

T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ, DİŞ, ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI

DİSPLAZİ ve ORAL SKUAMÖZ HÜCRELİ
KARSİNOMDA Ki-67, MCM-2 ve p53
PROLİFERASYON MARKERLARININ
PROGNOSTİK ÖNEMLERİNİN BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

DİŞ HEKİMİ

GÖKHAN TÖRE

DANIŞMAN

Prof. Dr. MEHMET KEMAL ŞENÇİFT

İSTANBUL - 2008

T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ, DİŞ, ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI

DİSPLAZİ ve ORAL SKUAMÖZ HÜCRELİ
KARSİNOMDA Ki-67, MCM-2 ve p53
PROLİFERASYON MARKERLARININ
PROGNOSTİK ÖNEMLERİNİN BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

DİŞ HEKİMİ

GÖKHAN TÖRE

DANIŞMAN

Prof. Dr. MEHMET KEMAL ŞENÇİFT

İSTANBUL - 2008

ÖZET

Töre G. Displazi ve Oral Skuamöz Hücreli Karsinomda Ki-67, MCM-2 ve p53 Proliferasyon Markerlerinin Prognostik Önemlerinin Belirlenmesi. Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul 2008. Hastalıkların klinik olarak değerlendirilmelerinde ve prognozlarının belirlenmesinde ön haberci görevleri bulunan markerlar, tümör biyolojisinin en doğru şekilde anlaşılabilmesini sağlayan moleküllerdir. Bu çalışma, sağlıklı oral mukoza ile birlikte oral displazik lezyonlarda ve oral skuamöz hücreli karsinomlarda Ki-67, MCM-2 ve p53 proliferasyon markerlerinin prognostik önemini belirlemek amacıyla planlandı. Bu çalışma, toplam 47 hastadan alınan 50 doku örneği üzerinde yürütüldü. Mukoza veya kemik retansiyonlu gömülü üçüncü molarları bulunan, yaşları 21 ile 69 arasında değişen (30,28±17,26), 4'ü kadın, 3'ü erkek, toplam 7 hastadan, gömülü üçüncü molar operasyonu sırasında alınan 10 adet sağlıklı dişeti örneği kontrol grubunu oluştururken, oral mukozada displazi ve skuamöz hücreli karsinom (OSHK) tanısı konmuş, yaşları 32 ile 79 arasında değişen (62,02±12,74), 17'si kadın, 23'ü erkek, toplam 40 hastadan alınan, 40 adet biyopsi örneği de çalışma grubunu oluşturdu. Hastaların yaş, cinsiyet, alınan doku örneklerinin lokalizasyonları, klinik ön tanıları, histopatolojik tanıları, displazi dereceleri ve tümörlerin histopatolojik diferansiyasyon evrelemesi ile Ki-67, MCM-2 ve p53 markerlerinin bu doku örneklerindeki ekspresyonları kaydedildi. Mandibulada lokalize oral skuamöz hücreli karsinom (OSHK) doku örneklerindeki p53 ekspresyonu (48,92±25,63), maksillaya göre (24±16,22) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$). OSHK grubunun Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları, kontrol ($p<0.001$) ve displazi ($p<0.05$) gruplarıyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek

bulundu. Hafif dereceli displazik doku örneklerindeki ortalama Ki-67 ekspresyonu ($13,8\pm 5,6$), orta dereceliden ($19,83\pm 6,91$) istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0,047$). Her iki dereceli displazik doku örneklerindeki ortalama MCM-2 ($11,47\pm 6,99$, $10,5\pm 4,48$) ve p53 ($9,87\pm 9,51$, $10,75\pm 7,92$) ekspresyonları arasında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0,94$, $p=0,54$). İyi diferansiye ile orta diferansiye OSHK doku örneklerindeki ortalama Ki-67 ekspresyonları ($37,35\pm 16,43$, $39,5\pm 24,47$) ve MCM-2 ekspresyonları ($28,13\pm 10,3$, $36\pm 20,21$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. İyi diferansiye OSHK doku örneklerindeki p53 ekspresyonu ($33,17\pm 20,98$), orta diferansiye doku ekspresyonundan ($53\pm 25,99$) istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0,037$). OSHK'deki ortalama Ki-67 ile MCM-2 ve MCM-2 ile p53 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak pozitif yönde anlamlı bir korelasyon bulundu. Displazik lezyonların derecelerine göre ayırımlarının en doğru şekilde yapılabilmesi için uygulanan yöntemlerin kesin sonuç vermelerindeki belirsizlik, bu çalışmada kullanılan proliferasyon markerlarının ekspresyon değerlerine göre hala devam etmektedir. **Sonuç olarak;** Ki-67 ekspresyonlarının, MCM-2 ve p53 ekspresyonlarına göre daha anlamlı sonuçlar verdiğini ve Ki-67 markerının displazik lezyonların derecelerinin ayırt edilmesinde, diğer markerlara göre daha güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: displazi; oral skuamöz hücreli karsinom; Ki-67; MCM-2; p53

ABSTRACT

Töre G., The prognostic significance assessment of Ki-67, MCM-2 and p53 proliferation markers in dysplasia and oral squamous cell carcinoma. Yeditepe University Health Sciences Institute, Department of Oral Surgery, PhD Thesis, Istanbul, 2008.

Tumor markers are the precursor molecules in clinical assessment of diseases and determination of the prognosis, thus achieving to conceive the accurate tumor biology. This study is planned in the purpose of investigating the prognostic significance of Ki-67, MCM-2 and p53 proliferation markers in oral dysplastic lesions and oral squamous cell carcinomas with healthy oral mucosa. The study is performed by 50 specimens taken from 47 patients. The control group was formed from 10 healthy normal oral mucosa taken from the impacted third molar surgery operation of 7 patients (4 females, 3 males) between the ages 21-69 (30,28±17,26). The study group was formed from 40 specimens of dysplasia and oral squamous cell carcinoma taken from 40 patients (17 females, 23 males) between the ages 32-79 (62,02±12,74). Ages and genders of the patients, localizations of tissue samples, clinical and histopathological diagnosis, grades of dysplastic lesions and tumors, expressions of Ki-67, MCM-2 and p53 on sections were recorded. p53 expression of oral squamous cell carcinoma (OSCC) localized at mandible (48,92±25,63) was statistically higher than the expression at maxilla (24±16,22), $p < 0.05$. Ki-67, MCM-2 and p53 expressions in OSCC were significantly higher than the expressions in controls ($p < 0.001$) and dysplasias ($p < 0.05$). Ki-67 expression in mild dysplasia (13,8±5,6) was statistically lower than the expression in moderate dysplasia (19,83±6,91), $p = 0,047$. There was no statistical difference between the expressions of MCM-2 ($p = 0,94$) and p53 ($p = 0,54$) in both grades of dysplasia. There was also no significant difference between the mean expressions of Ki-67 (37,35±16,43, 39,5±24,47) and MCM-2

(28,13±10,3, 36±20,21) in well and moderately differentiated OSCC. p53 expression in well differentiated OSCC (33,17±20,98) was statistically lower than its expression in moderately differentiated OSCC(53±25,99), p=0,037. A positive correlation was found between the mean expressions of Ki-67 with MCM-2 and MCM-2 with p53 in OSCC. Ambiguity of methods in accurate discrimination between the grades of dysplastic lesions still persists in the expressions of proliferation markers used in this study. **We conclude that;** Ki-67 expressions reveal more significant outcomes when compared with MCM-2 and p53 expressions. Furthermore, we suggest that Ki-67 marker is more reliable in distinguishing the grades of dysplasia than the others we examined.

Keywords: dysplasia; oral squamous cell carcinoma; Ki-67; MCM-2; p53

TEŞEKKÜR

Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'ndeki ilk günlerimden beri, ilgimi en çok çeken bölüm Ağız-Diş-Çene Hastalıkları ve Cerrahisi oldu. Bana bu sevdiğim bölümün kapılarını açan, tezimin hazırlanması aşamalarında tecrübelerinden ve bilgilerinden faydalandığım, Ağız-Diş-Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım, Sayın **Prof.Dr.M.Kemal Şençift'e**,

Bölüme girdiğim ilk günden bugüne kadar hergün bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, diş hekimi ve cerrahlığın yanında gerçek bir öğretmen olan, yeri geldiğinde abla kadar kendini bana yakın hissettiren, tezimin her satırında emeği olan, tezimin her aşamasında beni motive ederek çalışmamın eksiksiz olması için üstün bir gayret gösteren sevgili hocam, Sayın **Doç.Dr.Nurhan Güler'e**,

Önce diş hekimliği gibi eşsiz ve kutsal bu mesleği bana kazandıran, oral implantolojide master eğitimimi alarak mesleki bilgilerimi daha da arttırmamı sağlayan ve cerrahi bölümünde doktora eğitimimi alarak bilimsel dünyada benim de varolmamı destekleyen ve bütün bu saydığım olanakları benim gibi Yeditepelilere, dünya standartlarının üstünde en modern imkanlarda sunan dekanımız, Sayın **Prof.Dr.Türker Sandallı'ya**,

Tezimin gerçekleşmesinde beni destekleyen, sorularımı sıkılmadan yanıtlayan Sayın **Prof.Dr.Sedat Çöloğlu** ve tezimin patolojik çalışmalarında doku kesitlerinin boyama ve görüntülenmesinde bana yardımcı olan, Sayın **Doç.Dr.Nil Çomunoğlu** olmak üzere tüm Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı çalışanlarına,

Doktora tezimin temelini oluşturan hastaların bulunmasında bana yardımcı olan ve patolojik çalışmaların başlamasına vesile olan, Sayın **Prof.Dr.Gülçin Erseven** ve tek tek hastaların seçilmesinde bana yardımcı olan ve yol gösteren, Sayın **Dr.Vakur Olgaç** olmak üzere tüm İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Patoloji Bilim Dalı alışanlarına,

Tez çalışmalarım boyunca bana destek olan, tezimin en doğru ve güzel şekilde hazırlanmasında emeği geçen **Doç.Dr.ağrı Delilbaşı** ve tüm **Ağız-Diş-ene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı alışma arkadaşlarıma,**

Beni yetiştiren, bugünlere gelmemi sağlayan, bugünlere gelirken de hiçbir fedakrlıktan kaçınmayan, sevgi ve desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim canım annem **Nihal Töre**'ye ve akademisyenlik yolunda kendime örnek aldığım canım babam **Prof.Dr.Gökhan Töre**'ye,

Sevgi, Saygı ve Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	II
ONAY SAYFASI	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	VI
TEŞEKKÜR	VIII
İÇİNDEKİLER	X
KISALTMALAR ve SİMGELER	XII
ŞEKİLLER	XIV
RESİMLER	XV
TABLolar	XVII
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Oral kanserlerin gelişmesinde rol oynayan faktörler	6
2.2. Tümör Sınıflandırması	8
2.3. Displazi	13
2.4. Carcinoma in situ (CIS)	15
2.5. Oral Skuamöz Hücreli Karsinom (OSHK)	15
2.6. Hücre Bölünmesi	17
2.7. Hücre Siklusu	19
2.8. Tümör Markerları	23
2.9. Ki-67	25

2.10. Minichromosome Maintenance Proteins (MCM Proteinleri)	28
2.11. Apoptoz	32
2.12. p53	36
GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Materyal	41
3.2. İmmunohistokimyasal Metod	50
3.3. İstatistiksel Analiz	51
BULGULAR	52
TARTIŞMA	72
SONUÇLAR	85
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	102
EK-1: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	
EK-2: Hasta Kayıt Formu	
EK-3: Etik Kurul Onayı	

KISALTMALAR ve SİMGELER

AgNOR	Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions
AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ark.	arkadaşları
ATP	Adenosine Tri-phosphate
C°	Celcius (Derece)
CIS	Carcinoma in situ
DNA	Deoxyribonucleic Acid
G	Growth
HPV	Human Papilloma Virus
KW	Kruskal Wallis
M	Mitoz
MCM	Minichromosome Maintenance Proteinleri
mg	miligram
ml	mililitre
MIB-1	Monoklonal Antikor
MW	Mann-Whitney
ORC	Origin Recognition Complex
OSHK	Oral Skuamöz Hücreli Karsinom
p	probability
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
pH	power of Hydrogen

r	relation
RNA	Ribonucleic Acid
S	Sentez
SHK	Skvamöz Hücreli Karsinom
TBS	Trisitrate Buffer Solution
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
UV	Ultraviolet
WHO	World Health Organization

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1. Mitoz hücre bölünmesi ve fazları	18
Şekil 2.2. Hücre siklusu ve evreleri	21
Şekil 2.3. Apoptoz ve p53'ün apoptozdaki rolü	35
Şekil 4.1. Cinsiyete göre displazi ve oral skuamöz hücreli karsinom doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları	54
Şekil 4.2. Displazik doku örneklerinin lokalizasyonlarına göre Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyon ortalamaları	55
Şekil 4.3. Lokalizasyonlarına göre oral skuamöz hücreli karsinom doku örneklerinin Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları ortalaması (%)	56
Şekil 4.4. Kontrol, displazi ve oral skuamöz hücreli karsinom doku örneklerindeki ortalama Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları	58
Şekil 4.5. Hafif ve orta displazi doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyon ortalamaları	59
Şekil 4.6. OSHK doku örneklerinin, diferansiyasyon derecelerine göre ortalama Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları	62

RESİMLER

	Sayfa
Resim 3.1. Normal dişeti epitelı görüntüsü	42
Resim 3.2. Hafif derecede displazi gösteren skuamöz epitel	43
Resim 3.3. Orta derecede displazi gösteren skuamöz epitel	44
Resim 3.4. Ağır derecede displazi gösteren skuamöz epitel	45
Resim 3.5. Grade-1 Skuamöz hücreli karsinom	47
Resim 3.6. Grade-2 Skuamöz hücreli karsinom	48
Resim 3.7. Grade-3 Skuamöz hücreli karsinom	49
Resim 4.1. Hafif derecede displazi gösteren epitelde Ki-67 ile %40 oranında pozitiflik	63
Resim 4.2. Hafif derecede displazi gösteren epitelde MCM-2 ile %30 oranında pozitiflik	63
Resim 4.3. Hafif derecede displazi gösteren epitelde p53 ile %27 oranında pozitiflik	64
Resim 4.4. Orta derecede displazi gösteren epitelde Ki-67 ile %30 oranında pozitiflik	64
Resim 4.5. Orta derecede displazi gösteren epitelde MCM-2 ile %8 pozitiflik	65
Resim 4.6. Orta derecede displazi gösteren epitelde p53 ile %20 pozitiflik	65
Resim 4.7. Ağır derecede displazi gösteren epitelde Ki-67 ile %23 pozitiflik	66

Resim 4.8.	Ağır derecede displazi gösteren epitelde MCM-2 ile %20 pozitiflik	66
Resim 4.9.	Ağır derecede displazi gösteren epitelde p53 ile %20 pozitiflik	67
Resim 4.10.	Grade-1 Skuamöz hücreli karsinomda Ki-67 ile %65 pozitiflik	67
Resim 4.11.	Grade-1 Skuamöz hücreli karsinomda MCM-2 ile %40 pozitiflik	68
Resim 4.12.	Grade-1 Skuamöz hücreli karsinomda p53 ile %95 pozitiflik	68
Resim 4.13.	Grade-2 Skuamöz hücreli karsinomda Ki-67 ile %76 pozitiflik	69
Resim 4.14.	Grade-2 Skuamöz hücreli karsinomda MCM-2 ile %60 pozitiflik	69
Resim 4.15.	Grade-2 Skuamöz hücreli karsinomda p53 ile %95 pozitiflik	70
Resim 4.16.	Grade-3 Skuamöz hücreli karsinomda Ki-67 ile %10 pozitiflik	70
Resim 4.17.	Grade-3 Skuamöz hücreli karsinomda MCM-2 ile %10 pozitiflik	71
Resim 4.18.	Grade-3 Skuamöz hücreli karsinomda p53 ile %25 pozitiflik	71

TABLolar

	Sayfa
Tablo 2.1. T: Primer tümörün sınıflandırılması	9
Tablo 2.2. N: Bölgesel lenf bezi metastazının sınıflandırılması	10
Tablo 2.3. M: Uzak metastaz sınıflandırılması	11
Tablo 2.4. Tümör evrelemesi	11
Tablo 2.5. R: Residuel tümörün sınıflaması	12
Tablo 2.6. Tümörün histolojik grade sınıflaması	12
Tablo 4.1. Hasta grupları ile yaş ortalamaları, cinsiyet ve doku örneklerinin alındığı lokalizasyon bilgileri	53
Tablo 4.2. Cinsiyete göre displazi ve oral skuamöz hücreli karsinom doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları	53
Tablo 4.3. Displazik doku örneklerinin lokalizasyonlarına göre Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyon ortalamaları	54
Tablo 4.4. Lokalizasyonlarına göre oral skuamöz hücreli karsinom doku örneklerinin, Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları ortalaması (%)	56
Tablo 4.5. Kontrol, displazi ve oral skuamöz hücreli karsinom doku örneklerindeki ortalama Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları	57
Tablo 4.6. Hafif ve orta displazi doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyon ortalamaları	58

Tablo 4.7.	Displazik doku örneklerinde Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonlarının korelasyonu	59
Tablo 4.8.	Kontrol grubu ile hafif ve orta dereceli displazik doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonlarının ortalamaları	60
Tablo 4.9.	OSHK doku örneklerinin, diferansiyasyon derecelerine göre ortalama Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları	61
Tablo 4.10.	Oral Skuamöz Hücreli Karsinom doku örneklerinde, Ki-67, MCM-2, p53 ekspresyonlarının korelasyonu	62

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Oral karsinogenezin, birkaç basamaktan oluşan moleküler ve histolojik bir olay olduğu düşünülmektedir. Genellikle epitelin proliferatif alanındaki büyüme fraksiyonundaki ve hücre bölünme oranındaki artış gibi hücre kinetiğindeki değişimler, histolojik özelliklerini oluşturmaktadır. Bu değişimler, normal ağız içi epitelinin, malign bir tümöre transformasyonunu açıklamaktadır. Bu bilgilere dayanarak, normal epitelin karsinoma transformasyonu sırasında meydana gelen oluşumların, hafif ve ağır dereceli oral epitelyal neoplaziler olduğu ve bu displazik değişimlerin, invazif skuamöz hücreli karsinomun ön habercisi niteliğinde bulunduğu düşünülmektedir.

Hücre proliferasyonunun belirlenmesinde çeşitli metodlar kullanılmaktadır, ancak prognostik önemleri hala tartışma konusudur. Oral epitel hücrelerinin proliferasyon hızlarındaki değişimler, ağız mukozasının yüzey epitelinden gelişebilen kistler ve tümörlerin patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Bu hücrelerin proliferatif potansiyellerinin belirlenmesinde en sık Ki-67, PCNA, AgNOR gibi klasik proliferasyon markerları ile, apoptozu da belirleyen p53 markerının yer aldığı birçok immunohistokimyasal araştırma rapor edilmektedir. Günümüzde kullanılan markerlar içerisinde, hücrelerin aktif olarak proliferasyon olup olmadığını en doğru şekilde gösterebilen bir marker bulunmamaktadır. Ayrıca baş-boyun skuamöz hücreli karsinomlarda Ki-67, MCM-2 ve/veya p53 immunoreaktivitesi hala tartışma konusudur. Tümör birçok basamak ve faktörden geliştiğinden, prognozun belirlenmesinde tek bir marker kullanmanın yetersiz olacağı bildirilmektedir. Prognozun belirlenmesinde, proliferasyon ve apoptoz ile ilişkili markerların tek başlarına kullanılmalarının yanında, kombine bir

şekilde uygulanmalarının, çok daha anlamlı sonuçlar gösterdiği bildirilmektedir.

Ki-67 proliferasyon markerı, oral kavitenin premalign ve malign lezyonlarına eşlik eden genetik anormalliklerin olası göstergesi olarak oldukça yaygın kullanılmaktadır. Bu proliferasyon markerının ekspresyonunun, bazı kanserlerin prognozunda yararlı bilgiler verdiği bildirilirken, elde edilen bu bilginin klinik önemi hala tartışmalıdır. Klasik proliferasyon markerlarının hücre siklusu hakkında verdiği bilgilerin sınırlı olmasından dolayı, hücre biyolojisinin anlaşılabilmesi için yeni markerların geliştirilmesi ve kullanılması gerekmektedir. Oral mukozanın sitolojik değerlendirilmesine dayandırılarak, oral malignitelerin ve displazilerin teşhis edilmesinde, minimal invazif ve objektif testlerin geliştirilmesi, bu alandaki en önemli ilerlemeler olacaktır. Klasik sitolojik araştırmalar ile bazı oral skuamöz hücreli karsinomların tanısı konulabilmektedir. Ancak bu tekniklerin hatalı pozitif değerlerinin çok yüksek olması, malign ve displazik hücrelerin normal hücrelerden ayrılabilmelerini sağlayan biyomarkerların geliştirilmesine yolaçmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, MCM proteinlerinin olası tümör oluşumu tahmininde kullanılabilecek en iyi proliferasyon markerlardan biri olduğunu göstermektedir. Tüm bu özellikleriyle MCM proteinlerinin, proliferatif hücrelerin spesifik markerları olarak kullanılabileceği, sahip oldukları immunoreaktivitenin, çeşitli malign tümörlerde potansiyel klinik önem taşıdığı ileri sürülmektedir. MCM proteinleri gibi yeni proliferasyon markerlarını kullanarak, oral mukoza hücre proliferasyonu hakkında bilgi sahibi olabilmek için yeterli veri bulunmamaktadır.

Nükleer bir fosfoprotein olan p53, oral kanserler içerisinde ve özellikle de oral skuamöz hücreli karsinomda sıklıkla değişime uğradığı en iyi bilinen tümör supresör genidir. Baş-boyun skuamöz hücreli karsinomların yaklaşık %50'sinde p53 geninde mutasyonlar görülmektedir. İmmunohistokimyasal çalışmalar p53 proliferasyon markerının, displazilerin %85'inde, oral karsinomların ise %54-67'sinde ekspresyonunun yüksek olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma, sağlıklı oral mukoza ile birlikte oral displazik lezyonlarda ve oral skuamöz hücreli karsinomlarda Ki-67, MCM-2 ve p53 proliferasyon markerlarının prognostik önemini belirlemek amacıyla planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

Günümüzde oral kanserler, toplumun genelinde oldukça sık rastlanan, tüm dünyadaki önemli sağlık problemlerinden biridir. Dünya popülasyonunda görülen bütün kanser tiplerinin %5,6'sını baş-boyun kanserlerinin ve bunların yarısını (%3) ise, oral kanserlerin oluşturduğu¹, kanser insidans sıralamasında sekizinci sırada bulunduğu bildirilmektedir². Ülkemizde ise, kanser istatistik araştırmaları yeterli olmadığı ve kanser kayıt çalışmaları yakın yıllarda başladığı için, gerçek kanser insidansı tam olarak bilinmemektedir. Her yıl dünya genelinde meydana gelen bütün ölümlerin %13'ünün kanser nedeniyle olduğu bilinmektedir³. Kansere bağlı ölüm vakalarının %3'ünü oral ve orofaringeal kanserlerin oluşturduğu bildirilmektedir⁴. Türkiye' de 1996 ile 1998 yılları arasında en sık görülen ölüm sebepleri arasında kanser ikinci sırada yer almaktadır (%15)⁵. 2003 yılında yapılan bir çalışmada bu oranın %12,9 olduğu⁶, yaş gruplarına göre dağılımın incelendiği başka bir çalışmada ise, kanser görülme sıklığının 35-74 yaşları arasında en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmiştir⁵. 1991 yılında Türkiye'de ağız ve larinks bölgelerinde görülen kanser vakalarının, erkeklerde bütün kanser tiplerinin %4,1'ini, kadınlarda %2,6'sını oluşturduğu bildirilmiştir⁷. Kılıç ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmada, kanser tanısıyla izlenen hastaların %56,8'ini erkeklerin, %43,2'sini ise kadınların oluşturduğu, erkeklerde en sık 40 yaş ve altında (%29,2), kadınlarda en çok 40-54 yaşları arasında (%34,7) görüldüğü bildirilmiştir⁸. Bütün kanserler içerisinde baş-boyun tümörlerinin %6,1'inin erkeklerde, %2,3'ünün de kadınlarda olduğu, erkeklerde en çok 40 yaş altında (%7,5), kadınlarda ise en çok, 55-64 yaş grubunda (%3,5) görüldüğü rapor edilmektedir⁸. Ülkemizde bir yılda beklenen kanser vakası sayısı, ortalama 70.000 ile 100.000'dir. Ancak, 1999 yılında sadece 25942 vaka iken, 2003 yılında bu rakam 49387 olarak kaydedilmiştir^{5,6}. Hayatta kalma oranının

yükseltilebilmesinin en önemli kriteri, erken teşhistir. Oral kavite, muayene ve biyopsi için kolay ulaşılabilir bir bölge olduğundan, erken teşhisteki en önemli rolü, diş hekimleri üstlenmektedir⁹.

Oral kanserler dudak, dil, alt ve üst çene alveoler mukozası, damak, ağız tabanı, retromolar trigon ve orofarinks bölgesiyle sınırlandırılmış alanda görülmektedir. Oral kanserlerin 1/3'ü orofarinks bölgesini tutarken, geri kalan 2/3'lük bölüm, oral kavitede gelişmektedir. Oral kanserlerin bir yılda tüm kanser olgularının %2 ile %4 arasındaki bir bölümünü oluşturdukları bilinmektedir¹⁰. Bu durum ülkemizde de yaklaşık olarak bu oranlarda görülmektedir⁸. Güney Doğu Asya ülkelerinde oral kanserler, çok daha yüksek oranlarda görülmektedir. Oral kanserli hastaların %95'inin, 40 yaş üzerindeki bireyler oldukları ve hastalığın teşhisi sırasındaki ortalama yaşın 60 olduğu bilinmektedir. Kadın/erkek oranı, 1950 yılında 1/6 iken, 1997 yılında bu oran 1/2'ye yükselmiştir. 50 senelik bir süre içerisinde, oranların üç katı kadar artmış olmasına sebep olarak, kadınlarda ağız içi kanserlerinin nedeni olarak kabul edilen sigara ve alkol tüketiminin artışı düşünülmektedir. Olguların %75'indeki primer neden, alkol ve sigara olarak kabul edilmektedir¹¹.

Bu malignitelerin oluşmasına sebep olabilecek birçok risk faktörü, etiyolojik ajan olarak düşünülmektedir. Oral kanserler, multifaktoriyel etyolojileri olan hastalıklardır. Tütün çiğnemek, sigara kullanmak, sık alkol almak, uzun süre güneş ışınlarına maruz kalmak, ağız hijyeninin yetersiz, kötü olması ve hatta olmaması, beslenme bozuklukları, demir eksiklikleri, kandidal enfeksiyonlar gibi lokal faktörler ve özellikle HPV gibi viral enfeksiyonlar, ırk, cinsiyet, radyoterapi, genetik, avitaminozlar ve immun sistem hastalıkları gibi sistemik faktörler, kanser gelişimindeki en önemli faktörlerdir¹². Ayrıca oral kavitede devamlı travma oluşturan diş çürükleri, taşkın veya kötü

yapılmış dolgular, keskin tüberküllu dişler, kötü yapılmış her türlü protetik restorasyon, malign transformasyona neden olan lokal faktörler arasında yer almaktadır¹³.

2.1. Oral kanserlerin gelişmesinde rol oynayan faktörler

Lökoplaki, eritroplaki, oral submüköz fibrosis, proliferatif verrüköz displazi, likenoid displazi, atrofik ve büllöz liken planus, kandidal lökoplaki gibi kanser öncesi görülen bazı lezyonların varlığı, immün yetmezlik durumları, sifilis, konjenital diskeratosis, oral kanserlerin etnik ve familiyal özgeçmişinin bulunması, oral kanserlerin gelişimlerinde önemli yer tutmaktadır⁴.

