

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

**(DOKTORA TEZİ )**

**ORAL MUKOZANIN PREKANSERÖZ LEZYONLARI VE  
KANSERLERİNDE DİAGNOSTİK ÖNEMİ OLABİLECEK  
DAMARSAL BELİRLEYİCİLERİN ARAŞTIRILMASI**

**HİLAL OĞUZ SOYDİNÇ**

**DANIŞMAN  
PROF.DR.VİLDAN YASASEVER**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI  
KANSER BİYOKİMYASI PROGRAMI**




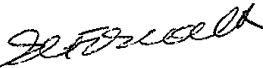

**İSTANBUL-2012**

**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı  
Kanser Biyokimyası Programında Hilal OĞUZ SOYDİNÇ tarafından hazırlanan "Oral  
Mukozanın Prekanseroz Lezyonları ve Kanselerinde Diagnostik Önemi Olabilecek  
Damarsal Belirleyicilerin Araştırılması" başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında  
Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

25 / 01 / 2012

**Tez Sınav Jürisi**

- | <u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>                                      | <u>İmzası</u>   |
|--|---|
| 1.Prof.Dr.Vildan YASASEVER/İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü/Temel Onkoloji ABD. / Danışman                       |     |
| 2.Prof.Dr.Nejat DALAY/İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü/Temel Onkoloji ABD.                                       |    |
| 3.Doç.Dr.Vakur OLGAC/İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü/Klinik Onkoloji ABD.                                       |    |
| 4.Doç.Dr.Şebnem ERÇALIK YALÇINKAYA/Marmara Üniv.Dişhekimliği Fak.<br>Ağız,Diş ve Çene Radyolojisi ABD. |  |
| 5.Doç.Dr.Derya DURANYILDIZ/İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü/Temel Onkoloji ABD.                                  |  |

**BEYAN**

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

Hilal OĞUZ SOYDİNÇ

## İTHAF

Anneme ve babama ithaf ediyorum

## TEŞEKKÜR

Burada doktora yapma olanağı sağlayan

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Müdürü **Sn. Prof.Dr. Ahmet KİZİR**'e,

Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı **Sn. Prof.Dr. Nejat DALAY**'a,

Bilgi, görüş ve katkılarıyla beni en doğru şekilde yönlendiren değerli hocam, tez danışmanım **Sn. Prof.Dr. Vildan YASASEVER**'e,

Her türlü destek ve katkılarından dolayı **Sn.Doç.Dr. Derya DURANYILDIZ**'a,

Tezin hazırlanmasındaki tüm yardımlarından dolayı **Sn. Doç.Dr. Vakur OLGAÇ**'a,

Materyal toplamada gösterdikleri yardım için Marmara Üniversitesi Oral Diagnoz ve Radyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri **Sn. Prof.Dr.Semih ÖZBAYRAK**, **Sn. Doç.Dr. Şebnem YALÇINKAYA**, **Sn. Yrd. Doç.Dr. Asım DUMLU**'ya,

Tüm yardımları için başta **MSc. Sevcihan MUTLU** olmak üzere tüm İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi ve Onkolojik Sitoloji Bilim Dalı çalışanlarına,

Tez çalışmam süresince anlayışlarını esirgemeyen laboratuardaki tüm çalışma arkadaşlarıma,

Onkoloji Enstitüsü Öğrenci İşleri Sorumlusu **Gülay ALAGÖZ**'e,

Ömür boyu benden desteklerini esirgemeyen **ANNEM** ve **BABAM**'a,

Her ihtiyacım olduğunda yanımda olan canım **KARDEŞİME** ve sevgili **EŞİME**

teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1839

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN .....	İİİ
İTHAF .....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ .....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	X
ÖZET.....	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. ORAL KAVİTE PREKANSErÖZ LEZYONLARI VE KANSERLERİ.....	2
2.1.1. ORAL KANSERLER .....	2
2.1.2. ORAL KANSERLERDE EVRELEME.....	3
2.1.3. ORAL KANSERLERDE TEDAVİ .....	5
2.1.4. ORAL KANSERLERDE PROGNOZ .....	5
2.2. PREKANSErÖZ LEZYONLAR.....	6
2.2.1. ORAL LÖKOPLAKİ (OL) .....	6
2.2.2. ERİTROPLAKİ (OEL) .....	7
2.2.3. SUBMUKOZ FİBROZİS.....	7
2.2.4. ORAL LİKEN PLANUS.....	8
2.2.5. KERATOAKANTOMA .....	8
2.2.6. NİKOTİN STOMATİTİ.....	8
2.3. TÜKÜRÜK .....	8
2.4. ANJİOGENEZ .....	12
2.4.1. TÜMÖR ANJİOGENEZİ.....	13
2.4.2. ANJİOGENEZ VE METASTAZ .....	15
2.4.3. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF) AİLESİ.....	17
2.4.4. VEGF RESEPTÖRLERİ.....	18

2.4.5. VEGF-C.....	19
2.4.6. ANGIOPOİETİNLER.....	20
2.4.7. INTERFERON-GAMMA-INDUCIBLE PROTEIN-10 (IP-10)/CXCL10 .....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. ARAŞTIRMADA KULLANILAN ÖRNEKLER .....	25
3.2. ARAŞTIRMADA KULLANILAN YÖNTEMLER .....	26
3.2.1. ELISA Yöntemi .....	26
3.3. ARAŞTIRMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER .....	27
3.3.1. VEGF-C Elisa Kit .....	27
3.3.2. Ang-1 Elisa kit .....	27
3.3.3. IP-10 Elisa kit .....	28
3.3.4. VEGF-C Antikor.....	28
3.3.5. Ang-1 Antikor.....	28
3.3.6. IP-10 Antikor .....	28
3.3.7. Cell & Tissue Staining Kit .....	28
3.4. ARAŞTIRMADA KULLANILAN GEREÇLER .....	28
3.5. TESTLERİN YAPILIŞI.....	29
3.5.1. VEGF-C Düzeylerinin Belirlenmesi.....	29
3.5.2. Ang-1 Düzeylerinin Belirlenmesi .....	32
3.5.3. IP-10 Düzeylerinin Belirlenmesi .....	35
3.6. İMMÜNİSTOKİMYASAL BOYAMA YÖNTEMİ .....	38
3.7.SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİNDE KULLANILAN İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER .....	40
4. BULGULAR .....	41
5. TARTIŞMA .....	57
KAYNAKLAR .....	64
FORMLAR .....	74
GÖNÜLLÜ ONAY FORMU .....	77
ETİK KURUL KARARI.....	78
ÖZGEÇMİŞ .....	80

**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 2-1 Oral kavite kanserlerinde etyolojik ajanlar.....	3
Tablo 2-2 Oral kanserlerde evreleme .....	4
Tablo 2-3 Anjiogenezi uyaran ve baskılayan faktörler .....	13
Tablo 2-4 ELR motiflerine (Glu-Leu-Arg) göre anjiogenik ve antianjiogenik CXC kemokinler .....	23
Tablo 4-1 Cinsiyete ve tanılara göre sigara ve alkol kullanımı .....	41
Tablo 4-2 Gruplara ait serum aritmetik ortalama (x), standart sapma (sd), ortanca (m), minimum (min) ve maksimum değerleri ( maks) .....	46
Tablo 4-3 Gruplara ait tükürük aritmetik ortalama (x), standart sapma (sd), ortanca (m), minimum (min) ve maksimum değerleri ( maks) .....	47
Tablo 4-4 Testlere ait istatistiksel anlamlılıklar (p değerleri).....	54
Tablo 4-5 Serumda çalışılan testlere ait duyarlılık, özgüllük ve doğruluk değerleri .....	55
Tablo 4-6 Tükürükte çalışılan testlere ait duyarlılık, özgüllük ve doğruluk değerleri.....	55



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 VEGF ailesi ve reseptörleri.....	19
Şekil 2-2 Kemokin yapıları.....	22
Şekil 3-1 ELISA yönteminin esası.....	27
Şekil 3-2 VEGF-C yönteminin akım şeması .....	31
Şekil 3-3 VEGF-C'in standart absorbanları ve bilinen konsantrasyonları arasında çizilen standart eğri grafiği .....	32
Şekil 3-4 Ang-1 yönteminin akım şeması .....	34
Şekil 3-5 Ang-1'in standart absorbanları ve bilinen konsantrasyonları arasında çizilen standart eğri grafiği .....	35
Şekil 3-6 IP-10 yönteminin akım şeması.....	37
Şekil 3-7 Serum IP-10'un standart absorbanları ve bilinen konsantrasyonları arasında çizilen standart eğri grafiği .....	38
Şekil 3-8 Tükürük IP-10'un standart absorbanları ve bilinen konsantrasyonları arasında çizilen standart eğri grafiği .....	38
Şekil 4-1 VEGF-C ekspresyonu.....	43
Şekil 4-2 Ang-1 ekspresyonu.....	44
Şekil 4-3 IP-10 ekspresyonu .....	45
Şekil 4-4 Gruplara ait serum VEGF-C dağılımı .....	48
Şekil 4-5 Gruplara ait serum Ang-1 dağılımı .....	49
Şekil 4-6 Gruplara ait serum IP-10 dağılımı.....	50
Şekil 4-7 Gruplara ait tükürük VEGF-C dağılımı.....	51
Şekil 4-8 Gruplara ait tükürük Ang-1 dağılımı.....	52
Şekil 4-9 Gruplara ait tükürük IP-10 dağılımı .....	53

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

VEGF: vasküler endotelyal büyüme faktörü

VEGF-C: vasküler endotelyal büyüme faktörü C

Ang-1: Angiopoietin-1

IP-10: Interferon-gamma-inducible protein-10

CXC: Cysteine-X amino acid-Cysteine

ELISA: **E**nzyme-**L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay

HPV: human papilloma virüs

TNM: **T**- tümörün lokal yayılımı **N**- tümörün bölgesel (servikal) lenf nodu yayılımı, **M**- tümörün uzak organ metastazı

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

OL: Oral Lökoplaki

OEL: Eritroplaki

CEA: Karsinoembriyonik antijen

CA125: Kanser antijen 125

TPS: Doku polipeptid spesifik antijeni

Cyfra 21-1: Sitokeratin Fragment

CA19-9: Karbohidrat antijen 19.9

SCC: Squamous Cell Carcinoma – Associated Antigen

IL: İnterlökin

TNF-alfa: tümör nekrozis faktör-alpha

b-FGF: temel fibroblast büyüme faktörü

PIGF: Plasenta büyüme faktörü

Glu-Leu-Arg: glutamik asit- lösin-arginin

GP: Gerçek pozitifler

YP: Yalancı pozitifler

GN: Gerçek negatifler

YN: Yalancı negatifler

## ÖZET

Oğuz Soydiñ, H. (2012) Oral Mukozanın Prekanseröz Lezyonları ve Kanserlerinde Diagnostik Önemi Olabilecek Damarsal Belirleyicilerin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Oral kanserler morbidite ve mortalite açısından önemli bir hastalık grubudur ve hastalığın erken evrede teşhis ve tedavi edilmesi hastaların yaşama şansı ve yaşam kalitesi açısından oldukça önemlidir. Tümör büyümesi ve metastazında önemli bir mekanizma olan anjiyogenez, proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda kontrol edilemez. VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) endotelial hücre çoğalmasını ve anjiogenezi uyaran, damarlanmayı düzenleyen önemli bir glikoproteindir. Angiopoietin-1 (Ang-1) de kapiller damarları güçlendiren, perisitleri stabilize ederek endotel hücre yaşam süresini arttıran ve yeni oluşan vasküler yapıyı güçlendiren anjiogenik etkili bir moleküldür. Interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10)/CXCL10 anjiogenezi inhibe eden bir CXC kemokindir. Bu çalışmada oral prekanseröz lezyonu ve erken evre oral kanseri olan hastalardan (n=50) alınan doku örneklerinde VEGF-C, IP-10 ve Ang-1 immünohistokimyasal olarak incelendi, serum ve tükürük örneklerinde de aynı parametrelerin düzeyleri çift antikor sandüviç enzim immunoassay (ELISA) yöntemi ile belirlenerek sonuçlar sağlıklı kontrollerle (n=50) karşılaştırıldı. Serum VEGF-C ve IP-10 düzeyleri oral kanserli hastalarda, prekanseröz lezyonlu hastalara ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Serum Ang-1 düzeylerinde kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında anlamlı fark belirlendi ( $p<0.05$ ). Tükürük VEGF-C ve Ang-1 düzeylerinin oral prekanseröz lezyonlu ve kanserli hastalarda sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi ( $p<0.05$ ). Tükürük IP-10 düzeyleri oral kanserli hastalarda prekanseröz lezyonlu hastalara ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Klinik olarak daha önce oral prekanseröz lezyonlar ve oral kanser ile yapılan çalışmalar içinde VEGF, IP-10 ve Ang-1 parametrelerini birlikte, serum, tükürük ve doku olmak üzere üç ayrı örnekte belirleyen bir çalışma yapılmadığından faydalı bir çalışma olduğu kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Oral kanser, Prekanseröz lezyonlar, VEGF-C, Ang-1, IP-10

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1839

## ABSTRACT

Oğuz Soydiç,H. (2012). Investigation of Possible Diagnostic Vascular Markers in Precancerous Lesions and Malignancies of Oral Mucosa, İstanbul University, Institute of Health Science, Basic Oncology Department. PhD Thesis. İstanbul.

Cancers of the oral cavity constitute an important group of diseases considering morbidity and mortality. Early diagnosis of oral carcinomas is essential for increasing the survival rates and life quality of the patients. Angiogenesis is an important mechanism for tumor growth and metastasis. VEGF is an important signaling glycoprotein involved in angiogenesis. In vitro, VEGF has been shown to stimulate endothelial cell mitogenesis and cell migration. Ang-1 is a positive regulator of blood vessel development, remodeling, and maturation. IP-10 is a member of CXC chemokine family that inhibits bone marrow colony formation and angiogenesis. In the current study, we determined the tissue, serum and saliva levels of VEGF-C, Ang-1 and IP-10 levels in the premalignant oral lesions and early stage oral cancer (n=50) patients and healthy controls (n=50). We found that serum VEGF-C and IP-10 levels of oral cancer patients were higher than the patients with premalignant lesions and healthy controls ( $p<0.05$ ). Serum Ang-1 were significantly different between the oral cancer patients and the healthy controls ( $p<0.05$ ). Saliva VEGF-C and Ang-1 levels were higher than the healthy controls in the patients with premalignant lesions and oral cancer ( $p<0.05$ ). Saliva IP-10 levels of oral cancer patients were higher than the patients with premalignant lesions and healthy controls ( $p<0.05$ ). This is the first study that determines the serum, saliva and tissue values of these parameters in both premalignant oral lesions and oral cancer. We believe it will be useful for clinicians to decide the diagnosis/prognosis of oral cancer.

**Key Words:** Oral cancer, Premalignant lesions, VEGF-C, Ang-1, IP-10

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 1839

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Anjiogenez, kanserde metastatik potansiyel ve prognozla ilişkili olduğundan, hastalarda belirlenmesi hem tedavi, hem de takip açısından gerekli bir süreç olarak kabul edilmektedir. Anjiogenezin belirlenmesinde mikrodamar dansitesinin saptanması, anjiogenik faktörlerin kan (serum/plazma), idrar ve tükürük gibi vücut sıvılarında kantitatif olarak; immünohistokimyasal yöntemle anjiogenik proteinlerin doku düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi en çok kullanılan yöntemlerdir.

Bu çalışmaya oral prekanseröz lezyonu ve erken evre oral kanseri olan hastalar dahil edilmiştir. Tüm hastalardan alınan doku örneklerinde diagnostik ve /veya prognostik önemi olabilecek vasküler endotelial büyüme faktörü-C (VEGF-C), Interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) ve Angiopoietin-1 immünohistokimyasal olarak incelenmiş, serum ve tükürük örneklerinde de aynı parametrelerin kantitatif düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar sağlıklı kontrollerle karşılaştırılmıştır.

Çalışmaya hem prekanseröz lezyonlu, hem de erken evre oral kanserli hasta grubunun dahil edilmesinin sebebi kanserleşme riski yüksek olan prekanseröz lezyonlu hastaları erken dönemde belirleyebilmektir. Bu ayırım istatistiksel farklılıklar olarak hesaplanacaktır.

Oral kanserlerin tanısı biyopsi ile konulmakta ve bu hasta için zor olmaktadır. Oysa tükürükteki tümör belirleyiciler tanı koymaya yardımcı olursa non-invaziv bir yöntem olarak hem daha kolay olacak, hem de daha hızlı sonuç alınacaktır. Eğer tükürükte hastalığın tanı koyma aşamasında patolojiye yardımcı olacak hassas belirleyiciler tespit edilebilirse, hastalığın evrelemesi ve riskini belirlemede faydalı olabileceğini belirten görüşler mevcuttur. Biz de örnekleme ve saklama kolaylığı, pıhtılaşmaması ve hasta konforu göz önüne alındığında daha avantajlı bir çalışma materyali olarak görülen tükürüğün klinik olarak da bu parametreler açısından önemli bir tanısal araç olup olmadığını belirlemeye çalıştık.

Klinik olarak daha önce oral prekanseröz lezyonlar ve oral kanser ile yapılan çalışmalar içinde VEGF-C, IP-10 ve Ang-1 parametrelerini birlikte, serum, tükürük ve doku olmak üzere üç ayrı örnekte belirleyen benzer bir çalışma bulunmamaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. ORAL KAVİTE PREKANSERÖZ LEZYONLARI VE KANSERLERİ

#### 2.1.1. ORAL KANSERLER

Oral kavite (ağız boşluğu), önde alt ve üst dudakların mukoza ve cilt birleşim hattından arkaya kadar uzanan, alttan ağız tabanı, üstten sert damak ve yanlarda yanak mukozası ile sınırlı anatomik boşluktur. Oral kavite örtücü doku işlevi yapan çok katlı yassı epitel (skuamöz epitel) ile döşelidir. Bu anatomik bölgeden gelişebilecek kanserler alt bölgeler olarak çeşitli gruplarda incelenir. Oral kanser denildiğinde dudak, alt ve üst çene alveoler mukozası, damak, dil, ağız tabanı ve oro-farinks bölgesiyle sınırlandırılmış alanda görülen olgular anlaşılmaktadır. Oral kanserlerin 1/3'ü oro-farinks bölgesini tutarken geri kalan 2/3'lük bölüm oral kaviteyi tutmaktadır (1).

Dünya çapında en sık görülen kanserler içerisinde yer alan oral kanserler, oldukça yüksek morbidite ve mortalite oranına sahiptir. Diğer kanserler arasında görülme sıklığı olarak altıncı sırada yer alırken, dünyanın çeşitli coğrafik bölgelerinde bu insidans %1-40 arasında değişmektedir (2). Oral kanserler Avrupa ve Kuzey Amerika'da tüm kanser olgularının %2-6'sını oluştururken, Güney Doğu Asya ülkelerinde ve Hindistan'da farklı tütün kullanımı alışkanlıkları sonucu tüm kanser olgularının %45'ini oluşturmaktadır (1). Dünya Sağlık Örgütü'nün tespit ettiği en ölümcül sekiz kanser türü içerisinde yer almaktadır. Oral kanser insidansının yaş ile birlikte arttığı ve hastaların %95'inden fazlasının 40 yaş üzerinde olduğu bildirilmektedir. Oral kanser erkeklerde kadınlara oranla iki kat daha fazla görülmektedir (3).

Son yıllarda tıp dünyasında kaydedilen gelişmelere rağmen, oral kanser hastalarının sağ kalım oranlarında belirgin bir artış kaydedilememiştir. 1 yıllık sağkalım oranları %81 civarlarında iken 5 yıllık sağkalım oranları hastalığın tüm evreleri için %48 ile %56 civarlarındadır (4,5). Dünya Sağlık Örgütü tarafından oral kanserlerin %90'ından fazlasının potansiyel olarak önlenabilir nitelikte olduğu kabul edilmesine rağmen, gün geçtikçe artan insidansı ve mortalite oranı ile global bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Tüm gelişmelere rağmen beş yıllık sağ kalım oranlarında bir değişiklik kaydedilememesi ve oral kanserlerin çok büyük bir kısmının halen daha ileri evrelerde teşhis edilmesi, oral kanser taramalarının yetersiz ve erken teşhis

yapılabilmesi için biyopsi dışında yardımcı parametrelerin olmadığını göstermektedir (3).

Oral kavite kanserleri mukoza, tükürük bezi veya ağzın diğer yumuşak ve sert dokularından köken alan çok çeşitli türde kanserleri kapsamaktadır. Ancak bunların %90'ından fazlasını, mukozanın yüzey epitelinden gelişen yassı epitel hücreli karsinom oluşturmaktadır (5). Yassı epitel hücreli karsinom sıklıkla dilde (%27,6) görülmekte ve bunu orofarinks (%22,8), dudaklar (%16,5), ağız tabanı (%14), dişeti (%9,1), sert damak (%4,1) ve bukkal mukoza (%3,5) takip etmektedir (3).

Alkol ve sigara tüketimi, genetik faktörler, çevresel faktörler, dental travmalar, kötü oral hijyen yassı epitel hücreli karsinom etyolojisinde önemli yer tutmaktadır. Ayrıca tersiyer sifiliz, human papilloma virüs, beslenme bozuklukları, Plummer-Vinson sendromu ve prekanseröz lezyonlar oral kanserler için predispozan faktörler olarak kabul edilirler (6-8). Oral kavite kanserlerinde etyolojik ajanlar tabloda gösterilmiştir (Tablo2-1).

**Tablo 2-1: Oral kavite kanserlerinde etyolojik ajanlar**

---

**Oral kavite kanserlerinde etyolojik ajanlar**

---

Tütün (Sigara, pipo, puro)

Alkol

Virüsler (HPV-16 ve HPV-18)

Radyasyon / Ultraviyole (dudak)

Kronik irritasyonlar (kırık diş ve kronik enfeksiyonlar)

Baskılanmış immün sistem

Genetik faktörler

Kötü ağız içi hijyen

Yetersiz beslenme (Vitamin A, C, E & demir)

Prekanseröz lezyonlar

---

### **2.1.2. ORAL KANSERLERDE EVRELEME**

Tüm bölgelerin malignitelerinin evrelendirilmesinde olduğu gibi bu bölge malignitelerinde de **TNM** sistemi kullanılır. Burada **T-** tümörün lokal yayılımını **N-**

tümörün bölgesel (servikal) lenf nodu yayılımını, **M-** tümörün uzak organ metastazını göstermektedir (Tablo 2-2).

**Tablo 2-2:** Oral kanserlerde evreleme (9)

---

**Tis** karsinoma in situ

**T1** tümör 2 cm veya daha küçük boyutta

**T2** tümör 2-4 cm büyüklüğünde

**T3** tümör 4 cm'den büyük

**T4** tümör komşu dokuları tutmuş (kortikal kemik, derin dil kasları maksiller sinüs, deri gibi)

**NX** lenf nodu değerlendirilmedi

**N0** lenf nodu metastazı yok

**N1** ipsilateral, tek, 3 cm veya daha küçük boyutta lenf nodu

**N2a** ipsilateral, tek, 3-6 cm'lik lenf nodu

**N2b** ipsilateral, birden fazla, 3-6 cm'lik lenf nodları

**N2c** bilateral veya kontrlateral, 6 cm'den küçük lenf nodu veya nodları

**N3** 6 cm'den büyük lenf nodu

**MX** uzak metastaz değerlendirilmedi

**M0** uzak metastaz yok

**M1** uzak metastaz var

**Evre 0** Tis N0 M0

**Evre 1** T1 N0 M0

**Evre 2** T2 N0 M0

**Evre 3** T3 N0 M0, T1-2 N1 M0

**Evre 4** T4 N0-1 M0, T... N2-3 M0, T... N... M1

---



### 2.1.3. ORAL KANSERLERDE TEDAVI

Oral kavitenin T1 lezyonlarında radyoterapi ve cerrahinin etkisi eşittir. Lezyonun yeri, hastanın fiziki durumu ve sosyoekonomik özelliği tedavinin seçiminde önemli faktörlerdir. Radyoterapi ile konuşma ve yutma fonksiyonları yönünden iyi bir sonuç alınırken, hastalarda radyoterapi sonrasında tat duyusu kaybı ve ağız kuruması gözlenebilir.

Evre III ve IV kanserlerde cerrahi + radyoterapi uygun tedavi seçimidir. Adjuvan kemoterapinin yeri ise tartışmalıdır.

Lenf nodu metastazı olmayan boyun bölgesine (N0) ışın verilip verilmeyeceği de tartışmalıdır. T2-T4 oral kavite lezyonlarında metastatik potansiyel %30 civarındadır. Bu nedenle N0 boyuna cerrahi veya radyoterapik yaklaşım gerekli olmaktadır. Hatta bazı T1 oral kavite kanserlerinde bile N0 boyuna cerrahi yaklaşım savunulmaktadır (9).

### 2.1.4. ORAL KANSERLERDE PROGNOZ

Kanserde prognoz tümörün lokalizasyonu, evresi ve histolojik yapısına göre değişir. Oral yassı epitel hücreli karsinomlarında uzak metastaz, hastaların %15-20'sinde görülür ve prognozu kötüdür. Uzak metastazın en sık görüldüğü lokalizasyonlar sırasıyla akciğer (%66), kemik (%22) ve karaciğer (%9.5)'dir (10).

