansuri, S., Soni, N., Singh, V., Bhat, K. H. and Mansuri, M. S. (2022). COVID-19 diagnosis: a comprehensive review of the RT-qPCR method for detection of SARS-CoV-2. *Diagnostics*, 12(6), 1503.
445. Fehlmann, T., Ludwig, N., Backes, C., Meese, E. and Keller, A. (2016). Distribution of microRNA biomarker candidates in solid tissues and body fluids. *RNA Biology*, 13(11), 1084-1088.
446. Thomas, L., Moore, E. J., Olsen, K. D. and Kasperbauer, J. L. (2012). Long-term quality of life in young adults treated for oral cavity squamous cell cancer. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 121(6), 395-401.
447. Rishabh, K., Khadilkar, S., Kumar, A., Kalra, I., Kumar, A. P. and Kunnumakkara, A. B. (2021). MicroRNAs as Modulators of Oral Tumorigenesis—A Focused Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2561.
448. Bronkhorst, A. J., Wentzel, J. F., Aucamp, J., Van Dyk, E., Du Plessis, L. and Pretorius, P. J. (2016). Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(1), 157-165.
449. Guillon, M., Dang, N. P., Thévenon, J. and Devoize, L. (2021). Salivary diagnosis of oral cancers by salivary samples: a systematic literature review. *Journal of Oral Medicine and Oral Surgery*, 27(3), 39.
450. von Brandenstein, M., Herden, J., Köditz, B., Huerta, M., Nestler, T., Heidenreich, A. and Fries, J. W. (2021). Non-invasive urine markers for the differentiation between RCCs and oncocytoma. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(5), e23762.
451. Ries, J., Baran, C., Wehrhan, F., Weber, M., Motel, C., Kesting, M. and Nkenke, E. (2019). The altered expression levels of miR-186, miR-494 and miR-3651 in OSCC tissue vary from those of the whole blood of OSCC patients. *Cancer Biomarkers*, 24(1), 19-30.
452. Cao, Z., Yoon, J. H., Nam, S. W., Lee, J. Y. and Park, W. S. (2012). PDCD4 expression inversely correlated with miR-21 levels in gastric cancers. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 138(4), 611-619.
453. Wang, L., Jiang, Y., Song, X., Guo, C., Zhu, F., Wang, X. and Zhang, L. (2016). Pdc4 deficiency enhances macrophage lipophagy and attenuates foam cell formation and atherosclerosis in mice. *Cell Death & Disease*, 7(1), e2055-e2055.
454. Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W. and Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*, 4, e05005.
455. Schlamp, K., Weinmann, A., Krupp, M., Maass, T., Galle, P. R. and Teufel, A. (2008). BlotBase: a northern blot database. *Gene*, 427(1-2), 47-50.

456. Taniguchi, M., Miura, K., Iwao, H. and Yamanaka, S. (2001). Quantitative assessment of DNA microarrays—comparison with Northern blot analyses. *Genomics*, 71(1), 34-39.
457. Streit, S., Michalski, C. W., Erkan, M., Kleeff, J. and Friess, H. (2009). Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. *Nature protocols*, 4(1), 37-43.
458. İnternet: Medline, O. (2007). *White paper on third molar data*. Web: https://www.aaoms.org/docs/govt_affairs/advocacy_white_papers/white_paper_third_molar_data.pdf, Son Erişim tarihi: 30/06/2022.
459. Selcuklu, S. D., Donoghue, M. T. and Spillane, C. (2009). miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochemical Society Transactions*, 37(4), 918-925.
460. Xu, L. F., Wu, Z. P., Chen, Y., Zhu, Q. S., Hamidi, S. and Navab, R. (2014). MicroRNA-21 (miR-21) regulates cellular proliferation, invasion, migration, and apoptosis by targeting PTEN, RECK and Bcl-2 in lung squamous carcinoma, Gejiu City, China. *PloS one*, 9(8), e103698.
461. Feng, Y. H. and Tsao, C. J. (2016). Emerging role of microRNA-21 in cancer. *Biomedical Reports*, 5(4), 395-402.
462. Wang, K., Yuan, Y., Cho, J. H., McClarty, S., Baxter, D. and Galas, D. J. (2012). Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS ONE* 7(7), e41561.
463. Mehdipour, M., Shahidi, M., Manifar, S., Jafari, S., Mashhadi Abbas, F., Barati, M. and Elmi Rankohi, Z. (2018). Diagnostic and prognostic relevance of salivary microRNA-21,-125a,-31 and-200a levels in patients with oral lichen planus-a short report. *Cellular Oncology*, 41(3), 329-334.
464. Hung, K. F., Liu, C. J., Chiu, P. C., Lin, J. S., Chang, K. W., Shih, W. Y. and Tu, H. F. (2016). MicroRNA-31 upregulation predicts increased risk of progression of oral potentially malignant disorder. *Oral Oncology*, 53, 42-47.
465. Zahran, F., Ghalwash, D., Shaker, O., Al-Johani, K. and Scully, C. (2015). Salivary micro RNA s in oral cancer. *Oral Diseases*, 21(6), 739-747.
466. Setti, G., Pezzi, M. E., Viani, M. V., Pertinhez, T. A., Cassi, D., Magnoni, C. and Meleti, M. (2020). Salivary microRNA for diagnosis of cancer and systemic diseases: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 907.
467. Hoshino, I., Ishige, F., Iwatate, Y., Gunji, H., Kuwayama, N., Nabeya, Y. and Matsubara, H. (2021). Cell-free microRNA-1246 in different body fluids as a diagnostic biomarker for esophageal squamous cell carcinoma. *Plos One*, 16(3), e0248016.
468. Robinson, S., Follo, M., Haenel, D., Mauler, M., Stallmann, D., Tewari, M. and Hortmann, M. (2018). Droplet digital PCR as a novel detection method for quantifying microRNAs in acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*, 257, 247-254.