Genellikle teşhis sırasında hastaların 2/3'ünün, ileri aşamada (evre III veya IV) olduğu bildirilmiştir¹⁴. Oral kanserli hastaların prognozları oldukça zayıftır ve teşhis edildikten sonraki 5 yıl içerisinde, hastaların üçte birinden fazlasının kaybedildiği görülmektedir¹⁴. Ancak evrelerine göre 5 yıllık yaşam oranı evre I ve II'de %65 ile %75 iken, evre III ve IV'te ise bu oran % 20 ile %30 arasında değişmektedir¹⁵. Hayatta kalma oranının bu kadar düşük olmasının sebebi ise, teşhisin geç yapılması, primer tümör alanındaki yüksek rekürens oranı ve ikinci primer tümörlerin oluşması gibi nedenlerin olabileceği düşünülmektedir^{16,17}. Yapılan çalışmalarda, 5 yıl takip altında tutulan hastalarda ikinci primer tümör oluşma insidansı, evre I olanlarda yıllık %4,3 iken, evre II olanlarda ise bu oran %6,4'e çıkmaktadır¹⁸. Bu sebeple, hastalığın kontrol altına alınabilmesi, yaşam süresi ve kalitesinin arttırılabilmesi için, çok daha etkili tanı ve tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi önerilmektedir. Yaşam süresi, başta kliniko-patolojik evre (TNM) ve diferansiyasyon derecesi (Grade) olmak üzere, hücre tipi ve nükleer morfoloji gibi, bazı prognostik faktörlerle ilişkilendirilmektedir¹⁹. Ancak aynı evre ve dereceye sahip hastaların

prognozunun da kendi arasında değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. Konuyla ilgili bilgilerin arttırılmasının, yüksek riskli hastalarda ilave prognostik parametrelerin bulunmasıyla mümkün olacağı düşünölmektedir.

Bazı araştırmaların sonuçları, sigara ve alkol tüketimi ile hayatta kalma arasında bir ilişkinin bulunmadığını göstermesine²⁰ rağmen, çoğu araştırmacı bu maddelerin tüketiminin mortaliteyi yükselttiği yönünde görüş bildirmektedir²¹⁻²³. Özellikle tütün çiğneme, hastalığın prognozunun çok daha kötü olmasına sebep olmaktadır²⁰. Sigara ve alkol kullananların, ikinci bir kanser odağının oluşma riskini, kullanmayanlara göre daha fazla taşıdığı ve daha ağır sonuçlara maruz kaldığı ileri sürölmektedir²⁴.

Oral kanser hastalarında 1 yıl içinde ikinci primer lezyon görülme oranı, %4 olarak bildirilmiştir. Primer oral kanser hastalarının büyük bir bölümünde ikinci primer, solunum ile sindirim yolları karsinomları olarak görölebilmektedir. Tanısı konulan olguların %36'sı lokalize hastalık olup, hastanın 5 yıl hayatta kalma şansı %81'dir. %43'ü ise reyonel hastalık olup, hastanın 5 yıl hayatta kalma şansı %42 iken, %9'u uzak metastazlıdır ve bu olgularda 5 yıl hayatta kalma şansı %17 olarak bildirilmektedir¹⁰.

Oral kanserlerin önlenmesi ve eğer oluştu ise, prognozunun iyi olabilmesi için, lezyonun erken teşhisi büyük önem taşımaktadır. İleri görüntöleme tekniklerinin dışında, erken teşhisin konulabilmesi ve müdahalenin zamanında yapılarak olası malign durumların önlenmesi, çeşitli prognostik faktörler aracılığı ile sağlanmaktadır. Tümörün klinikopatolojik evresi²⁰, histolojik grade'i²⁰, apoptotik markerlar²⁵, proliferasyon markerları²⁶ ve hastanın yaşı^{21,22}, oral kanserlerde rol oynayan bazı prognostik faktörlerdir.

2.2 Tümör Sınıflandırması

Tümörlerin sınıflandırmaları, hastalığın durumunun ortaya konması, tedavi planlamasında rehber olması ve hastaların 5 yıllık hayatta kalma olasılıklarının tahmini açısından belirleyici en önemli faktördür⁴. Günümüzde yaygın olarak kullanılmakta olan sınıflandırma, American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından 1980 yılında hazırlanmış ve 2002 yılında Greene ve arkadaşları tarafından son haline getirilmiş olan kliniko-patolojik sınıflandırmadır^{4,27,28}. Sınıflandırma sistemi, prognoz açısından güvenilir parametreler ortaya koyması açısından önemlidir. T, primer lezyonu ifade ederken, komşu dokulara infiltrasyon varlığına ve en büyük boyuta göre derecelendirilir (Tablo 2.1). N, bölgesel lenf nodülü tutulumunu ifade ederken, en büyük boyut ve nodül varlığına göre derecelendirilir (Tablo 2.2). M ise, uzak metastazların varlığına göre derecelendirilir (Tablo 2.3).

Tablo 2.1. T: Primer tümörün sınıflandırılması

<u>T: Primer Tümör</u>	
T _x	Cerrahi kurallar içinde belirlenemeyen primer tümör
T ₀	Primer tümöre ait bulgu yok
T _{is}	Carcinoma in-situ
T ₁	Çapı 2 cm. veya 2 cm.'den küçük tümör
T ₂	Çapı 2 cm.'den büyük, 4 cm.'den küçük tümör
T ₃	Çapı 4 cm.'den büyük tümör
T ₄	Çapı 4 cm.'den büyük solid tümör
T _{4a}	Komşu yapıları (kortikal kemik, dilin derin kasları, maksiller sinüs gibi) içine almış ancak, rezeke edilebilir tümör
T _{4b}	Pterigoid plak, kafa tabanı veya internal karotid arteri içine alan, rezeke edilemeyecek tümör

Tablo 2.2. N: Bölgesel lenf bezi metastazının sınıflandırılması

<u>N: Bölgesel Lenf Bezi Metastazı</u>	
N _x	Cerrahi kurallar içinde belirlenemeyen bölgesel lenf nodülü
N ₀	Klinik olarak bölgesel lenf nodülü metastazı yok
N ₁	Çapı 3cm. veya 3 cm.'den küçük olan, homolateral, tek lenf nodülü
N ₂	Klinik olarak pozitif, çapları 3-6 cm. olan, homolateral tek nodül veya klinik olarak pozitif, multipl homolateral nodüller
N _{2a}	Klinik olarak pozitif, çapları 3-6 cm. olan homolateral tek nodül
N _{2b}	Klinik olarak pozitif, çapları 3-6 cm. olan homolateral multipl nodüller
N ₃	Solid homolateral nodüller, bilateral nodüller veya kontralateral nodüller
N _{3a}	Klinik olarak pozitif, çapları 6 cm.' i geçmeyen homolateral multipl nodüller
N _{3b}	Klinik olarak pozitif bilateral nodül
N _{3c}	Klinik olarak pozitif kontralateral nodül

Tablo 2.3. M: Uzak metastaz sınıflandırılması

<u>M: Uzak Metastaz</u>	
M _x	Cerrahi kurallar içinde belirlenemeyen uzak metastaz
M ₀	Uzak metastaz yok
M ₁	Uzak metastaz var

Evrelendirme, klinik değerlendirme açısından çok önemli bir kriterdir (Tablo 4).

Tablo 2.4. Tümör evrelemesi

<u>Evreleme</u>	
Evre 0	T _{is} N ₀ M ₀
Evre 1	T ₁ N ₀ M ₀
Evre 2	T ₂ N ₀ M ₀
Evre 3	T ₃ N ₀ M ₀ / T ₁ N ₁ M ₀ / T ₂ N ₁ M ₀ / T ₃ N ₁ M ₀
Evre 4A	T _{4a} N ₀ M ₀ / T _{4a} N ₁ M ₀ / T ₁ N ₂ M ₀ T ₂ N ₂ M ₀ / T ₃ N ₂ M ₀ / T _{4a} N ₂ M ₀
Evre 4B	Herhangi T, N ₃ M ₀ veya T _{4b} , herhangi N, M ₀
Evre 4C	Herhangi T, herhangi N, M ₁

Tümör tedavisi sonrası residüel tümörlerin kalması, uygulanan tümör tedavisinin yetersiz olduğunu veya hiç etkili olmadığını belirtmektedir (Tablo 5).

Tablo 2.5. R: Residüel tümörün sınıflaması

<u>R: Residüel Tümör</u>	
R ₀	Residüel tümör yok
R ₁	Mikroskobik residüel tümör var
R ₂	Makroskobik residüel tümör var

Oral skuamöz hücreli karsinomun (OSHK) prognozunun değerlendirilmesinde esas olarak klinik TNM sınıflandırılması kullanılmaktadır ancak, bu evreleme sistemi prognozun en doğru şekilde değerlendirilmesinde yeterli değildir ve diğer güvenilir metotlar ile desteklenmesi gerekmektedir²⁹. Tümörlerin histolojik grade'i, SHK'nin klinik seyri tahmini amacı ile uzun senelerdir kullanılmaktadır. OSHK'nin biyolojik aktivitesi değerlendirilmekte ve iyi, orta ve kötü diferansiyasyon (indiferansiyasyon) olmak üzere tanımlanarak sınıflandırılmaktadır. Bu sistem ilk kez 1920 yılında, Broders tarafından geliştirilmiştir³⁰ (Tablo 6).

Tablo 2.6. Tümörün histolojik grade sınıflaması

Grade-1	İyi diferansiyasyon
Grade-2	Orta diferansiyasyon
Grade-3	Kötü diferansiyasyon / indiferansiyasyon

Oral kanserlerin, birçok basamaktan oluşan, moleküler ve histolojik bir hastalık olduğu düşünülmektedir. Histolojik özelliklere en etkili neden olarak, büyüme fraksiyonundaki ve hücre bölünmesindeki artış ile kendini gösteren, epitelin proliferatif hücrelerinin kinetiğindeki değişimler olarak gösterilmektedir. Bu değişim, normal ağız içi epitelinin, malign bir tümöre transformasyonunu belirlemektedir. Normal epitelden karsinoma geçişin sırası, öncelikle düşük, daha sonra yüksek evreli neoplaziler şeklindedir. Bu displazik değişimlerin, invaziv skuamöz hücreli karsinomun ön habercisi olduğu da bildirilmektedir³¹.

2.3 Displazi

Morfolojik olarak displazi, epitel hücrelerindeki, hücresel ve nükleer boyut, şekil ve boyanma özelliklerinde meydana gelen değişimlerin eşlik ettiği, çevreleri ile olan normal ilişkilerinin kaybolduğu patolojik durum olarak tanımlanmaktadır³². Displazi, bu hücresel anormalliklerin derecelerine göre sınıflandırılır ve servikal intraepitelyal neoplazi gibi premalign displazik durumların tanımlanmasında, normal dokudan neoplaziye doğru ilerleyişte ara bir evre olarak kabul edilmektedir³³. Çoğu neoplazilerin normal dokularla kıyaslandığında proliferasyon oranlarının çok daha hızlı olması, genel ortak özellik olarak kabul edilmektedir. Displazik epitelin tanımlanmasında kullanılan kriterler, artmış sayılarda gerçekleşen mitozların varlığı ve bu mitozların anormal dağılım göstermeleridir. Ayrıca bu kriterler ile, bu preinvazif lezyonların proliferasyon oranlarında da bir artış olduğu düşünülmektedir. Ancak, displazik insan dokularındaki hücre siklus kinetiğinde bu hipotezin araştırılması için yapılan girişimler, mevcut kullanılabilir biyolojik markerlar ile sınırlıdır³⁴. Oral epitelyal displazi, mikroskopik bulgulara dayanan bir kavram olup, klinik açıdan belirgin nitelikleri bulunmamaktadır. Kırmızı veya beyaz renkli lezyonlardaki displazik değişiklikler,

toplumlar arasında da farklılıklar göstermektedir. Bu farklılık, toplumların genetiğiyle ve toplumsal yaygınlık gösteren alışkanlıklarla açıklanmaktadır. Normal görünümdeki hücreler arasında yer yer atipik hücrelerin varlığı, bazal tabaka hücrelerinde hiperplazi, epitel hücrelerinde olgunlaşma ve tabakalaşma bozuklukları, hiperkromatik çekirdekli hücrelerin bulunması, serpilmiş mitozların saptanması gibi bulgular çok katlı yassı epitelde görülen displazik değişikliklerin temel bulgularıdır. Hafif, orta ve ağır displazi olarak derecelendirilmesi yapılmaktadır. Derecelendirmeleri yapılırken, inceleme sırasında görülen en ileri derece, tanı olarak verilmektedir. Ancak, epitel displazilerin derecelendirmesi çok somut bulgulara dayanmadığı için, doku kesitlerini inceleyen değişik patologlar tarafından farklı tanımlar konulabilmektedir. Displazi tanısının farklılıklar yaratmadan en doğru şekilde konulması için, 1997 yılında Pindborg ve ark. tarafından belirlenen kriterlerin göz önünde bulundurularak değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu kriterler; su damlası biçiminde papillamatoz, hücre çekirdeklerinde hiperkromatik boyanma ve pleomorfizm, sitoplazma-çekirdek oranında bozulma, mitoz sayısında artış, hücre katmanlarının bozulması, diskeratoz, diferansiyasyon bozuklukları ve hücreler arası bağlantıların bozulmasıdır³⁵. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2005 yılında oral epitelyal displazinin mikroskopik tanı kriterlerini, hücresel ve dokulara özgü olmak üzere 2 ayrı maddede tanımlamaktadır. Hücresel değişiklikler; çekirdeklerde ve hücrelerde büyüklük farkı, çekirdek/sitoplazma oranında artma, büyük hücreler ve çekirdekler, hiperkromatik ve pleomorfik çekirdek, mitoz ve nukleolus sayılarında artma şeklindedir. Dokulara özgü değişiklikler ise; epitelde tabakalaşma bozukluğu, diskeratoz, hücresel yoğunlukta artış, bazal ve spinal hücrelerde olgunlaşma bozukluğu, geniş tabanlı epitel papillaları ve bu papillalarda dallanmalar ile bazal hücrelerde hiperplazi olarak tanımlanmıştır³⁶. Ağız içerisinde oluşan displazik lezyonların %10 ile %20'sinin invazif karsinoma dönüştüğü bildirilmektedir³⁷.

2.4 Carcinoma in situ (CIS)

Carcinoma in situ (CIS), çok katlı yassı epitelde görülen displazik değişikliklerin son aşamasıdır. Lezyonun bulunduğu alandaki epitel dokusunun tüm katmanları atipik hücrelerden oluşmaktadır ve çok sayıda mitoz mevcuttur. Ancak, bazal membran bütünlüğünü koruduğu için, subepitelyal bağ dokusuna invazyon görülmemektedir. Bu özelliklerinden dolayı, CIS için kullanılan bir diğer tanımlama ise, preinvazif karsinomdur³⁸. Hellquist ve ark. (1999) çalışmasında, CIS'in yüksek invazif karsinom oluşturma riski taşıyan bir lezyon olduğunu bildirmektedir³⁹. Birchall ve ark.'nın (1995) çalışmasında, CIS'in prognostik öneminden bahsedilirken, apoptotik aktivitenin en çok bu lezyonda görüldüğü rapor edilmektedir⁴⁰.

2.5 Oral Skuamöz Hücreli Karsinom (OSHK)

Günümüzde baş ve boyun bölgesinde görülen skuamöz hücreli karsinom ile, batı dünyasındaki gelişmiş ülkelerde altıncı, gelişmekte olan ülkelerde ise üçüncü en yaygın kanser tipi olarak karşılaşılmaktadır¹. Oral skuamöz hücreli karsinomlar, baş ve boyun kanserlerinin %50 ile %60'ını, oral kanserlerin ise, %85 ile %95'ini oluşturmaktadır^{1,41}. Tüm dünyadaki kanser insidans sıralamasında, ağız içi kanserler 8. sırada bulunmaktadır. Orta-güney Asya'da ise, en yaygın 3. malignitedir². Bazı batı Avrupa ülkelerinde, OSHK insidansında artış görülmektedir. WHO, tüm dünya genelinde, OSHK'lerin insidansının daha da artacağını tahmin etmektedir. OSHK esas olarak, servikal lenf nodül metastazları ve bazen de, uzak organ metastazlarına sebep olarak, kansere bağlı ölümler içerisinde en sık rastlanan 6. neden olarak gösterilmektedir. Epitel hücrelerinin bazal membran ve komşu ekstraselüler matriksin özelliklerini bozması sonucu, OSHK metastazlarının oluştuğu bildirilmiştir⁴². Doğu

Avrupa'da son 20 yılda kanser nedeniyle gözlenen ölüm oranlarındaki artış, OSHK'nin ne kadar ciddi bir halk sağlığı sorunu oluşturduğunu göstermektedir⁴³. Onkoloji ve cerrahi alanlarındaki araştırmaların ve başarılı çalışmaların sonuçları ile, son zamanlarda kullanılan moleküler biyolojik tedavilerin ümit vaadeden sonuçlarına rağmen, bu malignitenin lokorejyonel kontrolü beklentileri karşılayamamakla beraber, mortalite ve morbidite oranları değişmemektedir¹¹.

Oral maligniteler çoğu zaman, non-keratinize stratifiye mukoza epitelinden kaynaklanmaktadır ve serviks, anüs veya bronşlar gibi vücudun diğer bölgelerinde görülen, skuamöz hücreli karsinomlara morfolojik olarak benzerlik göstermektedir⁴⁴. Oral malign oluşumların yaklaşık %90'ını oluşturan skuamöz hücreli karsinomun, daha çok ileri yaşlardaki erkek popülasyonunda görüldüğü bildirilmektedir⁴⁵.

Genel olarak, OSHK'nin gelişmesindeki en önemli çevresel risk faktörlerinin, sigara, tütün çiğnenmesi ve alkol tüketilmesi olduğu kabul edilmektedir^{44,46}. Ancak bazı hastalarda, bu önemli 3 risk faktörünün de bulunmamasına rağmen, OSHK geliştiği görülmüştür. Genetik yatkınlık, diyet veya onkojenik virüsler sebebi ile fizyolojik çoğalma mekanizmasından kurtulan hücrelerin, kontrol dışı çoğaldığı düşünülmektedir⁴⁷. OSHK'nin en önemli prognostik belirtileri, servikal lenf nodül veya uzak organ metastazı varlığı olarak bildirilmektedir⁹. Sıklıkla mukozada gelişen OSHK, zamanla daha derin dokulara, komşu yumuşak dokulara, lenf bezlerine, sinirlere, kan damarlarına ve kemiğe yayılabilmektedir^{9,48}. Küçük lezyonlar genellikle asemptomatiktir ve büyüdükçe ağrı, parestezi, şişlik gibi belirtiler göstermektedir. Kemiğe invaze olanlar, radyografik olarak sınırları belirgin olmayan, düzensiz, litik lezyonlar şeklinde görüntü vermektedir⁴⁸. Metastaz genellikle lenfatik yolla, sıklıkla submandibular ve submental lenf nodülleri ile

olmaktadır. Tedavisi genellikle radyoterapi, cerrahi veya her ikisinin birden uygulanması ile yapılmaktadır^{9,48}.

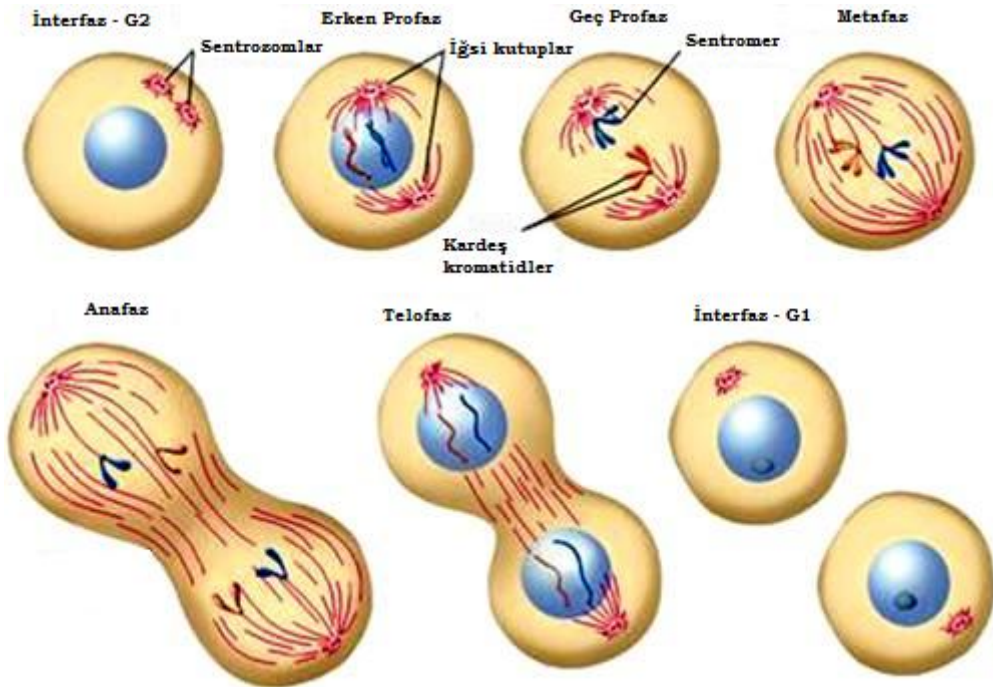
2.6 Hücre Bölünmesi

Hücresel yaşamın en temel unsuru, hücrelerin kendi kopyalarını üretebilmesidir. Bu işlem, organizmaların ve türlerin yaşamaları ve üremeleri için, aslına en uygun bir şekilde gerçekleştirilmesi gereken bir olaydır. Çok hücreli canlılarda hücre bölünmesi, mitoz ve eşeyli olarak çoğalan canlılarda zigotu oluşturacak gamet hücrelerinin (üreme hücreleri) yapılmasını (gametogenez) sağlayan mayoz olmak üzere iki farklı yol ile gerçekleşmektedir.

Hücre bölünmesi veya mitoz, ana hücrenin kendisiyle aynı kromozom sayısına sahip, 2 yavru hücreye bölünmesiyle gerçekleşmektedir ve bu bölünme ışık mikroskobu ile izlenilebilmektedir⁴⁹.

İnterfaz; hücre bölünmesinin gerçekleşmediği ve nukleusun normal gözükmeyeceği evredir ve mikroskopik olarak tespit edilememektedir. İnterfazdan sonra gelen evre ise, kromozomların yavru hücrelere eşit olarak dağıtılması için ihtiyaç duyulan hazırlıkların başladığı *Profaz*'dir. Bu evrede, çekirdek zarının bütünlüğü bozulmayan ve çekirdek içinde uzun iplikler halinde bulunan kromozomlar, kendilerini eşleyerek, ikiz kromatidleri (sentrion) oluşturmaktadır. Sentrioller ayrılarak, çiftler halinde hücrenin ayrı kutuplarına doğru göç etmektedirler ve aynı zamanda, mitotik iğ ipliğinin mikrotübülleri, sentriol çiftlerinin arasında görülmeye başlamaktadır. *Metafaz*, hücre bölünmesinin profazdan sonra gelen,

çekirdek kılıfı ve çekirdekçiğin kaybolduğu evredir. Kromozomlar hücrenin ekvator hattına doğru göç ederler ve burada boylamasına bölünerek, iki kromatid oluşur. Bunlar, sentromer adı verilen, elektrondan zengin bir alanda, mitotik iğ ipliğinin mikrotübüllerine bağlanırlar. Metafazdan sonra gelen evre, *Anafaz*'dır. Bu evrede ikiz kromatidler birbirinden ayrılmakta ve hücrenin farklı kutuplarına doğru göç etmektedirler. Bu sırada sentromerler de, merkezden ayrılmaktadır. Mikrotübüller protein olan tübülin, aktin ve myosinin iğsi alanda oluştukları, immunofloresans yöntemi ile gösterilmiştir. Anafazdan sonra gelen *Telofaz* evresinde ikiz hücreler içerisinde çekirdek, çekirdek zarı, çekirdekçik ve kromatin tekrar izlenmeye başlamakta ve kromozomlar daha önceki hallerine benzemeye başlamaktadır. Çekirdekte gelişen bu değişimler devam ederken ana hücrenin ekvator hattında bir daralmayla sitoplazma ve organeller ikiye bölünür⁴⁹ (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Mitoz hücre bölünmesi ve fazları.

2.7 Hücre Siklusu

Hücre popülasyonunda, hücrenin replikasyonu ve genetik olarak özdeş yavru hücrelere bölünmesi, iki fonksiyonel ve iki hazırlık fazları ile gerçekleşmektedir. Fonksiyonel fazlar, DNA replikasyonunun gerçekleştiği S fazı ile ana hücreye benzeyen, diploid sayıda ($2n$) kromozumlu iki yavru hücrenin meydana geldiği mitoz olarak adlandırılan M fazıdır⁵⁰. Mitoz, hücre bölünmesinin görülebilir bir belirtisidir. Ancak, hücre çoğalmasında temel rolü oynayan, ışık mikroskobu ile kolay görülemeyen başka mekanizmalar da bulunmaktadır. Bu mekanizmaların başında ise, hücrenin temel kromozom yapısı olan deoksiribonükleik asit (DNA) replikasyonunu içeren faz bulunmaktadır. H-thymidine gibi radyoaktif DNA precursorların hücre içine verilmesiyle, biyokimyasal ve radyootografik metodlar ile DNA'nın replikasyonu izlenebilmektedir. DNA replikasyonunun, hücre bölünmesinin görülemeyen olaylarının mikroskop ile izlenemediği interfazda gerçekleştiği gösterilmiştir. Hücre turnoverlarının gerçekleştiği bütün dokulardaki mitoz ve interfaz arasındaki bu değişim, "*hücre siklusu*" olarak tanımlanmaktadır⁴⁹.

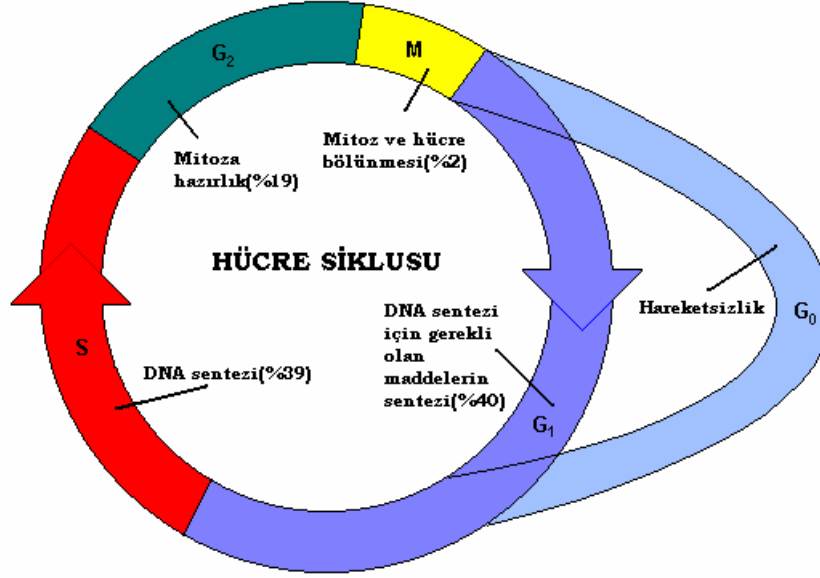
Hücre siklusu, G_1 , S, G_2 ve M olmak üzere, 4 fazdan oluşmaktadır ve genetik bilgilerin kopyalanmasını düzenlemekte ve kopyalanan bu genetik bilgilerin, yavru hücrelere eksiksiz dağıtılmasını sağlamaktadır. Yavru hücrelerin, ana hücreye ait olan bütün genetik bilgilere sahip olmasında, kromozomların doğru bir şekilde ayrıldığı ve DNA'nın aslına uygun olarak kopyalanıp kopyalanmadığının denetlenmesi için kontrol noktaları mevcuttur. Hasara uğrayan genetik bilgilerin tamirini ve düzenlenmesini yaparak, her bir yavru hücrenin ana hücrelerine özdeş genetik bilgilerin tamamını elde etmesi, bu kontrol noktaları ile sağlanmaktadır⁵¹. Kontrol noktalarının bu görevleri, hücre ölümü gibi farklı bazı hücre cevaplarına neden olabilmektedir. Memeli hücrelerinin

S fazına girişlerinin kontrol noktasında görev yapan p53 genidir ve fonksiyonu apoptoz ile gerçekleşmektedir. Hücrede herhangi bir hasar olduğunda, bu hücrenin onarılması için kontrol noktalarında yer alan p53 fosfoproteini hücrede apoptotik prosesi arttırır. Bu işlem kanser hücrelerinde apoptotik cevapların oluşmasında rol oynamaktadır ayrıca, hücrenin DNA'sına zarar veren ajanlara olan hassasiyetini de arttırmaktadır^{52,53}.