Oral yassı epitel hücreli karsinom lenf yoluyla metastaz yapar. Lenf nodu tutulumu kötü prognozun en önemli göstergelerinden biridir. Bu sebeple olguların %30-40'ında bölgesel lenf nodu metastazı vardır. Lenf yoluyla yayılma oranı pek çok tümöre göre daha fazla olduğundan sağkalımı düşüktür (11,12). Erken evre tümörlerde, daha klinik olarak lenf nodu tutulumu gözlenmezken, olası lenf metastazı riskini belirleyebilmek hastanın takibi ve tedavisinin planlanması için önemlidir (13). Oral yassı epitel hücreli karsinomlarda bu amaçla üzerinde en çok çalışılan parametre VEGF-C'dir (4,14,15).

Yassı epitel hücreli karsinom sıklığı toplumda giderek artmaktadır. Erken tanı ve tedavi yöntemlerine rağmen oral kanserlerin prognozu oldukça kötü olup 5 yıllık sağ kalım oranı düşük olduğundan prekanseröz lezyonların erken saptanması ve kemoprevensiyonu prognozun iyileştirilmesinde önemlidir. Prekanseröz lezyonların erken saptanması, primer ve sekonder prevensiyon stratejileri ile oral kanser gelişiminin engellenmesi güncel araştırma konularıdır. Riskli hastalarda kemoprevensiyon

prekanseröz lezyonların progresyonunu engelleyebilir (16). Bu sebeple erken tanı için biyopsiden daha kolay ve basit parametrelere ihtiyaç vardır.

## 2.2. PREKANSERÖZ LEZYONLAR

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 1997 yılında prekanseröz lezyon tanımını “normal haline göre kanserin daha kolay oluşabileceği, morfolojik olarak farklılaşmış doku” şeklinde yapmıştır (17). Malign dönüşüm potansiyeli taşıyan başlıca oral prekanseröz lezyonlar lökoplaki, eritroplaki, submukoz fibrozis, liken planus gibi epitelyal lezyonlardır.

### 2.2.1. ORAL LÖKOPLAKİ (OL)

Lökoplaki klinik ya da patolojik olarak herhangi bir hastalığa ait olmayan ve silindiğinde mukozadan uzaklaşmayan belirgin sınırlı oral beyaz lezyon olarak kabul edilmektedir (17). Oral mukozanın beyaz lezyonları; kalınlaşmış bir keratin tabakası, epitelyal hiperplazi, intrasellüler epitelyal ödem ve/veya alttaki bağ dokusunun azalmış vaskülaritesi gibi mukoza yüzeyindeki değişiklikler sonucu ışık dağılımının farklı olmasıyla meydana gelmektedir. Beyaz lezyonların iki ana sebebi olarak nekroz ve hiperkeratoz gösterilmektedir (18).

Lökoplakiler benzer klinik görünümüne karşın histopatolojik olarak benign hiperkeratozdan invaziv skuamöz hücreli karsinoma kadar değişen bir çeşitlilik gösterir (19). Bu klinik ve mikroskopik safhalar, lökoplaki olgularında gittikçe artan ciddiyeti göstermektedir. Klinik olarak lökoplaki ön tanısı konulan lezyonun histopatolojik olarak incelenmesi sonrasında lökoplaki tanısı yerini histopatolojik tanıya bırakır (20).

Histopatolojik bulgulara göre hastaya yaklaşım şu şekilde olmalıdır.

- Eğer displazi yoksa 6 aylık aralıklarla takip,
- Eğer displazi hafif, orta ise takip ve medikal tedavi
- Eğer displazi şiddetliyse total eksizyon, 1 aylık aralıklarla 1 yıl süreyle takip,
- Eğer karsinoma in situ ise kanser protokolü izlenir (18).

Oral mukozanın en sık rastlanan prekanseröz lezyonu olan lökoplaki ileri yaş (özellikle 50 yaş üzeri) ve erkek cinsiyette daha sık görülür. Sigara, alkol, tütün çiğneme, kötü ağız hijyeni gibi etkenler lökoplaki gelişiminde rol oynar. En çok oral

kavite ve larenks mukozasında görülür ve %15 - 40 arasında malignite riski taşırlar. Malign dönüşüm riski sigara kullananlarda daha fazladır.

Lökoplaki klinik görünüm olarak homojen (yüzeyi düzgün olan) ve homojen olmayan (yüzeyi düzgün olmayan) olarak iki grup altında incelenir. Eritroplaki ile beraber gözlenen homojen olmayan lökoplakilerin (eritrolökoplaki) malign transformasyon oranı homojen lökoplakilerden daha yüksektir (16).

13 yıllık bir sürede toplanan 3256 lökoplaki tanısı almış hasta örneklerinin incelenmesi sonucu; OL'nin bukkal, alveolar ve mandibular mukozada sık görüldüğü; dudak (%24), ağız tabanı (%42), ve dilde (%24) yerleşen lezyonlarda maligniteye dönüşümün daha sık olduğu bildirilmiştir (21). Oral lökoplakili 130 hastayı içeren diğer bir çalışmada da ağız tabanı, yumuşak damak, alveolar mukoza ve bukkal mukozadaki lezyonlarda displazi ve invaziv kanser riskinin arttığı bildirilmiştir (22). A vitamini, retinoidler, E vitamini ve bleomisin gibi çeşitli tedavi modaliteleri denemekte olsa da, lökoplakinin malign transformasyona uğramasını önleyecek bir tedavi yoktur (23). cOral prekanseröz lezyonların cerrahi eksizyon sonrası 7.5 yıllık takibinde ise %11'inde karsinom geliştiği saptanmıştır (16).

### 2.2.2. ERİTROPLAKİ (OEL)

Eritroplaki lökoplakiden daha nadir görülen ancak lökoplakilere kıyaslandığında 17 kat daha fazla kanserleşme riski taşıyan prekanseröz lezyondur. Klinik ya da patolojik olarak herhangi bir hastalığa ait olmayan oral mukozadaki kırmızı plaklardır. Sınırları belirgin olan lezyon, mukozadaki atrofi nedeniyle genellikle sığ bir çöküntü alanı biçimindedir. Yüzeyi düzensiz ve sarı-beyaz granüllü olabilir. Bir bölümü lökoplaki ile birlikte gözlenebilir (eritrolökoplaki). En sık bukkal mukoza, orofarinks ve ağız tabanında gözlenen, malign potansiyeli yüksek olan, yaklaşık %90 invaziv yassı epitel hücre karsinom, karsinoma insitu ve displazi gelişen bu prekanseröz lezyonun tanısı için biyopsi zorunludur (17).

### 2.2.3. SUBMUKOZ FİBROZİS

Oral dokuda sarı-beyaz renk değişimiyle üst gastrointestinal kanalın submukozal tabakasını etkileyen bir kollagen bozukluğudur. Genellikle Güneydoğu Asya ülkelerinin (özellikle Hindistan ve Pakistan) doğal bitkilerinden "betel quid; gutka" yapraklarını da içeren bir karışımın ağız içinde tutulması sonrasında oluşur. Kullanım alışkanlığına bağlı olarak damak ve yanak mukozasında bu lezyonlara daha sık rastlanır.

Lezyonların bulunduğu bölgelerdeki mukoza atrofik ve soluktur. Atrofiye rağmen soluk görünümün nedeni, bağ dokusundaki yoğun fibrozis ve yerel dolaşım bozukluğudur. Oral submuköz fibrozis lezyonları tek başına olabileceği gibi lökoplaki ve/veya eritroplaki ile birlikte bulunabilir. Lezyonlardan karsinom gelişmesi olasılığı %5 dolayındadır (16).

#### **2.2.4. ORAL LİKEN PLANUS**

Oral liken planus mukozanın rölatif olarak sık görülen kronik ve enflamatuar hastalığıdır. Özellikle sigara içenlerde görülen hipertrofik tipini klinik olarak oral lökoplakiden ayırt etmek güç olmaktadır. Bu durumda ayırıcı tanı histopatolojik olarak yapılmaktadır (20).

Histolojik olarak doğrulanmış 241 oral liken planus vakasının kayıtlarının retrospektif olarak incelendiği bir çalışmada 10 yıllık takip sonunda %3.7 hastada oral liken planus alanlarında invaziv yassı epitel hücreli karsinom veya in-situ karsinom geliştiği bildirilmiştir (16).

#### **2.2.5. KERATOAKANTOMA**

Genelde alt dudakta ve 50 yaş üzerinde daha sık gözlenen, kenarları kabarık ülser tarzında çok nadir görülen benign epitelyal bir tümördür. Yassı epitel hücreli karsinomdan klinik olarak ayırlamadığından tanı için biyopsi zorunludur.

#### **2.2.6. NİKOTİN STOMATİTİ**

Sıklıkla ileri yaşta ve erkeklerde, özellikle pipo kullanımının yarattığı termal etki sonucu sert ve yumuşak damakta gözlenen bir prekanseröz lezyondur. Tütün kullanımının kesilmesi ile lezyonlar dramatik şekilde geriler (24).

### **2.3. TÜKÜRÜK**

Tükürük, plazmayla eşit ya da daha düşük osmolaritede organik ve inorganik moleküller içeren akışkan bir sıvıdır. Primer olarak major ve minor tükürük bezlerinden salgılanmasına rağmen burun boşluğu, farinks ve ağız mukozasından gelen sıvılar da tükürüğün içeriğine katkıda bulunur (25). Major tükürük bezleri; parotis, submandibuler ve sublingual bezdir. Minor tükürük bezleri başta oral kavite ve farenks olmak üzere, tüm üst sindirim ve solunum yolu mukozası altında yaygın olarak yerleşir ve sayıları 700-1000 kadardır.

Tükürük bezleri salgılarının yapılarına göre müköz, seröz ve mikst olmak üzere üçe ayrılır. Müköz bezlerin salgısı musinden zengindir ve viskoziteleri yüksektir. Bu salgı daha çok mukoza kayganlığı sağlar ve mukozayı koruyucu özelliği vardır. Seröz bezler ise enzim ve mineralden zengin, akıcı ve sulu bir salgı üretir. Mikst (seromüköz) bezler ise barındırdıkları seröz ve müköz hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak salgı yapar (26).

Tükürüğün ağız sağlığının korunmasında önemli bir yeri vardır. Tükürük sekresyonunun azalması veya içeriğinin değişmesi diş, dişeti ve oral kavite hastalıklarına yol açar. Normal tükürük; renksiz, transparan, viskoz ve tatsızdır. Tükürüğün yoğunluğu 1003-1009 arasında değişir. Hipotonik bir sıvıdır. Viskozitesi 19-35 arasındadır. Tükürük pH'ı 6,7-7,4'dur (27). Erişkinde günde 1000-1500 ml. tükürük salgılanır. İstirahatte tükürüğün salgılanma hızı ortalama 0,05-0,3 ml/dk; uyarıldığında ise 0,18-1,7 ml/dk dır. Tükürük akış hızı gün içinde değişiklik gösterir. Akşam saatlerinde artan tükürük akış hızı geceleri düşer ve uykuda en düşük seviyeye ulaşır (25).

### **Tükürüğün Görevleri**

- 1- Tükürüğün, besinlerin parçalanmasında, ağız mukozasının ıslatılarak çiğneme ve yutma işlemlerinin kolaylaştırılmasında ve lokmanın özefagusa taşınmasında yardımcı rolü vardır. Tükürük bezlerinde bulunan aminooksidaz, aminoasitlerin parçalanmasında rol alır. Ayrıca tükürük yapısında bulunan pityalin ve amilaz, karbohidratların sindiriminde önemli rol oynar.
- 2- Tükürükte mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyen ve mukozayı enfeksiyondan koruyan bazı maddeler bulunur. Bunlar arasında aglutininler, histatin, immunoglobulinler, peroksidaz, lizozim, aminopeptidaz, laktoferrin sayılabilir. Bakteriostatik ve bakterisit etkisinden dolayı, ağız kokusuna neden olan bakterilerin üremesini engeller.
- 3- Tükürükle salgılanan bikarbonat ve fosfatlar, tamponlama görevi ile çürük oluşmasını engeller. Tükürük azlığında karbohidratların fermentasyonu ile asit oluşacağından, diş çürümesine yol açar.
- 4- Ağızdaki gıdaların tadının alınabilmesi için onların suda erimiş halde olmaları gereklidir. Ayrıca dildeki tat cisimcikleri tükürükle temizlenerek yeni uyarılara hazır duruma getirilir.

- 5- Konuşma için bukkal ve faringeal mukozanın yeterince ıslatılması önemlidir. Ağız kuruluğu durumunda konuşma zorlaşır.
- 6- Tükürük organizmanın pH değişimlerinde tampon etki yapar.
- 7- Tükürük organizmada ısı düzenleyicisi olarak rol oynar. Sıcak havalarda ısı artması nedeniyle kuruyan mukozadan, refleks yolla sulu tükürük salgısı meydana gelir.
- 8- İnorganik ve organik maddelerin çoğu tükürükle dışarı atılır. Çeşitli metabolizma artıkları, hormonlar ve toksinler tükürük yolu ile atılır.
- 9- Tükürükte defibrinolitik aktivite vardır. Ayrıca tükürükte, lipolitik aktivite, esteraz, maltaz, fosfataz, hyaluronidaz, katalaz ve mukolitik enzimler bulunur.
- 10-Tükürük bileşiminde bulunan kalsiyum, florur, fosfat, ve magnezyum gibi iyonlar diş minesine difuze olarak minenin olgunlaşmasını sağlar. Böylelikle çürüklere karşı daha dirençli bir yapı oluşur (25).

Tükürüğün normal bileşenleri arasında bulunmayan bazı maddeler pasif difüzyon, aktif taşınma gibi hücre içi ve ultrafiltrasyon gibi hücre dışı yollar aracılığıyla bu biyolojik sıvıya ulaşabilmektedirler. Serum bileşenlerinin de tükürüğe dışeti olduğu sıvısı aracılığıyla ulaşabildiği ve bazı tükürük proteinlerinin kaynağının serum olduğu bildirilmiştir.

Tükürüğün bir sistemik hastalığın tanısında kullanımı fikri ilk kez 1901 yılında Michaels tarafından ortaya atılmıştır (28). Bu düşünce tükürüğün bazı hormonal, immunolojik ve toksik moleküllerin doku düzeylerini yansıtabileceği gerçeğine dayanmaktadır. Ayrıca tükürüğün örnekleme ve saklama kolaylığı, pıhtılaşmaması ve hasta konforu, klinik olarak serumdan daha avantajlı bir tanısal araç olarak görülmesini sağlamıştır. Birçok biyolojik sürece dahil olan ve vücuttan tamamen girişimsel olmayan yollarla elde edilebilen tükürük örneklerinin kullanıldığı çalışmalarda proteomik veya genomik teknolojiler kullanılarak, biyolojik belirteçler geliştirilmeye çalışılmaktadır (29).

Tükürükteki biyolojik belirteçlerin sistemik hastalıkların değerlendirilmesinde artan bir şekilde kullanımı ve oral kavitedeki yassı epitel hücreli karsinomların %75'inin ağız içinde tükürüğün en çok göllendiği ve temasta olduğu mukozal alanda yer alması, tükürükte kanser belirteçleri ile ilgili çalışmaların gerçekleştirilmesini sağlamıştır. Oral yassı epitel hücreli karsinomlu hastaların serumlarında çeşitli epitelyal

kökenli tümör belirleyiciler çalışılmıştır. Oral kanserlerin tükürükle doğrudan ilişkili olmasına rağmen bu belirleyicilerin çoğunun tükürükte çalışılmamış olmasından yola çıkan Nagler ve arkadaşları, 14 dil tümörlü hastanın tükürük örneklerinde sık kullanılan altı tümör belirleyiciyi (CEA, CA125, TPS, Cyfra 21-1, CA19-9, SCC) çalışmışlar ve sonuçları 16 sağlıklı kontrolle karşılaştırmışlardır. Çalışılan parametrelerin tamamı hastalarda kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş, fakat istatistiksel anlamlılık sadece Cyfra 21-1, TPS ve CA125 için belirlenebilmiştir. Bu üç parametrenin kontrollere göre yaklaşık 400 kat daha yüksek bulunması, tükürükte diagnostik belirleyicilerin kullanılabilirliğini, ayrıca hasta takibinde özellikle de cerrahi ya da radyoterapi sonrası oluşmuş skarlar ile nükslerin ayırt edilmesinde faydalı olabileceği düşünülmüştür (30).

Oral yassı epitel hücreli karsinom tanısı biyopsi ile konulmaktadır. Oysa tükürükteki tümör belirleyiciler tanı koymaya yardımcı olursa non-invaziv bir yöntem olarak hem daha kolay olacak, hem de daha hızlı sonuç alınacaktır. Eğer tükürükte hastalığın tanı koyma aşamasında patolojiye yardımcı olacak hassas belirleyiciler tespit edilebilirse, hastalığın evrelemesi ve riskini belirlemede faydalı olabileceğini belirten görüşler de mevcuttur (31).

Son yıllarda sağlıklı bireylerle baş-boyun bölgesi kanser hastalarının tükürük örneklerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda, kanser hastalarında özgül proteinler için mRNA düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. p53 geninin kodon 63'ündeki mutasyonu, oral yassı hücreli karsinom için moleküler bir biyolojik belirteç olarak kabul edilmektedir. Meme kanserinde tükürükte yüksek düzeylerde c-erbB-2 bulunmaktadır ve bu düzeylerin değerlendirilmesi ile tedavi etkinliği takip edilebilmektedir (29).

Oral prekanseröz lezyonlu ve yassı epitel hücreli karsinomlu hastalar ile kontrollere ait tükürük örneklerinde IL-1, IL-6 ve IL-8 seviyelerine bakılan bir çalışmada, her üç parametrenin kontrollerde düşük, prekanseröz lezyonlu hastalarda yüksek, yassı epitel hücreli kanserli hastalarda daha da yüksek olduğu ve diagnostik/prognostik faktörler olabilecekleri sonucuna varılmıştır (32).

Oral kanser gelişiminin çok basamaklı bir süreç olduğunu; normal oral mukoza epitelinin sırasıyla prekanseröz lezyonlara, displastik lezyonlara ve oral kanserlere dönüştüğünü, ancak prekanseröz lezyon-kanser ayrımının sadece biyopsi ile yapılmasının hem klinisyen, hem de hasta için çok da konforlu olmadığını düşünen Jong EP ve arkadaşları, tükürüğün bu dönüşümde rol alan bazı belirleyicileri içeriğinde barındırabileceği fikrinden yola çıkarak bir çalışma planlamışlardır. Prekanseröz

lezyonlu ve oral kanserli hastalardan tükürük örnekleri almışlar, yaklaşık 855 proteinin tarandığı uzun bir aday protein belirleme süreci sonucunda aktin ve miyosin proteinlerinin prekanseröz lezyon ve kanser ayrımında kullanılabilecek umut verici non-invaziv testler olabileceği sonucuna varmışlardır (33).

## **2.4. ANJİOGENEZ**

Anjiogenez, önceden var olan damarlardan tomurcuklanma sonucu yeni damar oluşumudur (34). Anjiogenez terimi ilk olarak 1935 yılında plasentada yeni kan damarlarının oluşumunu ifade etmek için kullanılmıştır. Menstrüasyon, ovulasyon, gebelik, pre/postnatal doku gelişimi ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik durumların yanısıra, enflamasyon, dejeneratif ve metabolik hastalıklar, kollajen doku hastalıkları (romatoid artrit vb.), retinopatiler ve psöriasis gibi hastalıklar ile neoplaziler gibi olaylarda da önemli bir rol oynamaktadır (35).

Yeni kapiller damar oluşumu daha önceden varolan venül veya kapiller damarlardaki endotel hücrelerden kaynaklanır. Anjiogenik maddelerin salınımı ile oluşan endotel hücre aktivasyonu sonucu:

- (1) Ana damarın bazal membranının proteoliz ile parçalanması ve kapiller filizin oluşması,
- (2) Endotelyal hücre proliferasyonu,
- (3) Endotelyal hücrelerin anjiogenik uyarı kaynağına doğru göç etmesi,
- (4) Kapiller tüp oluşumu meydana gelir (36).

Anjiogenez, özgün uyarıcı (anjiogenik) moleküller ile başlatılır ve özgün baskılayıcı (antianjiogenik) moleküller tarafından durdurulur (Tablo 2-3). Anjiogenik ve antianjiogenik moleküller, endotel hücre döngüsü sırasında devamlı olarak ve birlikte faaliyet gösterirler (37).



**Tablo 2-3:** Anjiogenezi uyaran ve baskılayan faktörler

<b>Anjiogenik moleküller</b>	<b>Antianjiogenik moleküller</b>
Angiogenin	Arrestin
Angiopoietin-1, Anjiopoietin-2	Kallikrein bağlayan protein (KBP)
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	Endorepellin
Eritropoietin (EPO)	Endostatin
Fibroblast büyüme faktörleri (FGF)	Fibulin
İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1)	Trombospondin-1 (TSP-1)
İntegrinler	Trombospondin-2 (TSP-2)
İnterlökin-8	Büyüme faktörleri ve sitokinler
Hepatosit büyüme faktörü	İnterferonlar (alfa,beta, gama)
Leptin	İnterlökinler (IL-4, IL-12, IL-18)
Matriks metalloproteinazlar	Pigment epitel kaynaklı faktör (PEDF)
Nitrik oksit sentetaz	Trombosit faktör-4
Plasental büyüme faktörü (PIGF)	Troponin 1
Trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB (PDGF-BB)	Anjiostatin
Pleiotrophin	Antirombin
Doku faktörü/PAR	Plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI)
Transforming growth faktör-a (TGF-alfa)	Matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP)
Tümör nekrozis faktör-a (TNF-alfa)	Vazostatin
VE-kadherin	IP-10 (CXCL10)
VEGF	MIG (CXCL9)
	CXCL4

#### 2.4.1. TÜMÖR ANJIOGENEZİ

Tümör ile anjiogenez arasındaki bağlantıyı gösteren ilk çalışma 1963 yılında başlatılmış ve bu çalışma sonucunda izole perfüze organlara implante edilen tümörün büyümesi birkaç milimetreyi aşmamıştır. Buna karşılık donör kobaya implante edilen tümörün, implantasyondan sonra hızlı bir şekilde büyüdüğü, 1 cm<sup>3</sup> hacmini aştığı ve kobayı öldürdüğü görülmüştür. Bu durum tümörün izole perfüze organda vaskülarize

olmaması, buna karşılık tümörün kobayda vaskülarize olmasıyla açıklanmıştır (35). Tümörlerin anjiogeneze bağlı olarak büyüdüğü hipotezi, deneysel çalışmalar ve klinik gözlemler ile desteklendiğinden günümüzde yaygın olarak kabul görmektedir (38).

Solid tümörlerin beslenmesi, metabolik ürünlerin taşınması, büyümesi ve metastaz yapması için anjiogeneze ihtiyacı vardır. Çapı 2-3 mm'den küçük tümörler, besin desteğini mevcut damarlardan difüzyonla sağlayabilir. Ancak büyüebilmesi için kapiller damarların uyarılması ve yeni kapillerlerin oluşması gerekmektedir. (39). Hücreler oksijensiz kaldıklarında anjiogenik faktörler salgılayarak, yeni kapillerlerin gelişimini teşvik ederler (40, 41). Kan damarlarının besin ve oksijen sağlamak için tümör parenkiminin içine girmesiyle, infiltre olmaya çalışan immün hücrelere giriş rotası, sistemik dolaşıma metastaz yapmaya çalışan tümör hücrelerine de çıkış rotası sağlanır (42). Normalde her dokuda anjiogenez kapasitesi vardır ve bu mekanizma çok sıkı denetim altındadır. Tümör anjiogenezinde ise kan damarı oluşumunu denetleyen mekanizmalar neoplastik hücrelerce bozulmuş, bu bozulma sonucunda negatif düzenleyiciler azalırken pozitif düzenleyiciler artmıştır. Tümörün damarlanmasına yardımcı olan pozitif düzenleyici mekanizmaların, tümör hücrelerinin kendileri tarafından aktive edildiği gösterilmiştir (43).

Tümör hücrelerinin yeni oluşan damarların etrafında silindirik şeklinde ve 150-200 µm oksijen diffüzyon aralığı bırakarak dizildiğini gösterilmiştir. Tümör hücrelerine ilaveten, konak immün hücreleri de tümör anjiogenezinde rol oynayabilir. Makrofaj aktivasyonu birçok tümörde görülür ve bu durum tümör anjiogenezini güçlendirir. Aktive makrofajlar; tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-alfa) ve temel fibroblast büyüme faktörü (b-FGF) gibi anjiogenik maddeler sekrete edebilir (44).

Anjiogenez, tümör hücrelerinden ve tümör stromasındaki konak hücrelerden salınan anjiogenik moleküllerle düzenlenir. “Anjiogenik anahtar” olarak adlandırılan bir mekanizma ile anjiogenez uyarıcı ve baskılayıcı faktörler arasındaki denge sağlanmaktadır. Baskılayıcı konsantrasyonunda azalma, ya da uyarıcı seviyelerindeki artış ile denge değişebilmekte ve “anahtar” aktive olabilmektedir (45). Anjiogenik anahtar açıldığında iki yönlü parakrin stimülasyon başlar. Çoğalan tümör hücreleri tarafından uyarılan anjiogenik faktörler, endotel hücrelerinin çoğalmasını stimüle eder. Çoğalan endotel hücreleri tarafından sekrete edilen büyüme faktörleri de tümör hücrelerinin çoğalmasını uyarır (44, 39).