469. Wang, C. and Jing, Q. (2018). Non-coding RNAs as biomarkers for acute myocardial infarction. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(7), 1110-1119.
470. Yin, K., Liu, M., Zhang, M., Wang, F., Fen, M., Liu, Z. and Guan, W. (2016). miR-208a-3p suppresses cell apoptosis by targeting PDCD4 in gastric cancer. *Oncotarget*, 7(41), 67321.
471. Tang, Y., Cui, Y., Li, Z., Jiao, Z., Zhang, Y., He, Y. and Zhang, S. (2016). Radiation-induced miR-208a increases the proliferation and radioresistance by targeting p21 in human lung cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1), 1-14.
472. Desai, K. M. and Kale, A. D. (2017). Immunoexpression of programmed cell death 4 protein in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*, 21(3), 462.
473. Bozdağ, L., Leyla, A., Ersoy, H., Bayir, Ö., Korkmaz, M. H., Mollaoğlu, N. and Gültekin, S. E. (2022). Apoptosis related PDCD4 promising novel biomarker early detection of oral cancer. *ADO Klinik Bilimler Dergisi*, 11(2), 150-156.
474. Frankel, L. B., Christoffersen, N. R., Jacobsen, A., Lindow, M., Krogh, A. and Lund, A. H. (2008). Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(2), 1026-1033.
475. Lankat-Buttgereit, B. and Göke, R. (2009). The tumour suppressor Pdc4: recent advances in the elucidation of function and regulation. *Biology of the Cell*, 101(6), 309-317.
476. Soon, P. and Kiaris, H. (2013). MicroRNAs in the tumour microenvironment: big role for small players. *Endocrine-Related Cancer*, 20(5), R257-R267.

EKLER

EK-1. Etik kurul izni

Evrak Tarih ve Sayısı: 19.11.2020-E.28270



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Diş Hekimliği Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı : 21071282-050.99-
Konu : Etik Kurul

Sayın
Oral Patoloji Anabilim Dalı Başkanlığına

Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna, etik açıdan değerlendirmek üzere göndermiş olduğunuz "Likit Biyopsilerin Oral Premalign ve Malign Lezyonlarda Tanı Amaçlı Kullanımı" konulu çalışma, Etik Kurulumuz tarafından incelenmiş ve araştırma etiği açısından uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Kurul Başkanı

Önemli Not: Sağlık Bakanlığına başvuruda bulunacak çalışmaların, Kurulumuz tarafından incelenmiş ve onaylanmış "**Değerlendirilen Belgeler**" kısmında belirtilmiş olan **Tarih ve Versiyon/Revizyon numaralarının** yazılması gerekmektedir. Aksi takdirde Sağlık Bakanlığına teslim edilen belgelerde Tarih ve Versiyon/Revizyon numaralarında uyumsuzluk yaşanmaktadır ve bu nedenle dosyalar reddedilmektedir. Bu konuya önem verilmesi bilgilerinize sunulur.

Ek: Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu (3 Sayfa)/Elden Teslim Edilecektir.

EK-1. (devam) Etik kurul izni

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		gönderilen "Likit Biyopsilerin Oral Premalign ve Malign Lezyonlarda Tanı Amaçlı Kullanımı" konulu çalışmanın kabulüne,			
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU					
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu			
	AÇIK ADRESİ:				
	TELEFON				
	FAKS				
	E-POSTA				
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Oral Patoloji Anabilim Dalı Başkanlığı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☒		
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐	

EK-1. (devam) Etik kurul izni

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		K taraflarında	
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		gönderilen "Likit Biyopsilerin Oral Premalign ve Malign Lezyonlarda Tanı Amaçlı Kullanımı" konulu çalışmanın kabulüne,	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	05.11.2020	VERSİYON 2
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	05.11.2020	VERSİYON 2
	OLGU RAPOR FORMU	05.11.2020	VERSİYON 2
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	-	-
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Dili	
	SIGORTA	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	İLAN	Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	YILLIK BİLDİRİM	Açıklama	
	SONUÇ RAPORU	15.10.2020- VERSİYON 1	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ		
	DİĞER:		
	KARAR BİLGİLERİ	Karar No: GÜDHKAEK. 2020.24/3	Tarih: 19.11.2020
Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			
İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.			



Gazili olmak ayrıcalıktır