Hücre siklusunun G₁, S ve G₂ fazları, *İnterfaz* olarak adlandırılmaktadır. Kas ve sinir hücreleri gibi, sürekli bölünmeyen hücrelerin siklus içerisindeki aktivitelerinin geçici veya daimi olarak durdurulduğu faz ise, G₀'dır. Mitoz sırasında yarıya düşen hücre hacminin, normal seviyesine ulaştığı G₁ fazı, protein ve ribonükleik asit (RNA) sentezinin meydana geldiği ve bütün büyüme faktörlerin etkilerini gösterdiği ve tümör supresör genlerin görüldüğü fazdır. DNA sentezi ile hücre kromozomlarının replikasyonu, S fazında gerçekleşmektedir. Mitoz sırasında kullanılacak enerjinin üretimi ve birikimi ile hasara uğramış DNA'nın tamir mekanizması ve bağışıklığın denetlenmesi, G₂ fazında meydana gelen olaylardır. Hücre siklusundaki kontrol mekanizmalarının ilki G₁ ile S fazları arasında, diğeri ise G₂ ile M fazları arasındaki geçişlerde bulunmaktadır^{49,54} (Şekil 2.2).

Histolojik materyallerdeki hücresel proliferasyonunun değerlendirilmesi, klasik histopatolojik analizler içerisinde önemli bir bulgudur ve birçok farklı metot ile gerçekleştirilmektedir. Mitotik indeks, DNA içeriğinin incelenmesi, timidin etiketleme indeksi, flow sitometre, bromodeoksiüridin eklenmesi ve Ki-67 markerı gibi immunohistokimyasal yöntemler, tümör hücre proliferasyonunun değerlendirilmesinde kullanılan metotlardır. Uygulamalarının basit ve tekrar yapılabilir, klasik yöntemlerle hazırlanmış histolojik ve sitolojik kesitlerde kullanılabilir, ekonomik ve verdiği sonuçların doğru ve kesin

yorumlanabilir olması, bu metotların sahip olması gereken özellikler olarak tanımlanmaktadır⁵⁵.



Şekil 2.2. Hücre siklusu ve evreleri

Hücre siklusunun yalnız mitotik fazı, basit morfolojik inceleme ile gözlenebilmektedir. Mitotik hücrelerin doğru bir şekilde sayımı ile hücre proliferasyonunun değerlendirildiği mitoz sayımı metodunun, birçok tümör hakkında yararlı bilgiler sağladığı bildirilmiştir^{56,57}. Ancak, mitozların kullanılmasıyla proliferasyonun değerlendirilmesinde gözönünde tutulması gereken bazı problemler bulunmaktadır. Mitozların belirlenmesinin çok zor olması, dikkatli mikroskopik incelemeyi gerektirmektedir. Sadece kesin olarak mitozda olduğu belirlenen hücreler sayımda kullanılabilir. Piknotik çekirdekler ve şüpheli hücrelerin sayıma dahil edilmemesi gerekmektedir⁵⁸.

Flow sitometre metodu ile, hücrelerin DNA'ları ve sayısı incelenebilmektedir. Bu metodun avantajları arasında, çok sayıda hücrede kullanılabilmesi, fikse edilmiş veya parafine gömülmüş histolojik materyallerde uygulanabilmesi ve hücre proliferasyonu hakkında objektif bilgi sağlaması olarak sıralandırılmaktadır. Ancak, materyalin yüksek maliyeti, dokuların bozulması sonucu hücre alt popülasyonlarının kaybolması ve örneklerde neoplazik olmayan hücrelerin olası katılımı ise, metodun dezavantajlarıdır⁵⁵. Flow sitometre metodunun proliferasyon hakkında verdiği bilgilerin prognostik önemini belirten çalışmalar rapor edilmiştir^{59,60}.

Timidin etiketlenmesi, S fazı aktivitesi hakkında kesin sonuçlar ile histolojik korelasyon sağlayan bir metottur. Ancak, uygulaması uzun sürmektedir ve laboratuvarlardaki klinik kullanımı kolay değildir. Bu metot, birden fazla biyopsi örneği ve radyoaktif DNA ön belirleyici markerların kullanımını gerektirmektedir. Ayrıca, sonuçların elde edilebilmesi için birkaç hafta gerekmektedir⁵⁴.

İmmunohistokimyasal metodlar, hücre siklusunun çeşitli fazları sırasında eksprese olan antijenlere karşı antikörlerin kullanılması ile, solid tümörlerin proliferatif aktivitelerinin incelenmesinde kullanılmaktadır⁵⁵. Hücrelerin proliferatif potansiyellerinin belirlenmesinde belki de bilinen en iyi antikör, Ki-67'dir. Bununla birlikte immunohistokimyasal çalışmalarda en sık, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ve argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR) gibi diğer klasik proliferasyon markerları kullanılmaktadır^{55,61}. Ki-67, proliferen olan hücrelerin çekirdeklerinde bulunan antijeni tanıyarak, hücre bölünme aktivitesini gösteren bir antikördür ve hücre siklusunun G₁, S, G₂ ve M fazlarında görülür ancak, G₀ fazında kaybolur. PCNA, nükleer, histon olmayan, DNA replikasyonunda yer alan bir antijen olup, tümöral dokunun büyüme oranı hakkında

tahmini bilgi sağlması açısından önemlidir. Ki-67'ye olan farkı ise, hücre siklusunun geç G₁ fazında hücrenin çekirdeğinde belirmesi, S fazında artması ve G₂ ile M fazlarında azalmasıdır⁶². AgNOR boyaması hücrelerin durumları hakkında yararlı bilgiler veren histokimyasal bir teknik olup, gümüş boyasının çekirdek içinde koyu parçacıklar şeklinde görülmesiyle proliferasyon belirlenmektedir. Boyanmanın yoğunluğu, hücrelerin kopyalanma potansiyellerine bağlıdır. Yapılan son araştırmalarda, AgNOR ile boyanan hücre çekirdeklerinin sayısı ile hücre proliferasyonu arasında bir ilişki bulunduğu, normal ve benign dokulara kıyasla, malign neoplazmlardaki AgNOR'ların çok daha fazla belirlendiği gösterilmektedir^{63,64}.

2.8 Tümör Markerları

Tümör markerları, tümör veya doku tarafından suprafizyolojik düzeylerde üretilen, biyokimyasal veya immunokimyasal yöntemlerle hastanın doku, kan veya diğer vücut sıvılarında kantitatif ölçümleri yapılabilen hormon, enzim, metabolit, immunoglobulin veya protein yapısında maddelerdir. Ayrıca tümörle ilişkili antijenler, onkojen ve onkojen ürünlerini de içerebilmektedir⁶⁵. İdeal bir tümör markerı, yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olmalı, tümör henüz küçük iken veya hasta asemptomatik iken, tümörün tanınmasına ve küratif tedavinin yapılabilmesine olanak sağlamalıdır⁶⁶. Tümör markerları, tümör tanısında, tedaviden alınacak cevabın tahmininde, tümör proliferasyon ve gelişme kapasitesinin, tümör invazyon ve metastaz kapasitesinin saptanmasında, kanser şüphesinin tarama çalışmalarında, çok ufak metastazların veya tümör kalıntılarının saptanmasında ve tedavisinde kullanılabilirler.

Oral kanserli hastalarda, özellikle tümörün biyolojik potansiyelini yansıtan tümör proliferasyon markerları, prognoz için önemli faktörler olmasına rağmen, klinik önemleri hala tartışma konusudur. Tümör markerları ile hücre proliferasyonundan elde edilen değerler, malign bir oluşumun göstergesi olabileceği ancak, bu göstergenin kesin bir yargıyı ifade etmediği anlamına da gelebilmektedir. Bu da, inflamatuvar durumlar gibi tamamen benign sebeplerle de bu markerların salınabildiğinin gösterilmesiyle açıklanmaktadır.

Son yıllarda kanser hücre biyolojisinin anlaşılabilmesi için yoğun bir ilgi bulunmaktadır. Buna ilişkin çalışmalar, biyolojik markerların geliştirilmesi ile malign ve displazik hücrelerin, normal benzerlerinden ayırılabilmesi sağlanmaktadır. Biyolojik ve moleküler metotların gelişerek klinikte kullanılır hale gelmesi; non-sitotoksik biyolojik aktif ajanların tümör hücresi içerisine verilmesini mümkün kılmaktadır.

Oral epitel hücrelerinin proliferasyon hızlarındaki değişimler, ağız mukozasının yüzey epitelinden gelişebilen kistlerin ve tümörlerin patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Bu hücrelerin proliferatif potansiyellerinin belirlenmesinde en sık Ki-67, PCNA, AgNOR gibi klasik proliferasyon markerları ile, hem apoptozun gerçekleştirilmesinde anahtar rol oynayan ve bu sebeple apoptotik marker olarak değerlendirilen, hem de proliferatif hücrelerin belirlenmesinde de uzun yıllardır güvenle kullanılan p53 markerının yer aldığı birçok immunohistokimyasal araştırma rapor edilmektedir^{55,61,67}.

2.9 Ki-67

Ki-67 proliferasyon markerı, 1983 yılında Gerdes ve ark. tarafından keşfedilmiş olup, tümörlerdeki proliferatif hücrelerin sayısını değerlendirmede en sık kullanılan, basit ve ucuz bir metot olarak histopatoloji alanında oldukça popüler olmuş bir markerdir⁶⁸. G₂ ve M fazlarında, bu markerın ekspresyonu en üst seviyelere ulaşarak, proliferen olan hücrelerin çekirdeklerinde bulunan antijeni tanıyarak, hücre bölünme aktivitesini gösteren bir antikordur⁶⁹.

Ki-67'nin, hücre siklusunun G₁, S, G₂ ve M fazlarında görüldüğü ancak, G₀ fazında kaybolduğu bilinmektedir⁶⁸. Bu fazlarda Ki-67'nin görülmesi, tümöral dokularda siklusta olan hücrelerin oranlarının değerlendirilmesini sağlamaktadır⁷⁰. Ki-67, sadece teşhiste değil, aynı zamanda tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde de kullanılmaktadır. Ki-67 varlığı, tümörün büyüme fraksiyonunun göstergesi olup, tümörün proliferen olduğuna işaret eder. Bu özelliği ile bu markerın, tümörün radyasyona ve/veya kemoterapiye olan duyarlılığının arttığını da göstermektedir⁷¹.

MIB-1'in, Ki-67'ye eşdeğer bir antijen olduğu, 1992 yılında mikrodalga tekniğinin geliştirilmesi ile bulunmuştur. Sadece taze veya donmuş dokuda uygulanabilen Ki-67, bu teknikle birlikte, parafin bloklarda da kullanılabilir hale gelmiştir^{72,73}.

Ki-67 proliferasyon markerı, oral kavitenin premalign ve malign lezyonlarına eşlik eden genetik anormalliklerin olası göstergesi olarak oldukça sık kullanılmaktadır⁷⁴⁻⁷⁶. Bazal tabakada Ki-67 markerı için MIB-1 antikörünün, normal epitel ile hafif, orta ve yüksek dereceli displazilerin, yüzeysel tabakada ise, hafif ve orta dereceli displazi ile

yüksek dereceli displazilerin ayırt edilmesinde kullanılabilecek güvenilir bir marker olduğu bildirilmektedir⁷².

Bu proliferasyon markerının ekspresyonunun, bazı kanserlerin prognozunda yararlı bilgiler verdiği bildirilirken, elde edilen bu bilginin klinik önemi hala tartışmalıdır⁷⁷. Literatürde, proliferasyon oranı yüksek olan tümörlerin nüks oranlarının daha fazla ve prognozlarının daha kötü olduğunu bildirilen çalışmalar bulunmasına rağmen, Ki-67 ekspresyonunun tümörün nüks oranı ve prognozu hakkında yeterli bir bilgi sağlayamayacağını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır⁶⁷.

Rose ve ark., normal ve malign doku örneklerinde, monoklonal ve poliklonal Ki-67, PC10, MIB-1 ve JC1 antikörlerin immunohistokimyasal değerlerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, klasik histolojik preparasyonlarda, MIB1 veya poliklonal Ki-67'nin rutin kullanım için en iyi proliferasyon markerları olduğunu bildirmişlerdir⁶¹.

Kropveld ve ark., radyoterapi ile tedavi edilmiş T₂ laringeal karsinomlu 128 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, bu hastalardan rastgele 16 nüks etmemiş ve 20 nüks etmiş hasta seçmişlerdir. Bu hastalardan alınan doku örneklerindeki Ki-67 ve p53 ekspresyonlarının prognostik önemlerini araştırmışlar, yüksek Ki-67 ekspresyonunun saptandığı tümör hücrelerinin radyoterapiye çok iyi cevap verdiğini ve bu hücrelerde çok az rekürensın meydana geldiğini göstermişlerdir⁷⁸.

Macluskey ve ark.'nın (1999), oral mukozada epitelyal proliferasyon ile tümörün prognozu arasındaki olası ilişkiyi araştırdıkları çalışmasında, normal mukoza ile displazik ve SHK doku örneklerindeki proliferatif hücrelerin Ki-67 ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. Displazik ve SHK doku örneklerinin proliferatif indekslerinin, normal oral mukozaya göre anlamlı derecede yüksek olduğunu ancak, displazik ve SHK doku örnekleri arasında anlamlı bir farkın bulunmadığını bildirmişlerdir. Epitelyal proliferasyonun, normal

dokudan displazik dokuya geçişe eşlik ettiği, Ki-67 ekspresyonundaki artışın, oral mukozadaki değişimlerin erken dönemde belirlenebileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, epitelyal proliferasyonun displazik dokunun karsinoma geçişinde de artmaya devam edebileceğini ve bu geçişin, çok yavaş bir hızla gerçekleşebileceğini bildirmektedir. Tüm bu özellikleriyle Ki-67 ekspresyonunun neoplazik transformasyon için iyi bir klinik gösterge olmadığını savunmaktadırlar⁷⁹.

Liu ve ark.'nın, normal ve lökoplazili ağız epitelinde, PCNA, Ki-67 (MIB-1), cyclin D1 ve CENP-F hücre proliferasyon markerlarının, hücre tabakalarındaki ekspresyonlarını inceledikleri immunohistokimyasal çalışmalarında, normal ve patolojik değişime uğrayan dokular arasındaki en belirgin farkın, bazal ve yüzeysel tabakalarda izlendiği gösterilmiştir. Bu araştırmacılar Ki-67'nin, kanserlerin önlenmesinde ve terapötik klinik denemelerde, en güvenilir immunohistokimyasal marker olarak kullanılabileceğini ileri sürmektedirler⁷².

Piattelli ve ark. (2002), Ki-67, p53 ve bcl-2 marker ekspresyonları ile apoptotik indekslerini inceledikleri 70 biyopsi örneği (10 normal ağız mukozası, 12 lökoplaki, 6 orta ve 6 yüksek dereceli displazi ve carsinoma in situ, 12 iyi, 12 orta ve 12 kötü diferansiye invazif karsinom) üzerinde yaptıkları çalışmada, ağız kavitesinin prekanseröz ve malign doku örneklerindeki malign transformasyon ile Ki-67 ekspresyonu arasında anlamlı bir korelasyon olduğu sonucuna varmışlardır⁸⁰.

Chrysomali ve ark.'nın oral granüler hücreli tümörlerde, apoptozu stimüle veya inhibe eden proteinlerin hücre proliferasyon aktivitelerinin ve immunohistokimyasal ekspresyonlarının değerlendirildiği çalışmasında, Ki-67 ekspresyonunun benign tümörlerde düşük seviyede olduğu ancak, malign tümörlerin neoplazik hücrelerinde daha fazla izlendiği bildirilmiştir⁶⁷.

Birçok çalışmada, Ki-67 ekspresyonu ile proliferasyon gösteren hücrelerin büyüme fraksiyonu arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir^{71,81}. Bu çalışmaların sonuçlarında, Ki-67'in fonksiyonunun tam olarak ortaya konulmadığı ve bu nedenle hücre proliferasyonu için gerekli bir molekül olmadığı ileri sürülmektedir⁸². Bu da, hücrelerin besin eksikliği gibi dış faktörler nedeniyle Ki-67 ekspresyonunun değişebildiğinin gösterilmesiyle açıklanmaktadır⁸³. Neoplazik dokuların prognozunda, Ki-67'nin indikatör olarak kullanılmasının değerlendirildiği bazı çalışmalar arasında çelişkiler bulunmaktadır⁸⁴. Metodolojik farklılıkların varlığı bu markerin klinik kullanımını sınırlamaktadır. Tümör hücresinin siklusu tamamladığı süre ile büyüme fraksiyonu, tümörün proliferasyon oranını belirleyen iki önemli faktördür. Ki-67 markeri ile bu sürenin değerlendirilemediği ve Ki-67 ekspresyonunun sadece hücrenin, siklus içinde olup olmadığı hakkında bilgi verdiği rapor edilmektedir⁸⁵.

Klasik proliferasyon markerlerinin hücre siklusu hakkında verdiği bilgilerin sınırlı olmasından dolayı, hücre biyolojisinin anlaşılabilmesi için yeni markerların geliştirilmesi ve kullanılması gerekmektedir.

2.10 Minichromosome Maintenance Proteins (MCM Proteinleri)

Ökaryotik hücrelerde DNA sentezi, kromozomun belirlenmiş replikasyon bölgelerinde başlatılmaktadır⁸⁶. DNA replikasyonunun gerçekleşebilmesi için, ökaryotik hücrelerin tümünde, prereplikatif kompleksi oluşturan proteinler gereklidir⁸⁷. *Saccharomyces cerevisiae* mayasında ilk defa tanımlanan ve yeni bir proliferasyon markeri olan MCM proteinleri⁸⁶, prereplikatif kompleksin bir kısmını oluşturarak, ökaryotik DNA replikasyonunu başlatmak ve düzenlemek için gerekli

proteinlerdir³⁴. Birbirleri ile yapısal benzerlik gösteren MCM2-7 proteinleri, hücre siklusunda diğer markerlara benzer etki mekanizmalarına sahiptir³³. MCM proteinler, “origin recognition complex” (ORC) ve Cdc6 proteinlerinin daha önceden sıralı bir şekilde bağlı oldukları DNA bölgelerine bağlanarak, prereplikatif bir kompleks oluşturur⁸⁸. DNA replikasyonuna izin veren bu kompleks, replikasyonu geri dönüşümsüz olarak her siklуста bir kere sınırlayarak⁸⁸, genom stabilitesini sağlar⁸⁹. Ancak, MCM proteinlerinin işleyişinin düzenlenememesi, hücre proliferasyonunda anormal artış ve genom stabilitesinde bozulmanın gerçekleştiğini ifade etmektedir⁹⁰.

MCM proteinlerinin hücre siklusundaki varlığı ve etkinliği iyi tanımlanmıştır. Bu proteinin hücre siklusunun erken G₁ evresi de dahil tüm evrelerinde gözlemlendiği, G₀ evresinde, hücre siklusu tamamlandıktan sonra veya diferansiyasyonda kaybolduğu bildirilmektedir. Ancak bu proteinler, DNA tamiri bulunan hücrelerde görülmemektedir⁸⁶.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, MCM proteinlerinin olası tümör oluşumu tahmininde kullanılabilecek en iyi proliferasyon markerlarından biri olduğunu göstermektedir⁸⁶. Tüm bu özellikleriyle MCM proteinlerinin, proliferatif hücrelerin spesifik markerları olarak kullanılabileceği^{35,91}, sahip oldukları immunoreaktivitenin, çeşitli malign tümörlerde potansiyel klinik önem taşıdığı ileri sürülmektedir³⁵.

MCM-2 protein ekspresyonunun prostat kanserlerinde⁹², küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde⁹³, oligodendrogliomalarda⁹⁴ prognozun belirlenmesinde büyük bir rol oynadığı gösterilmiştir.

Freeman ve ark. (1999), DNA replikasyonunun düzenlenmesinde yer alan MCM ve Cdc6 proteinlerine karşı, yeni hücre sel proliferasyon markerları olan monoklonal ve poliklonal antikoları kullanarak, donmuş ve formalinle fikse edilmiş, parafine gömülü normal, displazik,

hiperplazik ve neoplazik deri, serviks, akciğer, kalın bağırsak ve mesane doku örneklerinde MCM-2, MCM-5, Ki-67 ve PCNA ekspresyonlarını araştırmışlardır. MCM ekspresyonlarının, Ki-67 ile PCNA ekspresyonlarına göre daha fazla izlendiğini, MCM'lerin normal, displazik ve neoplazik dokulardaki hücrelerin proliferasyonlarının belirlenmesinde etkili bir marker olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca MCM ekspresyonları ile karsinomlarda diferansiyasyonun derecesi arasında negatif yönde bir korelasyon olduğunu da bildirmişlerdir⁴⁸.

Krüger ve ark. (2002), T₁ evresindeki papiller mesane karsinomlarında tümör evresi ile Ki-67, MCM-2 ve p53 markerlarının immunoreaktivitelerini karşılaştırdıkları çalışmada; tümör gelişiminde prognozun değerlendirilmesinde ve tedavi planlamasının belirlenmesinde, MCM-2 ekspresyonunun önemli bir parametre olabileceğini bildirmişlerdir⁹⁵.

Gonzalez ve ark. (2003) meme kanserlerinde epiteldeki hücre siklus varlığının belirlenmesinde, MCM proteinlerinin standart bir proliferasyon markerı olan Ki-67'den çok daha fazla ekspresyon gösterdiğini, bunun da MCM-2'nin bu tip kanserlerde prognostik bir marker olarak kullanılabileceğini gösterdiğini bildirmişlerdir¹⁹. Her iki marker seviyesindeki farklılığın, hücre siklusunun erken G₁ fazında Ki-67 ekspresyonunun izlenmemesiyle açıklanmaktadır.

Yang ve ark.'nın (2006), küçük hücreli dışı akciğer kanseri olan 128 hastada, Ki-67 ve MCM-2 proliferasyon markerlarının prognostik önemlerini inceledikleri çalışmalarında, MCM-2'nin prognozda önemli bir rol oynayabileceği ancak, Ki-67'nin belirgin bir prognostik değerinin görülememesinin ise, örnek sayısının az olmasından kaynaklandığı bildirilmektedir⁹⁶.

Literatürde kanserli doku örneklerinde, tümörün patolojik evresi ile birlikte MCM-2 ekspresyonunun arttığını⁹⁷ ve yüksek seviyelerde bulunan MCM-2 ve Ki-67'nin, daha zayıf hayatta kalma ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır⁹⁸.

Ananthanarayanan ve ark.'nın (2006) prostat kanseri ile ilişkili normal ve premalign doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 proliferatif ve a-casp3, bcl-2 apoptotik markerların değişimleri inceledikleri çalışmasında, proliferasyon ve apoptozun sadece prekanseröz lezyonlarda değil, aynı zamanda kanser ile birlikte izlenen normal görünümlü epitelde de değişimin varlığını gösterdiğini bildirmişlerdir. Yüksek kanser riski bulunan normal epitelde özellikle MCM-2 ekspresyonunun önemli bir marker olabileceği, apoptotik markerların ise, daha kompleks bir durumu ifade ettiği, şüpheli dokuların proliferasyon düzeyi hakkında da bilgi verebileceği belirtilmiştir⁷⁷.

Normal, displazik ve skuamöz hücreli karsinomlu larinks dokularında, Ki-67 ve MCM-2 ekspresyonlarının karşılaştırıldığı çalışmada; her iki markerın normal doku örneklerinde düşük ekspresyon gösterdiği ancak, malign larinks doku örneklerinde, özellikle MCM-2 ekspresyonunda belirgin bir artış izlendiği bildirilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, MCM-2'nin premalign ve malign larinks hastalıklarında güvenle kullanılacak bir biyomarker olduğu rapor edilmiştir⁹⁹.

Scott ve ark. (2006), displazik ve OSHK'lı doku örneklerinde, Ki-67 ve MCM-2 markerlarının prognostik önemlerini araştırmışlar, normal mukozadan SHK'ya doğru artan malignite ile birlikte her iki markerın da ekspresyonlarında artış olduğunu ancak, MCM-2 ekspresyonlarının sitolojik tanıda daha hassas sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir¹⁰⁰.

Oral mukozanın sitolojik değerlendirilmesine dayandırılarak, oral malignitelerin ve displazilerin teğhis edilmesinde, minimal invazif ve objektif testlerin geliştirilmesi, bu alandaki en önemli ilerlemeler olacaktır. Eksfoliyatif hücrelerin klasik sitolojik araştırmalar ile bazı OSHK'ların tanısı konulabilmektedir. Ancak bu tekniklerin hatalı pozitif değerlerinin çok yüksek olmasıyla karşılaşılması, çalışmaları, malign ve displazik hücrelerin, normal benzerlerinden ayrılabilmelerini sağlayan biyomarkerların geliştirilmesine yöneltmiştir. MCM proteinleri gibi yeni proliferasyon markerlarını kullanarak, oral mukoza hücre proliferasyonu hakkında bilgi sahibi olabilmek için yeterli veriler bulunmamaktadır.

2.11 Apoptoz

Yaşayan hücrelerin ölümü, nekroz ve apoptoz olarak adlandırılan iki farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir. Nekroz, hücre dışından gelen, hipoksi, toksin, aşırı ısı değişiklikleri gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörlerin etkin olduğu hücre ölümüdür. Apoptoz ise, genetik hasarlı veya fonksiyonunu kaybetmiş, düzensiz gelişmiş, olması gerekenden fazla üretilmiş ve yaşlanmış hücrelerin, organizmaya zarar vermeden ortadan kaldırılmalarını sağlayan ve genetik kontrollü, programlanmış hücre ölümüdür. Nekroz patolojik bir olayı ifade ederken, apoptoz fizyolojik veya patolojik etkenler sonucu gelişen bir hücre ölümüdür¹⁰¹.

Patolojik hücre ölümü olan ve ATP miktarının azalıp, hücre homeostazının hızla bozulduğu, inflamasyon yanıtının geliştiği nekrozdan tamamen farklı olarak, apoptoz; inflamasyon olmaksızın hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, proteinsentezi ve enerjiye gereksinim duyan,

organizmada homeostazi koruyan bir olaydır. İlk kez, 1972 yılında Kerr ve ark. tarafından tanımlanmıştır¹⁰². 1983 yılında Duke ve ark., jel elektroforezi ile endonükleazların aktive olması sonucu, DNA hasarının oluşmasıyla biyokimyasal olarak apoptotik hücre ölümünü göstermişlerdir¹⁰³. Dokulardaki hücrelerin homeostazının sağlanması, defansif olarak immün reaksiyonları, hücrelerin hasar görmeleri durumlarında, hormon azalması sonucu gelişen involüsyonlar, embriyonal ve fötal gelişimi, yaşlılıkta, organ büyüklüklerinin korunması, rejenerasyon ve tamir olaylarının düzenlenmesini apoptoz ile sağlanır. Dokuda apoptozun artışı, nörodejeneratif hastalıklara ve lenfosit yetersizliğine; azalması ise, otoimmün hastalıklara ve maligniteye sebep olmaktadır^{101,104}.