Tümör hücrelerinin damarlanma yolları:

Tümör hücreleri,

- (i) anjiogenik faktörleri sentez edebilirler,
- (ii) makrofajları uyarıp anjiogenik faktör salmak için aktive edebilir,
- (iii) spesifik kollojenaz ve heparinaz sentezleme kabiliyetinden dolayı, ekstrasellüler matrikste depolanan anjiogenik faktörleri salgılayabilir,
- (iv) birden fazla anjiogenik faktör salınımı yeteneğinde olabilir,
- (iv) postkapiller venüllerden fibrinojen sızıntısına sebep olan bir vasküler permeabilite faktörü salabilir.

Normal dokuda bulunan ve tümörlü dokudan salınan anjiogenik peptidler arasında çok az biyokimyasal farklılık vardır veya hiç yoktur. Tümöre cevap olarak oluşan yeni kapiller ve fizyolojik neovaskülarizasyon sürecinde oluşan yeni kapiller arasında da önemli morfolojik fark yoktur. Buna karşılık tümör anjiogenezisi ile fizyolojik anjiogenez arasındaki en önemli fark, tümöre bağlı anjiogenezin çok yoğun olması ve devamlılık göstermesidir. Tümör anjiogenezisi, neoplazm ortadan kalkıncaya veya hasta ölüncüye kadar devam eder. Yara iyileşmesi gibi fizyolojik anjiogenezde ise yara içinde yeni oluşan kapiller damarlar yoluyla doku oksijenlenmesi arttığından makrofajların anjiogenik kapasitesi sona ermektedir (35).

#### **2.4.2. ANJIOGENEZ VE METASTAZ**

Anjiogenez, metastaz oluşumunda en önemli mekanizmadır ve anjiogenez olmazsa tümör hücreleri sirkülasyona giremez. Tümör çevresindeki kan damarı artışı malign hücrelerin kan dolaşımına girmesini kolaylaştırmaktadır. Yeni oluşan kapillerler daha kırılabilir (frajil) bir bazal membrana sahiptir ve tümör hücreleri tarafından, olgunlaşmış damarlara oranla daha kolay invaze edilebilir. İnvaze olan kapiller, metastaz oluşumuna aktif olarak katılabilir ve vasküler alanlara tümör hücrelerinin girişini kolaylaştırarak sistemik yayılıma neden olur. Metastazın oluşması için tümör anjiogenezisi gereklidir, fakat yeterli değildir. Metastaz yapabilmesi için tümör hücresi proliferasyon olmalı, konak dokuyu invaze etmeli, damar içinde canlı kalmalı, konak immün sisteminden kaçmalı ve vücudun farklı bir yerinde büyümeye başlayabilmelidir (44).

İlk kez Srivastava, 1988 yılında bir melanom çalışmasında metastaz ile tümör kan damarları arasındaki ilişkiyi göstermiştir. Bu çalışmada; metastazlı vakalardaki tümör tabanındaki vasküler alan, metastazı olmayanlara göre iki kez daha fazla olarak tespit edilmiştir (46).

Neovaskularizasyonun yokluğunda tümörler, nadiren 2-3 mm. çapı aşarlar, nekrotik ve/veya apoptotik görünümde dirler; nispeten hareketsiz durumdadırlar ve sıklıkla klinik olarak tespit edilemezler (47). Vaskularizasyonla birlikte çoğalan hücrelerin popülasyonu önemli ölçüde artar. Hızlı bir büyüme, invazyon ve çevre dokulara bası oluşur. Anjiogenez invazyonu kolaylaştırır ve tümörün genişlemesine izin verir. Vaskularize bir tümörde tüm tümör hücreleri anjiogenik değildir. Çok iyi vaskularize tümörlerde bile mikrodamar dansitesinin düşük olduğu alanlar ve yüksek olduğu alanlar gözlenir. Yüksek oranda anjiogenik hücreler içeren tümörler daha büyük ihtimalle yaygın metastaz yapar. Deneysel çalışmalarda, neovaskularizasyondan önce, tümör hücrelerinin nadiren dolaşıma girdikleri gösterilmiştir. Yüksek mikrodamar dansitesi yüzey alanını arttırarak hücrelerin dolaşıma girmesini kolaylaştırır ve hücreler sürekli dolaşımda bulunurlar. Tümör hücresi başarıyla metastaz yapmış olsa bile hedef organda hemen vaskularize olmayabilir ve mikroskopik düzeyde kalabilir. Klinik veriler metastatik potansiyelin ve prognozun anjiogenez şiddetine bağlı olduğunu desteklemektedir. Bu nedenle anjiogenezin şiddeti belirlenmeye çalışılmaktadır. Bu konuda kullanılan yöntemler, mikrodamar dansitesinin saptanması, anjiogenik faktörlerin kan ve idrarda ölçülmesi, anjiogenik proteinlerin doku düzeyinin saptanmasıdır (48).

Özet olarak tümör anjiogenezinde;

- Negatif düzenleyiciler azalır.
- Pozitif düzenleyiciler artar.
- Anjiogenezi uyarıcı mekanizmalar tümör hücreleri tarafından aktive edilir.
- Hücreler oksijensiz kaldıklarında anjiogenik faktörler salgılayarak, yeni kapillerlerin gelişimini uyarır.
- Kan damarları, besin ve oksijen sağlamak için tümör parenkimi içine girer.
- Oluşturulan damarlar, infiltre olmaya çalışan immün hücrelere giriş rotası, sistemik dolaşıma metastaz yapmaya çalışan tümör hücrelerine de çıkış rotası sağlar.

### 2.4.3. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF) AİLESİ

Tümör hücreleri büyüme ve metastatik yayılım esnasında çeşitli büyüme faktörleri salgılar. Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri süper ailesinin üyesi olan vasküler endotel büyüme faktörü ailesi, in vivo ve in vitro koşullarda endotel hücrelerine yüksek derecede özgüllük gösteren güçlü anjiogenik faktörlerdir.

VEGF ailesinin yedi üyesi tanımlanmıştır: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F ve Plasenta büyüme faktörü (PlGF) (49).

**1) VEGF-A:** Vasküler endotel büyüme faktörü-A (VEGF-A) molekül ağırlığı 45 kD olan, endotel hücre çoğalmasını ve yeni damar oluşumunu uyaran, glikoprotein yapıda bir moleküldür. VEGF geni 6. kromozomun kısa kolunda (6p12) yer almaktadır (50). VEGF-A'nın içerdiği aminoasit sayılarına göre; VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 ve VEGF206 olmak üzere altı adet izoformu vardır (**51**). VEGF'nin önemli kaynağı megakaryositlerdir. Akciğer alveolar hücreleri, böbrek proksimal tübül hücreleri, arteriyelleri çevreleyen fibroblastlar, bronşiyal ve koroid pleksus epitel hücreleri, hepatositler gibi çeşitli vücut hücrelerinde, özellikle de malign tümör hücrelerinde (karaciğer, mesane, böbrek, over, mide, kolon, beyin ve meme kanserleri) sentezlenmektedir (52).

VEGF'in seçici olarak endotel hücrelerinde mitojenik etki ile damar gelişimini uarması, vücutta hem fizyolojik anjiyogenezde, hem de tümör büyümesi ve yayılmasında rol oynar (53). Anti-apoptotik proteinlerin sentezinin artması veya anti-apoptotik sinyal yollarının aktivasyonu ve damar geçirgenliğini artırıcı özelliği ile hücre göçünde etkilidir. VEGF'in bu özelliği damar duvarından proteinlerin sızmasına, fibrin matriks oluşumuna ve stromal hücrelerin invazyonuna yol açarak tümör hücrelerinin yaşaması için elverişli ortam hazırlamaktadır (54).

**2)VEGF-B:** Başlangıçta VEGF-A ile %23'ü özdeş olan bir sinyal peptidinin bölünmesinden sonra, 186 aminoasitli bir protein olarak oluşur (51).

**3)VEGF-C:** VEGF-benzeri protein olarak da bilinir. VEGF-A ile %16'sı benzeyen 388 amino asitten oluşmuştur (55).

**4) VEGF-D:** 334 aminoasitten oluşan ve VEGF-A'ya %31 oranında aynı amino asitler içeren bir proteindir. VEGF-C ile benzer işlevler yapar (56).

**5) VEGF-E:** VEGF-A ile amino asit dizilimi %25 oranında aynı olan bir polipeptittir. Güçlü bir mitojen ve permeabilite arttırıcı faktördür (57).

**6) VEGF-F:** VEGF'nin yapısına çok benzeyen, yılan zehirinde bulunmuş bir

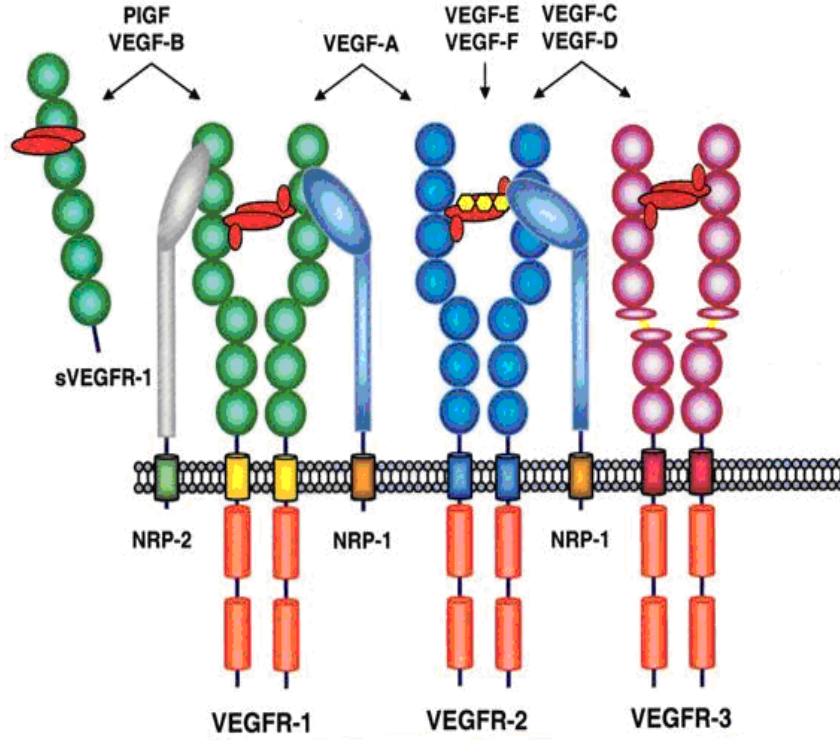
moleküldür. Bu molekül anjiogenezi VEGF-A'dan daha az arttırmasına rağmen, vasküler geçirgenliği VEGF-A'ya göre daha şiddetli arttırmaktadır (58).

**7) Plasental büyüme faktörü (PIGF):** VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. VEGF-A ile %37'si benzeyen 152 aminoasitten oluşmuştur (51).

#### **2.4.4. VEGF RESEPTÖRLERİ**

VEGF ailesinin etkilerini gösterebilmesi için, endotel hücreleri üzerinde bulunan özgün transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması gerekir. Bu reseptörler; VEGF reseptör-1 (VEGFR-1,flt-1), VEGF reseptör-2 (VEGFR-2,flt-1) ve VEGF reseptör-3'dür (VEGFR-3,flt-4). VEGFR-1 ve VEGFR-2, çözünebilir-VEGF reseptör-1 (sVEGFR-1) ve çözünebilir-VEGF reseptör-2 (sVEGFR-2) olarak serbest olarak da bulunmaktadır (Şekil 2-1). VEGF reseptörleri özgül ligandına bağlandığında dimerizasyona uğrayarak aktifleşir. Aktif hale gelen VEGF reseptörleri hücre içerisinde sinyal iletilisi sağlayan bazı proteinleri fosforile eder. Proteinlerin fosforile olması ikincil habercilerin oluşmasına katkıda bulunur ve mesaj hücre içine taşınır. Bu aktifleşme endotel aktivasyonuna, vasküler geçirgenliğe ve anjiogenezin artmasına yol açar (59).

VEGF ailesi üyeleri spesifik VEGF reseptörleri dışında nöronal reseptörler olan Nörofilin reseptörlerine de bağlanabilir. Endotel, nöron ve tümör hücrelerinde bulunan Nörofilin-1, VEGF165'in VEGFR-2'ye ilgisini arttırır. Nörofilin-2, VEGF165 ile birlikte VEGF145'i ve plasental büyüme faktörünü de bağlar (60).



**Şekil 2-1:** VEGF ailesi ve reseptörleri (61)

#### 2.4.5. VEGF-C

VEGF-C, VEGF-benzeri protein olarak da bilinir. VEGF-C salınımı çoğunlukla kalp, plasenta, kas, over ve ince barsaktan olur (55). VEGF-C, küçük bir öncül molekül olarak üretilir. Daha sonra proteolitik enzimler tarafından N ve C terminal uçları uzaklaştırılarak işleme uğrar (62). Olgun VEGF-C'nin VEGFR-3'e olan affinitesi daha fazladır ve VEGF-C'nin tam olarak aktif olmuş olgun formu VEGFR-2'yi aktive eder (55). VEGF-C'nin tümörü çevreleyen stromal hücrelerden ve tümör ilişkili makrofajlardan çok miktarlarda eksprese olduğu bildirilmiştir (63).

Lenfatik damar büyümesi olan lenfanjiogenez, fizyolojik durumlarda oluşabildiği gibi, yara iyileşmesi, inflamasyon, tümör lenfanjiogenezi ve tümör metastazı gibi patolojik olaylarda da gözlenir (64). VEGFR-3 lenfanjiogenezde kilit rol oynar. Primer tümör hücresinin, VEGF-C ve VEGF-D aracılığı ile lenfanjiogenezi başlatarak, lenfatik yayılımında direkt rol oynadığı gösterilmiştir (65). VEGF-C, VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak vasküler ve lenfatik endotel hücrelerinde mitojenik etki yapar (49).

VEGF-C'nin anjiogenezi uyarıcı özelliği diğer VEGF'lere göre daha azdır. Yapılan bir deneyde, transjenik farelerin derisinde VEGF-C'nin fazla salgılanmasının endotel hücre proliferasyonuna ve lenfatik damarlarda genişlemeye neden olduğu, buna karşılık vasküler doku oluşmadığı rapor edilmiştir (66). Tümör modellerinde VEGF-C'nin fazla salınımı lenf nodu metastazı gelişimi ile birlikte gitmektedir (67).

Akciğer, meme, prostat, serviks, kolon, mide kanseri ve malign melanom ile yapılan çalışmalarda, VEGF-C ve VEGF-D salınımının tümör progresyonu, lenfatik damar yoğunluğu ve lenf nodu metastazı varlığı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (68-71).

#### 2.4.6. ANGIPOİETİNLER

Angiopietin-1 (Ang-1) gelişen endotelyuma perisitlerin ve vasküler düz kas hücrelerinin katılımını, kan damarlarının olgunlaşmasını sağlayan ve yeni oluşan vasküler yapıyı güçlendiren anjiogenik etkili bir moleküldür. (72,73). VEGF gibi endotel hücreleri için mitojenik etki göstermeden endotel hücrelerinin kendi arasındaki ve çevredeki düz kas, perivasküler alan ya da ekstrasellüler matriks ile olan ilişkisini güçlendirir ve endotel hücre yaşam süresini artırır (74).

Ang-1, endotel hücre reseptörü Tie- 2'ye bağlanarak, VEGF'nin geçirgenlik artırıcı etkisini tersine çevirir, yani bir çeşit inhibitör görevi görür. Böylece düz kas hücrelerinin toplanmasını ve damarın olgunlaşmasını sağlar. Aşırı VEGF ekspresyonu çok sayıda geçirgen (sızıntı yapan) damar oluşumuna yol açarken, aşırı Ang-1 ekspresyonu, artmış yoğunluktaki ve çaptaki geçirgen-olmayan damarların oluşumuna neden olmaktadır (75).

Ang-2, Ang-1'in doğal bir antagonisti olup onunla aynı reseptöre, yani Tie2 reseptörüne bağlanmaktadır ve bu bağlanma damarı kararsız hale getirmektedir (76,77). Ang-1 ve Ang-2 arasındaki denge kan damarlarının stabilitesini, büyümesini ya da gerilemesini belirler. Her iki molekül de endotel hücre sayısını arttırmaz, VEGF ile uyarılmış neovaskularizasyonu düzenler.

VEGF varlığında, Angiopietin-2, Tie-2'ye bağlanarak endotel hücrelerinin stabilizasyonunu bozar ki bu da anjiyogenezin başlaması için gereklidir. Ang-2, Ang-1'e doğru olan endotel hücre göçünü bloke ederek, VEGF'in etkisini kuvvetlendirir ve yeni damar oluşumuna yol açar (78). Ang-2 ve VEGF artışı ve Ang-1 artmaması, yeni ve olgunlaşmamış damar oluşumunu uyarır (79).

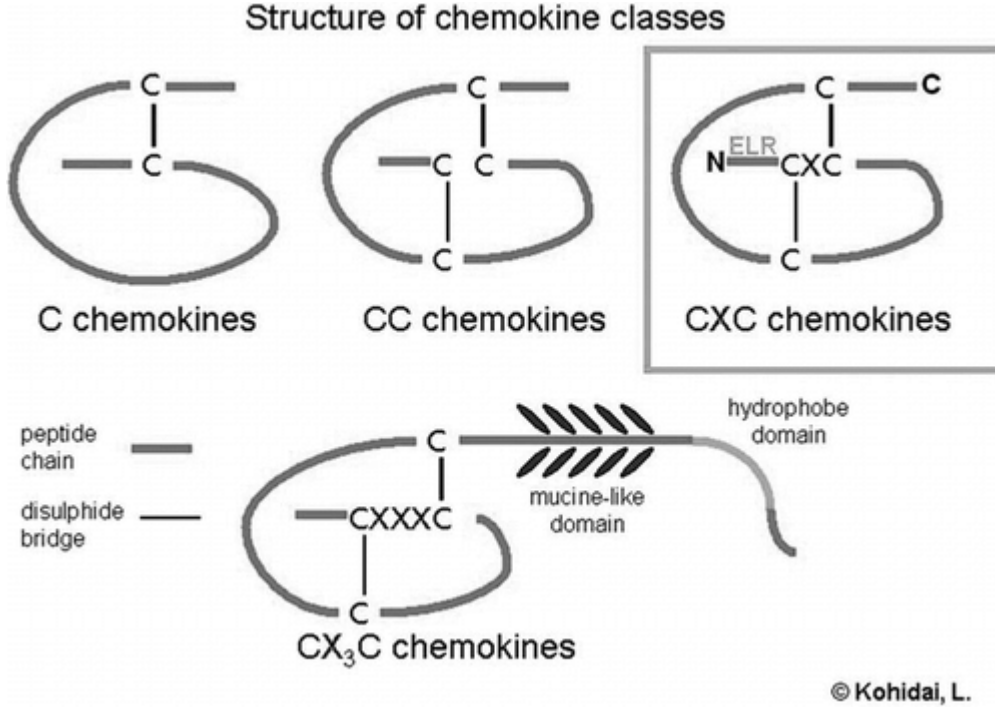


#### 2.4.7. INTERFERON-GAMMA-INDUCIBLE PROTEIN-10 (IP-10)/CXCL10

Interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10)/CXCL10, monosit, T lenfosit ve doğal öldürücü (natural killer) hücrelerinin göçünü uyararak, adezyon moleküllerinin ekspresyonunu etkileyen ve anjiogenezi inhibe eden bir CXC kemokindir (80).

Kemokinler insan kanserlerinde makrofaj ve lenfosit infiltrasyonunun önemli bileşenleri olması sebebiyle çeşitli kanserlerde eksprese edilerek lökositlerin hareketini doğrudan uyarırlar. Farklı hücre tiplerini aktive eden ve selektif olarak onlarla ilişki içerisinde olan kemokinler, inflamasyon, enfeksiyon, doku hasarı, allerji, kardiyovasküler hastalıklar ve tümör patofizyolojisinde rol alırlar. Bugüne kadar kemokin ailesine ait 30 adet kemokin ve 15 adet kemokin reseptörü tanımlanmıştır. Kemokinlerin uygun reseptöre bağlanması sonucunda sinyal iletimi ile uyarılan hücreler, doku zedelenmesi veya inflamasyon olan bölgeye göç etmek (kemotaksi) üzere harekete geçerler. Balkwill ve arkadaşlarının hipotezine göre tümörle ilişkili makrofajlar çeşitli sitokinler salgılayarak, bu salgıladıkları sitokinlere göre tümör progresyonunu uyarabilir veya baskılayabilirler (81).

Kemokinler, heparin bağlayan moleküller olup amino asit dizileri bakımından %20-75 oranında homoloji göstermektedirler. Kemokinler, yapılarında bulunan sistein (cysteine=C) kalıntılarının bulunduğu molekülün N-terminal ucundaki yerleşim pozisyonlarına göre CXC, CC, XC ve CX3C olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır (82, 83). CXC kemokinlerin yapılarında bulunan ilk 2 sistein kalıntısı tek bir aminoasit tarafından ayrılmış bulunmaktadır (Cysteine-X amino acid-Cysteine). CC kemokinler ise ilk iki sistein kalıntısı yan yana bulunan kemokinlerdir (Cysteine-Cysteine). CXXXC (CX3C) sınıfındaki fraktalkin, membran bağımlı glikoprotein yapısında olup ilk iki sistein kalıntısı üç aminoasitle ayrılmış konumda bulunmaktadır (84) (Şekil 2-2).



**Şekil 2-2: Kemokin yapıları (85)**

CXC kemokinler, N terminallerinde glutamik asit- lösin-arginin (Glu-Leu-Arg) dizilimi gösterenler (ELR kemokinler) ve göstermeyenler (non-ELR kemokinler) olarak biyolojik aktiviteleri farklı olan 2 alt gruba ayrılır (83). Glu-Leu-Arg diziliminin yokluğu nötrofillere karşı olan etkilerinin zayıf olmasına neden olur. ELR (+) CXC kemokinler güçlü bir anjiogenez destekçisidir. Karşıt olarak ELR (-) CXC kemokinler güçlü bir anjiogenez inhibitörüdür (Tablo 2-4).

**Tablo 2-4:** ELR motiflerine (Glu-Leu-Arg) göre anjiogenik ve antianjiogenik CXC kemokinler (80)

<b><u>Anjiogenik (ELR+)</u></b>	<b><u>Antianjiogenik (ELR-)</u></b>
IL-8 (CXCL8)	IP-10 (CXCL10)
ENA-78 (CXCL5)	MIG (CXCL9)
GRO-alfa (CXCL1)	ITAC (CXCL11)
GRO-beta (CXCL2)	CXCL4
GRO-gamma (CXCL3)	CXCL14
GCP-2 (CXCL6)	
PBP	
CTAP-III	
beta-TG	
NAP-2 (CXCL7)	

Tümörün sağkalımını mikroçevresindeki anjiogenik ve anti-anjiogenik kemokinlerin dengesi sağlar. Anjiogenik etkisi üzerinde en çok çalışılan CXC kemokin olan CXCL8 (interlökin-8)'in over, küçük hücreli dışı akciğer, prostat, meme, mide ve baş-boyun kanserlerinde anjiogenez ve metastaz oluşumunda önemli rolü olduğu gösterilmiştir. VEGF aktivasyonu arttığında bcl-2'nin ekspresyonunun artması sonucu CXCL8 ekspresyonunun arttığı ve endotel hücresi üzerinde anjiogenik etki gösterdiği belirtilmiştir (83, 86). CXCL9, CXCL10 (IP-10) ve CXCL11 ise endotel hücresinin CXCL8'e vereceği cevabı baskılayarak, vaskülarizasyon, tümör büyümesi ve metastazı baskılamakta ve anjiogenezi inhibe etmektedir (87).

IP-10 (CXCL10) üretimi Interferon-gamma, IL-2, IL-12, IL-18 ve IL-23 tarafından uyarıldığında vasküler hücre göçünü ve çoğalmasını engelleyerek tümör büyümesini ve metastaz oluşumunu baskılar (80, 88). Çeşitli epitelyal ve endotelyal hücre tiplerinin IP-10 (CXCL10)'a bağlanan çok sayıda spesifik reseptörleri olduğu bulunmuştur. IP-10, CXCR3 reseptörüne spesifik olarak bağlanmasının dışında hücre yüzey heparan sülfat glikozaminoglikana (GAG) da bağlanmaktadır (89). Luster ve Leder IP-10'un anti-tümör etkilerini araştıran ilk araştırmacılarıdır ve IP-10'un lipopolisakkaritlerin canlıdaki antitümör etkilerini düzenleyen önemli bir sitokin

olabileceğini belirtmişlerdir (90). IP-10 ekspresyonunun psöriaris, hipersensitivite reaksiyonları, deneysel glomerulonefrit ve allerjik ensefalomyelit gibi çeşitli dokuların inflamasyon durumlarında arttığı belirtilmektedir (91).

Normal prostat hücrelerinin, kanserli hücelere göre daha az anjiogenik kemokin (IL-8 gibi) ve daha fazla anjiostatik kemokin ürettiğini belirten Nagpal ML ve arkadaşları, insan prostat kanseri hücre soylarını aşırı miktarda CXCL10 (IP-10) ile uyardıklarında hücre çoğalmasının baskılandığını ve PSA (prostat spesifik antijen) üretiminin düştüğünü göstermişlerdir (92).