Apoptozda hücreler, koyu eozinofilik sitoplazmalı, bir veya birkaç parçalı piknotik çekirdekli olarak görünür. Çekirdeğin, hilal veya yarım ay şeklinde izlenmesi, kromatinin çekirdek membranının iç yüzüne yerleşmesi nedeniyledir¹⁰⁵.

Hücrelerde apoptozun devam etmesi ile sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre, içerilerinde sitoplazma ve organellerin bulunduğu apoptotik cisim adı verilen, membranla çevrilmiş olan küçük parçalara bölünür ve bu cisimler, çevrede bulunan parenkim hücreleri ve fagositler tarafından dokudan temizlenir¹⁰⁵.

Programlı hücre ölümünün moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, hücrelerin genetik olarak belleklerinde var olan intihar programının çeşitli sinyallerle, patofizyolojik koşullarla ve oksidatif stres gibi olaylarla aktive olmasıyla başlamaktadır¹⁰⁶. Ayrıca apoptoz mekanizması, uyarana ve hücre tipine göre farklılıklar göstermektedir. Apoptozu etkileyen hücre içi uyaranlar genel olarak: büyüme faktörleri, onkojenler, tümör süpresör genler olmak üzere üç

ana grupta toplanabilir¹⁰⁷. Apoptozu etkileyen uyaranlar; büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, Tumor Necrosis Factor (TNF), Transforming Growth Factor (TGF-B), Fas/FasL sisteminin aktive olması, DNA hasarı nedeniyle bir tümör supresör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyal enfeksiyonlar ve glukokortikoidler olarak sıralanabilmektedir^{107,108}. Bunlardan özellikle protoonkojenlerin (c-myc gibi) çoğunun, apoptozun regülasyonunda yer aldığı kanıtlanmıştır¹⁰⁹. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de hafif dozlarda apoptoz meydana getirirler¹⁰⁷. Apoptozda, hücre ölümü çevreye zarar vermeden gelişse de, bazen apoptoz dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da nekroz apoptoz gelişmesine yol açabilir¹¹⁰.

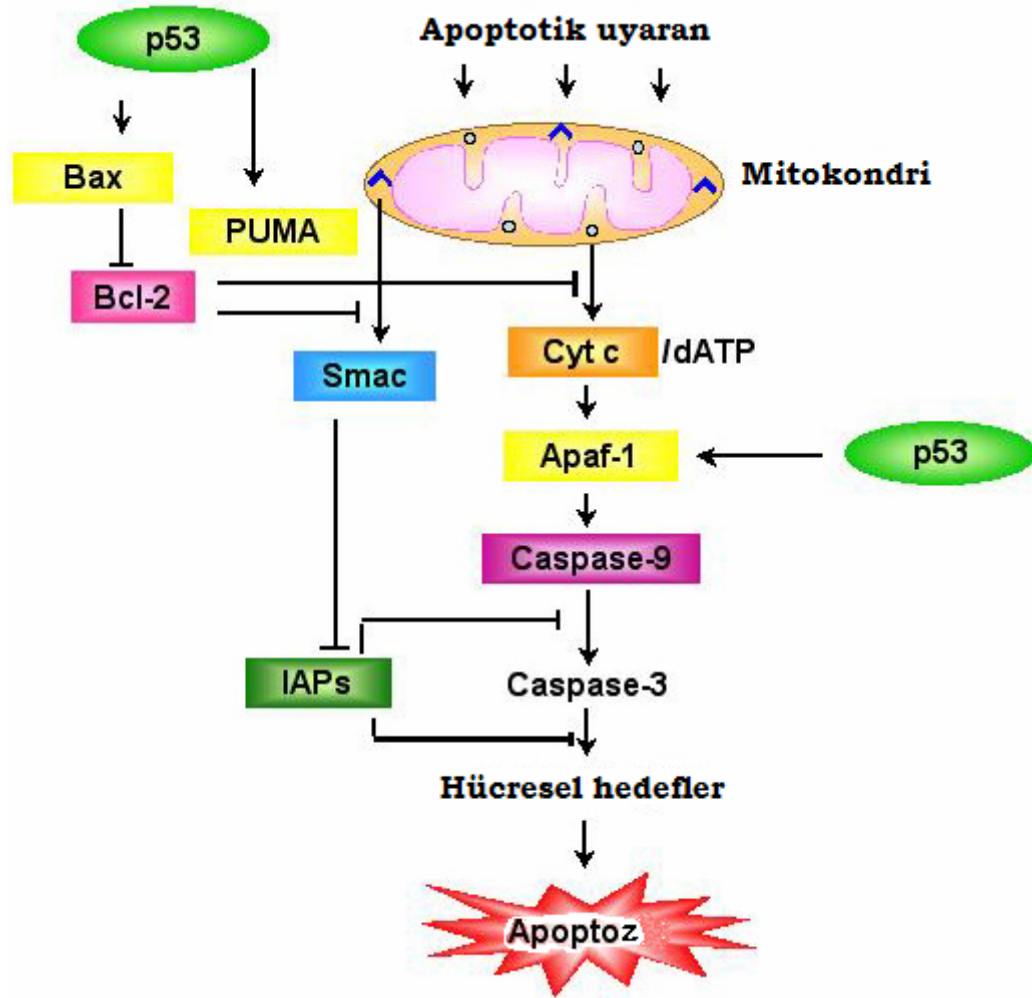
Apoptoz süreci: DNA hasarına genlerin yanıtı, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı), hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi (granzim) olmak üzere üç farklı şekilde işleyebilir¹⁰⁸.

Hücre siklus bozuklukları, metabolik değişiklikler, hücre içi kalsiyum seviyesinin artması, DNA'nın zarar görmesi, hücre içi pH'nın düşmesi gibi hücre içinden gelen sinyaller veya hipoksi, radyasyon, ultraviyole ve gamma ışınları, hücrelerin ihtiyaç duyduğu yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin düzenli bir şekilde ve yeterli miktarda olmaması gibi hücre dışından kaynaklanan faktörler apoptozu başlatır^{104,105}.

Günümüzde, apoptoz sürecinde rolü olan biyokimyasal ve genetik komponentlerin aydınlatılmasıyla birlikte apoptozun aktivasyonuna ya da inhibisyonuna yönelik çalışmalar; kanser, AIDS ve

otoimmün bozukluklar gibi birçok hastalıkta yeni tedavi olanaklarını gündeme getirmektedir^{107,110}.

Apoptozun regülasyonu gen kontrolü ile oldukça sıkı bir biçimde korunmaktadır. Ölüm sinyali, gen ekspresyonu ile düzenlenebilmesine rağmen, hücre apoptozunun başlamasına neden olan hücre içi ve dışı faktörler, DNA hasarı oluşturarak, genlerin aktivasyonuna sebep olur. Hücrenin apoptozuna neden olan bu genlerin en önemlisi, p53'tür¹¹¹ (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Apoptoz ve p53'ün apoptozdaki rolü

2.12 p53

İnsanda apoptozun düzenlenmesi, p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığında ya da bulunmadığında hücre yaşamı uzar. Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı, bir transkripsiyon regülatör geni olan p53'ü aktive eder. p53 protein ürünü, DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra, ya G₁'de hücre siklusunun durmasını indükleyerek tamir için gerekli zamanı kazanır ya da hasar fazlaysa apoptoza yönlendirir. Ayrıca p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği düşünülmektedir¹⁰⁸.

p53, karsinogenezi etkileyen en önemli genlerden biridir. Hücre siklusu kontrolünde yeralan p53 proteini¹¹², apoptozda³¹ ve genetik stabilitenin korunmasında yeralır. Malign tümörlerin oluşumunu önlemede kritik rol oynadığı kabul edilmektedir. DNA hasarı olduğunda, normalde inaktif durumda bulunan p53 geni aktifleşerek, p21 genini de aktive eder ve hücrenin S fazına geçmesini engelleyerek, geç G₁ fazında kalmasını sağlar. Hücre siklusunun bu şekilde durdurulması ile DNA'sı zarar gören hücrenin çoğalması engellenmiş olur. DNA'nın tamiri ile görevli olan proteinler, bu hasarı giderebildiğinde, hücre siklusu tekrar devam eder. Ancak, hasarın tamir edilemediği durumlarda ise, p53 geni, bax proteinini aktive eder ve hücrenin apoptozu başlatılır. Böylece, DNA hasarı olan hücre, siklustan tamamen temizlenmiş olur¹⁰⁵.

Normalde p53 proteinin fonksiyonu, DNA'sı zarara uğrayarak, genetik özelliği bozulmuş olan hücrenin yayılımını ve büyümesini engellemek için, hücre siklusunu G₁ fazı sonlarında durdurarak, o hücrenin ölümünü, yani apoptozunu veya DNA' sının tamiri için zaman sağlamaktır¹¹³. Hücrelerde p53 fonksiyonunun olmaması sonucu,

malign değişiklikler oluşmaktadır¹¹⁴. Nükleer bir fosfoprotein olan p53, baş-boyun ve özellikle ağız içi kanserlerinden oral skuamöz hücreli karsinom da dahil olmak üzere diğer tüm kanser tiplerinde sıklıkla değişime uğradığı¹¹⁵ en iyi bilinen tümör supresör genidir¹¹⁶. Baş-boyun skuamöz hücreli karsinomların yaklaşık %50'sinde p53 geninde mutasyonlar görülmektedir. Hollstein ve ark., oral kanserlerin oluşumunda, en sık karşılaşılan genetik değişikliğin, p53 mutasyonu olduğunu bildirmişlerdir¹¹⁷. Bu mutasyon sonucu birçok malign lezyonda, p53 protein birikiminin oluştuğu, moleküler, biyolojik ve immunohistokimyasal yöntemler ile gösterilmiştir¹¹⁸. İmmunohistokimyasal çalışmalar, oral karsinomların %54-67'sinde ve displazilerin %85'inde, p53 proteininin belirlendiğini göstermiştir¹¹⁴.

Literatürdeki çalışmalar, karsinomlarda yüksek oranlarda p53 belirlenmesinin, bu kanserlerde diferansiyasyon derecesinin düşük ve prognozun kötü olacağının göstergesi olduğunu ileri sürmektedir^{25,26}. Tümör tedavisinde özellikle radyoduyarlılığın değerlendirildiği çalışmalarda, p53 tümör markerının ekspresyonu ile ilgili sonuçlar klinik olarak kesin bilgiler vermemektedir. Bu çelişkili sonuçlar doğrultusunda tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde, bu markerın güvenilir olamayacağı ileri sürülmektedir²⁶. Bununla birlikte gen terapisinde p53 etkili bir tedavi olup, klinik olarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir²⁶.

Kerdpon ve ark.'nın (2000) OSHK hastaları üzerinde yaptıkları çalışmalarında, etyolojik faktörlerden biri olan alkol nedenli SHK hastalarında, hayat boyu alkol kullanımının p53 mutasyonuna sebep olduğunu, alkol kullanım süresi ve dozu ile p53 ekspresyonu arasında anlamlı derecede pozitif bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir¹¹⁹.

Max Robinson ve ark. (2006) klinik olarak malignite şüphesi bulunan 10 hastadaki beyaz ve kırmızı lezyonlardan alınan biyopsi örnekleri üzerinde yaptıkları çalışmalarında, p53 ve Ki-67 ekspresyonlarının epitelyal displazi ile birlikte artış gösterdiğini, bu displazik artış bulgusunun, epitelin malign transformasyonu olarak düşünülmesi gerektiğini bildirmişlerdir¹²⁰.

Kudo ve ark. (2003) normal mukoza ile primer ve metastatik tümörlerdeki p53 ve Ki-67 ekspresyonları üzerine yaptıkları çalışmalarında, daha önceki çalışmaların^{121,122} sonuçlarını destekleyerek, bu markerların primer ve metastatik doku örneklerinde oldukça fazla belirlendiğini ve oral karsinomlar için erken bir tanı yöntemi olabileceğini ileri sürmüşlerdir¹²³.

Abbas ve ark.'nın (2006) normal ağız içi epiteli, hiperplazik, displazik ve OSHK doku örneklerinde anjiyogenezin tümör prognozu açısından önemini belirlemeye çalıştıkları araştırmada, p53 protein immunoreaktivitesi ile anjiogenez arasında pozitif bir korelasyon bulunduğunu; normal mukozadan, displazik epitele ve invazif karsinoma doğru, patolojik hastalığın ilerlemesinde, anjiogenez ile birlikte p53 ekspresyonunun da arttığını göstermişlerdir. Bu bulgunun skuamöz hücreli karsinomda prognostik açıdan önemli olduğunu bildirmişlerdir¹¹⁴.

Yüksek apoptotik aktivite belirlenen tümörlerin prognozlarının daha iyi olduğu, böylece daha yavaş büyüdüğü¹²⁴, az diferansiye tümörlerde apoptoz görülen hücrelerde azalma belirlenirken, tümör hücreleri ile büyüme oranında ise artışın olduğu bildirilmektedir¹²⁵. Apoptozdaki bu düşüş ile proliferatif aktivite arasında kuvvetli bir ilişkinin olduğu ileri sürülmektedir¹²⁵.

Oral dokularda gelişen kanserlerin proliferatif ve apoptotik markerlar ile prognostik etkilerinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Klasik proliferasyon markerı olan Ki-67 ekspresyonu ile, hem proliferatif hem de apoptoz etkinliğinin belirlendiği p53 ekspresyonu, yaygın kullanılan markerlar olarak görülmektedir.

Xie ve ark. (1999), 85 skuamöz hücreli dil kanserinde, proliferatif ve apoptotik markerların prognostik etkilerini tüm tümör evrelerinde araştırdıkları çalışmada, Ki-67 ekspresyonunun yüksek bulunduğu örneklerin zayıf prognoza sahip olduğunu ancak, apoptotik ve proliferatif markerların tek başlarına vereceği bilgilere kıyasla, bu markerların kombinasyonu ile daha kuvvetli prognostik bilgi sağlandığını rapor etmişlerdir¹²⁶.

Stoll ve ark.'nın (1999) çalışmalarında, oral kavite ve orofarenksteki primer skuamöz hücreli karsinomlarda, apoptoz ve apoptoz ile ilişkili faktörlerin prognostik önemleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada sonuç olarak, Ki-67, p53, bcl-2 ve apoptotik indeksin, prognoz tahmin edilmesinde güvenilir bir şekilde kullanılamayacağını ancak, diferansiyasyon arttıkça Ki-67'nin diğer markerlara oranla, daha kuvvetli ekspresyon gösterdiğini göstermişlerdir¹²⁷.

Piattelli ve ark. (2002), oral kavitenin normal epiteli ile, premalign ve malign lezyonlarında, p53, Ki-67, bcl-2 immunoreaktivite ve apoptoz prevalansını inceledikleri çalışmalarında, hücrede p53 aktivitesinin kaybolması ile birçok preneoplazik lezyonun malign transformasyonu arasında pozitif yönde bir korelasyon bulmuşlardır. Ki-67 ekspresyonunun, tümör evresi yükseldikçe arttığını ve güçlü bir korelasyonun var olduğunu bildirmişlerdir. bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun, dokuda apoptozun azaldığının bir göstergesi

olduğunu, bu bulgunun karsinogenezde apoptozun prognostik önemini daha da arttırdığını rapor etmişlerdir⁸⁰.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Materyal

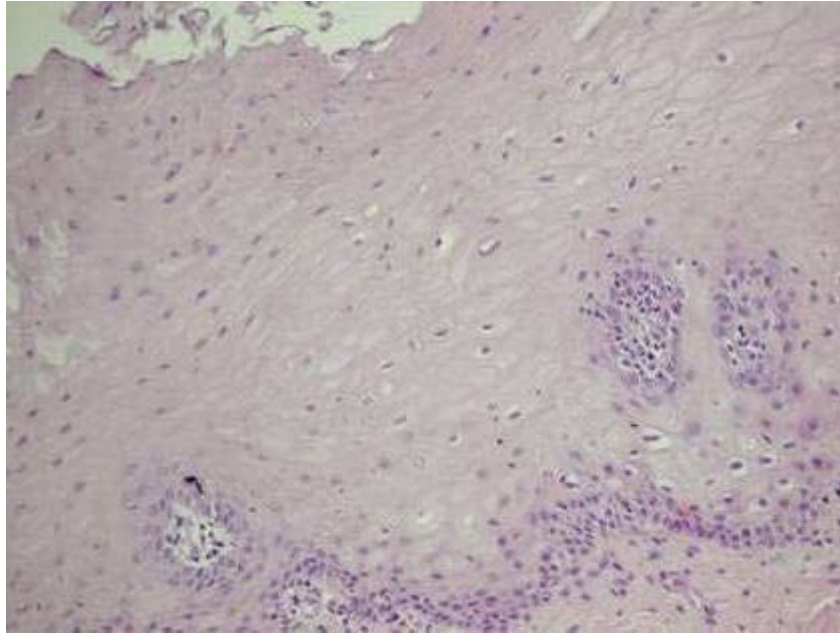
Araştırma, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Patoloji Bilim Dalı'nda ve Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız-Diş-Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı'nda, displazi ve oral mukoza yerleşimli skuamöz hücreli karsinomlu, yaşları 32 ile 79 arasında değişen ($62,02 \pm 12,74$), 17'si kadın, 23'ü erkek, toplam 40 hastadan alınan, 40 adet biyopsi örneği üzerinde yürütüldü. Kontrol grubu, Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız-Diş-Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvuran, mukoza veya kemik retansiyonlu gömülü üçüncü molarları bulunan, yaşları 21 ile 69 arasında değişen ($30,28 \pm 17,26$), 4'ü kadın, 3'ü erkek, toplam 7 hastadan, gömülü üçüncü molar operasyonu sırasında alınan 10 adet sağlıklı dişeti örneğinden oluşturuldu.

Çalışmaya dahil edilen tüm kontrol grubu hastaları, "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" doldurdu. Kontrol grubuna dahil edilen hastaların seçiminde; hastanın gömülü üçüncü molarına bağlı bir şikayetinin bulunmamasına, gömülü üçüncü moların üzerindeki mukozanın bütünlüğünün bozulmamış olmasına, klinik ve radyolojik olarak gömülü üçüncü molar kaynaklı bir inflamasyon ve patolojik bulgunun bulunmamasına dikkat edildi. Kontrol grubunu oluşturan tüm gömülü üçüncü molar operasyonları, standart cerrahi disiplin içerisinde, 40 mg. artikain hidroklorür ve 0,012 mg. epinefrin hidroklorür içeren lokal anestezi solüsyonu (Ultracaine®) ile alveolar inferior ve bukkal sinirin blok anestezisi oluşturularak gerçekleştirildi. Gömülü üçüncü molarların üzerini örten sağlıklı dişeti, mukoza bütünlüğüne ve formuna zarar verilmeden alındı ve %10'luk formalin

içine konularak, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderildi.

Hastaların yaş, cinsiyet, alınan doku örneklerinin lokalizasyonları, klinik ön tanıları, histopatolojik tanıları, dokuların displazi dereceleri ve tümörlerin histopatolojik diferansiyasyon evrelemesi ile, Ki-67, MCM-2 ve p53 markerlarının bütün kesitler üzerinde görülen ekspresyonları kaydedildi. Primer tümörler çalışmaya dahil edilirken, nüks ve metastatik tümörler çalışmada kullanılmadı. Oral skuamöz hücreli karsinom doku örneklerinin alındığı hastalarda, primer tümöre ait hazır hematoksilen eosin (H&E) boyalı lamlardan, skuamöz hücreli karsinomun evrelemesi ve varsa, displazi alanları belirlendi.

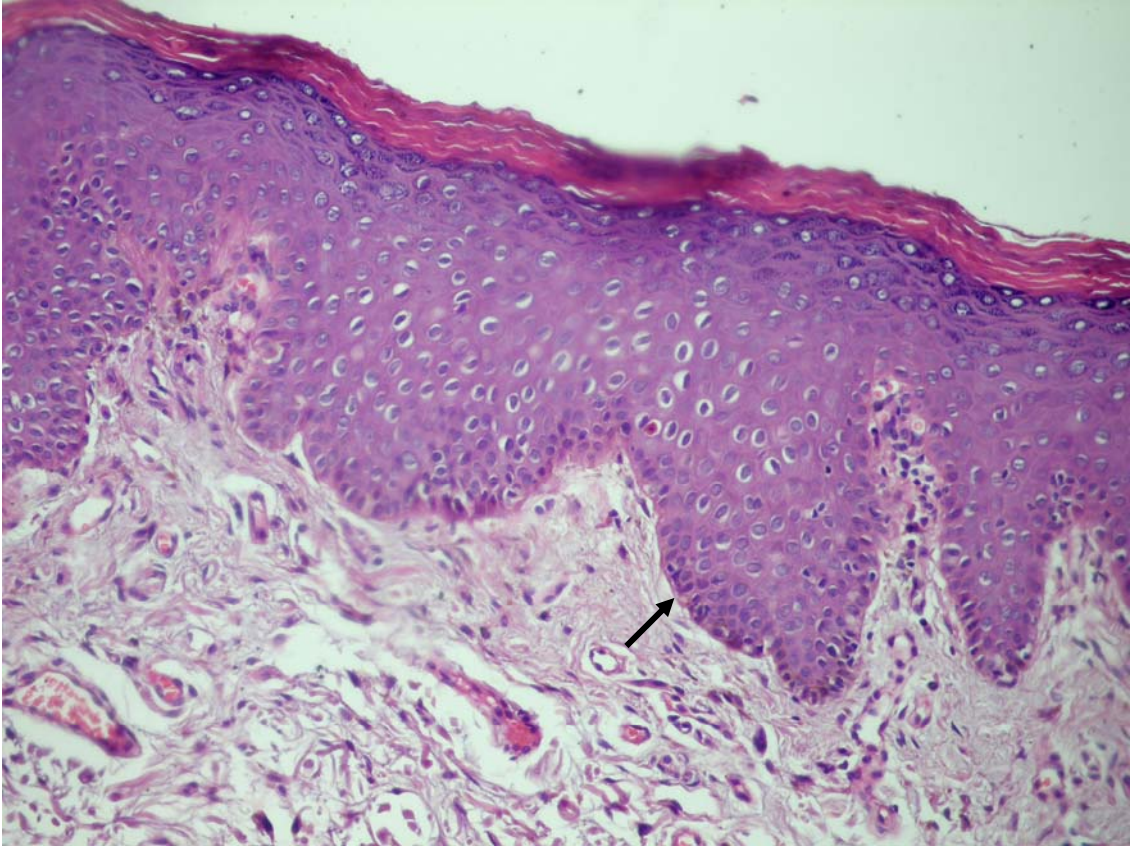
Displazilerin ve skuamöz hücreli karsinomların değerlendirilmesinde, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO Classification of Tumours, 2005) belirlemiş olduğu kriterler kullanıldı³⁶.



Resim 3.1. Normal dişeti epiteli görüntüsü (H&E x 100)

Hafif derecede displazi

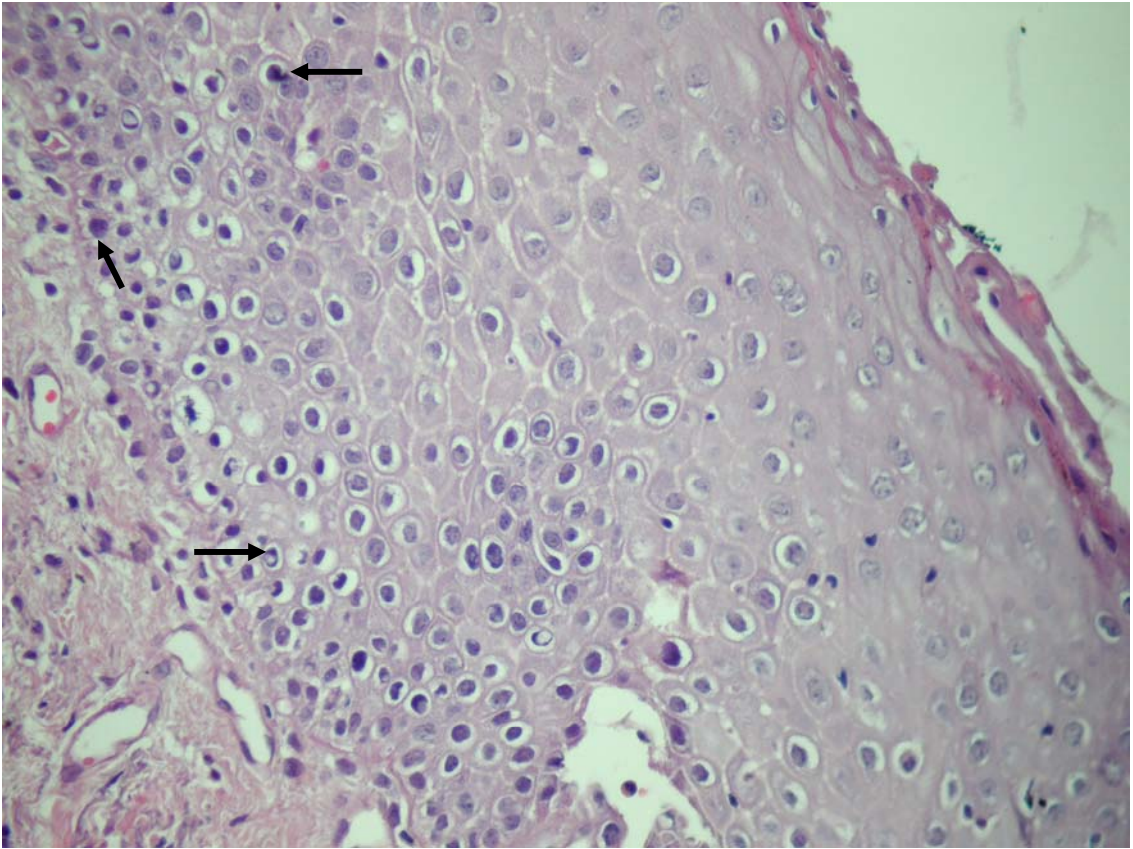
Maturasyon, skuamöz epitelin üst 2/3 kısmında mevcuttur. Bazal tabaka hücrelerinde, hafif atipi ve hafif nükleer anormallikler görülür. Hücrelerde mitoz olabilir fakat artmamıştır. Bazal tabakada sınırlıdır (Resim 3.2).



Resim 3.2. Hafif derecede displazi gösteren skuamöz epitel (H&E x 40)

Orta derecede displazi

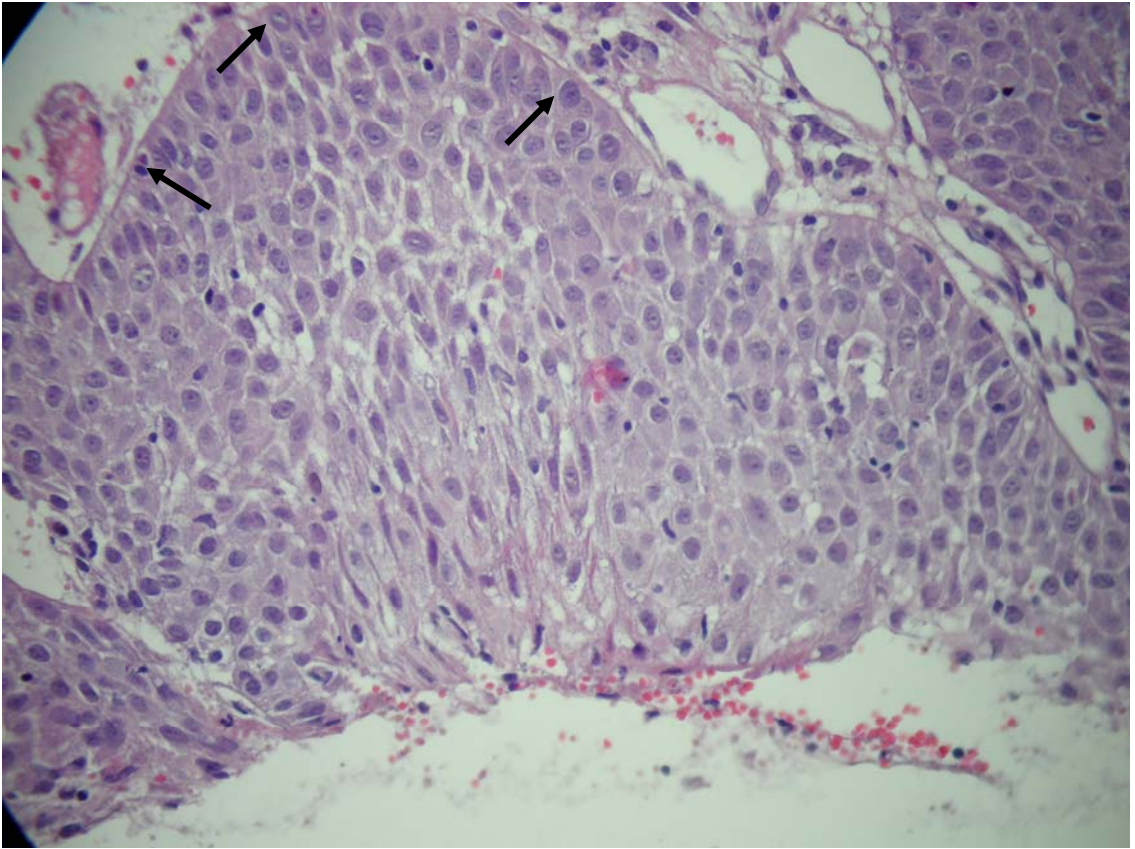
Maturasyon, skuamöz epitelin üst yarısında mevcuttur. Nükleer anormallikler, hafif derecede displazidekinden daha belirgindir. Hücrelerde mitoz, epitelin alt yarısında mevcuttur ve anormal sayılarda mitoz görülebilir (Resim 3.3).