Teruya-Felstein J ve arkadaşları, nasal hücreli lenfoma, non-hodgkin lenfoma ve burkitt lenfomalı hasta grubu ile sağlıklı kontrollere ait serum IP-10 düzeylerini ELISA yöntemi ile belirlemişler ve nasal hücreli lenfomalı hastalarda kontrollere göre yüksek bulmuşlardır (93).

Evre II-III kolorektal kanser (adenokarsinom) dokularında ise IP-10 ekspresyonunun azaldığı, nüks ve metastazlı vakalarda daha da düşük olduğu bulunmuş; sağkalım takibi sonucunda düşük IP-10 düzeylerine sahip hastaların 5-yıllık hastalısız sağkalımının daha kısa olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda araştırmacılar IP-10'un kolorektal kanserlerde önemli bir prognostik faktör olabileceği sonucuna varmışlardır (94).

Bu çalışmada oral kavitede prekanseröz lezyonu olan hastalarla, malignitesi olan hastaların serum ve tükürük örneklerinde vasküler endotelial büyüme faktörü-C (VEGF-C), Interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) ve angiopietin-1 düzeyleri belirlendi, aynı parametreler doku örneklerinde de immünohistokimyasal olarak incelendi.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. ARAŞTIRMADA KULLANILAN ÖRNEKLER

Çalışmaya 2007-2010 yılları arasında İ.Ü İstanbul Diş Hekimliği Fakültesi ve Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Kliniklerine başvuran oral kavite alt ve üst çene yerleşimli ağız mukozasında displazik değişiklikleri olan ve biyopsi alınması uygun görülen hastalardan gönüllü olanlar dahil edildi. Tamamen sağlıklı dokuları elde etme imkanımız olmadığından, çeşitli cerrahi işlemler sırasında çıkartılmış parçaları ve sağlıklı görünen ağız mukozalarını kontrol grubu olarak çalışmaya dahil ettik.

Hastalardan biyopsi ile doku örnekleri alınmadan önce sabah 8.00-12.00 saatleri arasında tükürük ve kan örnekleri alındı.

**Tükürük:** Gönüllülerden tükürük alma işleminin 1 saat öncesinde herhangi bir şey yememeleri ve içmemeleri istendi. Daha sonra gönüllülerden ağızlarını su ile çalkalayıp rahat bir pozisyonda oturmaları, başları hafif öne eğik, dudakları hafif aralık biçimde durmaları ve gelen tükürüğü steril dereceli ve kapaklı plastik tüpe en az 3 ml olacak şekilde biriktirmeleri istendi.

Hastalardan alınan tükürük örnekleri bekletilmeden hemen 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj (Hettich Micro 200R) edilip, ayrılan supernatant kısmı test sayısı tamamlanıncaya kadar -80°C 'de saklandı.

**Serum:** Hastalardan alınan kanlar 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj (Hettich Universal 32) edildikten sonra, ayrılan serumlar test sayısı tamamlanıncaya kadar -20°C'de saklandı.

**Doku:** Hastalardan klinik olarak 2 cm ve daha küçük lezyonlar eksizyonel biyopsi, daha büyük lezyonlar ise insizyonel biyopsi ile çıkartılıp İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi Bilim Dalı'na yollandı. Yollanan biyopsiler rutin işlemlerden geçirildi (% 10'luk tamponlanmış formolde fikse edildi, rutin doku takibinden geçirilip, parafin bloklar hazırlandı, parafin bloklardan hazırlanan 5 mikron kalınlığındaki kesitlerden bir bölümü hematoksilin – eozin ile boyanıp raporları hazırlandı). Bu olgulara ayrıca immunhistokimyasal olarak antiVEGF-C, antiIP – 10 ve Antiangiopoetin-1 primer antikörleri uygulandı. Çalışmamız için seçtiğimiz olgular içinde, 50 tane sağlıklı görünen ağız mukozası, 20 tane ağır ve orta derecede displazik ağız mukozası ve 30 tane ağız mukozasından kaynaklanan primer erken evre, lenf nodu

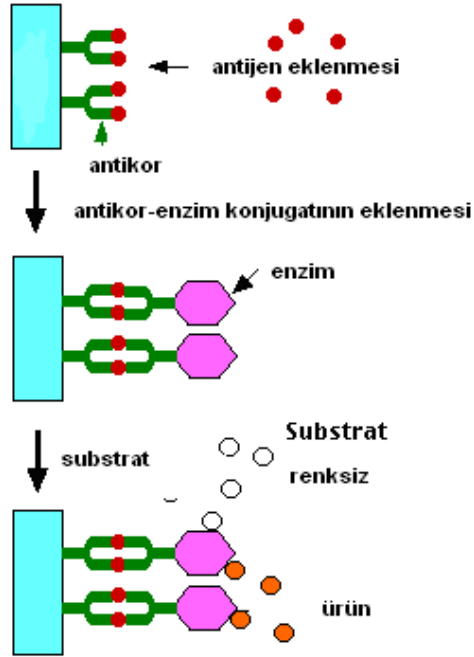
tutulumu olmayan yassı epitel hücreli karsinom olgusu yer aldı. Tüm biyopsi parçaları VEGF-C, IP-10 ve angiopoetin-1 ekspresyonu açısından incelenirken yok (0), az (1), orta (2) ve yoğun (3) olarak değerlendirildi.

## **3.2. ARAŞTIRMADA KULLANILAN YÖNTEMLER**

### **3.2.1. ELISA Yöntemi**

Serum ve tükürükte VEGF-C, IP-10 ve Ang-1 parametrelerinin belirlenmesi ELISA yöntemi ile yapıldı. Bu yöntem, kantitatif olarak protein miktarını belirlemek için kullanılan yöntemlerden biridir. ELISA yönteminde protein miktarını belirlemek için yapılan işaretleme radyoaktif maddelerle değil, enzim aracılığıyla yapılmaktadır.

ELISA terimi “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” sözünün baş harflerinden oluşur. Bu yöntemde reaksiyonun bileşenlerinden biri solid faza kaplanmıştır. Bu solid faz küçük kürecikler veya mikrotiter plaklar olabilir. Bu özellik serbest veya bağlanmış işaretli moleküllerin ayrılmasına yardımcı olur. Bilinen miktarda antijen ihtiva eden standartlar ve örnekler eklenip bunların antikor kaplı yüzeye bağlanması sağlanır. Bağlanmayan antijenin yıkama işlemi ile uzaklaştırılmasından sonra bağlanan antikordan farklı enzim işaretli ikinci antikor ilave edilir. Bu şekilde oluşan komplekse Antikor- Antijen- Antikor “enzim solid faz sandöviç kompleksi” denir. Bağlanmamış durumdaki sekonder antikorlar yıkama işlemi ile uzaklaştırılır ve enzimin substratı eklenir. Enzim substratı ile etkileşir ve örnekteki antijen miktarı ile doğru orantılı renk reaksiyonu oluşur. Bu renk reaksiyonunun absorbansı spektrofotometrede belli dalga boyunda okunur ve konsantrasyonu bilinen standartlarla çizilen standart eğri yardımıyla örneklere ait konsantrasyonlar belirlenir. ELISA yönteminin esası şematik olarak gösterilmiştir (Şekil 3-1).



Şekil 3-1: ELISA yönteminin esası

### 3.3. ARAŞTIRMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

#### 3.3.1. VEGF-C Elisa Kit (R&D Systems Minneapolis, USA )

Liyofilize VEGF-C Standart (rekombinant insan VEGF-C)

Assay Diluent RD1W (protein bazlı tampon)

VEGF-C Konjugatı (horseradish peroksidaza bağlı poliklonal VEGF-C antikor)

Kalibratör Diluent RD6U (hayvan serumu)

Renk reaktifi A (stabilize hidrojen peroksit)

Renk reaktifi B (tetrametilbenzidin)

Konsantre yıkama solüsyonu

Stop solüsyonu (2N sülfürik asit)

Anti VEGF-C kaplı mikroplate

#### 3.3.2. Ang-1 Elisa kit (R&D Systems Minneapolis, USA)

Liyofilize Ang-1 Standart (rekombinant insan Ang-1)

Assay Diluent RD1-20 (tampon)

Kalibratör Diluent RD5P (protein bazlı tampon)

Ang-1 Konjugatı (horseradish peroksidaza bağlı monoklonal Ang-1 antikoru)

Renk reaktifi A (stabilize hidrojen peroksit)

Renk reaktifi B (tetrametilbenzidin)

Konsantre yıkama solüsyonu

Stop Solüsyonu (2N sülfürik asit)

Anti Ang-1 kaplı mikroplate

### **3.3.3. IP-10 Elisa kit (R&D Systems Minneapolis, USA)**

Liyofilize IP-10 Standart (rekombinant insan IP-10)

Assay Diluent RD1-56 (protein bazlı tampon)

Kalibrator Diluent RD5K (protein bazlı tampon)

Kalibrator Diluent RD6Q (hayvan serumu)

IP-10 Konjugatı (horseradish peroksidaza bağlı poliklonal IP-10 antikoru)

Renk reaktifi A (stabilize hidrojen peroksit)

Renk reaktifi B (tetrametilbenzidin)

Konsantre yıkama solüsyonu

Stop Solüsyonu (2N sülfürik asit)

Anti IP-10 kaplı mikroplate

### **3.3.4. VEGF-C Antikor (R&D Systems Minneapolis, USA)**

### **3.3.5. Ang-1 Antikor (R&D Systems Minneapolis, USA)**

### **3.3.6. IP-10 Antikor (R&D Systems Minneapolis, USA)**

### **3.3.7. Cell & Tissue Staining Kit (R&D Systems Minneapolis, USA)**

## **3.4. ARAŞTIRMADA KULLANILAN GEREÇLER**

Santrifüj (Hettich Universal 32 )

Santrifüj (Hettich Micro 200R)

Pipet takımı (Finnpipette)

Karıştırıcı (Es-clot rotative shaker ES-24)

Mikroplate yıkayıcı ( Medispec ESW- Microplate washer)

ELISA okuyucu ( Rayto, RT-1904C Chemistry Analyzer)

Ksilol, %99'luk alkol, %96'luk alkol

Antijen retrieval reagent (EDTA Buffer, Citrat buffer)

Fosfat buffer solüsyonu



%3'lük hidrojen peroksit (3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Blokaj Solüsyonu

Amonyaklı Su

Su bazlı kapatma malzemesi

Distile su

Pappen kalemi

Pozitif şarjlı lam

Işık mikroskobu (Olympus BX60)

### **3.5. TESTLERİN YAPILIŞI**

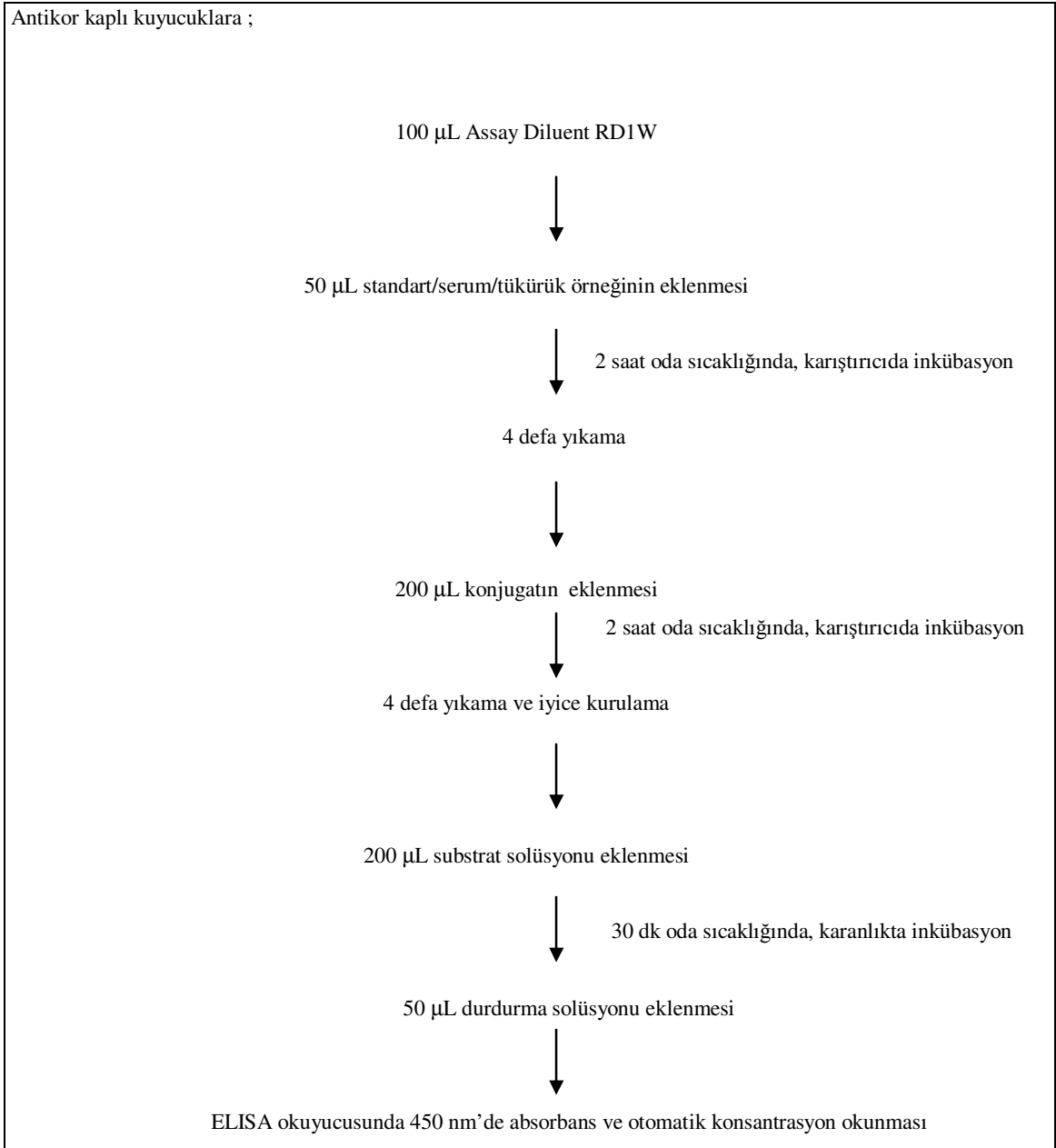
Hasta ve kontrol grubuna ait serum ve tükürük VEGF-C, Ang-1 ve IP-10 (R&D Systems Minneapolis, USA) düzeyleri ELISA yöntemi ile duplike olarak çalışılarak, İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Kanser Biyokimyası ve Tümör Marker Laboratuvarlarında belirlendi. Doku VEGF-C, Ang-1 ve IP-10 düzeyleri ise immünohistokimyasal olarak İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi Bilim Dalı Laboratuvarında incelenmiştir.

#### **3.5.1. VEGF-C Düzeylerinin Belirlenmesi**

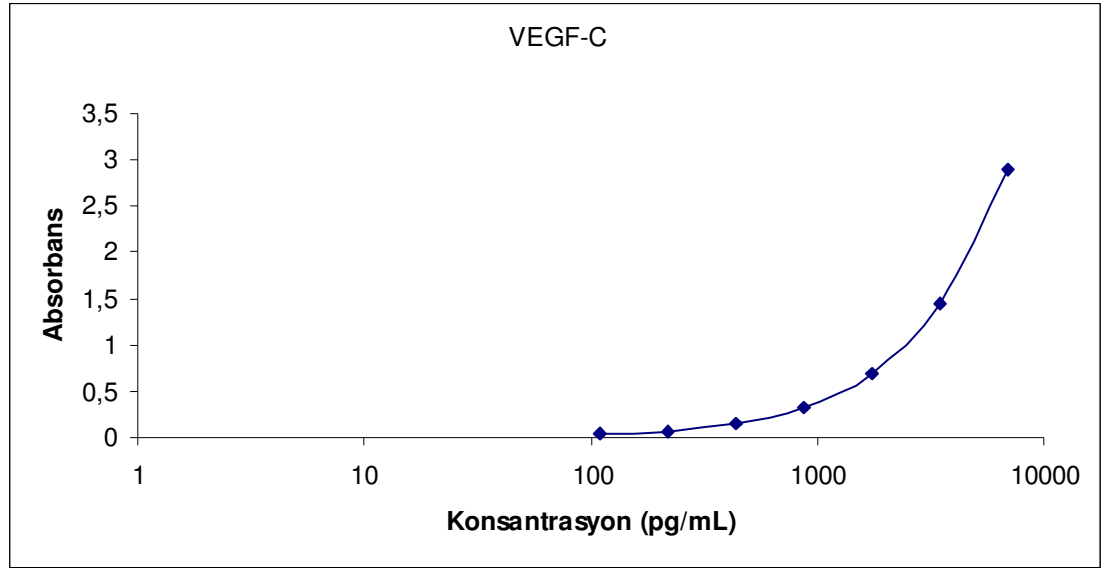
VEGF-C düzeylerini belirlemek için kullanılacak 109 pg/mL, 219 pg/mL, 438 pg/mL, 875 pg/mL, 1750 pg/mL, 3500 pg/mL ve 7000 pg/mL değerlerinde standartlar 70000 pg/mL stok standarttan Kalibrator Diluent RD6U kullanılarak hazırlandı. Serum ve tükürük örnekleri oda sıcaklığına getirildi. Çalışma protokolüne göre serum örnekleri Kalibrator Diluent RD6U kullanılarak 5 kat seyreltildi.

Tüm antikor kaplı kuyucuklara 100 µL Assay Diluent RD1W eklendikten sonra 50 µL standart, tükürük ve seyreltilmiş serum örnekleri otomatik pipet yardımıyla uygulandı. Mikrokuyucuklar oda sıcaklığında ve karıştırıcıda 2 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. 400 µL yıkama solüsyonu ile 4 defa yıkama yapıp (Medispec ESW- Microplate washer), iyice kurutulduktan sonra 200 µL biotin konjugatı eklenip, tekrar 2 saat boyunca oda sıcaklığında ve karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. 400 µL yıkama solüsyonu ile 4 defa yıkama yapıp 200 µL Substrat Solüsyonu (Renk reaktifi A + Renk reaktifi B) eklenerek, 30 dakika karanlıkta tekrar inkübasyona bırakıldı. Oluşan renk reaksiyonu 50 µL durdurma solüsyonu ilavesiyle durduruldu. 450 nm'de ELISA okuyucuda (Rayto, 2100C Chemistry Analyzer) örneklerin absorbanları ve konsantrasyonları ayrı ayrı okundu. Absorbanları okunan ve değerleri bilinen

standartlar yardımıyla semi-logaritmik olarak çizilen standart eğri grafiğinden hesaplanan konsantrasyon değerleri otomatik olarak okunan konsantrasyonlarla karşılaştırıldı. Belirlenen serum değerleri seyreltme katsayısıyla çarpılarak düzeltildi. Kullanılan testlere ait ELISA yönteminin uygulama şeması ve çizilen standart eğri grafiği şekilde şekilde gösterilmiştir (Şekil 3-2, Şekil 3-3).



**Şekil 3-2:** VEGF-C yönteminin akım şeması



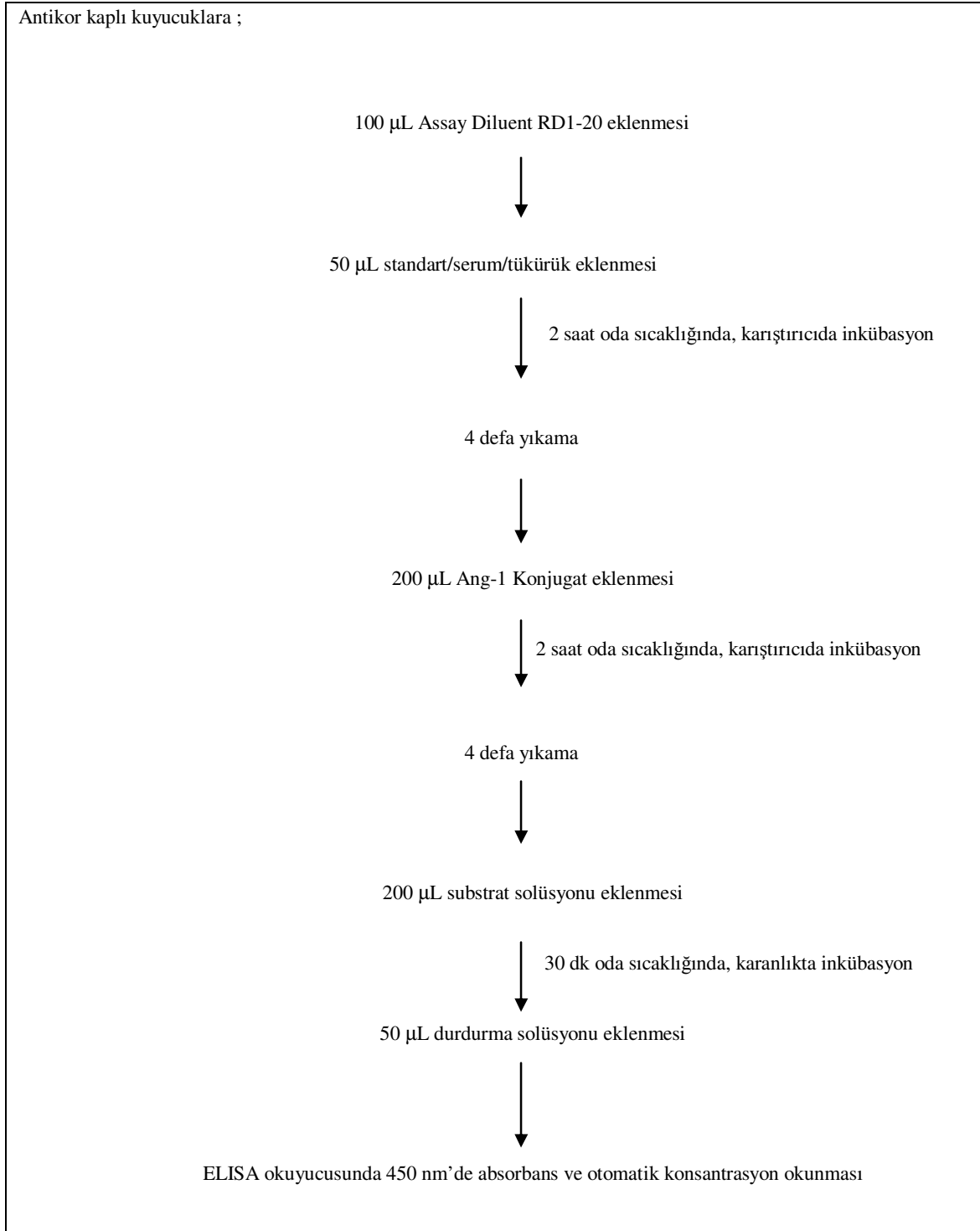
**Şekil 3-3:** VEGF-C'in standart absorbansları ve bilinen konsantrasyonları arasında çizilen standart eğri grafiği (Serum ve tükürük için aynı standart eğri kullanılmıştır)

### 3.5.2. Ang-1 Düzeylerinin Belirlenmesi

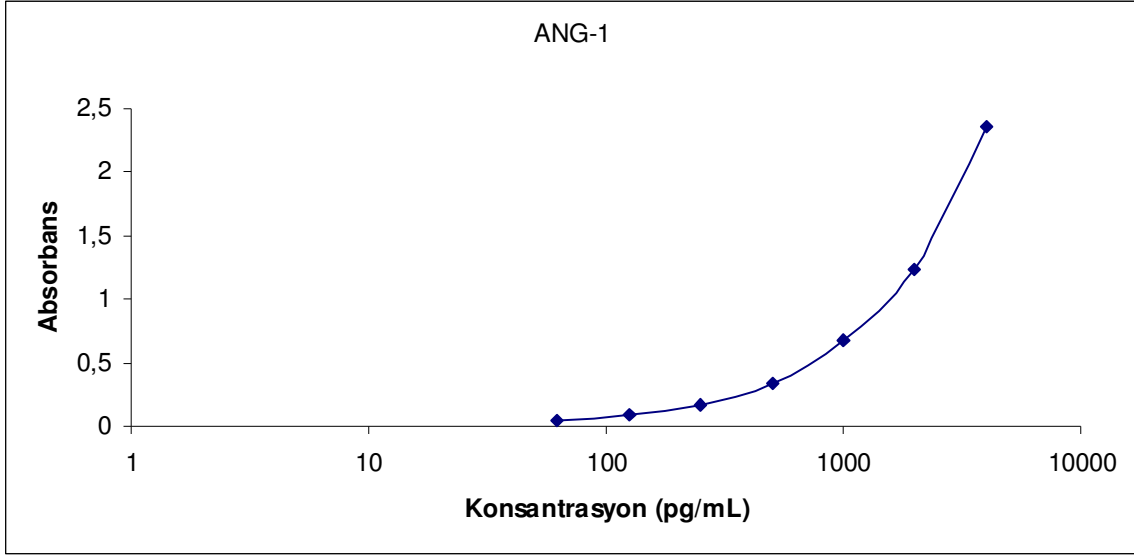
Ang-1 düzeylerini belirlemek için kullanılacak 62.5 pg/mL, 125 pg/mL, 250 pg/mL, 500 pg/mL, 1000 pg/mL, 2000 pg/mL ve 4000 pg/mL değerlerinde standartlar 40000 pg/mL stok standarttan Kalibrator Diluent RD5P kullanılarak hazırlandı. Serum ve tükürük örnekleri oda sıcaklığına getirildi. Çalışma protokolüne göre serum örnekleri Kalibrator Diluent RD5P kullanılarak 50 kat, tükürük örnekleri ise 2 kat seyreltildi.

Antikor kaplı kuyucuklara 100 µL Assay Diluent RD1-20 eklendikten sonra 50 µL standartlar ve seyreltilmiş serum ve tükürük örnekleri otomatik pipet yardımıyla uygulandı ve 2 saat oda sıcaklığında, karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. Yıkama solüsyonu ile 4 defa yıkayıp, (Medispec ESW- Microplate washer) 200 µL Ang-1 Konjugat eklendi ve yeniden 2 saat oda sıcaklığında, karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. 4 defa yıkama işleminden sonra 200 µL Substrat Solüsyonu (Renk reaktifi A + Renk reaktifi B) eklenerek, 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Oluşan renk reaksiyonu 50 µL durdurma solüsyonu ilavesi ile durduruldu. 450 nm'de ELISA okuyucuda (Rayto, 2100C Chemistry Analyzer) örneklerin absorbansları ve konsantrasyonları ayrı ayrı okundu. Absorbansları okunan ve değerleri bilinen standartlar yardımıyla semi-logaritmik olarak çizilen standart eğri grafiğinden hesaplanan konsantrasyon değerleri otomatik olarak okunan konsantrasyonlarla

karşılaştırıldı. Belirlenen değerler seyreltme katsayısıyla çarpılarak serum ve tükürükteki Ang-1 düzeyleri hesaplandı. Kullanılan testlere ait ELISA yönteminin uygulama şeması ve çizilen standart eğri grafiği şekilde gösterilmiştir (Şekil 3-4, Şekil 3-5).



**Şekil 3-4:** Ang-1 yönteminin akım şeması



**Şekil 3-5:** Ang-1'in standart absorbansları ve bilinen konsantrasyonları arasında çizilen standart eğri grafiği (Serum ve tükürük için aynı standart eğri kullanılmıştır)

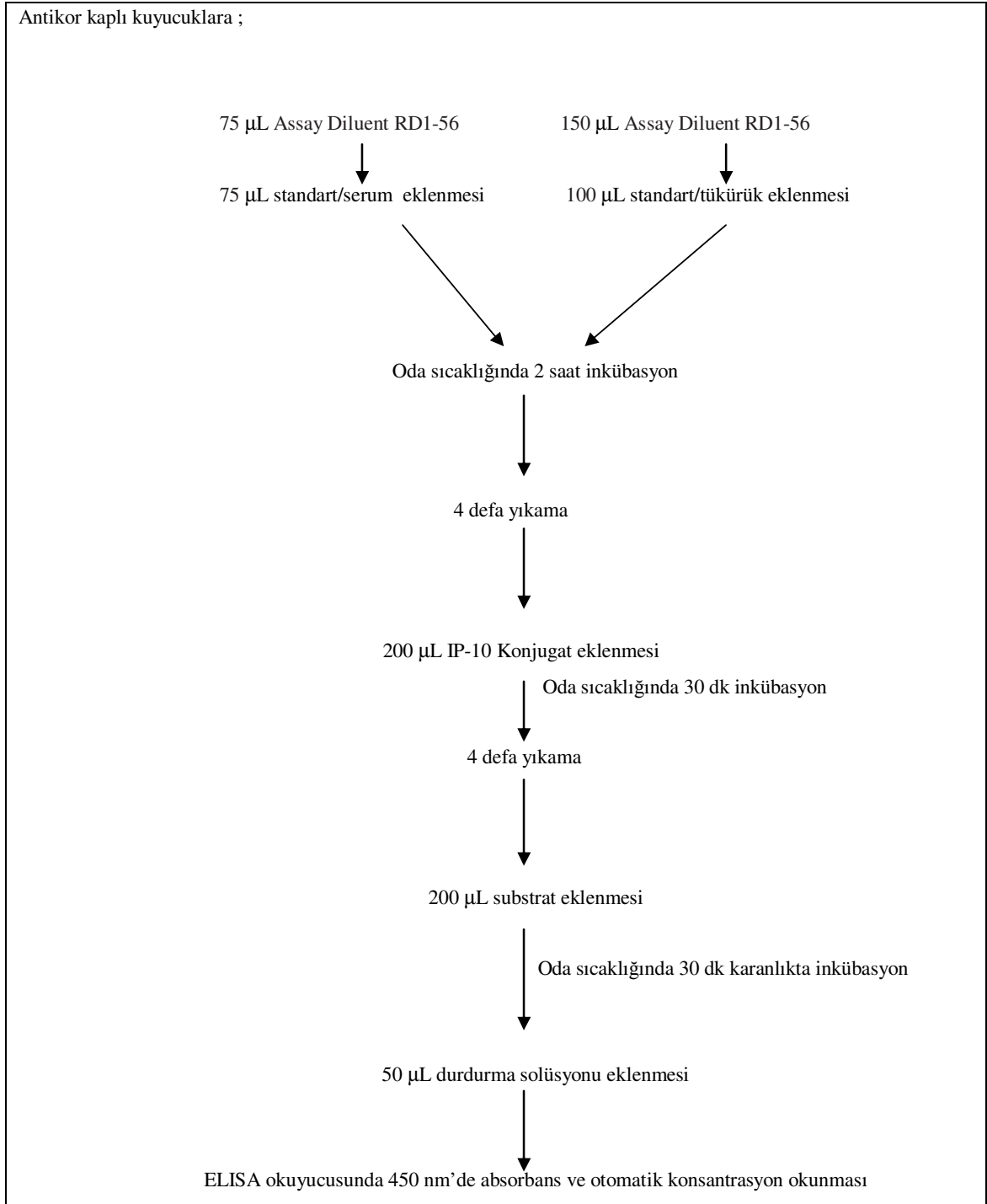
### 3.5.3. IP-10 Düzeylerinin Belirlenmesi

IP-10 düzeylerini belirlemek için kullanılacak 7.8 pg/mL, 15.6 pg/mL, 31.2 pg/mL, 62.5 pg/mL, 125 pg/mL, 250 pg/mL ve 500 pg/mL değerlerinde standartlar 40000 pg/mL stok standarttan tükürük örnekleri için Kalibratör Diluent RD5K, serum örnekleri için ise kalibratör Diluent RD6Q kullanılarak ayrı ayrı hazırlandı. Serum ve tükürük örnekleri oda sıcaklığına getirildi. Çalışma protokolüne göre tükürük örnekleri Kalibratör Diluent RD5K kullanılarak 5 kat seyreltildi.

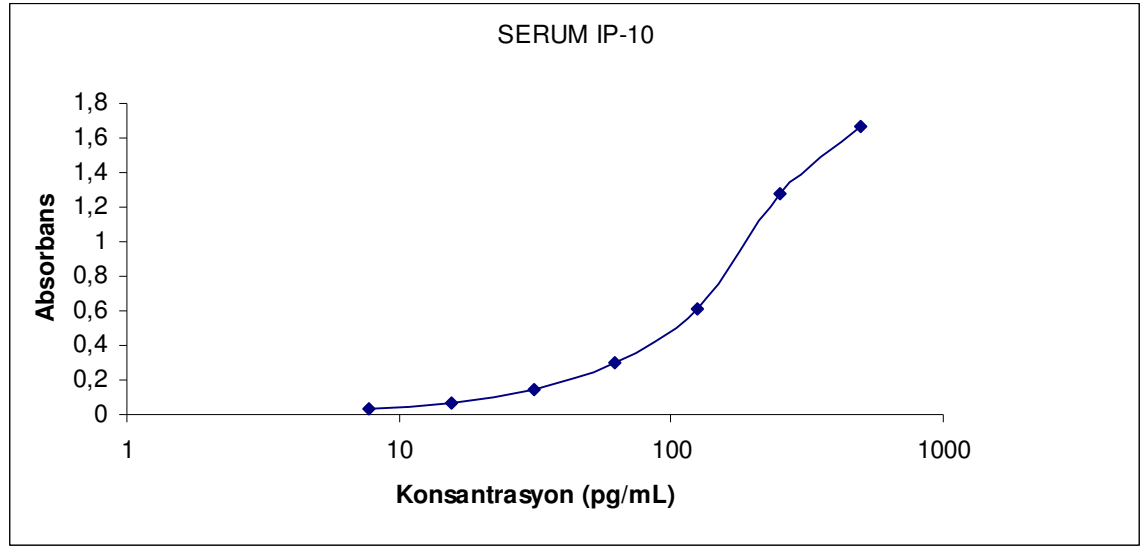
Tükürük örneklerini çalışmak için antikor kaplı kuyucuklara 150 µL Assay Diluent RD1-56 eklendikten sonra 100 µL standartlar ve seyreltilmiş tükürük örnekleri otomatik pipet yardımıyla uygulandı. Serum örnekleri için ise antikor kaplı kuyucuklara 75 µL Assay Diluent RD1-56 eklendikten sonra 75 µL standart ve serum örnekleri otomatik pipet yardımıyla eklendi, 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 400 µL yıkama solüsyonu ile 4 defa yıkandıktan sonra ( Medispec ESW- Microplate washer) 200 µL IP-10 Konjugat eklendi, 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Yıkama işlemi 4 defa tekrarlandıktan sonra 200 µL substrat solüsyonu eklenip, 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. 50 µL durdurma solüsyonu ilavesi ile reaksiyon durduruldu. 450 nm'de ELISA okuyucuda (Rayto, 2100C Chemistry Analyzer) örneklerin absorbansları ve konsantrasyonları ayrı ayrı okundu. Absorbansları okunan ve değerleri bilinen standartlar yardımıyla semi-logaritmik olarak

Çizilen standart eğri grafiğinden hesaplanan konsantrasyon değerleri otomatik olarak okunan konsantrasyonlarla karşılaştırıldı. Belirlenen tükürük değerleri seyreltme katsayısıyla çarpılarak asıl düzeyleri hesaplandı. Kullanılan testlere ait ELISA yönteminin uygulama şeması ve çizilen standart eğri grafikleri şekilde gösterilmiştir (şekil 3-6, şekil 3-7, şekil 3-8) .

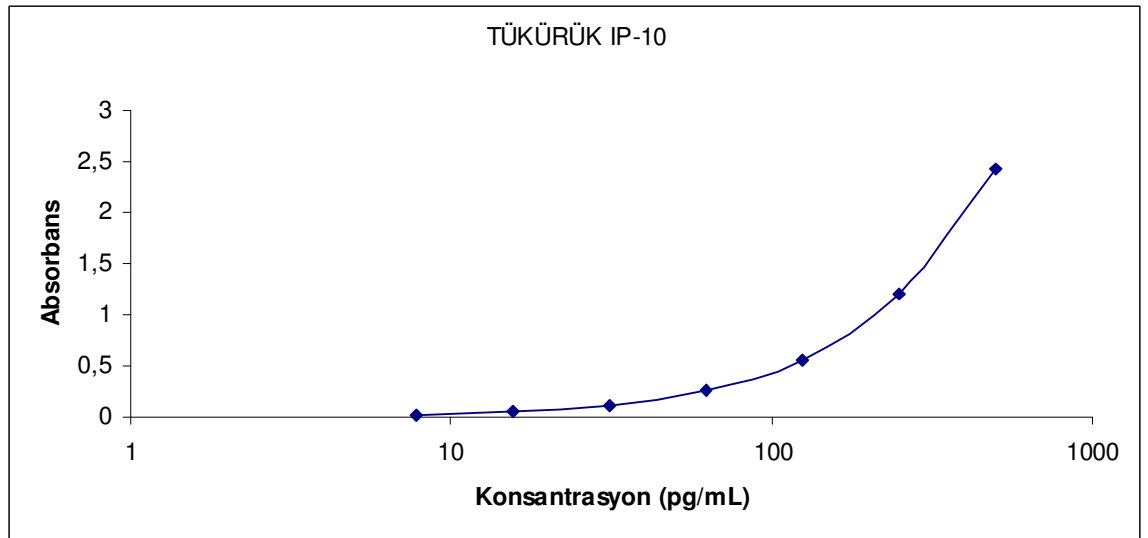




**Şekil 3-6:** IP-10 yönteminin akım şeması



**Şekil 3-7:** Serum IP-10'un standart absorbansları ve bilinen konsantrasyonları arasında çizilen standart eğri grafiği



**Şekil 3-8:** Tükürük IP-10'un standart absorbansları ve bilinen konsantrasyonları arasında çizilen standart eğri grafiği

### 3.6. İMMÜNİSTOKİMYASAL BOYAMA YÖNTEMİ

Rutin formol-parafin takibinden geçen dokulardan elde edilen parafin bloklardan pozitif şarjlı lamlara yaklaşık 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitlerin lam üzerine tam olarak yapışmaları ve deparafinizasyonu için lamlar bir gece boyunca etüvde 56°C sıcaklıkta bekletildi. Boyama işlemine başlamadan önce lamlar sırasıyla

ksilolde 30 dakika, 99°'lik alkolde 15 dakika, 96°'lik alkolde 15 dakika bekletilerek distile suya alındı.

Daha sonra kesitlere sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı :

1- Formalin fiksasyonu ile oluşan gizlenmiş antijenik bölgelerin açığa çıkarılması amacıyla Antijen Retrieval Reagent ile ön muamele yapıldı. Bu işlem için Citrat Buffer solüsyonu (Citrata Buffer (x10), 500ml, Thermo Scientific) kullanıldı. Antijen retrieval işlemi mikrodalga fırında 5 dakikadan dört kez uygulandı ve daha sonra 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğuyan lamalar distile suya alındı ve kesitlerin etrafı pappen kalem ile çizilerek 5 dakika Fosfat Buffer Solüsyonu'nda (PBS) (Phosphate Buffered Saline (x25), 500ml, Scytek Laboratories) bekletildi.

2- Endojen peroksidaz aktivitesinin önlenmesi için kesitler %3'lük hidrojen peroksitle ( $H_2O_2$ ) inkübe edildi. 20 dakika sonunda lamalar distile su ile yıkandı ve 5 dakika PBS'te bekletildi.

3- Non-spesifik zemin boyasını önlemek için kesitler 15 dakika blokaj solüsyonu (Super Block, 125ml, Scytek Laboratories) ile inkübe edildi.

4- Primer antikorlar VEGF-C (0,1 ml, concentrated, R&D Systems Minneapolis, USA), IP – 10 (0,1 ml, concentrated, R&D Systems Minneapolis, USA) ve angiopoetin-1 (0,1 ml, concentrated, R&D Systems Minneapolis, USA) damlatıldı. Süre sonunda lamalar distile su ile yıkandı ve 5 dakika PBS'te bekletildi.

5- Primer antikora bağlanacak olan sekonder antikor solüsyonu (Anti- Polyvalent Biotinylated Antibody, 125ml, Scytek Laboratories) damlatıldı ve 25 dakika inkübe edildi. Süre sonunda lamalar distile su ile yıkandı ve 5 dakika PBS'te bekletildi.

6- Sekonder antikora bağlanacak olan peroksidaz-streptavidin solüsyonu (Sensitek HRP, 125 ml, Scytek Laboratories) damlatıldı ve 25 dakika inkübe edildi. Süre sonunda lamalar distile su ile yıkandı ve 5 dakika PBS'te bekletildi.

7- Kesitler AEC kromojen solüsyonu (AEC chromogen/substrate kit, 125ml, Scytek Laboratories) ile 20 dakika inkübe edildi ve görünür hale getirildi. Süre sonunda lamalar distile su ile yıkandı.

8- Lamlar 3 dakika Mayer Hematoksilen'inde bekletildikten sonra musluk suyu ile yıkandı. Daha sonra 15 saniye amonyaklı suda bekletilerek distile suya alındı. Tüm preparatlar su bazlı kapatma malzemesiyle kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi.

### 3.7. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİNDE KULLANILAN İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 16 (SPSS 16, Chicago, IL, USA) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov- Smirnov / Shapiro-Wilk testleri) incelenmiştir. Tanımlayıcı analizler normal dağılan değişkenler için ortalama ve standart sapmalar kullanılarak verilmiştir. Verilerin normal dağılım gösterdiği belirlendiğinden, parametreler çalışma grupları arasında Student-t testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. İstatistiksel anlamlılık için tip-1 hata düzeyi %5 olarak kullanıldı. P değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirilmiştir (95).

Her bir parametreye ait özgüllük, duyarlılık ve doğruluklar sağlıklı kontrollerin aritmetik ortalama değerleri üst sınır alınarak aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır (95).

$$\text{Duyarlılık (\%)} = [\text{GP}/(\text{GP}+\text{YN})]\times 100$$

$$\text{Özgüllük (\%)} = [\text{GN}/(\text{GN}+\text{YP})]\times 100$$

$$\text{Doğruluk (\%)} = (\text{GP} + \text{GN}) / (\text{GP} + \text{GN} + \text{YP} + \text{YN})$$

GP: Gerçek pozitifler

YP: Yalancı pozitifler

GN: Gerçek negatifler

YN: Yalancı negatifler

#### 4. BULGULAR

Tamamı evre I-II, lenf nodu tutulumu olmayan yassı epitel hücreli karsinom tanısı almış olan kanserli hastalardan 12'si kadın, 18'i erkektir. Prekanseröz lezyonlu olan hastaların ise 9'u kadın, 11'i erkektir. Kontrol grubu 25 kadın ve 25 erkekten oluşturulmuştur. Yaş ortalamaları prekanseröz lezyonlu hastalarda  $51.36 \pm 12.88$ , kanserli hastalarda  $59.36 \pm 11.80$ , kontrol grubunda ise  $54.33 \pm 11.03$  olarak belirlenmiştir. Hastaların tütün ve alkol kullanımları sorgulanmış, tütün olarak sadece sigara tüketimi olduğu gözlenmiştir. Cinsiyete ve tanılara göre sigara ve alkol kullanımı tabloda gösterilmiştir (Tablo 4-1).

**Tablo 4-1:** Cinsiyete ve tanılara göre sigara ve alkol kullanımı

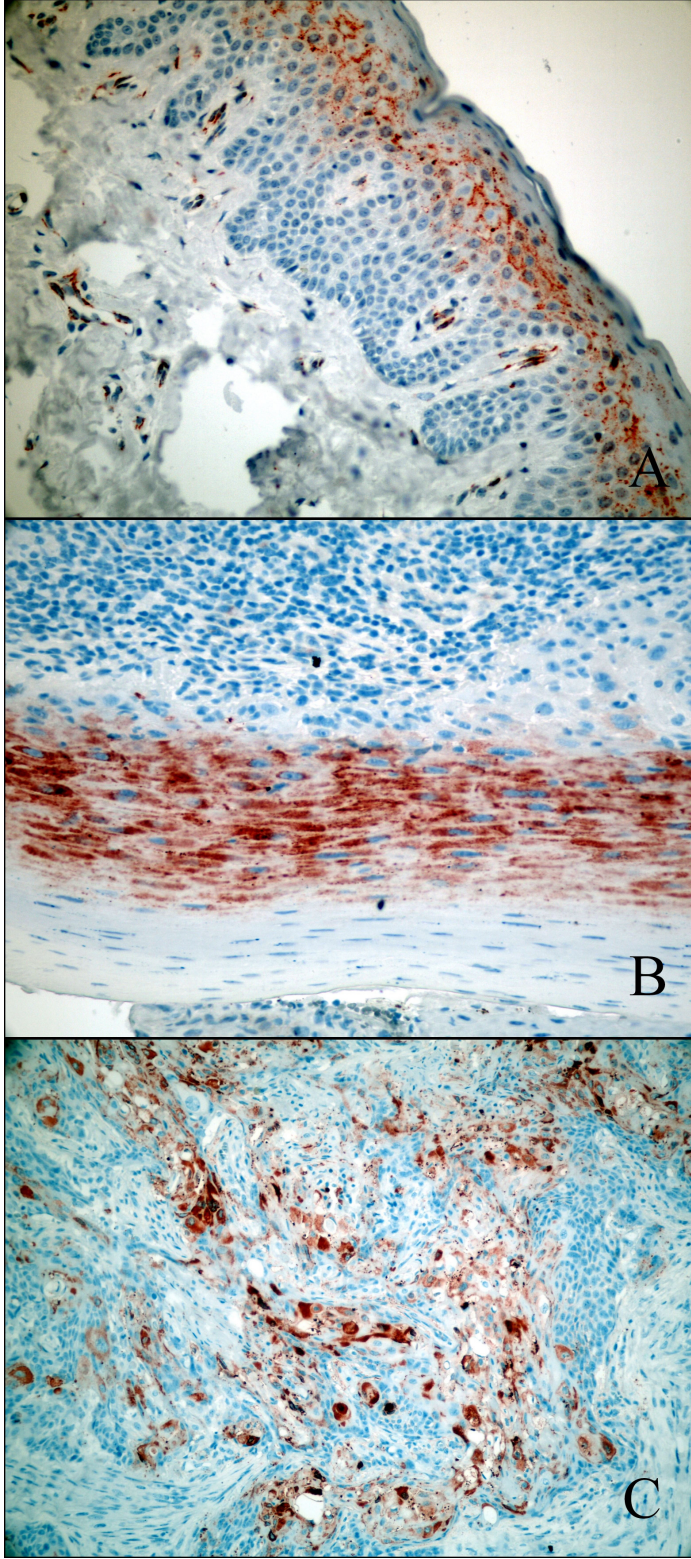
		CİNSİYET	
		KADIN (n)	ERKEK (n)
KANSER K:12 E:18	SİGARA (+)	10	15
	SİGARA (-)	2	3
	ALKOL (+)	2	12
	ALKOL (-)	10	6
PREKANSERÖZ K:9 E:11	SİGARA (+)	6	11
	SİGARA (-)	3	0
	ALKOL (+)	1	8
	ALKOL (-)	8	3

Çalışma gruplarına ait tüm doku parçaları VEGF-C, Angiopoietin-1 ve IP – 10 ekspresyonu açısından incelenmiş; yok (0), az (1), orta (2) ve yoğun (3) olarak değerlendirilmiştir.

Immunhistokimya sonuçlarına göre VEGF-C ekspresyonu kontrol grubunda en düşük, prekanseröz lezyonlu dokularda orta derecede ve oral kanserli hastalarda yüksek oranda gözlenmiştir (Şekil 4-1).

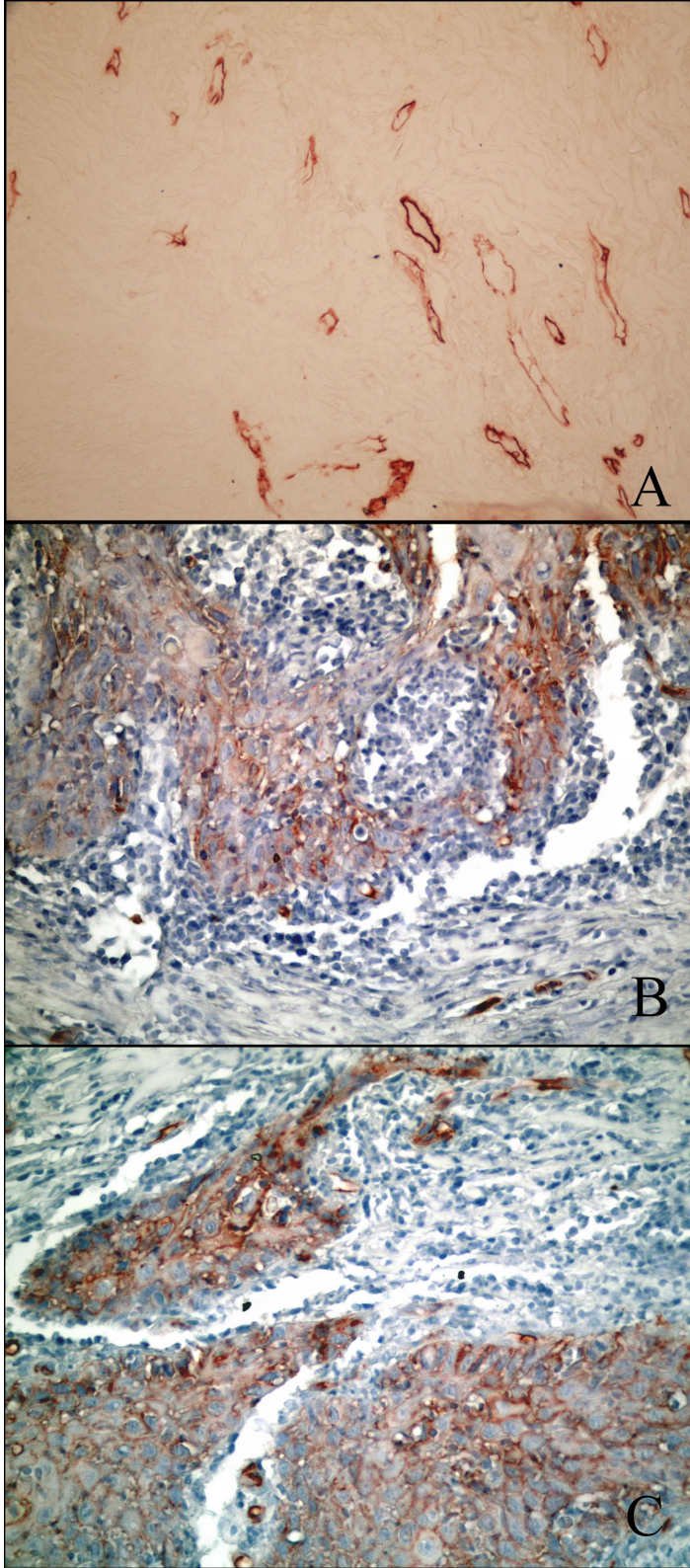
Ang-1 ekspresyonu VEGF-C'nin aksine kanser hastalarında en az (1) ekspresyon göstermiştir. Prekanseröz lezyonlarda tıpkı VEGF-C gibi orta derecede (2), kontrol grubunda ise en yoğun (3) ekspresyon belirlenmiştir (Şekil 4-2).