Resim 3.3. Orta derecede displazi gösteren skuamöz epitel (H&E x 40)

Ağır derecede displazi

Maturasyon genelde izlenmez veya epitelin üst 1/3 kısmında izlenebilir. Nükleer anormallikler belirgindir ve hücrelerin mitoz sayısında artış gözlenir. Anormal mitotik figürler izlenir (Resim 3.4).



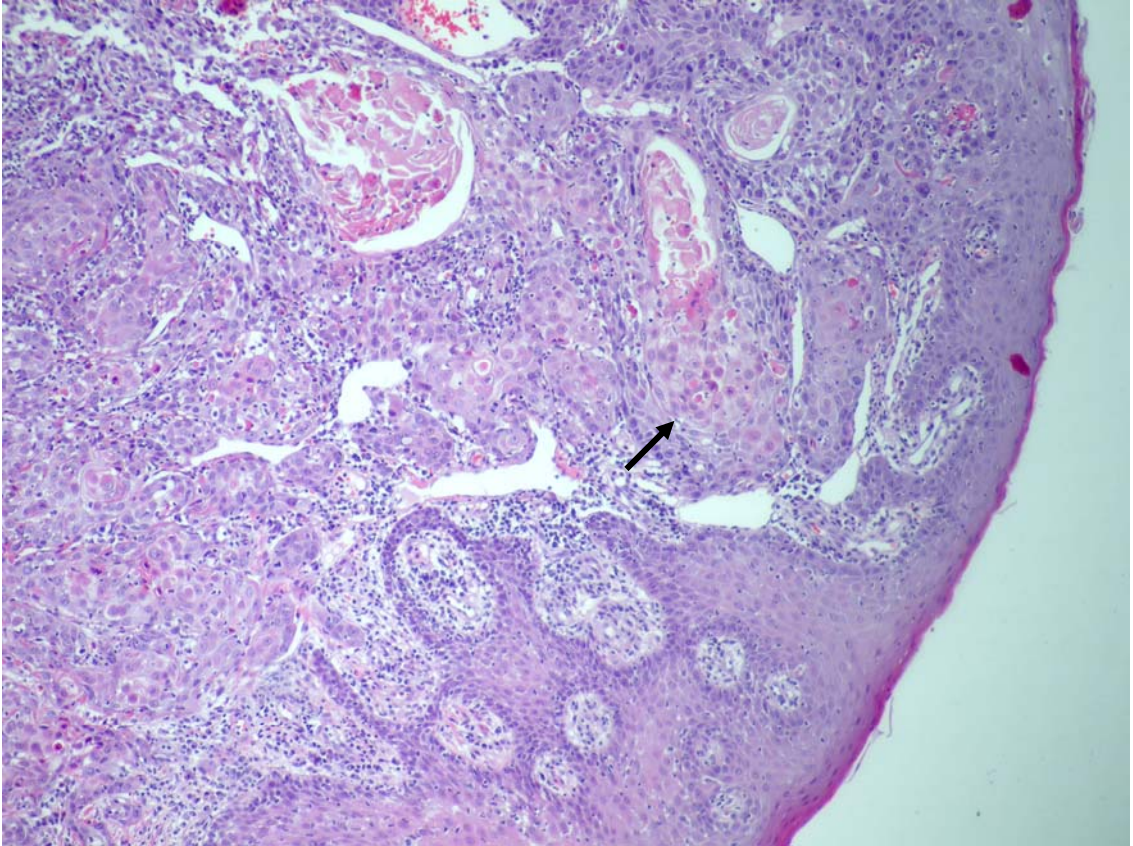
Resim 3.4. Ağır derecede displazi gösteren skuamöz epitel (H&E x 40)

Tümör evrelemesi, Cawson ve arkadaşlarının belirledikleri kriterler kullanılarak değerlendirildi¹²⁸. İyi diferansiyasyon gösteren lezyonlar grade-1, orta diferansiyasyon gösteren lezyonlar grade-2 ve kötü diferansiyasyon (indiferansiyasyon) gösteren lezyonlar ise, grade-3 olarak değerlendirildi.

Skvamöz hücreli karsinomun patolojik tanı kriterleri, skuamöz epitelde proliferasyon, disorganizasyon, bazal membranı infiltre eden atipik skuamöz epitel hücreleri ile hücrelerde pleomorfizm, nükleus/sitoplazma oranında değişiklikler, nükleusda büyüme, nükleer membranda düzensizlik, hiperkromazi ve atipik mitoz olarak değerlendirilir.

İyi diferansiye (Grade-1)

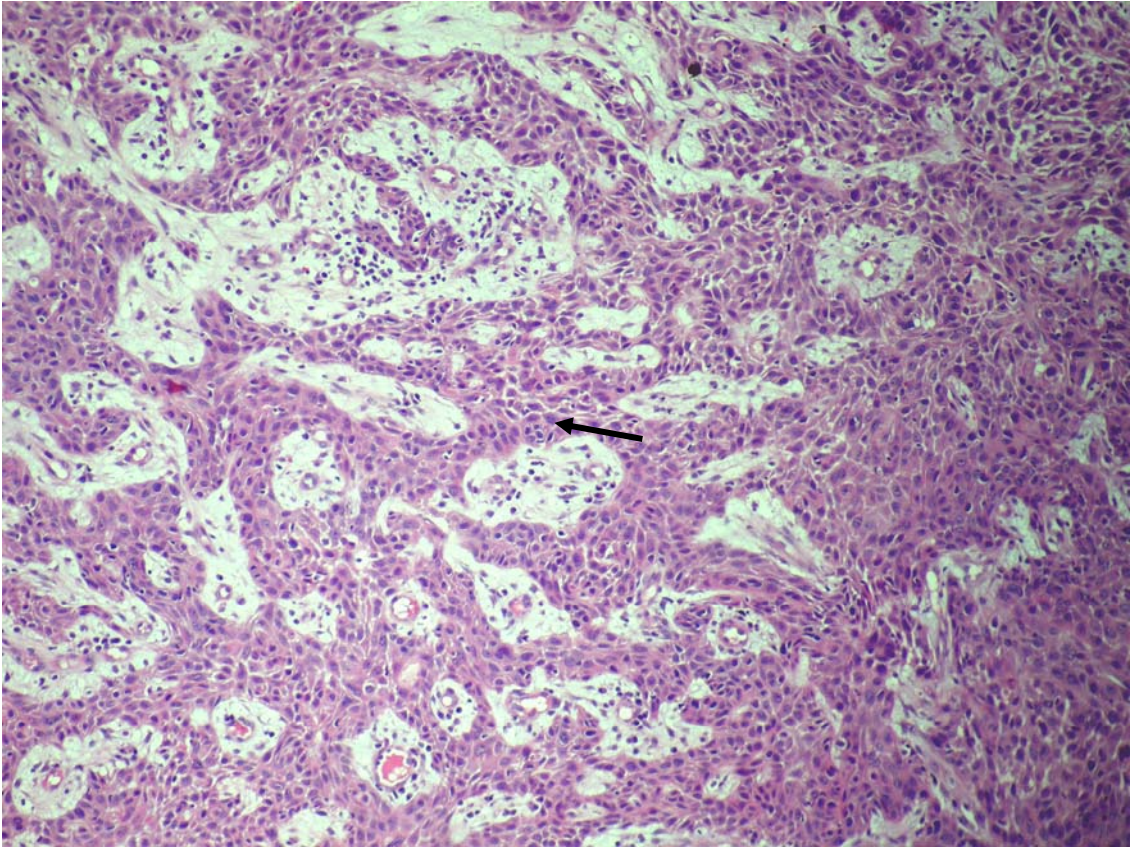
Tümöral hücreler, normal skuamöz epitele benzerler ve keratinizasyon gösterirler. Bu hücreler, normal hücrelerden daha pleomorfik olup, nükleer atipi belirgindir. Yuvarlak kitleler oluşturan tümöral hücrelerde belirgin keratinizasyon izlenir. Ayrıca, mitoz ve atipik mitoz mevcuttur (Resim 3.5).



Resim 3.5. Grade-1 Skuamöz hücreli karsinom (H&E x 40)

Orta diferansiye (Grade-2)

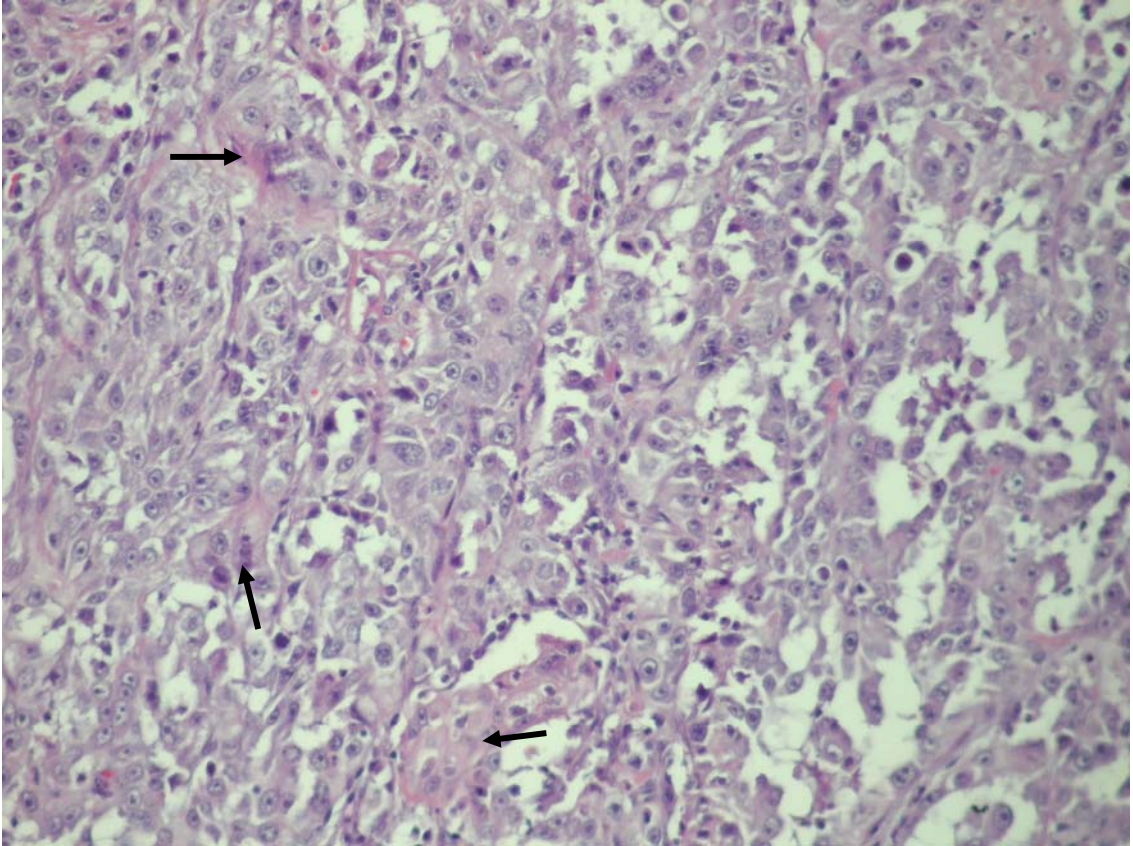
Tümöral hücrelerde orta derecede nükleer pleomorfizm mevcuttur. Keratinizasyon, daha az miktarlarda ve fokal alanlarda görülür. Hücrelerin sitoplazma oranı artmıştır. Daha küçük nükleusludur. Mitoz ve atipik mitozda artış izlenir (Resim 3.6).



Resim 3.6. Grade-2 Skuamöz hücreli karsinom (H&E x 200)

Kötü diferansiye (Grade-3)

Skvamöz hücre diferansiyasyonunun kaybolduğu alanlardan oluşan, immatür hücreler sıklıkla izlenir. Tümöral hücrelerde belirgin pleomorfizm mevcuttur. Keratinizasyon çok az miktardadır. Daha fazla mitoz ve atipik mitoz izlenir (Resim 3.7).



Resim 3.7. Grade-3 Skvamöz hücreli karsinom (H&E x 400)

3.2. İmmunohistokimyasal Metod

İmmunohistokimyasal çalışma için örnekler, doku takip cihazından geçirildikten sonra, elde edilen parafin bloklardan her bir örnekten, 3 adet polilizinli lama 5 mikronluk kesitler alındı. Polilizinli lama alınan örnekler, 37°C derecede 1 gece etüvde bekletildi. Daha sonra, 2 kez 15'er dakika xylenden geçirildi. 10 dakikalık beklemlerle 3 kez alkolden geçirildikten sonra, distile suyla yıkandı. Bu aşamadan sonra, trisitat buffer solüsyonunda (TBS) yıkanarak 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda tutuldu. Tekrar TBS'den geçirildikten sonra, sitrat buffer solüsyonu içinde 15 dakika mikrodalga uygulandı. TBS ile yıkanarak, 5 dakika süreyle UV blok (UltraTek HRP antipolivalan kit) uygulandı. TBS ile yıkandıktan sonra, primer antikorlardan Ki-67 (ScyTek, Logan, U.S.A, Ready to use: 7 ml) 60 dakika, p53 (Neomarkers, Fremont, U.S.A Ready to use: 7 ml) 60 dakika, Minichromosome maintenance protein 2 (MCM-2; CRCT 2.1 (D1.9H5); 1/100 dilüsyon; ABCAM, U.S.A) 12 saat, +4°C derecede inkübe edildi, TBS ile yıkandı ve daha sonra 15 dakika Streptavidin (UltraTek HRP antipolivalan kit) uygulandı. TBS ile yıkandıktan sonra, 15 dakika Biotin (UltraTek HRP antipolivalan kit) uygulandı, TBS ile yıkandı. Son aşamada, 15 dakika DAB kromojende tutuldu ve zemin hematoksilen boyası ile boyandıktan sonra, xylenden geçirilip üzerleri lamel ile kapatıldı. İmmunohistokimyasal boyamada, Ki-67 için displastik serviks epiteli, p53 için pozitif boyanma gösteren beyin glioblastom örneği, MCM-2 için tonsil dokusu, pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bu proliferasyon markerlarının dokulardaki değerlendirmeleri yapılırken, en yoğun boyanmanın olduğu alanlarda 100 hücre sayılarak, bu hücreler içinde pozitif nükleer boyanma sayısı % olarak verildi.

3.3 İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada istatistiksel analizler, NCSS 2007 paket programı ile yapıldı. Verilerin değerlendirilmesinde, tanımlayıcı istatistiksel metotların (ortalama, standart sapma) yanı sıra, gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal Wallis testi, alt grup karşılaştırmalarında Dunn's çoklu karşılaştırma testi, ikili grupların karşılaştırmasında Mann-Whitney-U testi, değişkenlerin birbirleri ile ilişkilerini belirlemede ise, Pearson korelasyon testi kullanıldı. Sonuçlar, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde, %95'lik güven aralığında değerlendirildi.

4. BULGULAR

Hastaların yaş, cinsiyet ve lokalizasyon bilgileri, Tablo 4.1' de gösterilmiştir. Yaş ortalaması $62,02 \pm 12,74$ olan bütün hastaların yaş gruplarına göre dağılımında, 9'unun (%18) 20-29 yaş grubunda, 2'sinin (%4) 30-39 yaş grubunda, 7'sinin (%14) 40-49 yaş grubunda, 5'inin (%10) 50-59 yaş grubunda, 13'ünün (%26) 60-69 yaş grubunda ve 14'ünün (%28) >70 yaş grubunda olduğu belirlendi. Kontrol grubu doku örnekleri, gömülü 20 yaş dışı çekimi sırasında, çevre dışı mukozasının bütünlüğünün bozulmadığı bölgelerden alınırken, displazi ve OSHK örneklerinin 2'si (%5) dilden, 6'sı (%15) bukkal mukozadan, 16'sı (%40) maksilladan ve 16'sı (%40) mandibuladan alındı. Klinik ön tanıları lökoplaki olan 10 hastanın doku örneklerinin histopatolojik tanısı displazi olarak belirlendi. Klinik ön tanısı adenokarsinom olan 2'sinin, foliküler kist olan 1'inin, irritasyon fibromu olan 1'inin, periferik hücreli granulom olan 1'inin ve lökoplaki olan 1'inin histopatolojik tanısı, skuamöz hücreli karsinom olarak kaydedildi. Displazilerin 7'sinin (%70) hafif dereceli, 3'ünün (%30) ise orta dereceli olduğu gözlemlendi. Oral skuamöz hücreli karsinom doku örneklerinin 18'inin (%60) iyi diferansiye, 11'inin (%36,6) orta diferansiye ve 1'inin (%3,4) az diferansiye olduğu tespit edildi.

Çalışmaya dahil edilen hastaların yaşları ile displazik doku örneklerindeki Ki-67 ($r=-0,085$, $p=0,815$), MCM-2 ($r=0,305$, $p=0,391$), p53 ($r=0,018$, $p=0,960$) ekspresyonları arasında ve OSHK doku örneklerindeki Ki-67 ($r=0,122$, $p=0,530$), MCM-2 ($r=-0,011$, $p=0,956$) ve p53 ($r=0,101$, $p=0,601$) ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon gözlenmedi.

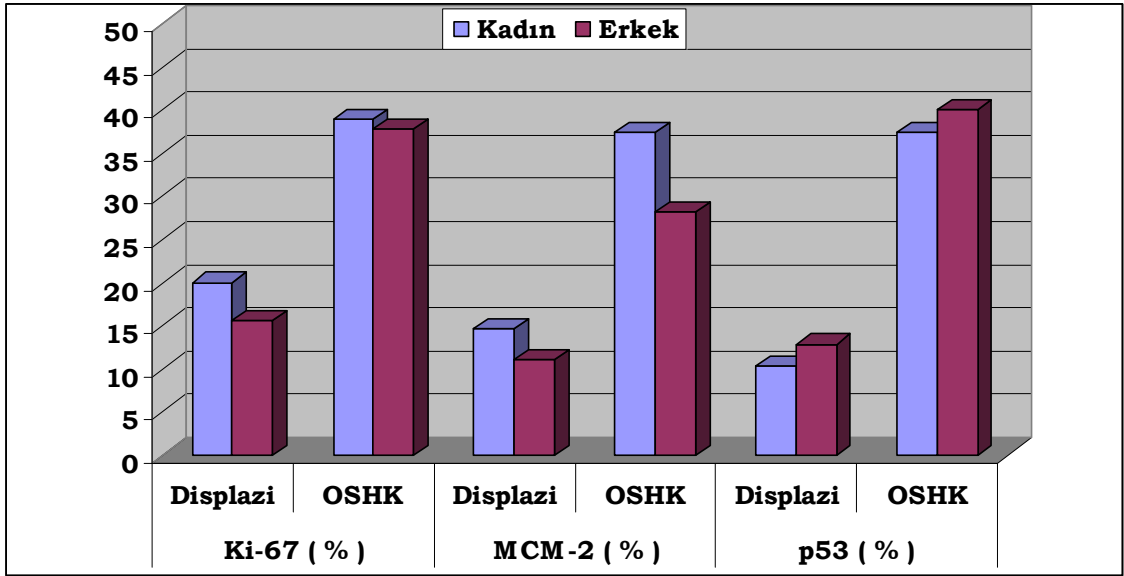
Tablo 4.1. Hasta grupları ile yaş ortalamaları, cinsiyet ve doku örneklerinin alındığı lokalizasyon bilgileri

	Yaş Ortalaması ± SD	Cinsiyet		Lokalizasyon				
		Kadın ♀	Erkek ♂	Bukkal Mukoza	Maksilla	Mandibula	Dil	Dışeti
Kontrol Grubu	28,1 ± 14,56	6 (% 60)	4 (% 40)	-	-	-	-	10
Displazi Grubu	58,3 ± 13,31	3 (% 30)	7 (% 70)	1 (% 10)	5 (% 50)	3 (% 30)	1 (% 10)	-
Oral Skuamöz Hücreli Karsinom Grubu	63,26 ± 12,53	14 (% 46)	16 (% 54)	5 (% 18)	11 (% 36)	13 (% 43)	1 (% 3)	-

Cinsiyete göre displazi ve oral skuamöz hücreli karsinom doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları, Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Cinsiyet ile displazi ve OSHK doku örneklerindeki Ki-67 (p=0,383, p=0,786), MCM-2 (p=0,246, p=0,288) ve p53 (p=0,998, p=0,739) ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.1).

Tablo 4.2. Cinsiyete göre displazi ve oral skuamöz hücreli karsinom doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları

		Kadın	Erkek	MW	p
Ki-67 (%)	Displazi	20±8,66	15,57±7,98	6,5	0,383
	OSHK	38,93±19,33	37,75±21,83	105	0,786
MCM-2 (%)	Displazi	14,67±5,03	11,14±68,61	4,5	0,246
	OSHK	37,43±26,07	28,19±15,16	86	0,288
p53 (%)	Displazi	10,33±5,68	12,86±12,71	10	0,998
	OSHK	37,43±26,07	40±24,18	103,5	0,739

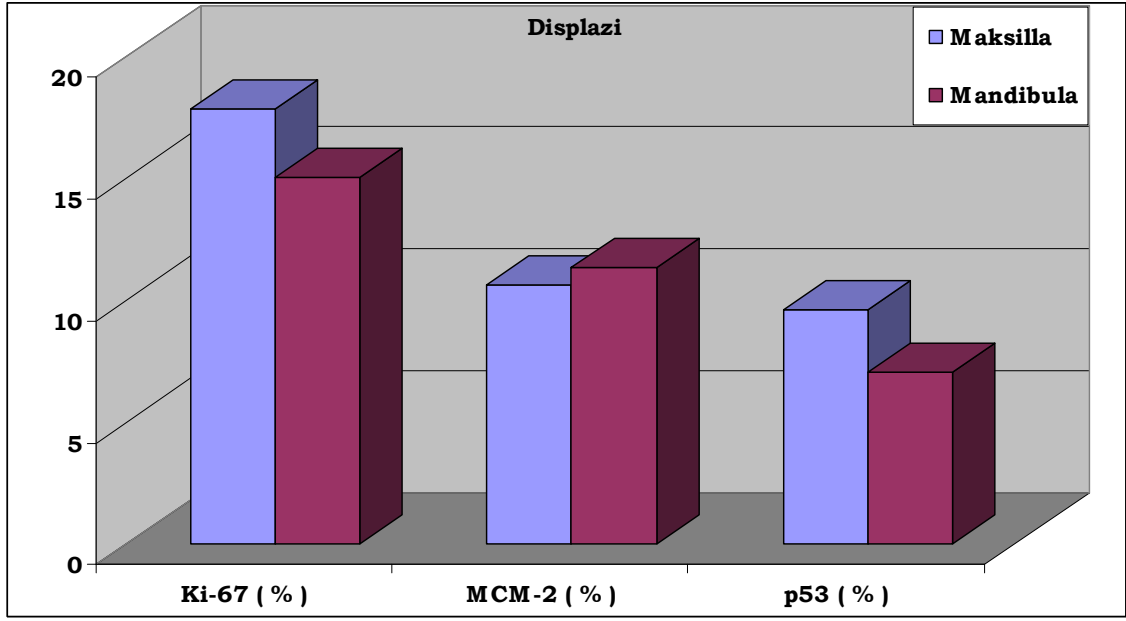


Şekil 4.1. Cinsiyete göre displazi ve oral skuamöz hücreli karsinom doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları

Tümör markerlarının, displazik doku örneklerinin lokalizasyonlarına göre ortalama ekspresyonu, Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Maksilla ve mandibulada lokalizasyon gösteren displazik doku örneklerinde, Ki-67 ($p=0,998$), MCM-2 ($p=0,571$) ve p53 ($p=0,571$) ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.2).

Tablo 4.3. Displazik doku örneklerinin lokalizasyonlarına göre Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyon ortalamaları

Displazi	Maksilla	Mandibula	MW	p
Ki-67 (%)	17,8 ± 7,69	15 ± 0	7	0,998
MCM-2 (%)	10,6 ± 5,64	11,3 ± 2,3	5	0,571
p53 (%)	9,6 ± 5,5	7 ± 4,35	5	0,571

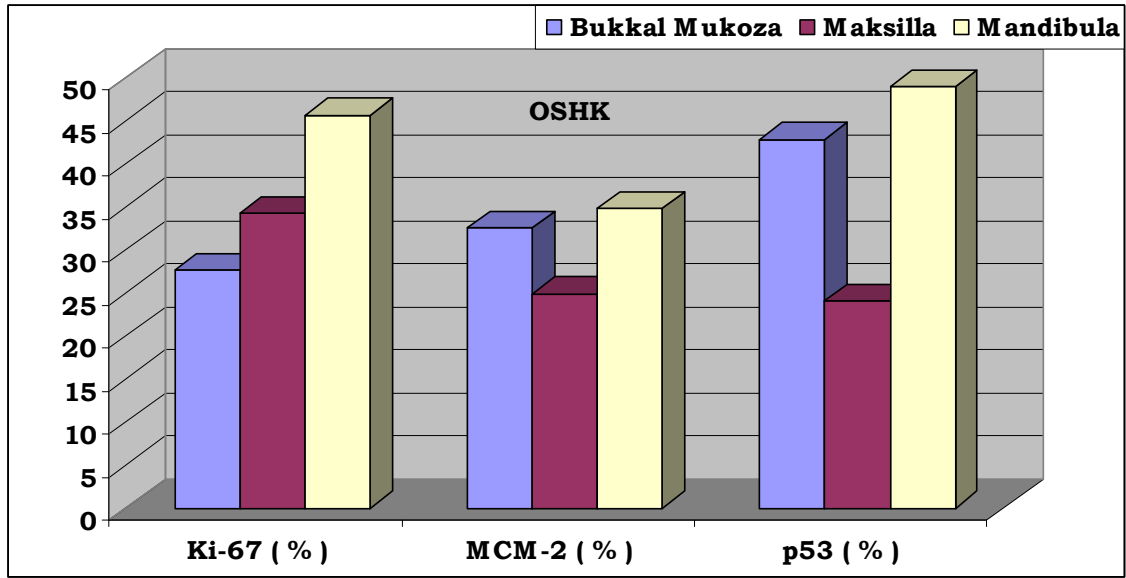


Şekil 4.2. Displazik doku örneklerinin lokalizasyonlarına göre Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyon ortalamaları

Lokalizasyonlarına göre OSHK doku örneklerinin, Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları ortalaması, Tablo 4.4'te gösterilmiştir. Maksilla, mandibula ve bukkal mukozada izlenen OSHK'lardaki Ki-67 ve MCM-2 ekspresyonları ile lokalizasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0,199$, $p=0,258$). Ancak, p53 ekspresyonu ile tümörün lokalizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0,045$). Mandibulada lokalize tümörlerdeki p53 ekspresyonu, maksillaya göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$), (Şekil 4.3).