IP-10 ise VEGF-C ile benzerlik göstermekte, kanserli hastalarda en yüksek, kontrol grubunda ise en düşük ekspresyon sergilemektedir (Şekil 4-3).



Şekil 4-1: VEGF-C ekspresyonu (AntiVEGF-C primer antikoru X400)

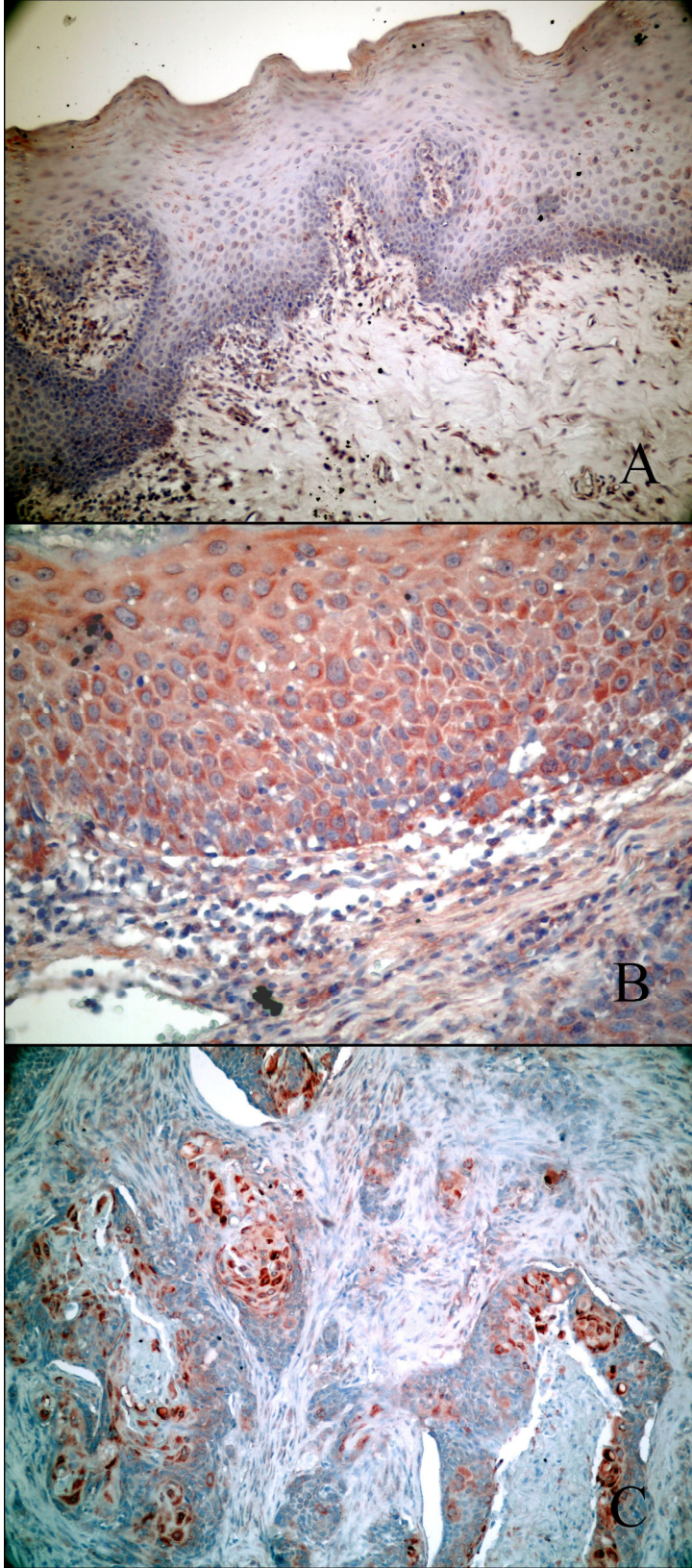
- A. normal epitel
- B. prekanseröz lezyon
- C. yassı epitel hücreli karsinom



Şekil 4-2: Ang-1 ekspresyonu (AntiANG-1 primer antikoru X400)

- A. normal epitel
- B. prekanseröz lezyon
- C. yassı epitel hücreli karsinom





Şekil 4-3: IP-10 ekspresyonu (AntiIP-10 primer antikorlu X400)

- A. normal epitel
- B. prekanseröz lezyon
- C. yassı epitel hücreli karsinom

Hasta ve kontrol gruplarına ait serum aritmetik ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 4-2).

**Tablo 4-2:** Gruplara ait serum aritmetik ortalama (x), standart sapma (sd), ortanca (m), minimum (min) ve maksimum değerleri (maks)

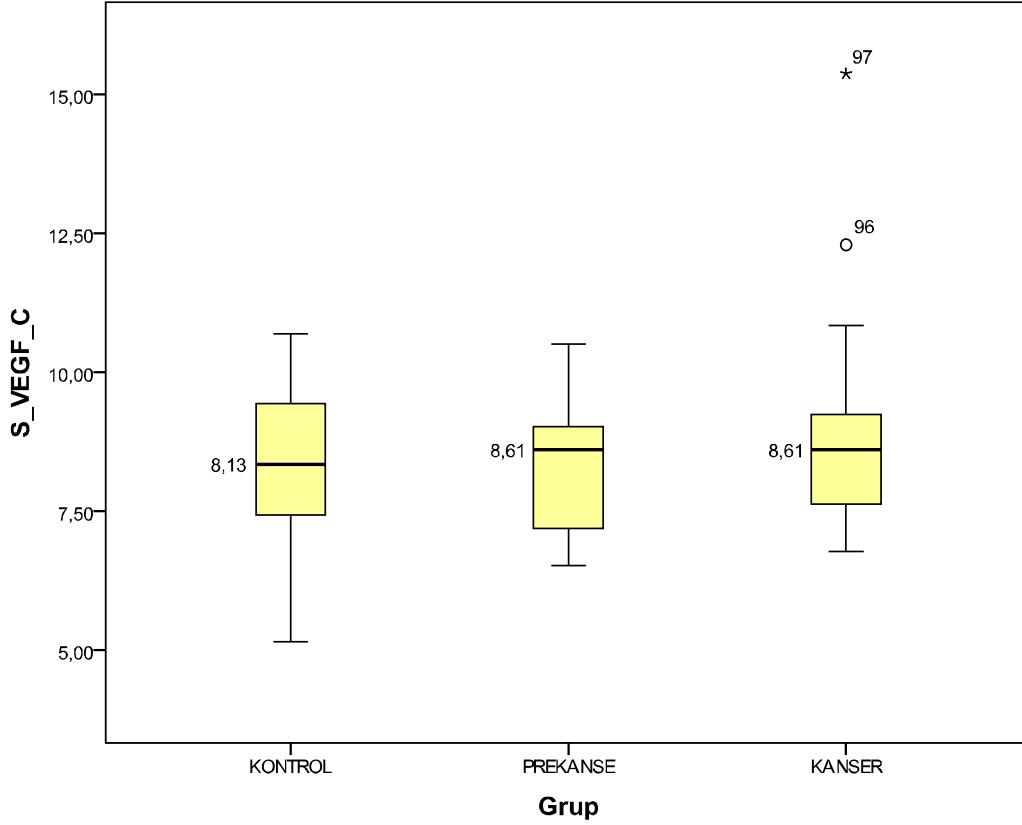
<b>SERUM</b>	<b>VEGF-C (ng/mL)</b> x±sd m (min,maks)	<b>ANG-1 (ng/mL)</b> x±sd m (min, maks)	<b>IP-10 (ng/mL)</b> x±sd m (min, maks)
<b>KONTROL (n=50)</b>	8.04±1.05 8.13 (5.15-10.70)	62.48±26.05 52.47 (21.37-151.29)	0.18±0.08 0.16 (0.08-0.25)
<b>PREKANSERÖZ LEZYON (n=20)</b>	8.23±1.36 8.61(6.52-10.51)	54.89 ±16.3 48.62 (14.99-80.34)	0.23±0.12 0.17 (0.11-0.39)
<b>KANSER (n=30)</b>	8.96±2.06 8.61 (6.78-15.38)	50.95 ±23.24 65.01 (30.05-135.77)	0.27±0.10 0.21 (0.11-0.43)

Hastalar ve kontrollere ait tükürük aritmetik ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 4-3).

**Tablo 4-3:** Gruplara ait tükürük aritmetik ortalama (x), standart sapma (sd), ortanca (m), minimum (min) ve maksimum değerleri (maks)

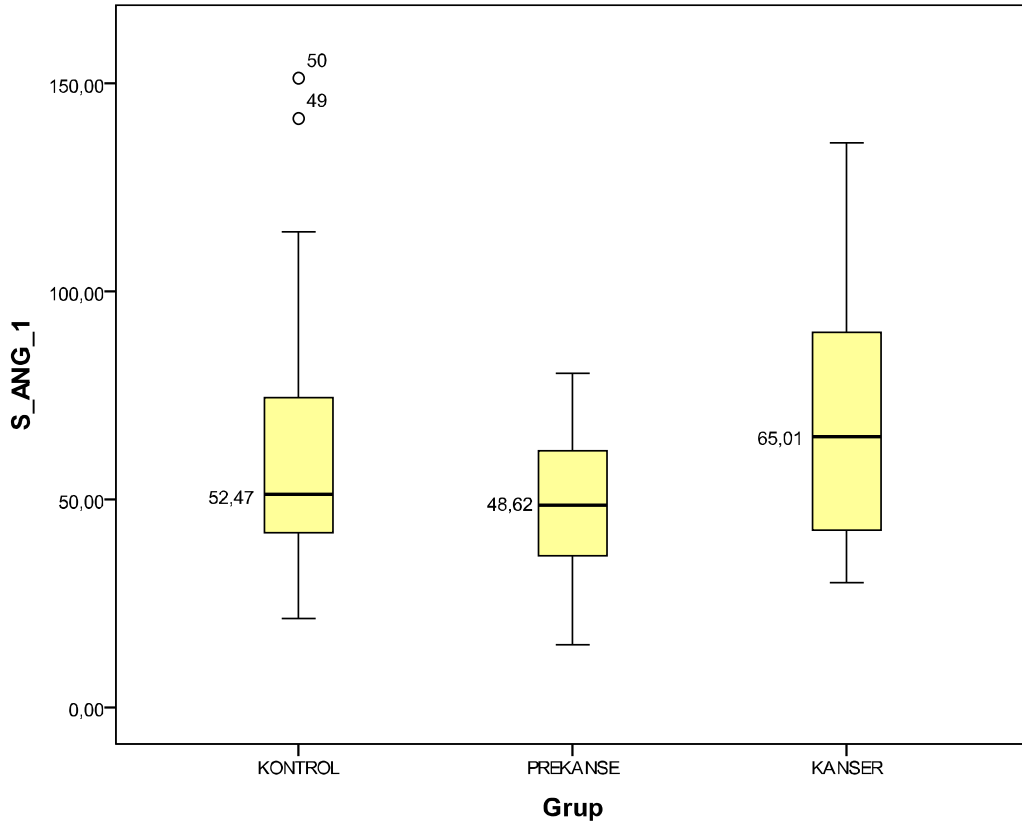
<b>TÜKÜRÜK</b>	<b>VEGF-C (ng/mL)</b> x±sd m (min, maks)	<b>ANG-1 (ng/mL)</b> x±sd m (min, maks)	<b>IP-10 (ng/mL)</b> x±sd m (min, maks)
<b>KONTROL</b> (n=50)	0.65±0.12 0.66 (0.45-0.87)	2.4±1.54 2.24 (0.40-8.99)	0.55±0.24 0.47 (0.37-1.39)
<b>PREKANSERÖZ LEZYON</b> (n=20)	0.75±0.17 0.74 (0.51-1.08)	3.24±1.55 2.79 (1.46-7.98)	0.61±0.22 0.59 (0.37-1.12)
<b>KANSER</b> (n=30)	0.81±0.19 0.71 (0.47-1.27)	3.31±2.2 1.47 (0.46-8.23)	0.78±0.95 0.48 (0.38-4.54)

Serum VEGF-C düzeylerinde oral prekanseröz lezyonlu hastalar ile sağlıklı kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ). Buna karşılık oral kanserli hastalarda VEGF-C düzeyleri prekanseröz lezyonlu hastalara ( $p=0.01$ ) ve kontrol grubuna ( $p=0.02$ ) göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Gruplara göre serum VEGF-C düzeyleri şekilde gösterilmiştir (Şekil 4-4).



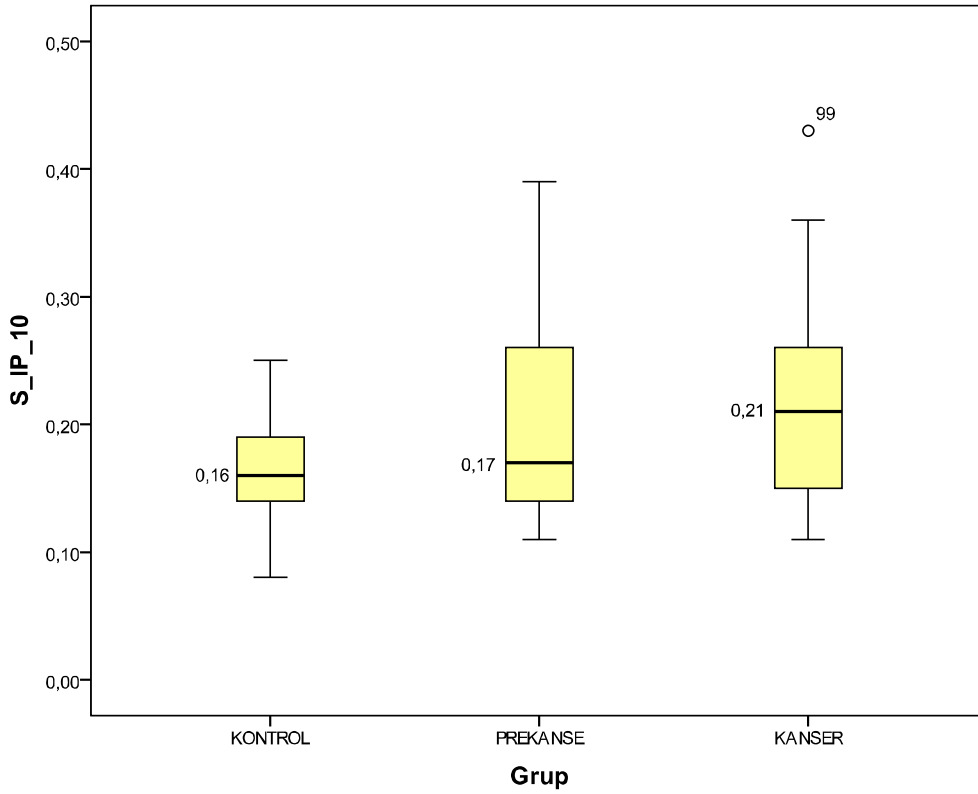
Şekil 4-4: Gruplara ait serum VEGF-C düzeyleri

Oral prekanseröz lezyonlu hastaların serum Ang-1 düzeyleri ile, sağlıklı kontroller ve kanserli hastaların serum Ang-1 düzeyleri arasında fark olmadığı ( $p<0.05$ ) görülmüş, ancak kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında anlamlı fark belirlenmiştir ( $p=0.02$ ). Gruplara göre serum Ang-1 düzeyleri şekilde gösterilmiştir (Şekil 4-5).



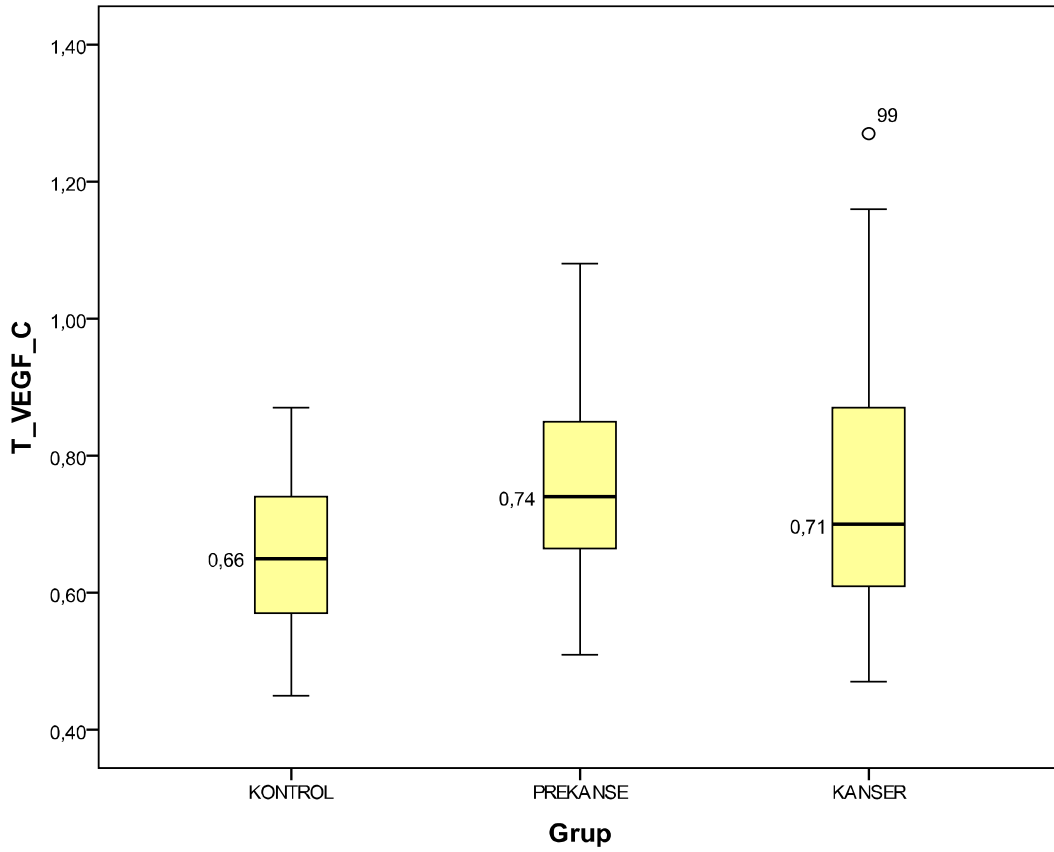
Şekil 4-5: Gruplara ait serum Ang-1 düzeyleri

Serum IP-10 düzeylerinin oral prekanseröz lezyonlu hastalarda sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir ( $p=0.02$ ). Kanserli hastalarda hem prekanseröz lezyonlu hastalar, hem de kontrollere göre daha yüksek serum IP-10 düzeyleri belirlenmiş olmasına karşın sadece kanser ve kontrol grubu arasında ileri derecede istatistiksel anlamlılık bulunmuştur ( $p=0.001$ ). Gruplara ait serum IP-10 düzeyleri şekilde gösterilmiştir (Şekil 4-6 ).



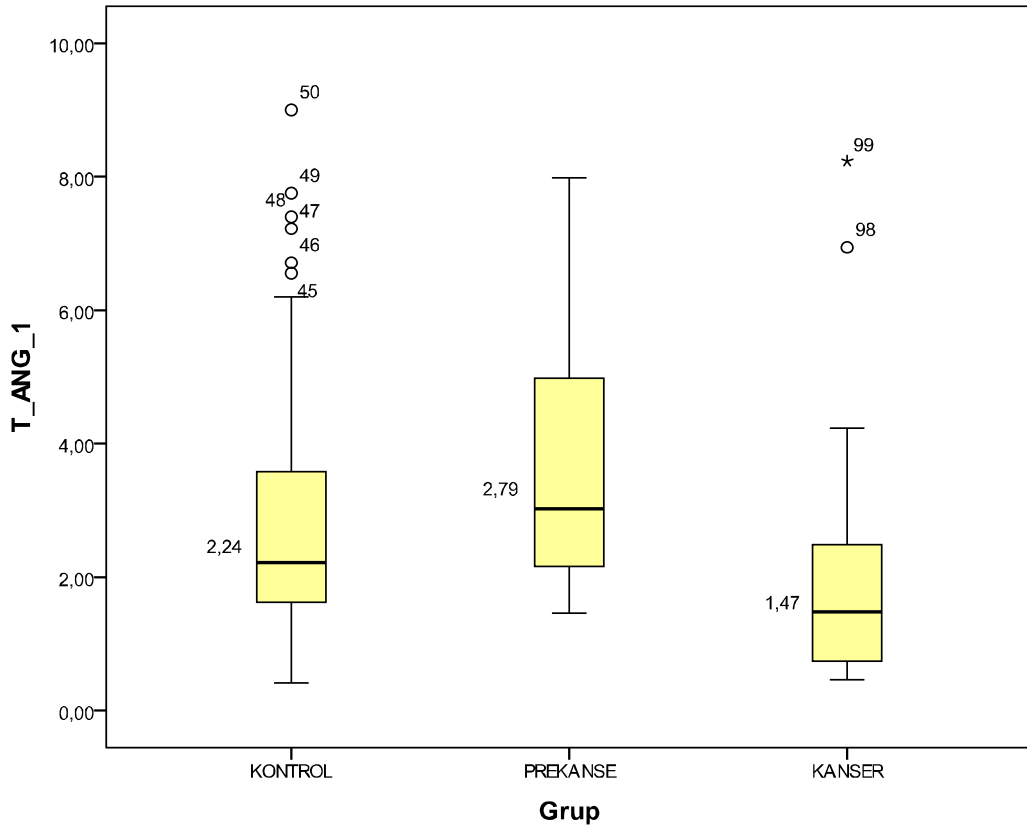
**Şekil 4-6:** Gruplara ait serum IP-10 düzeyleri

Tükürük VEGF-C düzeylerinin oral prekanseröz lezyonlu hastalarda sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir ( $p=0.01$ ). Kanserli hastalarda VEGF-C düzeyi prekanseröz lezyonlu hastalar ve kontrollere göre daha yüksektir ve oral kanser hastaları ile kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlılık mevcuttur ( $p=0.01$ ). Grupların tükürük VEGF-C düzeyleri şekilde gösterilmiştir (Şekil 4-7).



Şekil 4-7: Gruplara ait tükürük VEGF-C düzeyleri

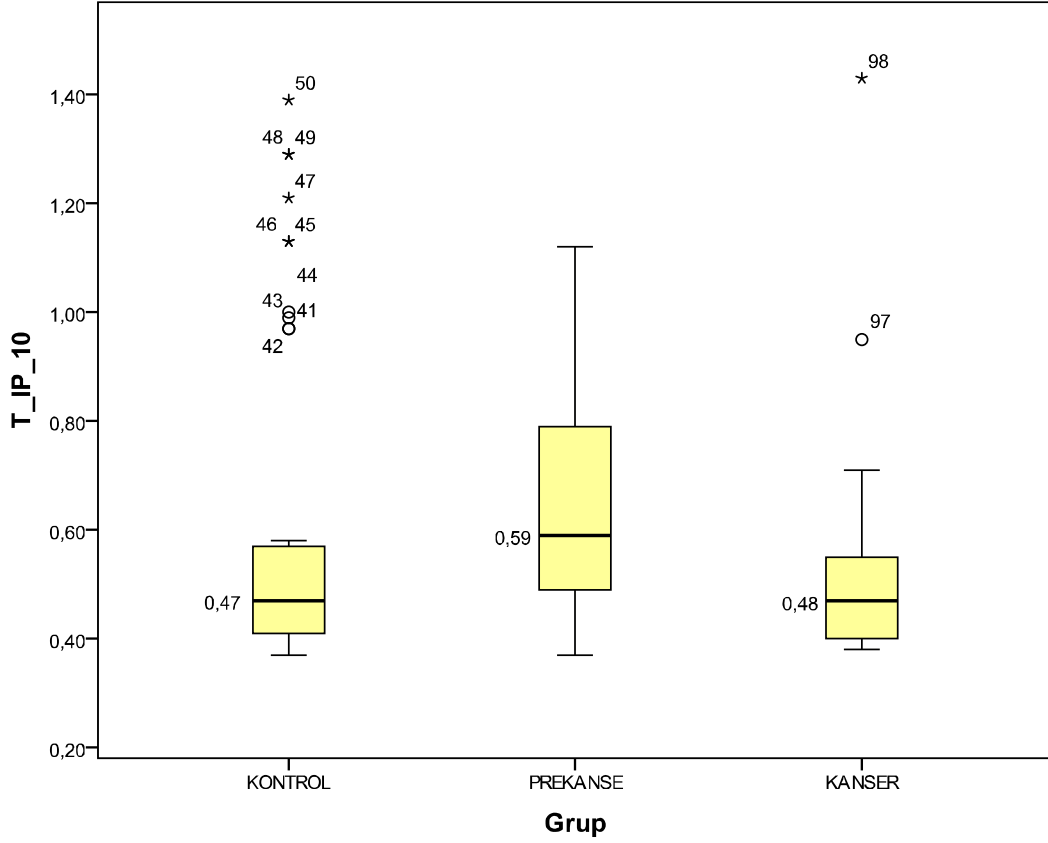
Tükürük Ang-1 düzeyleri oral prekanseröz lezyonlu hastalarda sağlıklı kontrollere göre ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p=0.001$ ). Kanserli hastalarda ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek ( $p=0.02$ ) olan tükürük Ang-1 düzeyleri, kanserli hastalar ile prekanseröz lezyonlu hastalar arasında belirgin bir farklılık göstermemektedir ( $p>0.05$ ). Grupların tükürük Ang-1 düzeyleri şekilde gösterilmiştir (Şekil 4-8).



**Şekil 4-8:** Gruplara ait tükürük Ang-1 düzeyleri



Tükürük IP-10 düzeylerinde oral prekanseröz lezyonlu hastalar ile sağlıklı kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ( $p>0.05$ ). Oral kanserli hastalarda tükürük IP-10 düzeyleri prekanseröz lezyonlu hastalara ( $p=0.02$ ) ve kontrol grubuna ( $p=0.02$ ) göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Gruplara göre tükürük IP-10 düzeyleri gösterilmiştir (Şekil 4-9).



Şekil 4-9: Gruplara ait tükürük IP-10 düzeyleri

Testlere ait belirlenen istatistiksel anlamlılıklar tabloda gösterilmiştir (Tablo 4-4).

**Tablo 4-4:** Testlere ait istatistiksel anlamlılıklar (p değerleri)

	SERUM			TÜKÜRÜK		
	VEGF-C	ANG-1	IP-10	VEGF-C	ANG-1	IP-10
<b>Kanser-Kontrol</b>	<b>p=0.02</b>	<b>p=0.02</b>	<b>p=0.001</b>	<b>p=0.01</b>	<b>p=0.02</b>	<b>p=0.02</b>
<b>Prekanseröz-Kontrol</b>	p>0.05	p>0.05	<b>p=0.02</b>	<b>p=0.01</b>	<b>p=0.001</b>	p>0.05
<b>Kanser-Prekanseröz</b>	<b>p=0.01</b>	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	<b>p=0.02</b>

Her bir parametreye ait özgüllük, duyarlılık ve doğruluklar hesaplanmış ve serum ve tükürük için ayrı tablolarda verilmiştir (Tablo 4-5, Tablo 4-6). Tüm duyarlılık (sensitivite), özgüllük (spesifite) ve doğruluk (accuracy) testleri için kontrol grubunda çalışılan parametreler olan VEGF-C, Ang-1 ve IP-10'un aritmetik ortalama değerleri üst sınır değer olarak kabul edilmiştir (serum VEGF-C: 8.04 ng/mL, tükürük VEGF-C: 0.65 ng/mL, serum Ang-1: 62.5 ng/mL, tükürük Ang-1: 2.4 ng/mL, serum IP-10: 0.18 ng/mL, tükürük IP-10: 0.55 ng/mL). %65'in üzerindeki özgüllük, duyarlılık ve doğruluklar değerlendirilmiştir.

**Tablo 4-5:** Serumda çalışılan testlere ait duyarlılık, özgüllük ve doğruluk değerleri

	<b>SERUM</b>					
	Duyarlılık (%)		Özgüllük (%)		Doğruluk (%)	
	Kanser	Prekanseröz	Kanser	Prekanseröz	Kanser	Prekanseröz
VEGF-C	58	50	<b>68</b>	42	64	45
ANG-1	<b>67</b>	25	<b>70</b>	30	<b>69</b>	53
IP-10	63	42	<b>72</b>	<b>72</b>	<b>68</b>	62

**Tablo 4-6:** Tükürükte çalışılan testlere ait duyarlılık, özgüllük ve doğruluk değerleri

	<b>TÜKÜRÜK</b>					
	Duyarlılık (%)		Özgüllük (%)		Doğruluk (%)	
	Kanser	Prekanseröz	Kanser	Prekanseröz	Kanser	Prekanseröz
VEGF-C	<b>68</b>	<b>75</b>	<b>75</b>	<b>75</b>	<b>66</b>	<b>75</b>
ANG-1	0	0	<b>100</b>	<b>100</b>	60	<b>68</b>
IP-10	32	58	64	64	50	62

Serum VEGF-C testinin için oral kanserli hastalar için özgüllüğü % 68 olarak hesaplanmıştır.

Tükürük VEGF-C testinin oral kanserli hastalar için duyarlılığı % 68, özgüllüğü %75 ve doğruluğu % 66; prekanseröz lezyonlu hastalar için duyarlılığı % 75, özgüllüğü % 75 ve doğruluğu % 75 olarak belirlenmiştir.

Serum Ang-1 testinin oral kanserli hastalarda duyarlılığı % 67, özgüllüğü %70 ve doğruluğu % 69 olarak bulunmuştur.

Tükürük Ang-1 testinin oral kanserli hastalardaki özgüllüğü %100 ve doğruluğu % 60; prekanseröz lezyonlu hastalar için özgüllüğü % 100 ve doğruluğu % 68 olarak bulunmuştur.

Serum IP-10 testinin oral kanserli hastalarda özgüllüğü % 72 ve doğruluğu % 68; prekanseröz lezyonlu hastalar için özgüllüğü % 72 olarak hesaplanmıştır.

## 5. TARTIŞMA

Araştırmamızda oral prekanseröz lezyon (n=20) ve oral kanserli (n=30) hastalar ile sağlıklı kontrollerin (n=50) doku örneklerinde VEGF-C, IP-10 ve Ang-1 immünohistokimyasal olarak incelendi, serum ve tükürük örneklerinde aynı parametrelerin kantitatif düzeyleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar sağlıklı kontrollerle karşılaştırılmıştır. Bu parametrelerin özellikle tükürükte belirlenmesi, “invaziv yöntemlere başvurmadan oral kanserlerin erken tanısında yardımcı olabilir mi?” sorusuna yanıt aramak için yapıldı. Aynı zamanda kanserleşme riski yüksek olan prekanseröz lezyonlu hasta grubunun takibinde faydalı parametreler olup olmayacaklarına da bakıldı.

Literatüre baktığımızda bu çalışmada belirlediğimiz parametrelerden VEGF-C’yi de içine alan VEGF ailesinin oral yassı epitel hücreli karsinomlardaki rolü ile ilgili çok sayıda çalışma olduğu görülmektedir (13,96-99).

Li QI ve arkadaşları 99 dil tümörlü hastanın (yassı epitel hücreli) dokularındaki VEGF-C ekspresyonunu, 17 benign dil lezyonu olan hasta dokularına göre daha yüksek bulmuşlardır. Lenfatik metastazı olan dil tümörlü hastalarda metastazı olmayanlara göre daha yüksek olan VEGF-C ekspresyonu, evre I-II hastalarda evre III-IV hastalara göre daha düşük bulunmuştur. 5 yıllık sağkalım oranlarına bakıldığında, VEGF-C ekspresyonu yüksek olan hastaların daha az yaşadığı belirlenmiş ve VEGF-C’nin lenf nodu metastazı, hastalığın evresi ve prognoz ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (96).

Shintani ve arkadaşları evreleri I ve IV arasında değişen primer oral yassı epitel hücreli karsinomlu 98 hastanın dokularında VEGF-A/B/C/D ekspresyonlarını belirleyip hastaların evreleri ile değişkenliklerini karşılaştırmaya çalışmışlardır. Hasta örneklerinden 59’unda VEGF-A, 61’inde VEGF-B, 66’sında VEGF-C ve 54’ünde VEGF-D ekspresyonu immünohistokimya yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışılan parametrelerden hiçbirisini hastalığın evresi ile ilişkisi bulunamamıştır. Ancak, VEGF-A ve B’nin tümör anjiogenezi ve mikrodamar yoğunluğu ile; VEGF-C ve D’nin ise lenfatik tümör yayılımı ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (97).

Siriwardena ve arkadaşları oral yassı epitel hücreli karsinomlu 54 hastanın parafin bloklarından immünohistokimya (IHC) yöntemi ile VEGF-C ekspresyonlarına bakmışlar ve 37 dokuda yüksek olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışma kapsamında 18

hastanın da taze dokusundan RT-PCR yöntemi ile VEGF-C mRNA'sı izole etmeyi denemişler ve 15 dokuda izole etmişlerdir. Ayrıca spesifik olarak lenfatik endotel hücrelerini belirleyen, ancak kan damarları ile reaksiyon göstermeyen D2-40 antikoru kullanılarak IHC yöntemi ile lenfatik duruma bakıldığında, nod metastazı olan vakalarda anlamlı olarak fazla lenf damarı gözlendiği, gözlenen lenf damarı sayısı ile VEGF-C ekspresyonunun ilişkili olduğunu bulmuşlardır (13). Bizim çalışmamızda ise immunhistokimya sonuçlarına göre VEGF-C ekspresyonu en az kontrol grubunda, orta derecede prekanseröz lezyonlu dokularda, en yüksek ise oral kanserli hastalarda gözlenmiştir.

Lenfanjiogenezdeki rolü bilinen VEGF-C'nin, sıklıkla lenf metastazı yapan bir hastalık olan oral yassı epitel hücreli karsinomda, henüz lenf nodu tutulumu olmayan erken evre hastalarda belirleyerek "hastalığın prognozu ile ilgili bir bilgi verebilir mi?" sorusuna yanıt aramaya çalışan Faustino SE ve arkadaşları ağız tabanı ve dilde, klinik olarak evre I-II, primer oral yassı epitel hücreli karsinomlu 87 hastanın biyopsi örneklerinde VEGF-C ekspresyonuna bakmışlar ve hastaların 66'sında yoğun sitoplazmik VEGF-C boyanması, 21 hastada ise zayıf VEGF-C boyanması belirlemişlerdir. Ortalama 82.2 ay takip edilen hastalarda lenf nodu tutulumunun en önemli prognostik faktörlerden biri olduğu ancak VEGF-C'nin gizli lenf nodu tutulumunu belirlemede rolünün olmadığı sonucuna varmışlardır (11).

Artmış lokal ve periferik VEGF seviyelerinin lenf nodu tutulumu ile ilişkili olduğunu belirten Strauss L ve arkadaşları baş-boyun kanserli 46 hastayı lenf nodu pozitif ve sağkalımı 27 aydan az olanlar ile lenf nodu negatif ve sağkalımı 27 aydan fazla olanlar olarak iki gruba ayırarak VEGF-A, VEGF-C ve VEGF-D düzeyleri açısından değerlendirmişlerdir. Lenf nodu tutulumlu hastaların tümör dokularında VEGF-A ve VEGF-C ekspresyon düzeylerinin daha yüksek olduğunu, plazmalarında ise sadece VEGF-A düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğunu göstermişlerdir (98). Çalışmamızdaki erken evre oral kanserli 30 hastamızın tamamının dokularında VEGF-C ekspresyonu gözlendi. Oral kanserli hastalarda kontrol grubuna göre artmış bulunan VEGF-C ekspresyonuna paralel olarak artmış serum ( $p=0.01$ ) ve tükürük ( $p=0.02$ ) VEGF-C düzeylerini belirledik. Serum VEGF-C testinin oral kanserli hastalar için özgüllüğü % 68 olarak hesaplandı ve sağlıklı kişileri hastalardan ayırabilmek için kullanılabilceği sonucuna varıldı.

Baş-boyun kanserlerinin anjiogenez aracılığı ile büyümelerini ve lenfanjiogenez aracılığıyla metastaz yapmalarını sağlayacak endotelial büyüme faktörlerini yüksek miktarlarda salgıladığı bilinmektedir. Tükürük, VEGF'in bilinen kaynaklarından biridir. Tükürükte yapılmış VEGF-C ile ilgili bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Upile T ve arkadaşlarının yaptığı, 7 oral yassı epitel hücreli hastanın hem serum, hem de tükürük örneklerindeki VEGF-A düzeyleri 14 sağlıklıya göre ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunduğu bir çalışma mevcuttur (100). Yassı epitel hücreli dil kanserli hastaların tükürük örneklerinde de kontrol grubuna göre yüksek miktarlarda VEGF-A olduğu gösterilmiş ve tükürük VEGF-A'nın kanser taraması ve kanserin erken tanısında yeni bir belirleyici olabileceği, hatta gelecekte bir tedavi hedefi olarak bile kullanılabilmesi belirtilmiştir (101). Bizim sonuçlarımızda da tükürük VEGF-C düzeylerinin oral prekanseröz lezyonlu hastalarda sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi ( $p=0.01$ ). Kanserli hastalarda tükürük VEGF-C düzeyi prekanseröz lezyonlu hastalar ve kontrollere göre daha yüksek bulundu ve oral kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlılık belirlendi ( $p=0.01$ ). Tükürük VEGF-C testinin oral kanserli hastalar için duyarlılığı % 68, özgüllüğü %75 ve doğruluğu % 66, prekanseröz lezyonlu hastalar için duyarlılığı % 75, özgüllüğü % 75 ve doğruluğu % 75 olarak belirlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda tükürük VEGF-C hem kanserli hastalar, hem de prekanseröz lezyonlu hastalar için hasta ile sağlıklı grubu ayırmakta yardımcı olacaktır.

Li C ve arkadaşları 41 oral yassı epitel hücreli karsinomlu hasta, 30 prekanseröz doku ve 10 normal oral mukozada Ang-1 ekspresyonuna baktıklarında, Ang-1 ekspresyonunun kanserli hastalarda diğer gruplara göre düşük olduğunu görmüşlerdir. Prekanseröz doku ile normal oral mukoza arasında ise fark gösterilememiştir (102). Aynı yazarlar bir diğer çalışmalarında ise 62 oral yassı epitel hücreli karsinomlu örnek ile 30 prekanseröz oral doku ve 10 normal mukozada immunhistokimya yöntemi ile Ang-1, Ang-2 ve VEGF ekspresyonlarına bakarak hastalığın prognozunda etkili olup olmadıklarını belirlemeye çalışmışlardır. Ang-1/Ang-2 ekspresyon oranı, kanserli hastalarda diğer iki gruba göre daha düşük olarak bulunmuş, ayrıca kanserli hastalarda lenf nodu metastaz durumu ile ilişkili olduğu belirlenmiş ve prognostik bir faktör olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır (103). Li C ve arkadaşlarının çalışmasında

olduğu gibi, kanser, prekanseröz ve normal oral mukoza dokuları ile yaptığımız çalışmamızın sonuçlarında da literatürle uyumlu şekilde kanserli hasta dokusunda Ang-1 ekspresyonu diğer iki gruba göre düşük belirlenmiştir. Serum Ang-1 düzeylerinde sadece kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında anlamlı fark belirlenmiştir ( $p=0.02$ ). Tükürük Ang-1 düzeyleri oral prekanseröz lezyonlu hastalarda ( $p=0.001$ ) ve kanserli hastalarda ( $p=0.02$ ) sağlıklı kontrollere göre yüksek bulunmuştur.

VEGF vasküler yapıların oluşumunun erken döneminde etkili olurken, Ang-1 vasküler yapıların geç dönem stabilizasyonu ve olgunlaşması üzerinde etkilidir. VEGF'in vasküler geçirgenlik üzerinde yaptığı artışın Ang-1 tarafından engellendiği gösterilmiştir (79). Tümörde ise anjiogenez sürekli ve damarlar olgunlaşmaya vakit kalmadan sürekli olarak yenilenip çoğalmaktadırlar. Normal şartlarda anjiogenez üzerine pozitif etkili bir düzenleyici olduğu belirtilen Ang-1'in hem kanserli hastaların serumlarında, hem de dokularında kontrole göre daha düşük düzeylerde belirlemiş olmamızın sebebi tümördeki anjiogenezin sürekliliği ve damarların olgunlaşmasına fırsat kalmadan sürekli çoğalması olabilir.

Serum Ang-1 testinin oral kanserli hastalarda duyarlılığı % 67, özgüllüğü %70 ve doğruluğu % 69 olarak bulunduğundan bu test de hem kanserli hastaları, hem de sağlıklı grubu ayırmakta kullanılabilir. Tükürük Ang-1 testinin oral kanserli hastalardaki özgüllüğü %100; prekanseröz lezyonlu hastalar için özgüllüğü % 100 ve doğruluğu % 68 olarak bulundu. Tükürük Ang-1 yüksek özgüllük değerleri ile sağlıklı grubu ayırmakta oldukça yararlı bir belirleyici olarak düşünöldü. Serum ve tükürük Ang-1 düzeyleri kanserli hastaları sağlıklılıklardan ayırmak için kullanılabilir bir test olmasına rağmen, kanserli hastalar ve prekanseröz lezyonlu hastalar arasında anlamlı bir fark bulunamadığından, prekanseröz lezyonların kanserleşme riskini belirlemede rolü olmadığı sonucuna varılmıştır.

Literatürde bugüne kadar oral kanserli hastaların plazma ve oral sıvılarında IP-10 ile ilgili iki çalışma yapılmıştır (104, 105). Oral yassı epitel hücreli karsinom karsinogenezi lokal kronik enflamasyon süreci ile ilişkili olmasına rağmen tümör ilişkili sitokin ve kemokinlerin düzeylerinin tümör mikroçevresinde olduğu kadar sistemik dolaşımında da değişmiş olabileceğini düşönen Chang ve arkadaşları, içinde VEGF ve IP-10'un da olduğu 48 farklı proteinin plazma düzeylerini sağlıklı kontrol ( $n=112$ ), oral yassı epitel hücreli karsinom ( $n=111$ ) ve prekanseröz lezyonu ( $n=107$ ) olan hasta gruplarında "multiplex suspension array system" yöntemi ile belirlemişlerdir. Plazma



VEGF düzeyleri kanserli hastalarda kontrol grubuna göre ileri derecede anlamlı olarak yüksek bulunmuş, IP-10 düzeylerinde ise gruplar arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (104). ELISA yöntemiyle yaptığımız araştırmamızda oral kanserli hastalarımızın hem serum ( $p=0.001$ ) hem de tükürük IP-10 ( $p=0.02$ ) düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek bulundu.

Literatürdeki IP-10 ile ilişkili diğer çalışmaya 9 oral kanserli ve 4 larenks kanserli (yassı epitel hücreli karsinom) hasta, 25 kronik periodontitisli hasta ile 6 sağlıklı kişi dahil edilmiştir. Çalışma grubunun oral sıvılarında ELISA yöntemi ile CXCL4, CXCL8 ve CXCL10 (IP-10) gibi çeşitli kemokinler araştırılmış ve bizim de aynı yöntemle çalışmış olduğumuz CXCL10 (IP-10)'un sadece kanserli hastaların tedavi öncesi sıvılarında tespit edildiği, radyoterapi ile tedavi edilen kanserli hastalarda tedavi sonrası CXCL10 (IP-10) düzeylerinin anlamlı şekilde düştüğü gösterilmiştir. Oral ve larenks kanserli hastalar arasında ise herhangi bir fark belirlenmemiştir (105). Bu çalışma ile benzer bir hasta grubu (oral kanser ve prekanseröz lezyon) ile planlanmış çalışma sonuçlarımızda da tükürük IP-10 düzeyleri kanserli hastalarda prekanseröz lezyonlu hastalar ve kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Ancak prekanseröz lezyonlu hastalar ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Tükürük IP-10 düzeylerine ek olarak belirlediğimiz serum IP-10 düzeyleri kanserli hastalar ile kontrol grubu ( $p=0.001$ ) arasında ve prekanseröz lezyonlu hastalar ile kontrol grubu ( $p=0.001$ ) arasında farklı bulundu. Serum ve tükürük IP-10 düzeylerinin kanserli hastaları sağlıklılarından ayırmada kullanılabilecek bir diagnostik belirleyici olabileceği, ancak kanserleşme riski olan prekanseröz lezyonlu hastaları ayırt etmede faydalı olamayacağı sonucuna varıldı. Oral kanserli hastalarda serum IP-10 testi %72 ve tükürük IP-10 testi %64 özgüllük değerleri ile bu sonucu desteklemektedir. IP-10 ekspresyonu en düşük kontrol grubunda, orta derecede prekanseröz lezyonlu dokularda, en yüksek ise oral kanserli hastalarda gözlemlendi ve serum ile tükürük IP-10 sonuçlarımızın dokudaki ekspresyon sonuçları ile uyumlu olduğu belirlendi. Tükürük IP-10 ise hem oral kanserli ve hem de prekanseröz lezyonlu hastalarda %64 özgüllük değerleri ile sağlıklıları hastalardan ayırmada faydalı olabilecek bir test olarak bulundu.

Kanserde tümöre reaktif iltihapsal yanıt eşlik etmektedir. Ayrıca bir çok tümör olgusu ülserlidir, dolayısıyla onarım yanıtı da bu sürece eşlik etmekte ve tümör anjiogenezi haricinde de bölgede damarlanma artmaktadır. Buna bağlı olarak anjiogenezi ile ilişkili olarak doku ve tükürük örneklerinde çalıştığımız parametrelerin

tamamının lokal olarak tümörden kaynaklandığını söylememiz mümkün olmamaktadır. Benzer problemler kontrol grubu olarak çalıştığımız örnekler için de geçerlidir. Tamamen sağlıklı dokuları elde etme imkanımız olmadığından, çeşitli cerrahi işlemler sırasında çıkartılmış parçaları ve sağlıklı görünen ağız mukozalarını kontrol grubu olarak çalışmaya dahil ettik. Görünüşte sağlıklı olmasına rağmen bu parçaların *iltihaplı/ülserli* dokuların komşuları olabileceği ve bunlardan kaynaklanan çeşitli biyolojik yanıtların da lokal (doku ve tükürük örneklerinde) olarak bölgede etkili olabileceği göz ardı edilmemelidir.

Tükürüğün normal bileşenleri arasında bulunmayan bazı maddeler pasif difüzyon, aktif taşınma gibi hücre içi ve ultrafiltrasyon gibi hücre dışı yollar aracılığıyla bu biyolojik sıvıya ulaşabilmektedirler. Serum bileşenleri de tükürüğe dişeti oluğu sıvısı aracılığıyla ulaşabileceği ve bazı tükürük proteinlerinin kaynağının serum olduğu bildirilmiştir (29). Bizim de sonuçlarımızla belirlemeye çalıştığımız bulgulardan en önemlisi, parametrelerin, tümöral sebeplerle lokal olarak sadece tükürükte miktarının artabileceği, ancak sistemik dolaşımında miktarının çok değişmeyeceği varsayımını doğrulayabilmektir. Prekanseroz lezyonlarda tükürük VEGF-C ve tükürük Ang-1 kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş, ancak prekanseroz lezyonlu hastalar ile kontroller arasında serum VEGF-C ve serum Ang-1 de bir farklılık gözlenmemiştir. Tükürük VEGF-C ve Ang-1'in klinikte prekanseroz lezyonlu hastaların takibinde ve risk gruplarının belirlenmesinde faydalı olacağını düşünmekteyiz. IP-10'un serum düzeylerinin ise kanserli hastalarda prekanseroz lezyonlu hastalardan çok farklı olmayıp, tükürük düzeylerinin kanserli hastalarda anlamlı şekilde yüksek bulunması, tükürük IP-10'un kanserleşme riski fazla olan prekanseroz lezyonlu hastaları sağlıklı kişilerden ayırt etmede ve kanserleşme riski açısından takipte yararlanılabilecek bir test olabileceğini düşündürmektedir.

Klinik olarak henüz lenf nodu tutulumu olmayan, erken evre oral kanserli hastalarda immunhistokimyasal yöntemle VEGF-C, Ang-1 ve IP-10 ekspresyonunu, ELISA yöntemi ile serum ve tükürük VEGF-C, Ang-1 ve IP-10 düzeylerini belirledik ve kanserli hastaların sonuçlarını kontrol grubu ve prekanseroz lezyonlu grupla karşılaştırdık. Kanserli hastalarda diğer gruplara göre pozitif değerler ve yüksek sonuçlar elde ettik. Prekanseroz lezyonlu ve kanserli hasta gruplarını daha uzun süre takip etme şansımız olur da, mevcut çalışmayı bu yönde geliştirebilirsek, VEGF-C, Ang-1 ve IP-10'un hem kanserli hastalarda prognostik faktör, hem de prekanseroz

lezyonlarda kanserleşmeyi erken belirleyebileceğimiz bir faktör olup olmadığını daha kesin sonuçlarla vermemiz mümkün olacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Brad W, Neville BW, Day TA. Oral Cancer and Precancerous Lesions. *CA Cancer J Clin* 2002; **52**:195-215.
2. Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 1994; **44**: 7-26.
3. Tanyeri H, Ofluoğlu D, Karataşlı G, Yılmaz R. Oral Kanserlerin Erken Teşhisinde Diş Hekimlerinin Rolü: İki Olgu Nedeniyle. *İÜ Dişhek Fak Derg* 2008; **42**: 11-16.
4. Warburton G, Nikitakis NG, Roberson P, Marinos NJ, Wu T, Sauk JJ Jr, et al. Histopathological and lymphangiogenic parameters in relation to lymph node metastasis in early stage oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; **65**:475-84.
5. Sasahira T, Kirita T, Kurihara M, Yamamoto K, Bhawal UK, Bosserhoff AK, et al. MIA-dependent angiogenesis and lymphangiogenesis are closely associated with progression, nodal metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2010; **46**:2285-94.
6. Isık AU, Imamoğlu M, Caylan R, Bahadır O, Muhtar H. Oral kavite ve orofarenksin yassı hücreli kanserleri. *Turk Arch Otolaryngol* 1998; **36**:28-31.
7. Werning JW, editor. *Oral Cancer; Diagnosis, management and rehabilitation*. New York : Thieme; 2007.
8. Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol* 2009; **45**:324-34.
9. Karadeniz AN . İçinde Topuz E, Aydın A, Karadeniz AN, editor. *Klinik Onkoloji*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları; 2000. pp. 161-200.
10. Myers EN, Simental AA. In: Myers EN, Suen JY, Myers JN, Hanna EYN, editor. *Cancer of the Head and Neck*. Philadelphia: Saunders;2003. pp. 279-319.
11. Faustino SE, Oliveira DT, Nonogaki S, Landman G, Carvalho AL, Kowalski LP. Expression Of Vascular Endothelial Growth Factor-C Does Not Predict Occult Lymph-Node Metastasis in Early Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008; **37**:372-8.