Tablo 4.4. Lokalizasyonlarına göre oral skuamöz hücreli karsinom doku örneklerinin, Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları ortalaması (%)

OSHK	Bukkal Mukoza	Maksilla	Mandibula	KW	p
Ki-67 (%)	27,6±13,74	34,27±20,17	45,69±121,85	3,22	0,199
MCM-2 (%)	32,6±18,2	24,91±11,92	34,77±17,63	2,70	0,258
p53 (%)	42,8±28,23	24±16,22	48,92±25,63	6,16	0,045
Dunn's Çoklu Karşılaştırma Testi				p53 (%)	
Bukkal Mukoza / Maksilla				p > 0.05	
Bukkal Mukoza / Mandibula				p > 0.05	
Maksilla / Mandibula				p < 0.05	



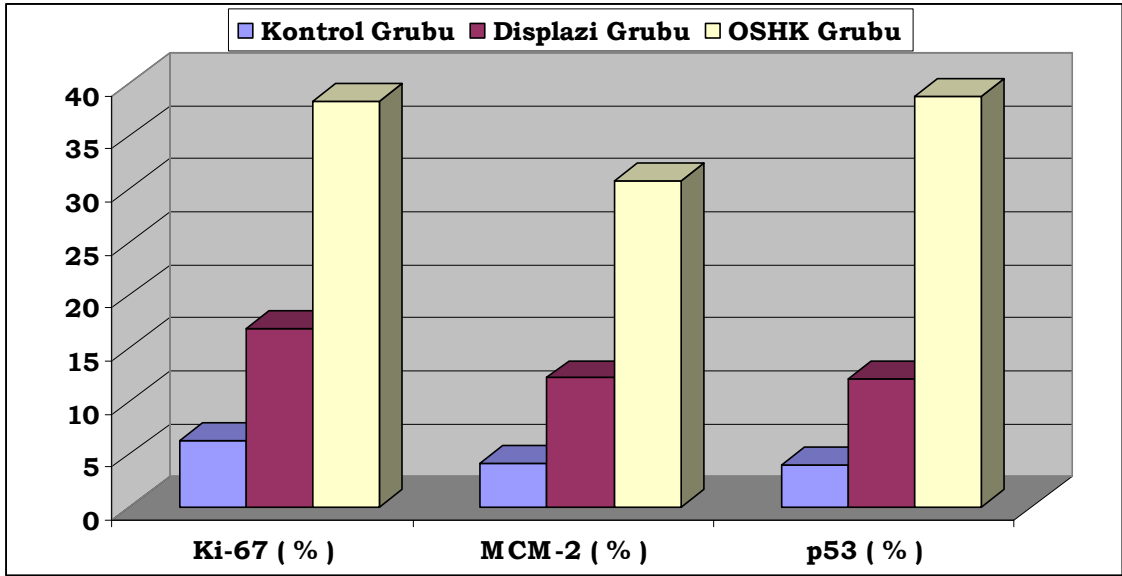
Şekil 4.3. Lokalizasyonlarına göre oral skuamöz hücreli karsinom doku örneklerinin, Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları ortalaması (%)

Kontrol, displazi ve oral skuamöz hücreli karsinom doku örneklerinde, ortalama Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları, Tablo 4.5'te gösterilmiştir. Ancak, kontrol ve displazi grupları karşılaştırıldığında, Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$). Kontrol, displazi ve OSHK gruplarındaki doku örneklerinin, Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu ($p = 0,0001$). OSHK grubunun Ki-67 ($p < 0,001$, $p < 0,05$), MCM-2 ($p < 0,001$, $p < 0,01$) ve p53 ($p < 0,001$, $p < 0,05$) ekspresyonları, kontrol ve displazi gruplarıyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (Şekil 4.4).

Tablo 4.5. Kontrol, displazi ve oral skuamöz hücreli karsinom doku örneklerindeki ortalama Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları

	Kontrol Grubu	Displazi Grubu	OSHK Grubu	KW	p
Ki-67 (%)	6,3±3,71	16,9±7,92	38,3±20,35	28,28	0,0001
MCM-2 (%)	4,2±1,32	12,2±7,61	30,8±15,64	23,15	0,0001
p53 (%)	4±1,15	12,1±10,79	38,8±24,67	25,85	0,0001

Dunn's Çoklu Karşılaştırma Testi			
	Ki-67	MCM-2	p53
Kontrol Grubu/Displazi Grubu	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
Kontrol Grubu / OSHK Grubu	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
Displazi Grubu / OSHK Grubu	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p < 0.05$

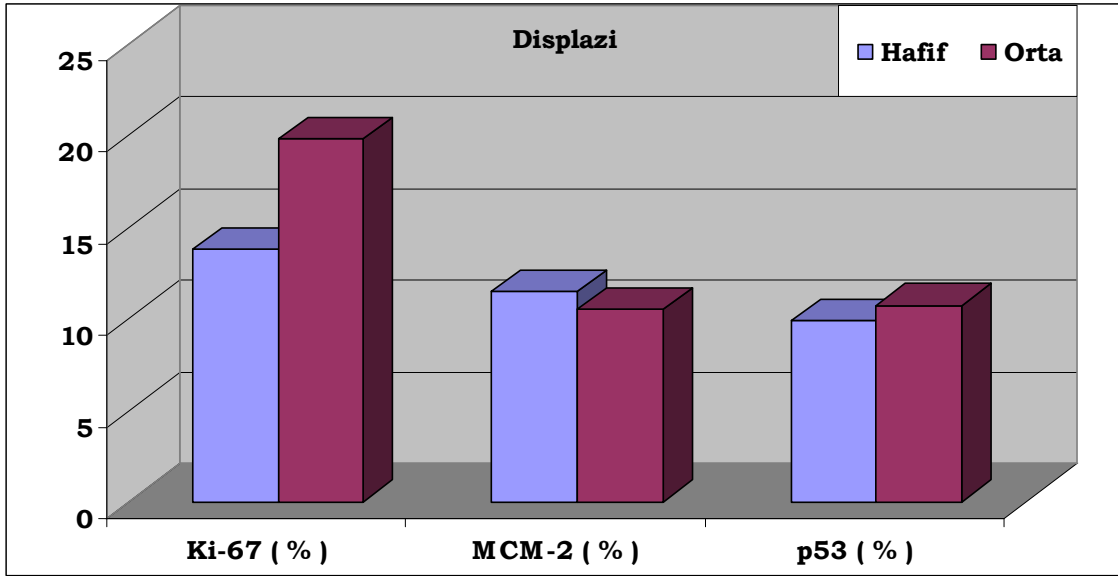


Şekil 4.4. Kontrol, displazi ve oral skuamöz hücreli karsinom doku örneklerindeki ortalama Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları

Hafif ve orta displazi doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyon ortalamaları Tablo 4.6'da gösterilmiştir. Hafif dereceli displazik doku örneklerindeki ortalama Ki-67 ekspresyonu ($13,8 \pm 5,6$), orta dereceliden ($19,83 \pm 6,91$), istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0,047$). Her iki dereceli displazik doku örneklerindeki ortalama MCM-2 ($11,47 \pm 6,99$, $10,5 \pm 4,48$) ve p53 ($9,87 \pm 9,51$, $10,75 \pm 7,92$) ekspresyonları arasında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0,94$, $p=0,54$), (Şekil 4.5).

Tablo 4.6. Hafif ve orta displazik doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyon ortalamaları

Displazi	Hafif	Orta	MW	p
Ki-67 (%)	$13,8 \pm 5,6$	$19,83 \pm 6,91$	49,5	0,047
MCM-2 (%)	$11,47 \pm 6,99$	$10,5 \pm 4,48$	88,5	0,94
p53 (%)	$9,87 \pm 9,51$	$10,75 \pm 7,92$	77,5	0,54



Şekil 4.5. Hafif ve orta displazik doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyon ortalamaları

Displazik doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonlarının korelasyonu, Tablo 4.7'de gösterilmiştir. Displazik doku örneklerindeki ortalama Ki-67 ekspresyonu ile MCM-2 ve p53 ekspresyonları arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon belirlenmedi ($p=0,473$). Ancak, ortalama MCM-2 ekspresyonu ile p53 ekspresyonu arasında, istatistiksel olarak pozitif yönde anlamlı bir korelasyon belirlendi ($p=0,001$).

Tablo 4.7. Displazik doku örneklerinde Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonlarının korelasyonu

Displazi grubu		Ki-67 (%)	MCM-2 (%)	p53 (%)
Ki-67 (%)	r		-0,258	-0,264
	p		0,473	0,461
MCM-2 (%)	r	-0,258		0,874
	p	0,473		0,001
p53 (%)	r	-0,264	0,874	
	p	0,461	0,001	

Kontrol grubu ile hafif ve orta dereceli displazik doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonlarının ortalaması, Tablo 4.8'de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile hafif ve orta dereceli displazik doku örneklerindeki ortalama Ki-67 ($p=0,003$), MCM-2 ($p=0,002$), p53 ($p=0,019$) ekspresyonları arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu. Kontrol grubu doku örneklerindeki ortalama Ki-67 ($p<0,01$) ve p53 ($p<0,05$) ekspresyonları, orta dereceli displazik doku örneklerindeki ortalama ekspresyonlarından, istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu. Ancak, hafif dereceli displazik doku örnekleri ile kontrol grubu ve orta dereceli displazik doku örneklerindeki ortalama Ki-67 ve p53 ekspresyonları arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmedi ($p>0,05$). Kontrol grubu doku örneklerindeki MCM-2 ekspresyonu, hem hafif ($p<0,01$), hem de orta dereceli displazik ($p<0,05$) doku örneklerinin ortalama MCM-2 ekspresyonlarından, istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu. Hafif ile orta dereceli displazik doku örneklerinin ortalama MCM-2 ekspresyonları arasında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmedi ($p>0,05$).

Tablo 4.8. Kontrol grubu ile hafif ve orta dereceli displazik doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonlarının ortalamaları

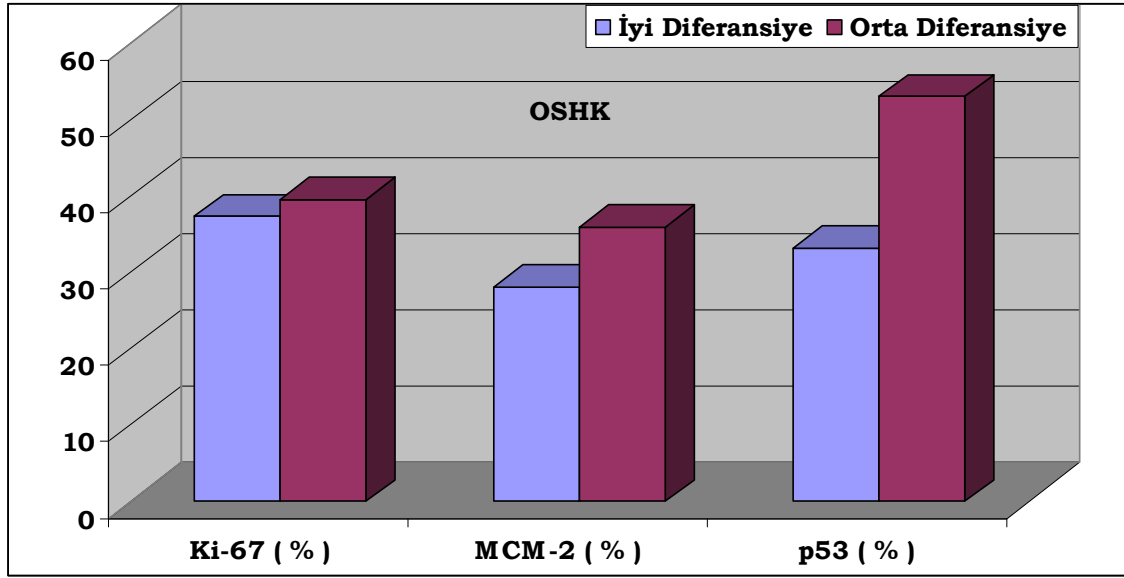
Displazi	Kontrol grubu	Hafif dereceli	Orta dereceli	KW	p
Ki-67 (%)	6,3±3,71	13,43±4,72	25±8,66	11,76	0,003
MCM-2 (%)	4,2±1,32	11,86±8,21	13±7,55	12,44	0,002
p53 (%)	4±1,15	11,71±13,15	13±1,73	7,93	0,019

Dunn's Çoklu Karşılaştırma Testi	Ki-67 (%)	MCM-2(%)	p53 (%)
Kontrol / Hafif	p > 0.05	p < 0.01	p > 0.05
Kontrol / Orta	p < 0.01	p < 0.05	p < 0.05
Hafif / Orta	P > 0.05	p > 0.05	p > 0.05

OSHK doku örneklerinin, diferansiyasyon derecelerine göre ortalama Ki-67, MCM-2, p53 ekspresyonları, Tablo 4.9'de gösterilmektedir. Kötü diferansiye OSHK belirlenen sadece 1 doku örneği olduğu için, Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları kaydedildi ancak, istatistiksel çalışmaya dahil edilmedi. İyi diferansiye ile orta diferansiye OSHK doku örneklerindeki Ki-67 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0,998$). İyi diferansiye ve orta diferansiye OSHK doku örneklerindeki MCM-2 ekspresyon ortalamaları ($28,13\pm 10,3$, $36\pm 20,21$) arasında da, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0,4$). Ancak, iyi diferansiye OSHK doku örneklerindeki p53 ekspresyonu ($33,17\pm 20,98$), orta diferansiyede belirlenen ekspresyondan ($53\pm 25,99$) istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0,037$), (Şekil 4.6).

Tablo 4.9. OSHK doku örneklerinin, diferansiyasyon derecelerine göre ortalama Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları

OSHK	İyi Diferansiye	Orta Diferansiye	MW	p
Ki-67 (%)	37,35±16,43	39,5±24,47	138	0,998
MCM-2 (%)	28,13±10,3	36±20,21	114	0,4
p53 (%)	33,17±20,98	53±25,99	78	0,037

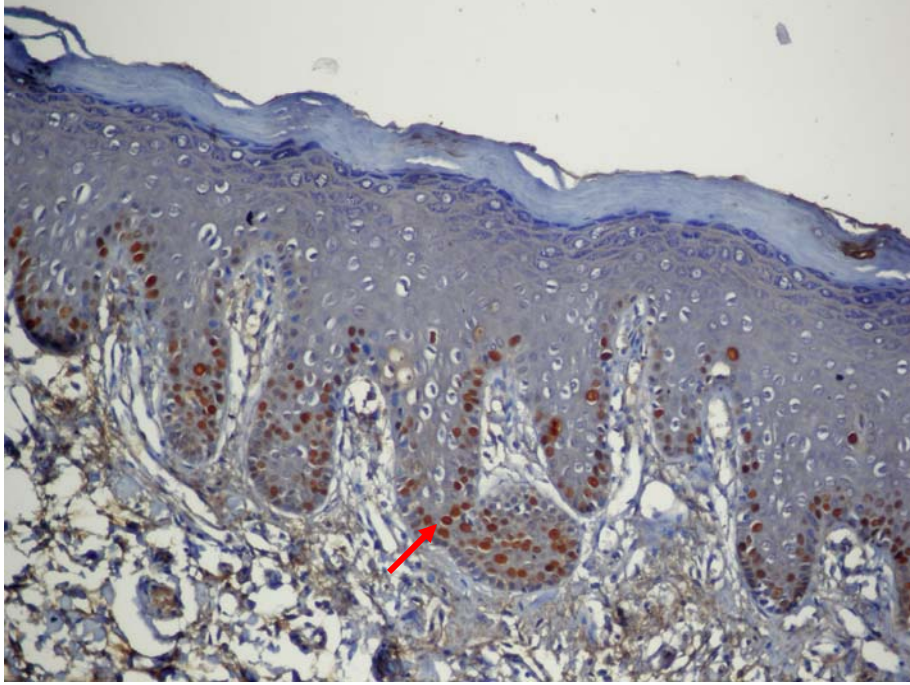


Şekil 4.6. OSHK doku örneklerinin, diferansiyasyon derecelerine göre ortalama Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları

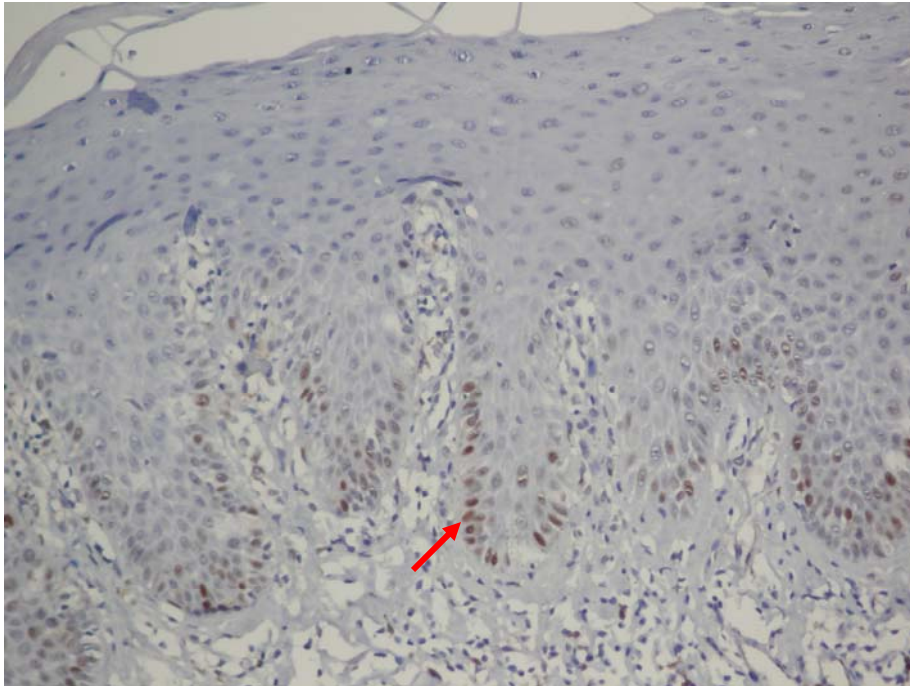
OSHK doku örneklerindeki ortalama Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonlarının korelasyonu Tablo 4.10'da belirtilmiştir. OSHK' da, Ki-67 ile MCM-2 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak pozitif yönde anlamlı bir korelasyon bulundu ($p=0,0001$). Ki-67 ile p53 ekspresyonları arasında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmadı ($p=0,205$). Ancak, ortalama MCM-2 ve p53 ekspresyonları arasında, istatistiksel olarak pozitif yönde anlamlı bir korelasyon belirlendi ($p=0,011$).

Tablo 4.10. Oral Skuamöz Hücreli Karsinom doku örneklerinde, Ki-67, MCM-2, p53 ekspresyonlarının korelasyonu

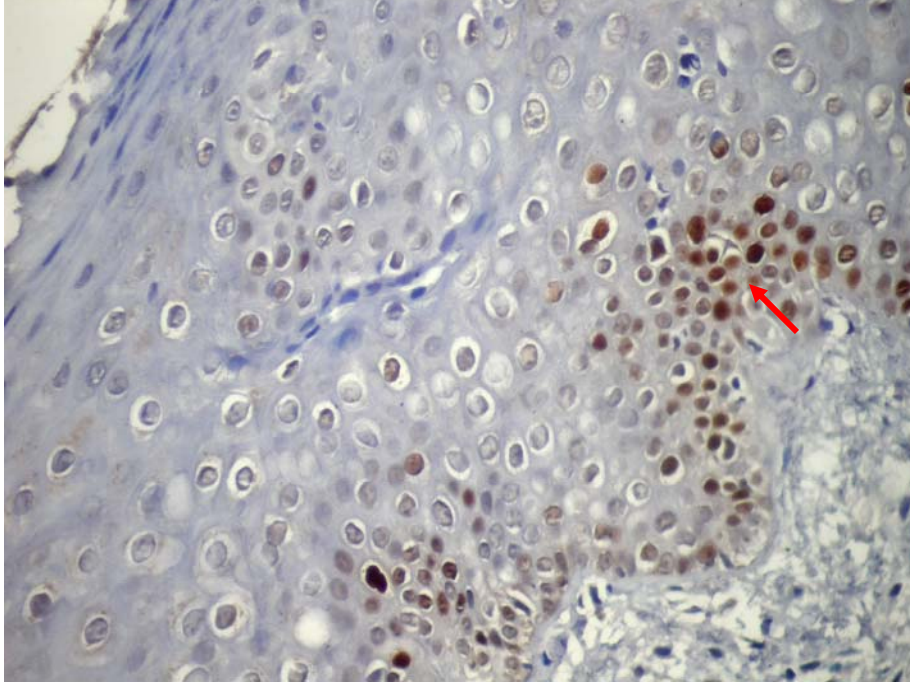
OSHK' da		Ki-67 (%)	MCM-2 (%)	p53 (%)
Ki-67 (%)	r		0,766	0,242
	p		0,0001	0,205
MCM-2 (%)	r	0,766		0,463
	p	0,0001		0,011
p53 (%)	r	0,242	0,463	
	p	0,205	0,011	



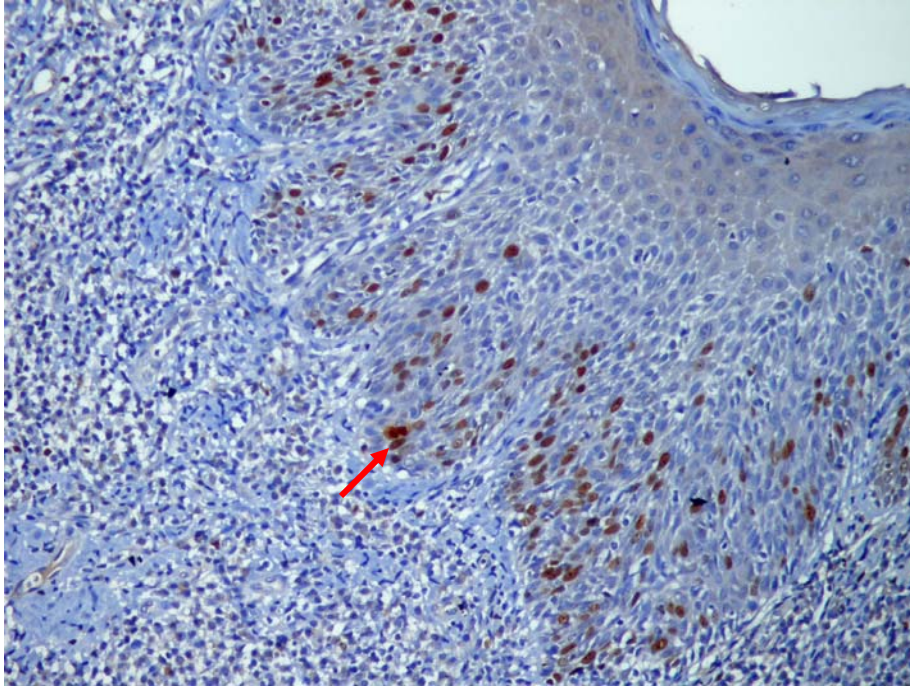
Resim 4.1. Hafif derecede displazi gösteren epitelde Ki-67 ile %40 oranında pozitiflik (Ki-67 x 40)



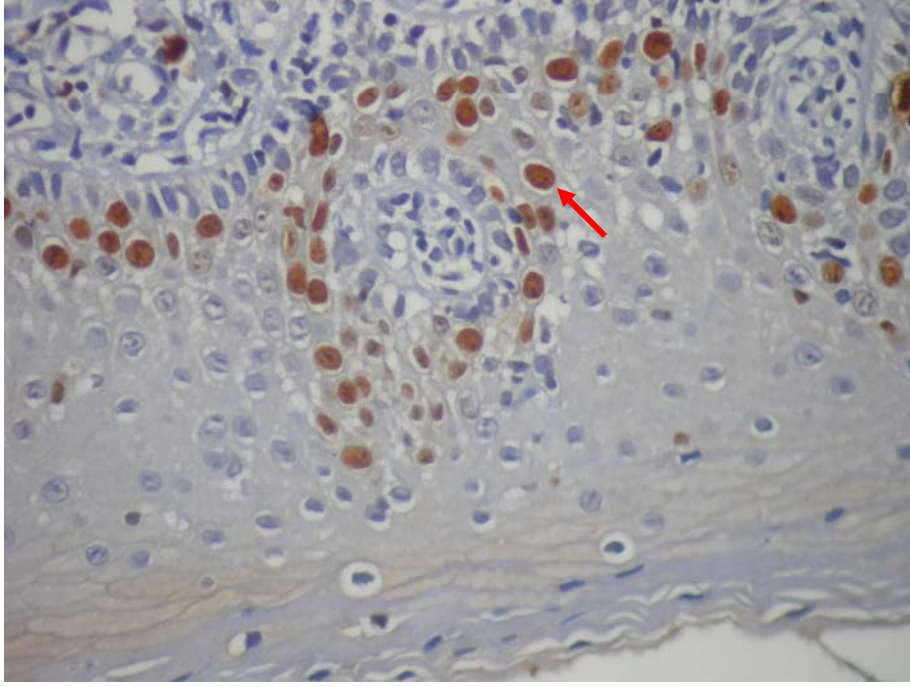
Resim 4.2. Hafif derecede displazi gösteren epitelde MCM-2 ile %30 oranında pozitiflik (MCM-2 x 40)



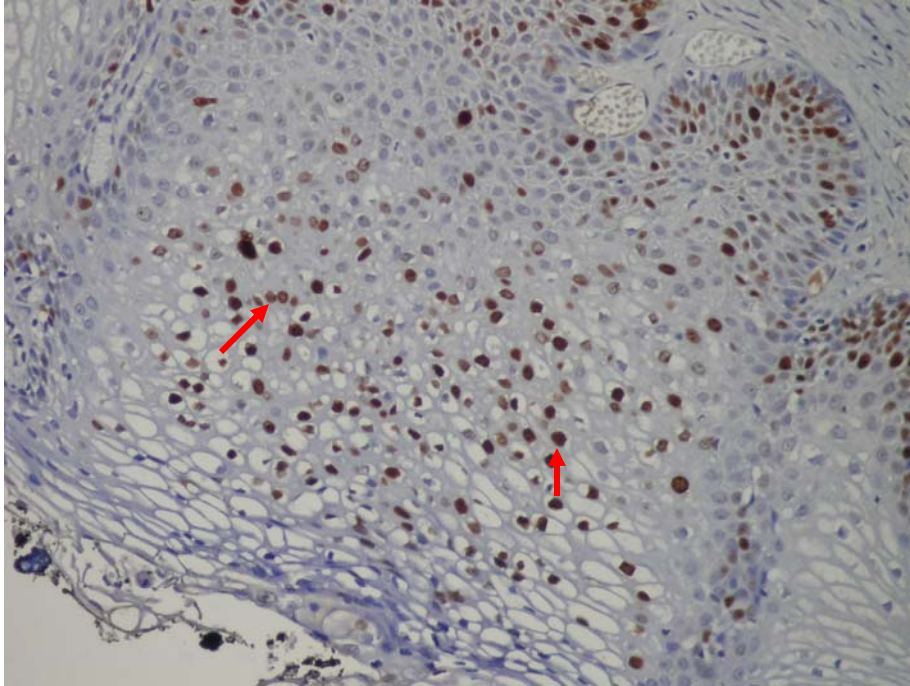
Resim 4.3. Hafif derecede displazi gösteren epitelde p53 ile %27 oranında pozitiflik (p53 x 100)