12. Tanigaki Y, Nagashima Y, Kitamura Y, Matsuda H, Mikami Y, Tsukuda M. The expression of vascular endothelial growth factor-A and -C, and receptors 1 and 3: correlation with lymph node metastasis and prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* 2004;**14**:389-95.
13. Siriwardena BS, Kudo Y, Ogawa I, Udagama K, Tilakaratne WM, Takata T. VEGF-C is associated with lymphatic status and invasion in oral cancer. *J Clin Pathol.* 2008; **61**:103-8.
14. Sugiura T, Inoue Y, Matsuki R, Ishii K, Takahashi M, Abe M, et al. VEGF-C and VEGF-D expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: Implications for use as a prognostic marker. *Int J Oncol* 2009; **34**:673-80
15. Kishimoto K, Sasaki A, Yoshihama Y, Mese H, Tsukamoto G, Matsumura T. Expression Of Vascular Endothelial Growth Factor-C Predicts Regional Lymph Node Metastasis İn Early Oral Squamous Cell Carcinoma. *Oral Oncol.* 2003; **39**:391-6.
16. Öztürk B, Coşkun U, Yaman E, Kaya AO, Yıldız R, Benekli M ve ark. Oral Kavite Kanserlerinde Risk Faktörleri, Premalign Lezyonlar Ve Kemoprevensiyon. *UHOD* 2009; **2**: 117-126
17. Neville BW. Update on current trends in oral and maxillofacial pathology. *Head Neck Pathol.* 2007;**1**(1):75-80.
18. Kutluay AH, Çankal DU. Oral Mukozanın Premalign Beyaz Lezyonları. *EÜ Dişhek Fak Derg* 2009; **30**: 75-86
19. Axéll T, Pindborg JJ, Smith CJ, van der Waal I. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco- related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. International Collaborative Group on Oral White Lesions. *J Oral Pathol Med* 1996; **25**:49-54.
20. van der Waal I, Schepman KP, van der Meij EH. A modified classification and staging system for oral leukoplakia. *Oral Oncol* 2000; **36**:264-6.
21. Waldron CA, Shafer WG. Leukoplakia revisited: A clinicopathologic study of 3256 oral leukoplakias. *Cancer* 1975; **36**:1386-1392.

22. Feller I, Altini M, Slabbert H. Pre-malignant lesions of the oral mucosa in a South African sample: A clinicopathologic study. *J Dent Assoc South Africa* 1991; **46**: 261-265.
23. Van der Waal I, Schepman KP, Van der Meij EH, Smeele LE. Oral Leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol* 1997; **33**:291-301.
24. Ortiz GM, Pierce AM, Wilson DF. Palatal changes associated with reverse smoking in Filipino women. *Oral Dis* 1996; **2**:232-237.
25. Edgar WM. Saliva: Its Secretion, Composition And Functions. *Br Dent J* 1992, **172**, 305-312.
26. Hold KM, Boer D, Zuidema J, Robert AA. Saliva As Analytical Tool in Toxicology. *Int J Drug Test* 2000; **1**: 1-34.
27. Lagerlof F, Oliveby A. Caries Protective Factors in Saliva. *Adv Dent Res* 1994; **8**: 229-238.
28. Michaels P. Saliva as an aid in the diagnosis of diathetic diseases. *Dent Dig* 1901; **7**:105-10.
29. İlhan Kal B, Tuğsel Z, Özgönül AM. Tükürüğün Sistemik Hastalıklardaki Tanısal Önemi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2008; **28**: 66-73.
30. Nagler R, Dayan D. The dual role of saliva in oral carcinogenesis. *Oncology* 2006; **71**:10-7.
31. Wu JY, Yi C, Chung HR, Wang DJ, Chang WC, Lee SY, et al. Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2010; **46**:226-31.
32. Rhodus NL, Ho V, Miller CS, Myers S, Ondrey F. NF-kappaB dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Detect Prev* 2005; **29**:42-5.
33. de Jong EP, Xie H, Onsongo G, Stone MD, Chen XB, Kooren JA, et al. Quantitative proteomics reveals myosin and actin as promising saliva biomarkers for distinguishing pre-malignant and malignant oral lesions. *PLoS One*. 2010; **5**:e11148.
34. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. In: *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th edition*. Philedelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders Company;2005. pp. 87-119.
35. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; **235**: 442-7.

36. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; **64**: 327- 36.
37. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; **267**: 10931-10934.
38. Folkman J. Successful treatment of an angiogenic disease. *N Engl J Med* 1989; **320**: 1211-1212.
39. Böhle AS, Kalthoff H. Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Langenbeck's Arch Surg* 1999; **384**: 133-40.
40. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia angiogenesis. *Nature* 1992; **359**:843-845.
41. Thompson WD, Shiach KJ, Fraser RA, Macintosh LC, JG Simpson. Tumors acquire their vasculature by vessel incorporation, not vessel in growth. *J Pathol* 1987; **151**:323-332.
42. Folkman J. Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. *Ann Intern Med* 1975; **82**:96-100.
43. Blood CH, Zetter BR. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochem Biophys Acta* 1990; **1032**: 89-118.
44. Weidner N. Tumor angiogenesis: Review of current applications in tumor prognostication. *Semin Diagn Pathol* 1993; **10**: 302-13.
45. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; **86**: 353- 64.
46. Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76- 4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. *Am J Pathol* 1988; **133**:419-23.
47. Lu H, Lin C, Zheng Z, Li S, Guo S, Zhang X, et al. Angiogenesis inhibitor Z24 induces endothelial cell apoptosis and suppresses tumor growth and metastasis. *J Pharmacol Sci* 2005; **97**:533-540.
48. Ozuysal S. Tumoral Anjiogenezis. *Türk Patoloji Derg* 2001; **17**:90-93.
49. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; **9**:669-676.

50. Wei MH, Popescu NC, Lerman MI, Merrill MJ, Zimonjic DB. Localization of the human vascular endothelial growth factor gene, VEGF, at chromosome 6p12. *Hum Genet* 1996; **97**:794-7.
51. Zachary I. Molecules in focus VEGF. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; **30**:1169-4.
52. Yamaguchi R, Yano H, Iemura A, Ogasawara S, Haramaki M, Kojiro M. Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; **28**:68-77.
53. Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochem Pharmacol* 2004; **68**: 1017-1021.
54. Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 2000; **11**:617-624.
55. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt (VEGFR-3) and KDR (VEGF-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996; **15**:290-8.
56. Farnebo F, Piehl F, Lagercrantz J. Restricted expression pattern of VEGF-D in the adult and fetal mouse high expression in the embryonic lung. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **257**:891-4.
57. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, et al. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1999; **18**:363-74.
58. Houch KA, Ferrara N, Winer H. The vascular endothelial growth factor family. Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991; **5**:1806-14.
59. Pepper MS, Mandriota SJ. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (flk-1) expression in endothelial cells. *Exp Cell Res* 1998; **241**: 414-425.
60. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005; **9**:777-794.



61. Cébe-Suarez S, Zehnder-Fjällman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci* 2006; **63**:601-15.
62. Schoppmann S, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, et al. Tumor associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2004; **161**:947-6.
63. Duff S, Li C, Renehan A, O'Dwyer S, Kumar S. Immunodetection and molecular forms of plasma vascular endothelial growth factor-C. *Int J Oncol* 2003; **22**:339-3.
64. Korpelainen E, Alitalo K. Signaling angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1998; **10**:159-4.
65. Oliver G, Detmar M. The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev* 2000; **16**:773-83.
66. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* 1997; **276**:1423-25.
67. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, et al. Vascular endothelial growth factor- C mediated lymphangiogenesis promotes tumor metastasis. *EMBO J* 2001; **20**:672-82
68. Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Path* 1998; **153**:103-8.
69. Kitadai Y, Kodama M, Cho S. Quantitative analysis of lymphangiogenic markers for predicting metastasis of human gastric carcinoma to lymph nodes. *Int J Cancer* 2005; **115**:388-2.
70. Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG, et al. Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* 2003; **162**:1951-60.
71. Bando H, Weich HA, Horiguchi S, Funata N, Ogawa T, Toi M. The association between vascular endothelial growth factor-C, its corresponding receptor, VEGFR-3, and prognosis in primary breast cancer: A study with 193 cases. *Oncol Rep* 2006; **15**:653-9.

72. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; **87**: 1171-80.
73. Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U, Risau W. Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol* 1998; **8**: 529-32.
74. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; **407**: 242-8.
75. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Jakobiec FA, Flynn E, Chatzistefanou K, et al. Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. *Ophthalmology* 1996; **103**:1820-8.
76. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; **277**:55-60.
77. Eichhorn ME, Kleespies A, Angele MK, Jauch KW, Bruns CJ. Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. *Langenbecks Arch Surg* 2007; **392(3)**:371-9.
78. Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; **99**:11205-10.
79. Tavakkoli AS, Atalar E, Özer N, Övünç K, Aksöyek S, Özmen F. Kararlı Koroner Arter Hastalarında Plazma Angiopoietin-1, Angiopoietin-2 ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Düzeyleri *TGKD* 2008; **12**:97-107.
80. Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer* 2006; **42**:768-78.
81. Balkwill F. Chemokine biology in cancer. *Semin Immunol*. 2003;**15**: 49-55.
82. Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today* 2000; **21**:418-20.
83. Strieter RM, Belperio JA, Phillips RJ, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Semin Cancer Biol* 2004; **14**:195-200.

84. Çağlar M, Kansu E. Kemokinler, Kemokin Reseptörleri ve İnflamasyon. *ANKEM* 2004; **18**:164-168.
85. Kayes SG. Presidential address: conventional wisdom and a tale of two cytokines. *J Parasitol* 2007; **93**:1254-61.
86. Nör JE, Christensen J, Liu J, Peters M, Mooney DJ, Strieter RM, et al. Up-Regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth. *Cancer Res.* 2001; **61**:2183-8.
87. Salcedo R, Resau JH, Halverson D, Hudson EA, Dambach M, Powell D, et al. Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells. *FASEB J* 2000; **14**:2055-64.
88. Kai K, Nasu K, Nakamura S, Fukuda J, Nishida M, Miyakawa I. Expression of interferon-gamma-inducible protein-10 in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* 2002; **8**:176-80.
89. Soejima K, Rollins BJ. A functional IFN-gamma-inducible protein-10/CXCL10-specific receptor expressed by epithelial and endothelial cells that is neither CXCR3 nor glycosaminoglycan. *J Immunol* 2001; **167**:6576-82.
90. Luster AD, Leder P. IP-10, a -C-X-C chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. *J Exp Med* 1993; **178**: 1057-1065.
91. Luster AD, Greenberg SM, Leder P. The IP-10 Chemokine Binds to a Specific Cell Surface Heparan Sulfate Site Shared with Platelet Factor 4 and Inhibits Endothelial Cell Proliferation. *J Exp Med* 1995; **182**: 219-231.
92. Nagpal ML, Davis J, Lin T. Overexpression of CXCL10 in human prostate LNCaP cells activates its receptor (CXCR3) expression and inhibits cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* 2006; **1762**:811-8.
93. Teruya-Feldstein J, Jaffe ES, Burd PR, Kanegane H, Kingma DW, Wilson WH, et al. The role of Mig, the monokine induced by interferon-gamma, and IP-10, the interferon-gamma-inducible protein-10, in tissue necrosis and vascular damage associated with Epstein-Barr virus-positive lymphoproliferative disease. *Blood* 1997; **90**:4099-105.
94. Jiang Z, Xu Y, Cai S. CXCL10 expression and prognostic significance in stage II and III colorectal cancer. *Mol Biol Rep* 2010; **37**:3029-36.

95. Hayran M, Hayran M. *Sağlık Araştırmaları İçin Temel İstatistik*. Ankara: Omega Araştırma; 2011. pp 137-154.
96. Li QL, Chen FJ, Zeng ZY, Yang AK, Wu QL, Zhang HZ, et al. Expression and clinical significance of VEGF-C and Flt-4 in tongue squamous cell carcinoma. *Ai Zheng*. 2006; **25**:235-40
97. Shintani S, Li C, Ishikawa T, Mihara M, Nakashiro K, Hamakawa H. Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004; **40**:13-20.
98. Strauss L, Volland D, Kunkel M, Reichert TE. Dual role of VEGF family members in the pathogenesis of head and neck cancer (HNSCC): possible link between angiogenesis and immune tolerance. *Med Sci Monit* 2005; **11**:BR280-92.
99. Shang ZJ, Li JR, Li ZB. Upregulation of serum and tissue vascular endothelial growth factor correlates with angiogenesis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; **65**:17-21.
100. Upile T, Jerjes W, Kafas P, Hirani S, Singh SU, Guyer M, et al. Salivary VEGF: a non-invasive angiogenic and lymphangiogenic proxy in head and neck cancer prognostication. *Int Arch Med* 2009; **2**:12.
101. Korostoff A, Reder L, Masood R, Sinha UK. The role of salivary cytokine biomarkers in tongue cancer invasion and mortality. *Oral Oncol* 2011; **47**:282-7.
102. Li C, Feng HC, Chen JC, Song YF. Expression and significance of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in oral squamous cell carcinoma. *Ai Zheng* 2005; **24**:1388-93.
103. Li C, Zhang B, Wang ZH, Chen JC, Li B, Wang SX, et al. Significance of a Reversal Expression of the Angiopoietin-1 and 2 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2009; **44**:412-8.  
[Article in Chinese]
104. Chang KP, Chang YT, Liao CT, Yen TC, Chen IH, Chang YL, et al. Prognostic cytokine markers in peripheral blood for oral cavity squamous cell carcinoma identified by multiplexed immunobead-based profiling. *Clin Chim Acta* 2011; **412**:980-7.

- 105.** Michiels K, Schutyser E, Conings R, Lenaerts JpP, Put W, Nuyts S, et al. Carcinoma Cell-Derived Chemokines and Their Presence in Oral Fluid. *Eur J Oral Sci* 2009; **117**:362-8.

## FORMLAR

### HASTA BİLGİLENDİRME FORMU

**Çalışma Adı:** Oral Mukozanın Prekanseröz Lezyonları ve Kanserlerinde Diagnostik Önemi Olabilecek Damarsal Belirleyicilerin Araştırılması

**Proje Yürütücüsü:** MSc.Hilal OĞUZ SOYDİNÇ

**Tez İzleme Komitesi:** Prof.Dr. Vildan YASASEVER, Prof.Dr. Nejat DALAY,  
Doç.Dr. Vakur OLGAÇ

**Amaç:** Bu çalışmada, oral kavitede prekanseröz lezyonu ve malignitesi olan hastaların kan ve tükürük örneklerinde diagnostik ve /veya prognostik önemi olabilecek vasküler endotelial büyüme faktörü-C (VEGF-C), Interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) ve Angiopoietin-1'in belirlenmesine çalışılacak ve sonuçlar sağlıklı kontrollerle karşılaştırılacaktır. Hastalardan alınan doku örneklerine histopatolojik olarak tanıları konduktan sonra aynı parametreler immünohistokimyasal olarak incelenip, kan ve tükürük örnekleri ile korelasyonu karşılaştırılacaktır.

Çalışmaya tanıları patolojik olarak konulmuş oral prekanseröz lezyonlu ve oral kanserli toplam 50 hasta dahil edilecek, İ.Ü Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi ve Kanser Biyokimyası Laboratuvarlarında yapılacak deneyler sonucu elde edilecek sonuçlar sağlıklı kontroller (n=50) ile karşılaştırılacaktır.

**Konunun Özgünlüğü ve Bilimsel Önemi:** Klinik olarak daha önce oral premalign lezyonlar ve oral kanser ile yapılan çalışmalar içinde VEGF-C, IP-10 ve Ang-1 parametrelerini hem bir arada hem de serum, tükürük ve doku olmak üzere üç ayrı örnekte belirleyen benzer bir çalışma yapılmamıştır.

Planlamış olduğumuz bu çalışmaya hem premalign lezyonlu hem de oral kanserli hasta grubunun dahil edilmesi ile her iki grup arasındaki olası farklar belirlenerek kanserleşme riski olan hasta grubunun tespit edilmesi amaçlanmaktadır. Bu bağlamda klinik olarak faydalı bir çalışma olacağı kanaatindeyiz.

**Yönetim Düzeni:** Proje yöneticisi, çalışmanın sürdürülmesi için birimler arasındaki iletişimi sağlayacak ve deneysel çalışmalarda yer alacaktır. Proje yöneticisi konuyla ilgili literatür bilgilerinin toplanması ve değerlendirilmesi, hastalardan alınan kan, tükürük ve doku örneklerinin uygun koşullarda saklanması, deneylerin yapılması,

verilerin değerlendirilmesi ve sonuçların klinik anlamda karşılaştırılması ve değerlendirilmesi aşamalarından sorumludur.

Ü. Dişhekimliği Fakültesindeki araştırmacılar, hastaların anamnezi alınarak ve gerekli muayeneleri yapılarak klinik olarak tanılarının konulması, biopsi, kan ve tükürük örneklerinin uygun olarak alınması aşamalarında, İ.Ü Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi Bilim Dalı'ndaki araştırmacılar ise hastanın biopsi örneklerinden patolojik olarak tanı konması aşamasında görev alacaklar, immünohistokimyasal çalışmalarda danışman ve gözetmen olarak yardımcı olacaklardır.

Çalışma kapsamında yapılacak olan kan ve tükürükle bildirilen parametrelerin kantitatif düzeylerinin belirlenmesi proje yürütücüsünün bağlı olduğu İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Kanser Biyokimyası Bilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilecektir.

Bu çalışmaya gönüllü olmaya karar verirsiniz bu bilgilendirilmiş olur (onay ) formunu imzalamanız gerekecektir. Sadece kendi rızanız ile hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, tedaviniz esnasında doktorunuz tarafından alınacak doku örneğiniz ile doktorunuza danışılarak alınacak 7-10 cc.'lik kan ve tükürük örneğiniz ile bu bilimsel çalışmaya katılmış olacaksınız. Kan alma sırasında kan alınan bölgede acı, morarma, kanama ya da diğer rahatsızlıklar meydana gelebilir, fakat bu güçlüklerin en aza indirilmesi için önlemler alınacaktır. Size kişisel bilgileriniz olarak sadece yaşınız sorulacaktır. Etik kurullar inceleme amacıyla medikal kayıtlardaki kişisel medikal bilgilerinize ve bu çalışmadan elde edilen bilgilere erişebilirler. Medikal bilgilerinize erişim çalışma için gereken verilerin toplanması ve işlenmesi ile sınırlı olacaktır.

Araştırma amaçlı bu çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılarda ya da yayınlarda sunulabilir, ancak bu sunumlarda sizin kimliğiniz açıklanmayacaktır. Ayrıca sizden araştırma ile ilgili olarak herhangi bir maddi talepte bulunulmayacak ve size de herhangi bir ücret ödenmeyecektir. Katılmaya karar verdikten sonra da herhangi bir zamanda bu çalışmaya katılma için olurunuzu geri çekebilir ve çalışmadan çıkabilirsiniz. Bu karar medikal tedavinizi etkilemeyecektir. Ayrıca bu araştırmaya katılmaya karar verdiğiniz takdirde ileriye dönük olarak hastalığınız hakkında elde edilecek bilgilerle bilim dünyasını konuyla ilgili olarak önemli derecede katkı sağlayacağınız kesindir. Gönüllü olmaya karar verdiğiniz ve bu bilgilendirilmiş gönüllü onay ve rıza formunu imzaladığınız takdirde yukarıda yazılanları okuyup kabul ettiğinizi ve hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın ailenizin bilgisi dahilinde sadece kendi rızanız ile karar verdiğinizi onaylamış olacaksınız.

**İkinci bölüm: (Katılımcının/Hastanın Beyanı)**

Sayın Doç.Dr. Vakur OLGAC'ın gözetiminde MSc. Hilal OĞUZ SOYDİNÇ tarafından İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

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

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

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim)

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr. Vakur OLGAC'ı 0212 414 24 34 – 207 no'lu telefondan ve İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü'nden arayabileceğimi biliyorum.

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

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.



## 6. GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

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

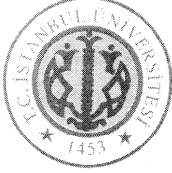
Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı, İmzası

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı-soyadı, İmzası, Görevi

## ETİK KURUL KARARI



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
DEKANLIĞI  
Yerel Etik Kurulu



Sayı : 816

Tarih : 24/03/2008

Konu : Prof.Dr.Vildan YASASEVER hk,

Sayın, Prof.Dr.Vildan YASASEVER  
Onkoloji Enstitüsü  
Öğretim Üyesi

İlgi : 03.12.2007 tarihli, 357/2264 sayılı yazınız,

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve tez öğrencisi Msc. Hilal Oğuz SOYDINÇ'in yürüteceği 2008/302 dosya no'lu "Oral Mukozanın Prekanseroz Lezyonları ve Kansellerinde Diagnostik Önemi Olabilecek Damarsal Belirleyicilerin Araştırılması" başlıklı tez çalışması Araştırma Fonundan desteklendiği takdirde kurulumuzun 20.02.2008 tarihli, 02 sayılı toplantısında onaylanmış olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof. Dr. Zafer ARI  
İstanbul Tıp Fakültesi  
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak



**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI**

**Toplantı Tarihi :** 20/02/2008

**Toplantı Yeri :** Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu

**Toplantı Sayısı :** 2

Sorumlu araştırmacılığını Üniversitemiz Onkoloji Enstitüsü Öğretim Üyesi Prof.Dr. Vildan YASASEVER'in üstlendiği ve Tez Öğrencisi MSc.Hilal Oğuz SOYDINÇ'in yürüteceği 2008/302 protokol numaralı "Oral Mukozanın Prekanseroz Lezyonları ve Kanselerinde Diagnostik Önemi Olabilecek Damarsal Belirleyicilerin Araştırılması" başlıklı tez çalışması Araştırma Fonundan Desteklenmek Şartı ile kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

**Prof.Dr. Zafer ARI**  
Etik Kurul Başkanı ( Dekan Yardımcısı)

**Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN**  
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

**Prof.Dr. Ahmet GÜL**  
İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

**Prof.Dr. Berrin UMMAN**  
Kardiyoloji A.D.

**Prof.Dr. Cahide GÖKKUŞU (Katılmadı)**  
Biokimya A.D

**Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ**  
Anesteziyoloji A.D.

**Prof.Dr. Sevinç EMRE**  
Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

**Prof.Dr. Nuran YILDIRIM (Katılmadı)**  
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.

**Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN**  
Nöroloji A.D.

**Prof.Dr. Pınar SAİP (Katılmadı)**  
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

**Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU**  
Biokimya A.D

**Prof.Dr. Çiçek BAYINDIR (Katılmadı)**  
Patoloji A.D., Nöropatolojik B.D

**Prof.Dr. Yeşim ERBİL (Katılmadı)**  
Genel Cerrahi A.D.

**Prof.Dr. Neşe ÇOLAK**  
İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.

**Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR (Katılmadı)**  
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

**Fatma Ceyda DÖNMEZER**  
Sivil Toplum Örgütü Üyesi

**Av. Dilek Temiz ÖZBEK**  
Hukukçu

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	HİLAL	<b>Soyadı</b>	OĞUZ SOYDİNÇ
<b>Doğ. Yeri</b>	İSTANBUL	<b>Doğ. Tar.</b>	19.09.1978
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	20983211040
<b>Email</b>	hilaloguz@yahoo.com	<b>Tel</b>	5354012704

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>	İ.Ü. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, KANSER BİYOKİMYASI	2005
<b>Lisans</b>	İ.Ü.CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOLOJİK BİLİMLER BÖLÜMÜ	2002
<b>Lise</b>	ŞEHREMİNİ LİSESİ	1995

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
<b>1.</b>	BİYOLOG	İ.Ü.ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ	2007-
<b>2.</b>	LABORANT	İ.Ü.ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ	2003-2007
<b>3.</b>			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İNGİLİZCE	İYİ	İYİ	İYİ	68.75	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>	57.061	59.558	62.055
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS-Office Uygulamaları	İyi

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

24 adet yurtdışı, 10 adet yurtiçi yayını, 36 adet yurtiçi, 10 adet yurtdışı kongre posterini, 6 adet yurtiçi, 1 adet yurtdışı kongre sözlü bildirisi bulunmaktadır.