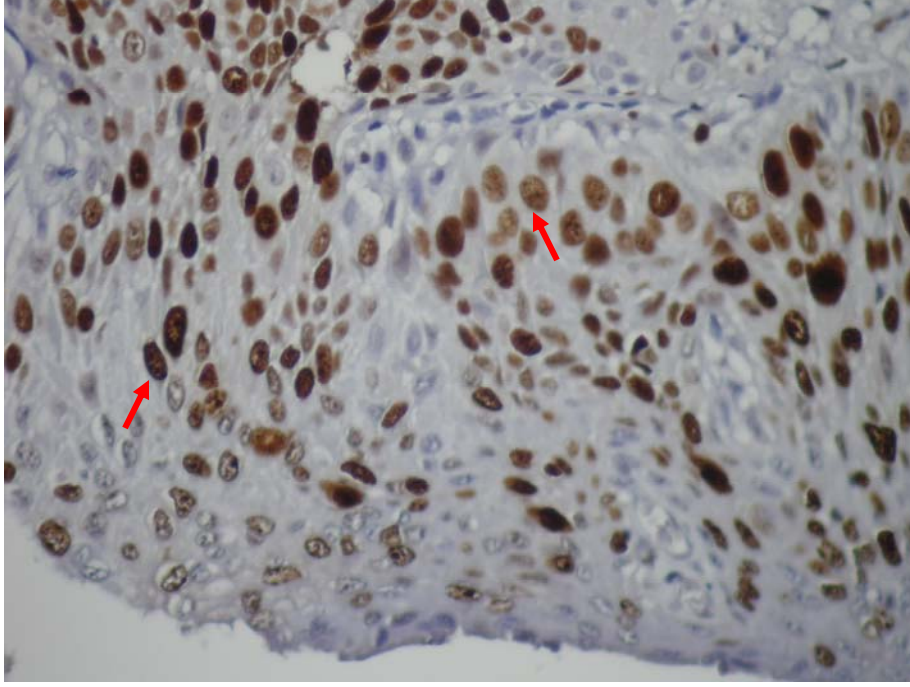
Resim 4.4. Orta derecede displazi gösteren epitelde Ki-67 ile %30 oranında pozitiflik (Ki-67 x 100)



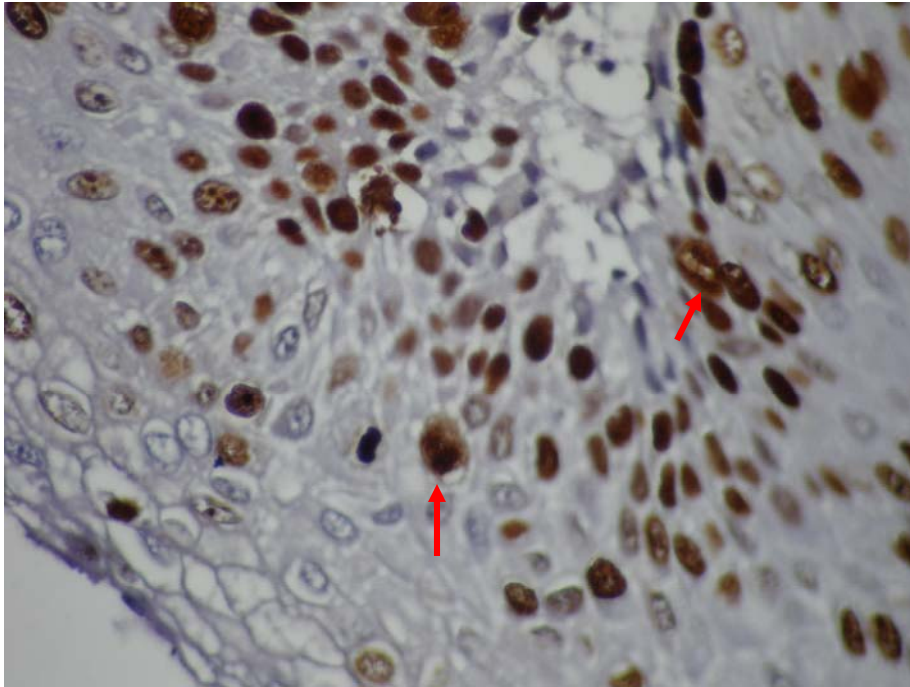
Resim 4.5. Orta derecede displazi gösteren epitelde MCM-2 ile %8 pozitiflik (MCM-2 x 400)



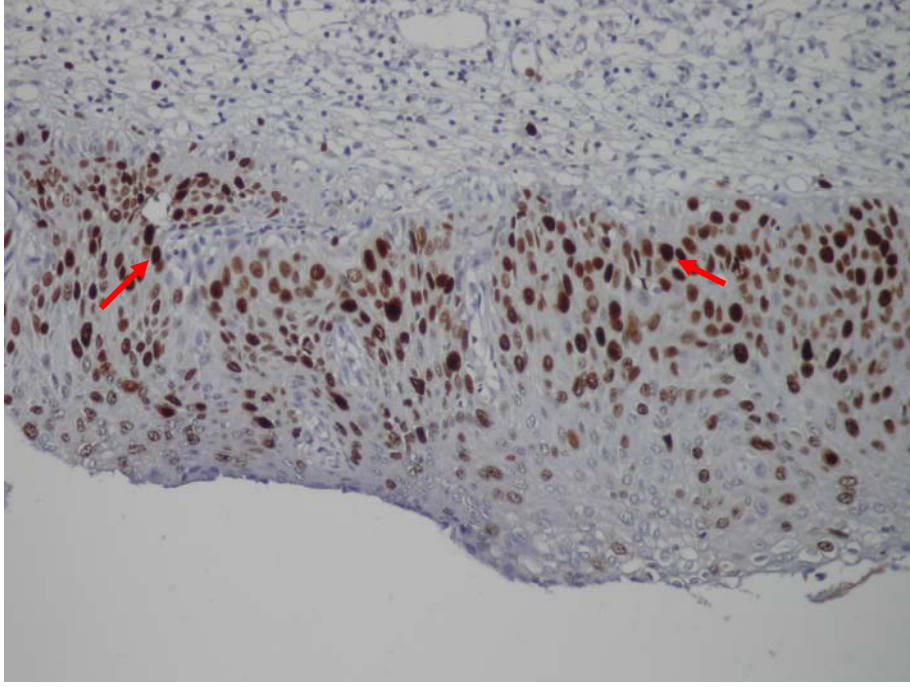
Resim 4.6. Orta derecede displazi gösteren epitelde p53 ile %20 pozitiflik (p53 x 100)



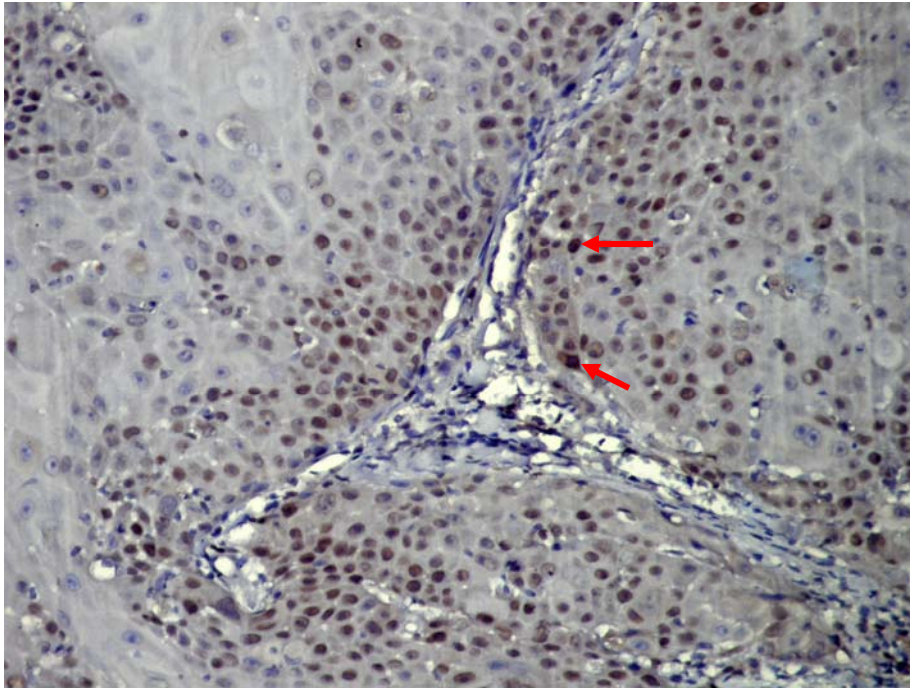
Resim 4.7. Ağır derecede displazi gösteren epitelde Ki-67 ile %23 pozitiflik (Ki-67 x 400)



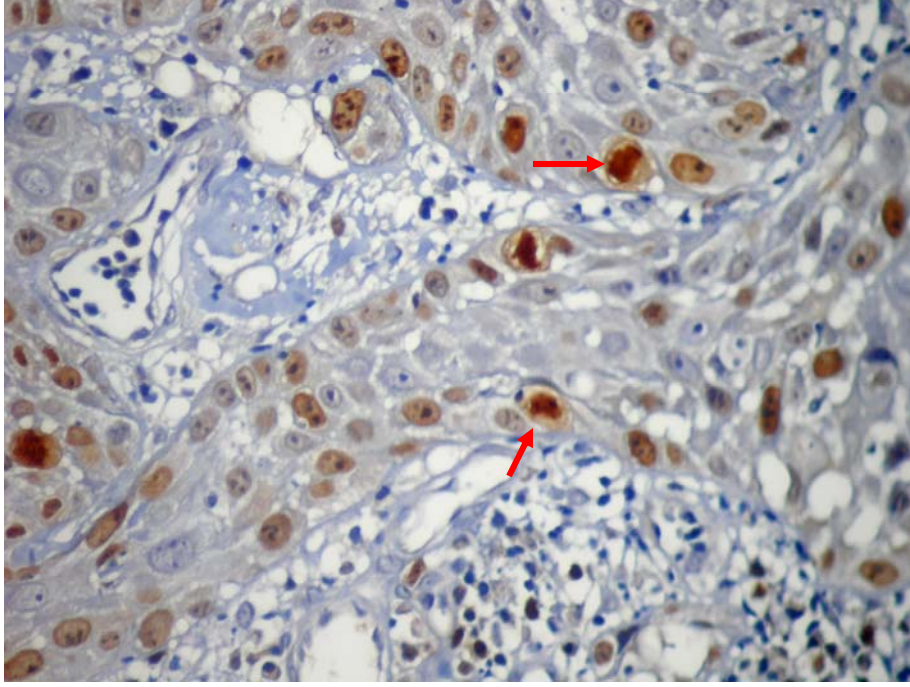
Resim 4.8. Ağır derecede displazi gösteren epitelde MCM-2 ile %20 pozitiflik (MCM-2 x 400)



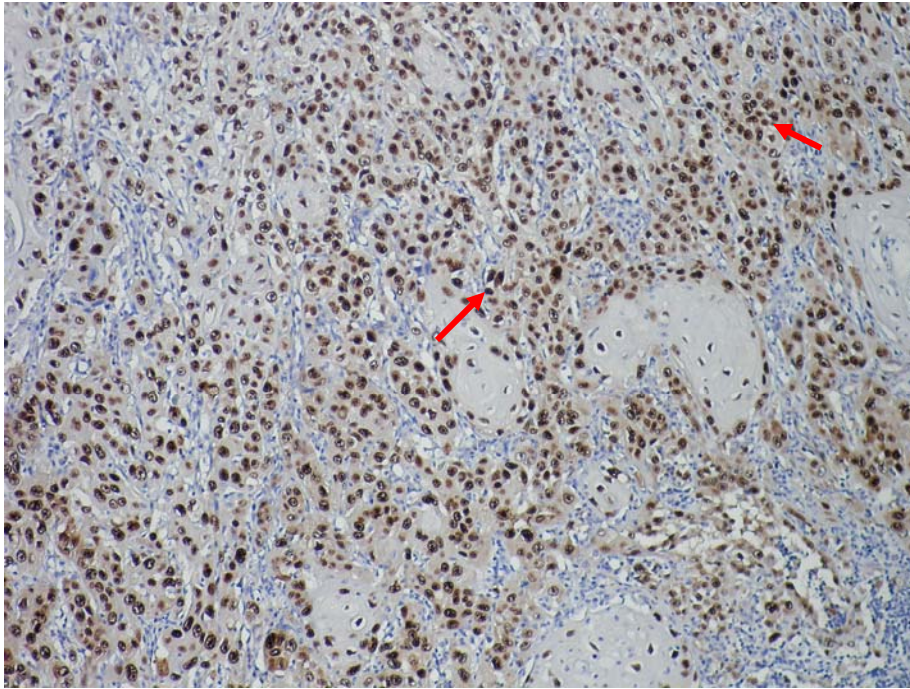
Resim 4.9. Ağır derecede displazi gösteren epitelde p53 ile %20 pozitiflik (p53 x 100)



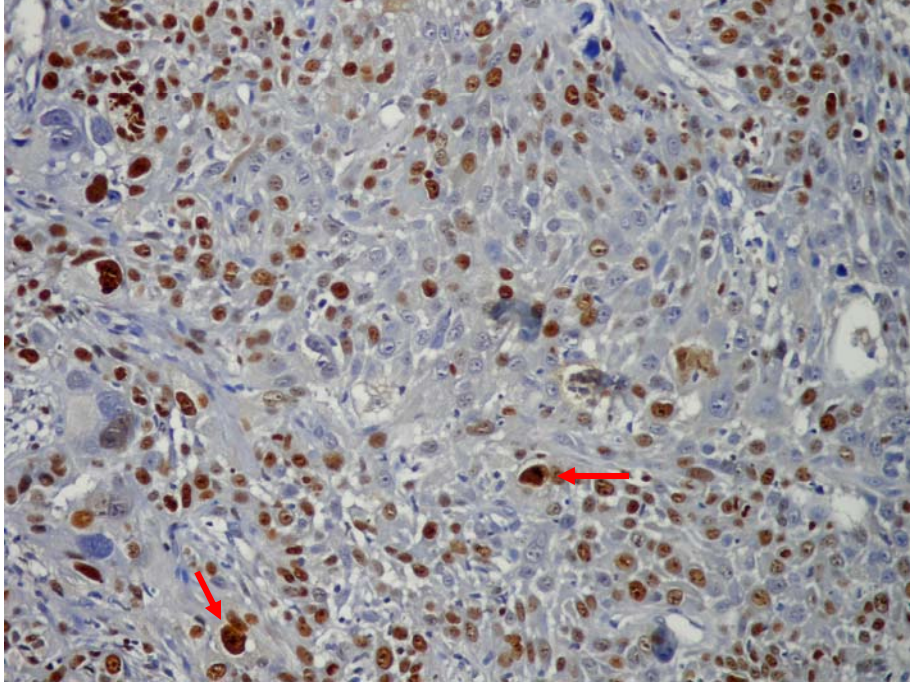
Resim 4.10. Grade-1 Skuamöz hücreli karsinomda Ki-67 ile %65 pozitiflik (Ki-67 x 100)



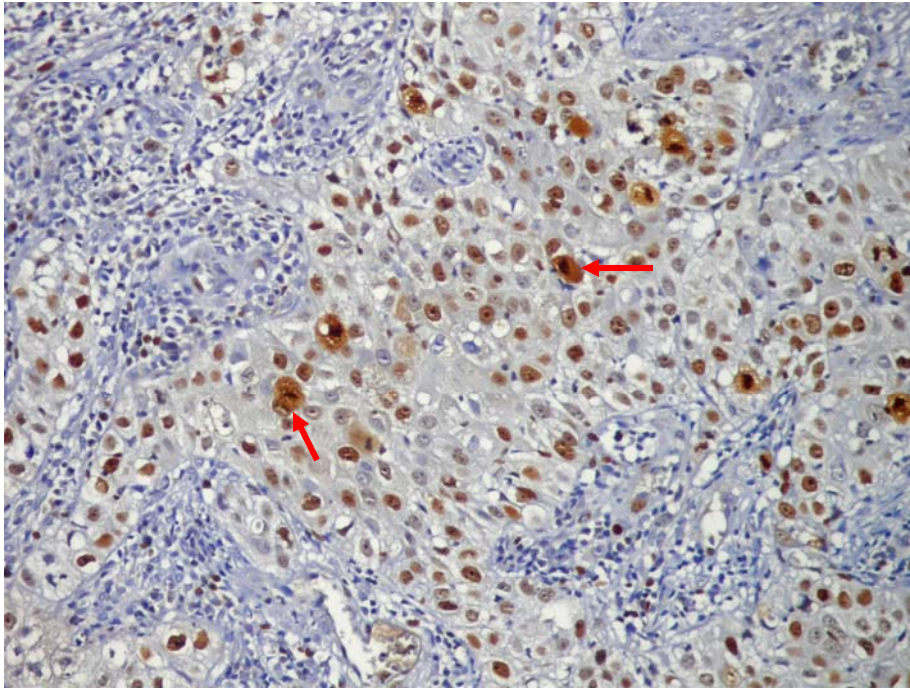
Resim 4.11. Grade-1 Skuamöz hücreli karsinomda MCM-2 ile %40 pozitiflik (MCM-2 x 400)



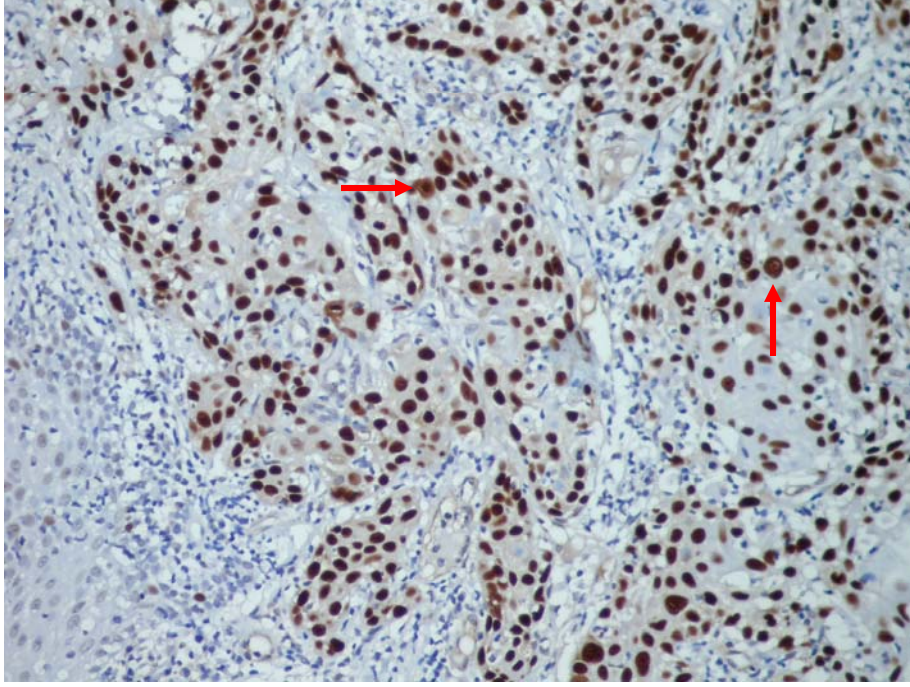
Resim 4.12. Grade-1 Skuamöz hücreli karsinomda p53 ile %95 pozitiflik (p53 x 200)



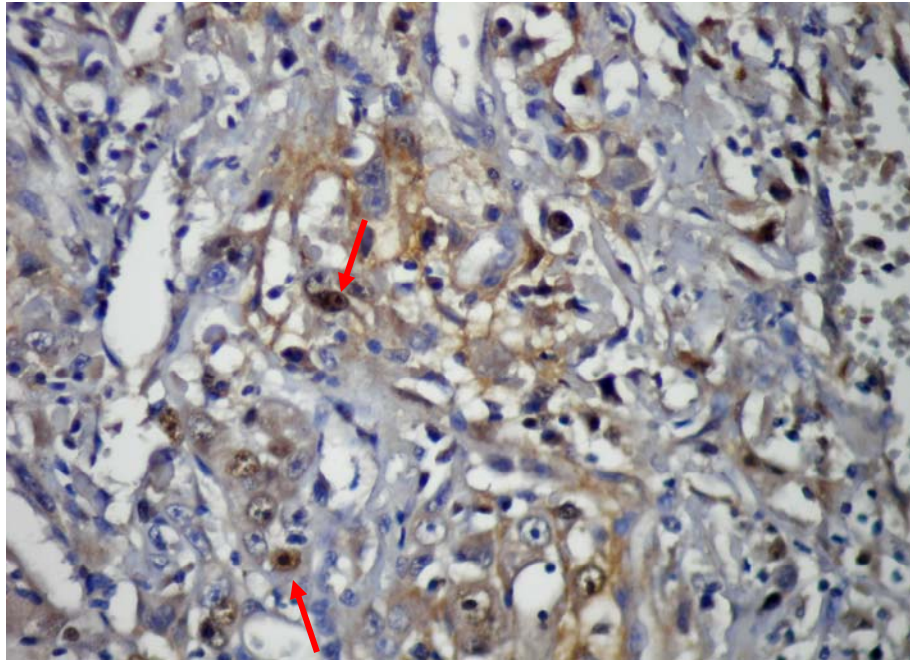
Resim 4.13. Grade-2 Skuamöz hücreli karsinomda Ki-67 ile %76 pozitiflik (Ki-67 x 200)



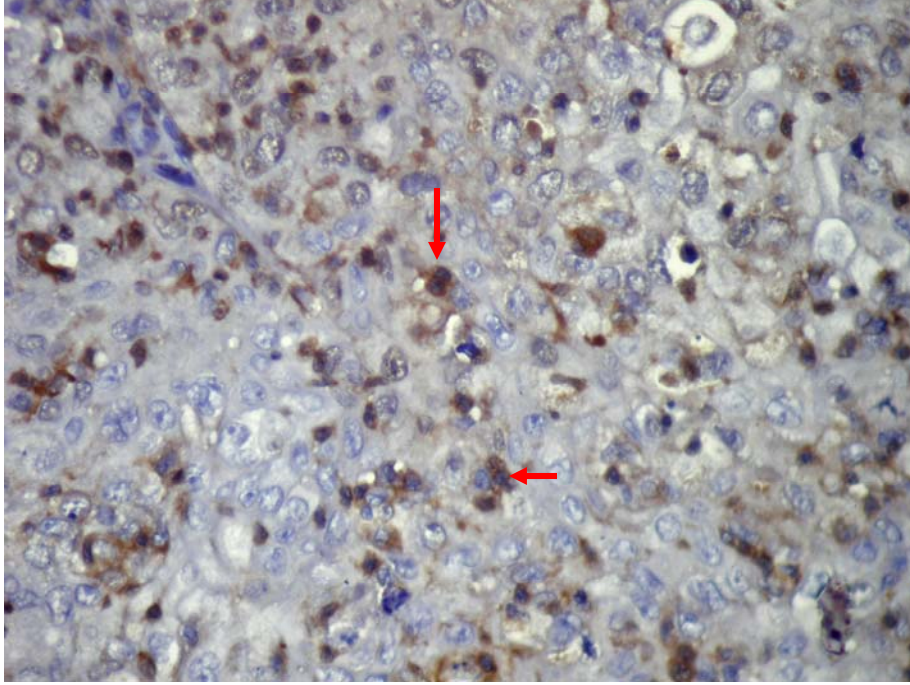
Resim 4.14. Grade-2 Skuamöz hücreli karsinomda MCM-2 ile %60 pozitiflik (MCM-2 x 200)



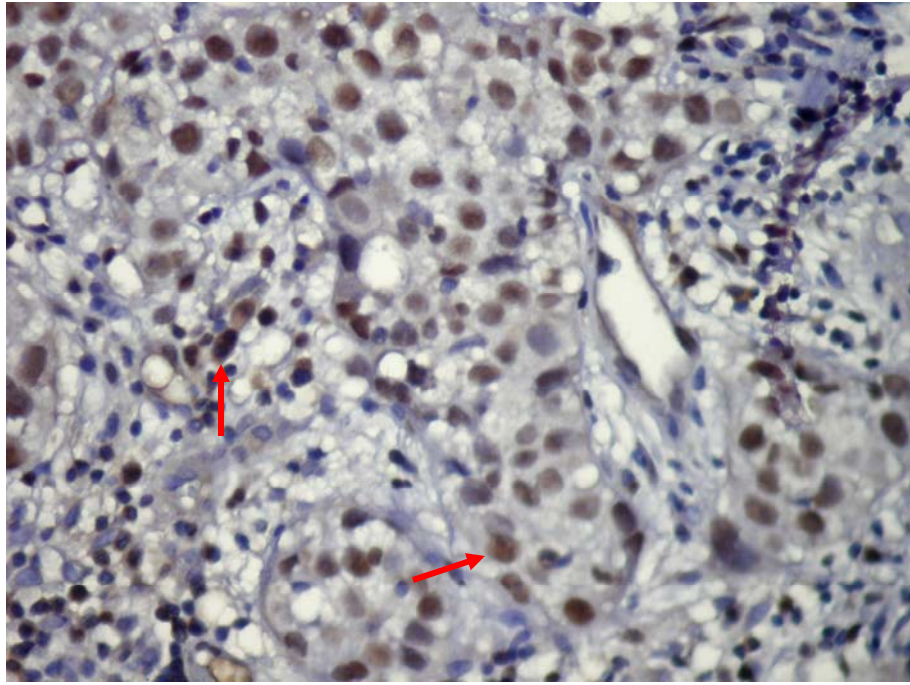
Resim 4.15. Grade-2 Skuamöz hücreli karsinomda p53 ile %95 pozitiflik (p53 x 100)



Resim 4.16. Grade-3 Skuamöz hücreli karsinomda Ki-67 ile %10 pozitiflik (Ki-67 x 400)



Resim 4.17. Grade-3 Skuamöz hücreli karsinomda MCM-2 ile %10 pozitiflik (MCM-2 x 400)



Resim 4.18. Grade-3 Skuamöz hücreli karsinomda p53 ile %25 pozitiflik (p53 x 400)

5. TARTIŞMA

Oral kanserler, özellikle gelişmekte olan ülkelerde toplumun sigara, tütün çiğneme ve alkol gibi alışkanlıklarının artması ve oral kavitenin bu kanserojen maddelere fazla maruz kalmasıyla, baş-boyun kanserleri içerisinde en sık karşılaşılan malign lezyonlar arasında yer almaktadır¹²⁹. Skuamöz hücreli karsinom ise, oral kavitede en sık görülen malign tümör tipi olup⁹, tüm dünyada halk sağlığı için önemli bir tehlike olarak görülmektedir¹³⁰.

Kanserin oluşmasının temelinde, hücre siklusunda herhangi bir nedenle meydana gelen çeşitli düzensizlikler rol oynamaktadır. Kanserojen maddelerin hücre siklusundaki kontrol mekanizmalarında görevli proteinleri etkilemesi sonucunda, genetik yapıda değişimlere neden olmaktadır. Kontrol mekanizmasındaki bu değişimler, yavru hücrelere hasarlı bilgilerin aktarılmasına ve hasarlı hücrelerin kontrol dışı çoğalmasına yol açmaktadır. Normalden çok fazla hücre bölünmesi ve buna bağlı olarak hücrelerin proliferasyonlarının artarak devam etmesi, displazilerin ve malign lezyonların en önemli ortak özelliklerinden biridir. Bu anormal hücre bölünmelerini, tümöral yapıların oluşması izlemektedir. Bu nedenle hücrelerin en doğru şekilde bölünmesi ve DNA replikasyonunun hatasız düzenlenmesini sağlayan birbirine bağlı mekanizmaların işleyişi çok önemlidir. Hücre siklusunun düzenlenmesi oldukça karmaşık bir olay olup, DNA replikasyonunun başlatılması ve sürdürülmesinde birçok gen ve protein rol oynamaktadır⁹⁶. Ki-67¹³¹, PCNA⁷², MCM¹³² ve p53²⁵, bu hücresel mekanizmalar içerisinde yer alan, genetik yapıların yavru hücrelere geçişinde önemli görevleri olan, prognostik önemleri birçok çalışmada gösterilmiş, proliferasyon gösteren tümör markerlarıdır.

Tümör markerları, tümör hücrelerinin içerisinde, ilgili tümöral hücreler veya doku tarafından suprafizyolojik düzeylerde üretilen ve vücut sıvıları içerisine salgılanan, biyokimyasal veya immunohistokimyasal yöntemlerle hastanın doku, kan veya diğer vücut sıvılarında non-invazif kantitatif ölçümlerle tespit edilebilen; hormon, enzim, metabolit, immunoglobulin veya protein yapısında maddelerdir¹³³. Hücrelerin malign transformasyonu sonucu, tümör markerlarının konsantrasyonlarında gözlenen artış, malign hastalıkların teşhisinde yardımcı olmaktadır¹³³. Ancak, bazı iltihabi reaksiyonlar ve benign transformasyonlar gibi diğer proliferatif olaylarda, tümör marker seviyelerinde bir artışa neden olabildiği bilinmektedir¹³³. İdeal bir tümör markerı yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip, olabildiğince erken dönemde tümörün tanınmasına ve tedavisinin yapılabilmesine olanak sağlayacak bilgiyi verebilmelidir⁶⁶. Baş-boyun ve oral kanserlerin prognozlarının değerlendirilmesinde kullanılan proliferatif markerların klinik önemleri hala tartışma konusudur. Bu proliferasyon markerlarının ekspresyonunun, bazı kanserlerin prognozunda yararlı bilgiler verdiği bildirilirken, elde edilen bu bilginin klinik önemi hala tartışmalıdır⁷⁷. Klasik proliferasyon markerlarının hücre siklusu hakkında verdiği bilgilerin sınırlı olmasından dolayı, hücre biyolojisinin anlaşılabilmesi çabaları çalışmaları, malign ve displazik hücrelerin, normal benzerlerinden ayrılabilmelerini sağlayan biyomarkerların geliştirilmesine yöneltmiştir. MCM proteinleri gibi yeni proliferasyon markerlarını kullanarak, oral mukoza hücre proliferasyonu hakkında bilgi sahibi olabilmek için yeterli veriler henüz bulunmamaktadır.

Bu çalışma, oral displazik lezyonlarda ve skuamöz hücreli karsinomlarda, Ki-67, MCM-2 ve p53 proliferasyon markerlarını kullanarak, her markerın doku örnekleri üzerindeki ekspresyonlarının değerlendirildiği ve birbirlerinin etkinliğinin karşılaştırıldığı, prognostik önemlerinin araştırıldığı literatürdeki ilk çalışma olma özelliğine sahiptir.

Cüre ve ark. (2007), benign bir hastalık olan akut pankreatit vakalarında, bazı tümör markerlarının yalancı pozitive gösterdiğini ve kontrol grubuna kıyasla, hasta gruplarında marker ekspresyonlarının anlamlı derecede yüksek bulunduğunu rapor etmiştir. Bu nedenle, tümör markerlarının teşhis amaçlı kullanımından çok, hastalıkların izlenmesi ve prognozu hakkında bilgi edinilmesinde kullanılmasının daha doğru olacağını önermektedir¹³⁴. Bizim çalışmamızda da, doku örnekleri üzerinde ekspresyonları ölçülen proliferasyon markerlarının teşhise yönelik değerlerinden çok, prognostik özelliklerine yönelik sonuçları belirlendi.

Oral kanserlerde prognoz ile yaş arasında bir korelasyon olduğuna dair bilgiler tartışma konusudur. Bazı araştırmacılar böyle bir korelasyonun bulunmadığını ileri sürerken^{135,136}, bazıları ise yaşlı hastalarda prognozun daha kötü olduğunu bildirmektedirler^{21,22}. Mevcut çalışmalarda, erkek ve kadınlar arasında prognostik bir farklılık görülmemiştir^{20,135}. Ancak medikal tedavinin geciktirilmesi ve tedaviyi kabullenmeme gibi sebeplerden dolayı kadınlarda daha fazla ölüm ile karşılaşıldığı da bildirilmektedir²¹. Çalışmamızda, hastaların yaşları ile hem displazik, hem de OSHK doku örneklerinde incelediğimiz üç markerın ekspresyonları arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmedi. Ayrıca cinsiyete göre doku örneklerindeki marker ekspresyonları arasında da bir ilişki kaydedilmedi. Ancak, hastaların yaş ve cinsiyet dağılımlarında daha homojen bir grup oluşturularak yapılacak bir çalışmanın, prognostik önemi açısından daha anlamlı olacağına düşünmekteyiz.

Vasküler ve lenfatik ağlar anatomik bölgeler arasında değişiklik gösterdiğinden, bu yapıların dağılımındaki farklılık tümör gelişimini ve hastalığın sonucunu etkileyebilmektedir. OSHK'nın ağız tabanında metastaz gösterme olasılığının, dile göre daha yüksek olduğu¹³⁷, dudak

ile dil karsinomları karşılaştırıldığında dil karsinomlu hastalarda daha yüksek mortalite oranı izlendiği bildirilmektedir²¹. Üst çenede gingivolabial sulkus gibi bazı anatomik bölgelerin zengin lenfatik drenajının olması ve hastalığın lokal olarak yayılmasının kontrolünün zor olması, hastalık sonucunu kötü yönde etkilemektedir¹³⁸. Çalışmamızda lenfatik drenajın ve vaskülarizasyonun zengin olduğu anatomik bölge olarak yalnız bukkal mukozaya dahil edildi. Ancak maksilla, mandibula ve bukkal mukozada lokalize kanser dokusunda marker ekspresyonları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p < 0.05$). Hasta seçiminde göz önünde bulundurulmuş kriterlerin hepsinin yer aldığı homojen bir grubun oluşturulması çok zor olduğundan, daha geniş popülasyonlarda yaş, cinsiyet ve lokalizasyon bilgilerinin daha eşit dağılım gösterdiği çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Displazilerin prekanseröz lezyonlar olarak adlandırılabilmesi ancak histolojik tanı ile mümkün olmaktadır. Bu lezyonların, normal epitel dokularına kıyasla, invazif skuamöz hücreli karsinoma dönüşme olasılığı daha yüksektir^{139,140}. Farklı anatomik bölgelerin premalign lezyonları, displazi derecesi ile paralellik gösteren hücre proliferasyonunda bir artış ile karakterizedir. Genel olarak, artmış proliferasyonun, daha çok ilerlemiş lezyonlarla ilişkili olduğu ve proliferatif hücrelerin dağıldığı doku örneklerinde, çok basamaklı bir olay olan karsinogenez sırasında hangi düzenleyici mekanizmanın fonksiyonunu yerine getiremediği hakkında bilgi verdiği kabul edilmektedir⁷². Hafif hiperkeratotik lezyonlardan ağır dereceli displaziye kadar değişen lezyonların birbirlerinden ayırt edilmesi; tedavi planlaması ve prognozlarının değerlendirilmesi çok önemlidir. Çünkü her bir lezyon kendi içerisinde farklılık göstermektedir. Hafif ve orta dereceli epitelyal displazilerin ayırımında kullanılan morfolojik özellikler dışında etkili bir yöntem geliştirilememiştir. Displazik lezyonların teşhisinde, subjektif histolojik kriterler kullanılmaktadır. Objektif kriterlerin bulunmaması, bu

lezyonların teşhisinde patoloğlar arasında farklı yorumlara yol açmaktadır¹⁴¹.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, proliferasyon markerları ile oral kanserlerde ve prekanseröz lezyonlarda olumlu sonuçlar elde edilmektedir¹⁴²⁻¹⁴⁴. Genetik değişikliklerin premalign ve malign lezyonlar üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, Ki-67, MIB-1, PCNA gibi proliferasyon markerları yaygın olarak kullanılmıştır⁷⁴⁻⁷⁶. Normal ağız mukozasından hafif, orta ve ağır displazilerin diferansiyasyonlarının belirlenmesinde ve tedavi etkinliğinin gösterilmesinde MIB-1 gibi proliferasyon markerlarının önemli sonuçlar verdiği rapor edilmiştir⁷².

Prekanseröz lezyonlardan karsinomların gelişebildiği genel olarak kabul edilmektedir¹⁴⁵. Acay ve ark.'nın (2005) OSHK'ya malign transformasyon gösteren liken planus ve likenoid lezyonların, malignite potansiyellerini değerlendirdikleri çalışmasında, Ki-67 ekspresyonunun bu iki prekanseröz lezyon arasında anlamlı bir fark göstermediğini ancak, p53 markerının liken planusta yüksek değerlerde ekspresyon gösterdiğini ve artmış ekspresyonun olası inflamasyon nedeni olabileceğini rapor etmişlerdir¹⁴⁵.

Bazı araştırmacılar, doku örneklerindeki yüksek proliferatif indekslerinin, zayıf prognoz ile ilişkili olduğunu belirtirken^{146,147}, diğer büyük bir çoğunluğu, proliferatif markerların prognostik önemlerinin bulunmadığını ifade etmektedir¹⁴⁸⁻¹⁵². Bu da 10 yıllık bir sürede mevcut premalign lezyonlardan oral kanser gelişme olasılığı yaklaşık %10 ile %20 arasında değiştiğinin gösterilmesiyle açıklanmaktadır. Normal oral mukoza ile displazilerin ve skuamöz hücreli karsinomların karşılaştırıldığı çalışmaların sonuçları tartışmalıdır¹⁵³⁻¹⁵⁶. Bununla birlikte genel olarak proliferasyon marker ekspresyonları ile tümör gelişimi arasında pozitif yönde bir korelasyonun olduğu

bildirilmektedir³⁷. Histolojik olarak az differansiyasyon gösteren tümörler ile zayıf prognoz arasında önemli korelasyonlar tespit edilirken²⁰, bazı çalışmalarda böyle bir ilişkinin bulunmadığı ileri sürülmektedir^{21,135,136}.

Bu çalışmada, displazik doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 ve p53 proliferasyon marker ekspresyonlarının, sağlıklı ağız mukozası doku örneklerine göre anlamlı derecede yüksek bulunması, displazik lezyonların malign transformasyon gösterme olasılıklarının, normal dokulara kıyasla çok daha fazla olduğunu düşündürmektedir. Bu sonuçlara dayanarak, displazik lezyonların prekanseröz lezyon olarak tanımlanmalarını desteklemekteyiz.

Çalışmamızda, hafif ve orta displazi doku örneklerindeki MCM-2 ve p53 ekspresyonları arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken, hafif dereceli displazik doku örneklerindeki Ki-67 ekspresyonu, orta dereceden düşük bulunmuştur. Displazik lezyonların farklı derecelerinin belirlenmesinde Ki-67 proliferasyon markerinin MCM-2 ve p53 markerlarına göre daha güvenle kullanılabilceğini düşünmekteyiz.

Ki-67'ye pozitif cevap veren hücrelerin fraksiyonu, tümöral yapının büyüme potansiyelini, dolayısıyla proliferatif aktivitesini yansıttığından oldukça ilgi çekmiştir¹⁵⁷. Baş ve boyun tümörleri de dahil birçok tümör tipinde, yüksek Ki-67 ekspresyonu, prognozun zayıflığını göstermektedir¹⁵⁸⁻¹⁶⁰.

Macluskey ve ark. (1999), oral mukozada epitelyal proliferasyon ile lezyon gelişimi arasındaki olası ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında; displazik ve OHSK'lı dokulardaki Ki-67 proliferasyon indeksinin, normal oral mukozaya oranla anlamlı derecede yüksek olduğunu, displazik ve skuamöz hücreli karsinomlu dokular arasında ise, anlamlı bir farkın bulunmadığını bildirmişlerdir. Ki-67 ekspresyonunun oral mukozadaki

lezyonların oluşmasının ve/veya gelişmesinin erken tanımlanmasında etkili bir marker olduğunu ancak, neoplazik transformasyon hakkında tek başına iyi bir indikatör olmadığını ileri sürmüşlerdir⁷⁹.

Ökaryotik hücrelerde DNA replikasyonu için gerekli olan, prereplikasyon kompleksinin oluşmasında rol oynayan MCM proteinleri, hücre siklusunun hassas ve spesifik proliferasyon markerları olup, kanser teşhisinin geliştirilmesinde kullanılmaktadır¹⁶¹. Bu proteinlerin ekspresyonlarındaki düzensizliğin belirlenmesi, displazik veya malign bir durumu ifade ettiği birçok çalışmada bildirilmektedir^{91,162}. Proliferatif etkinliklerin karşılaştırıldığı çalışmalarda, MCM ekspresyonunun Ki-67 gibi diğer klasik proliferasyon markerlarından daha yüksek seviyede olduğu da bildirilmektedir^{100,163}. Bu nedenle premalign ve malign lezyonların tanımlanmasında, MCM-2 markerının güvenle kullanılabileceği de ileri sürülmektedir^{34,91,163-165}.

Chatrath ve ark. (2003), normal, displazik ve skuamöz hücreli karsinomlu larinks doku örneklerinde, MCM-2 ve Ki-67 markerlarının ekspresyonlarını inceledikleri çalışmalarında; her iki marker arasında korelasyon olduğunu, normal epitelden karsinoma doğru hastalık seyrinin artması ile, iki markerın ekspresyonlarının da artışlar gösterdiğini ancak, MCM-2 ekspresyonunun daha fazla sayıda hücrede belirlendiğini rapor etmişlerdir. Larinksdeki hücre siklusunun belirlenmesinde, MCM-2'nin, Ki-67 markerına göre daha üstün olduğu sonucuna varmışlardır⁹⁹.

Yang ve ark. (2006), küçük hücreli dışı akciğer kanserinde, MCM-2'nin prognozda önemli bir rol oynayabileceğini ancak, Ki-67'nin belirgin bir prognostik değerinin görülemediğini⁹⁶, Dudderidge ve ark. (2005), böbrek hücresi karsinomunda, tümörün patolojik evresi ile birlikte, MCM-2 ekspresyonunun da yükseldiğini⁹⁷, Hashimoto ve ark. (2004) ise,

akciğer adenokarsinomlarında yüksek seviyelerde bulunan MCM-2 ve Ki-67 ekspresyonları ile hayatta kalma arasında daha zayıf bir ilişkinin olduğunu rapor etmişlerdir⁹⁸.

Scott ve ark. (2006), displazik ve OSHK'lı doku örneklerinde, Ki-67 ve MCM-2 markerlarının prognostik önemlerini araştırdıkları çalışmalarında, normal mukozadan SHK'ya doğru artan malignite ile birlikte her iki markerın da ekspresyonlarında artış olduğunu ancak, MCM-2 ekspresyonlarının sitolojik tanıda daha hassas sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir¹⁰⁰.

Bu çalışmada her iki markerdan elde ettiğimiz ekspresyon sonuçları Scott ve ark.'nın çalışmaları ile uyumlu olarak, OSHK grubunun MCM-2 ekspresyonları ($30,8 \pm 15,64$), kontrol ($4,2 \pm 1,32$) ve displazi ($12,2 \pm 7,61$) gruplarıyla karşılaştırıldığında, daha yüksek bulunmuştur. Ancak çalışmamızda, kontrol ve displazi grupları karşılaştırıldığında, MCM-2 ekspresyonları arasında bir fark bulunmamıştır. Bu farklılığın, OSHK'daki anormal hücre bölünmesi ile karakterize olan proliferatif aktivitenin ve normal mukoza ile erken displazik lezyonların histopatolojik değerlendirmelerinin subjektif olması ve birbirleri arasında proliferatif reaksiyon farklılığının fazla olmamasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Tümörün gelişmesi sadece hücrenin proliferatif aktivitesine değil, aynı zamanda apoptoza da bağlıdır¹²⁶. Fizyolojik olarak tümöral dokulardaki doku büyümesi, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü oranı arasındaki dengenin bozulması ile karakterizedir^{166,167}. Apoptoz sadece fetal gelişim sırasındaki morfogenez ve doku homeostazının sürdürülmesinde değil, aynı zamanda bazı dokulardaki neoplazik transformasyonda da çok önemlidir^{168,169}. Hasara uğrayan hücrelerin genomlarında apoptozun başlaması, p53 fosfoproteininin fonksiyonuna

bağlıdır. Bu protein, oluşan genomik hasarın tamirinin tamamlanmasına kadar hücre siklusunu geç G₁ fazında durdurur veya tamirin gerçekleşmemesi durumunda hücrede apoptozun başlatılmasından sorumludur. Böylece, genomik hasar yavru hücrelere iletilmeden ortadan kaldırılmaktadır¹⁷⁰. Bu sebeple p53' e "kalıtımın koruyucusu" adı da verilmektedir¹⁷¹. Apoptozun oluşmasını sağlayan ve tetikleyen genlerin ekspresyonlarındaki azalmanın, prognozun zayıflığı ile ilişkili olduğu immunohistokimyasal yöntemlerde gösterilmiştir^{172,173}.

Oral kavite ve orofarenks kanserlerinde Ki-67 (MIB-1), p53 ve PCNA markerlarının prognostik önemleri karşılaştırıldığında, her üç markerın da prognostik değerinin bulunmadığı¹⁷⁴, Ki-67, p53, bcl-2 ve apoptotik indeksin prognoz tahmininde güvenle kullanılamayacağı ancak, iyi ve kötü diferansiye tümörlerde Ki-67'nin diğer markerlara kıyasla, daha yüksek ekspresyon gösterdiği bildirilmektedir¹²⁷. Bununla birlikte Ki-67'nin yoğun ekspresyonunun zayıf prognoz ile ilişkisi olduğu ancak, apoptotik ve proliferatif markerların kombinasyonunun, markerların yalnız başlarına sağladığı bilgilere kıyasla daha kuvvetli prognostik bilgi sağladığı rapor edilmektedir¹²⁶. Yüksek apoptotik aktivitenin belirlendiği tümörlerin prognozlarının daha iyi olduğu ve bu tümörlerin daha yavaş büyüdüğü anlamına geldiği¹²⁴, az diferansiye tümörlerde ise, apoptoz görülen hücrelerde azalma belirlenirken, apoptozdaki bu düşüş ile proliferatif aktivite arasında kuvvetli ilişki olduğu da bildirilmektedir¹²⁵.

Ananthanarayanan ve ark. (2006), prostat kanseri ile ilişkili normal ve premalign doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 proliferatif ve a-casp3, bcl-2 apoptotik markerların değişimlerini inceledikleri çalışmalarında, bu markerların sadece prekanseröz lezyonlarda değil, kanser ile ilişkili normal görünümlü epitelde de değişim gösterdiğini rapor etmişlerdir. Yüksek riskli normal epitelin belirlenmesinde özellikle

MCM-2 ekspresyonunun önemli sonuçlar gösterdiği, apoptotik markerların ise, şüpheli dokuların proliferasyon düzeyi hakkında bilgi verebileceği belirtilmiştir⁷⁷.

Bu çalışmada elde ettiğimiz veriler, önceki çalışma sonuçları ile uyumludur. Ki-67, MCM-2 ve p53 markerlarının ekspresyonları normal mukoza ile displazik ve SHK doku örneklerinde karşılaştırılmış ve proliferasyonun sadece displazik ve karsinomlu dokularda değil, normal mukozada da (sırasıyla; $6,3 \pm 3,71$, $4,2 \pm 1,32$, $4 \pm 1,15$) değişim gösterdiği bulunmuştur. Normal mukoza doku örneklerinin, profilaktik çekimleri yapılan, asemptomatik yirmi yaş dişleri etrafındaki sağlıklı dokudan alınmış olmasının, markerların proliferasyon değerlerini az da olsa arttırmış olabileceğini düşünmekteyiz. Çünkü daha önce yapılan çalışmada, klinik ve radyografik olarak asemptomatik gömülü üçüncü molar dişlerin dental foliküllerinde patoloji gelişebileceği, metaplazik potansiyelinin bulunduğu ve proliferatif aktivitesinin sağlıklı dişetinden anlamlı derecede yüksek bulunabileceği ve tümöral dokuların gelişebileceği bildirilmiştir¹⁷⁵.

Piattelli ve ark. (2002), oral kavitenin normal epiteli ile, premalign ve malign lezyonlarında, p53, Ki-67, bcl-2 immunoreaktivite ve apoptoz prevalansını inceledikleri çalışmalarında, normal p53 aktivitesinin kaybolması ile birçok prekanseröz lezyonun kanserlere dönüşmesi arasında korelasyon bulmuşlardır. Ki-67 ekspresyonunun, yüksek tümör evresi (grade) ile güçlü korelasyonu olduğunu, bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun, programlanmış hücre ölümünü işaret ettiğini, bunun da karsinogenezde apoptozun prognostik önemini daha da arttırdığını rapor etmişlerdir⁸⁰.

De Aguiar Júnior ve ark. (2006), OSHK hastalarında oluşan erken lokalize nükslerle, Ki-67, p53, bcl-2, FAS, Erb-B2, β -catenin ve E-

cadherin gibi immunohistokimyasal markerların ilişkisi ve olası klinikopatolojik parametreleri tanımladıkları çalışmalarında, nüks eden ve etmeyen tümörlerin p53 ekspresyonları arasında anlamlı bir farkın olmadığı, iyi diferansiye tümörlerde, Ki-67 ekspresyonlarının düşük bulunduğu, bu bulgulara dayanarak daha önce yapılan tedavilerin yetersiz olduğu sonucuna varmışlardır. Yüksek proliferasyon indeksli diğer birçok malign hastalıkta olduğu gibi, OSHK hastalarının, radyoterapiye daha iyi cevap verdiği belirtilmiştir¹⁷⁶.

Hafian ve ark. (2004), premalign oral lezyonları ve OSHK doku örneklerinde, topo-I, topo-II, Ki-67 ve p53'ün proliferatif potansiyellerini araştırdıkları çalışmalarında, proliferasyon markerları ile displazik lezyonların dereceleri arasındaki ilişkinin çelişkili sonuç verdiğini, Ki-67'nin farklı doku örneklerinin malignitesi yükseldikçe kademeli olarak arttığını bildirmektedirler. Ki-67'nin proliferasyon markerı olarak kullanılabileceğini belirtirlerken, apoptotik aktivite hakkında bilgi veren p53 için benzer bir sonuç verememektedirler³¹.

Çalışmamızda kullanılan p53 markerının displazik doku örneklerindeki ekspresyonunun (12,1±10,79) düşük ancak, OSHK doku örneklerinde (38,8±24,67) anlamlı bir artış gösterdiği bulundu. Ancak, hafif (9,87±9,51) ve orta (10,75±7,92) dereceli displazilerdeki ekspresyonu karşılaştırıldığında, anlamlı bir farkın bulunmaması, hafif ve orta displazi tanımlamalarının yapılırken kesin ayırıcı tanı kriterlerinin bulunmayışı olarak düşünülebilir.

Çalışmamızda, OSHK doku örneklerinin diferansiyasyon derecelerine göre Ki-67 ve MCM-2 ekspresyon ortalamaları arasında bir fark gözlenmedi ($p>0.05$). Ancak, p53 ekspresyonu özellikle orta diferansiye OSHK'da (53±25,99), iyi diferansiye OSHK'ya (33,17±20,98) göre yüksek bulundu. p53 ekspresyonunun orta diferansiyasyonlu doku

örneklerinde yüksek değerlerde olması; apoptotik aktivitenin gerçekleşeceği doku alanlarında, dokuya spesifik hücrelerin malign transformasyona uğramaması için, p53 fosfoproteinini aktive ederek hücre ölümünü başlatması ve böylece dokunun kimliğini oluşturan spesifik hücrelerin diğer hücre gruplarına diferansiyasyonunun zorlaşmasıyla açıklanabilir. Ayrıca, karsinomlu doku örneklerindeki marker ekspresyonlarının, diğer doku örneklerine kıyasla daha yoğun olarak izlenmesi, genomik bilgilerin yavru hücrelere hasarlı iletilmesi ve kontrol edilemeyen doku oluşumları neticesinde, hastaların hayatta kalma şanslarının malignite derecesi ile negatif korelasyon gösterdiği sonucuna varmaktayız.

Bu çalışmada, yeni bir proliferasyon markerı olan MCM-2'nin ekspresyon değerlerinin, Ki-67 ve p53 gibi sıklıkla kullanılan klasik markerların ekspresyonlarından anlamlı bir farklılık göstermediği bulundu. Ayrıca, tümör diferansiyasyon derecesi ile birlikte her üç markerın ekspresyonlarında artış görülmüş ancak, anlamlı farklılık p53 marker değerlerinde belirlenmiştir. Apoptotik markerlardan biri olan p53'ün değerlerindeki anlamlı artışın, hücrelerdeki apoptotik aktivitenin artarak devam ettiği ve malign transformasyonun gerçekleşmemesi için p53 proteininin, birçok hücrede siklusu durdurma eğiliminde olduğunun işareti olarak düşünmekteyiz.

Lezyonların farklı displazi derecelerinin histolojik tanılarını en doğru şekilde koymak, displazik lezyonları daha güvenilir bir şekilde ayırdedebilmek, displazik lezyonların invazif malign hastalıklara olası ilerlemelerini veya bu displazik durumun regresyon göstermesini (gerileme) veya konservatif tedaviye cevap vermesini sağlamak gibi kriterlerin geliştirilmesi çok önemlidir⁹⁹.

Genellikle hafif dereceli displazilerden ağır dereceli displazilere ve daha da ilerleyerek invazif malignitelere doğru bir gelişim söz konusudur. Oral kavitedeki displazik ve erken malign lezyonların spesifik olmayan klinik görünüşleri, oral kanserlerin mortalite ve morbidite insidanslarındaki yüksek oranlar, bu tip lezyonların erken tanılarının konulabilmesi amacı ile daha etkili, uygun ve güvenilir bir yöntemin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Malign transformasyonda, “erken teşhis” anahtar rolü oynamaktadır ve erken teşhiste yeralan en önemli kriterlerden biri de prognostik faktörlerdir. Bu amaçla, prekanseröz ve kanseröz lezyonların dahil edildiği ve hasta sayısının arttırıldığı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Ayrıca, spesifitesi ve sensitivitesi yüksek yeni markerların kullanılmasının, prekanseröz ve kanseröz tüm lezyonlar hakkında daha fazla bilginin elde edilmesiyle, prognostik verilerin daha fazla önem kazanması, terapötik başarının artması ve morbidite ile mortalite oranlarının da hızla düşmesi gibi önemli klinik başarıları beraberinde getireceğine inanmaktayız.

6. SONUÇLAR

- Çalışmaya dahil edilen hastaların yaşları ve cinsiyetleri ile displazi ve OSHK doku örneklerindeki Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.
- Maksilla ve mandibulada lokalizasyon gösteren displazik doku örneklerinde Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.
- Maksilla, mandibula ve bukkal mukozada izlenen OSHK'lerdeki Ki-67 ve MCM-2 ekspresyonları ile lokalizasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Ancak, p53 ekspresyonu ile tümörün lokalizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0.05$).
- Kontrol ve displazi grupları karşılaştırıldığında, Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Kontrol, displazi ve OSHK gruplarındaki doku örneklerinin Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu.
- Displazik doku örneklerinde ortalama MCM-2 ile p53 ekspresyonları arasında, istatistiksel olarak pozitif yönde anlamlı bir korelasyon belirlendi.
- Kontrol grubu ile orta dereceli displazik doku örneklerindeki ortalama Ki-67, MCM-2 ve p53 ekspresyonları arasında, istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu. Kontrol grubu doku örneklerindeki MCM-2 ekspresyonu ($4,2 \pm 1,32$), hafif dereceli displazik doku örneklerinin ortalama MCM-2 ekspresyonundan ($11,86 \pm 8,21$), istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0.01$). Hafif

ile orta dereceli displazik doku örneklerindeki her üç marker ekspresyonları arasında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

- Çalışmamızda her üç markerın proliferasyon değerlerinin histopatolojik evre ile pozitif yönde korelasyonu belirlendi. p53'ün iyi diferansiye OSHK doku örneklerindeki ekspresyonu ($33,17\pm 20,98$), orta diferansiye olandan ($53\pm 25,99$) anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0,037$).

Sonuç olarak;

Çalışmamızda kullanılan proliferasyon markerlarının normal oral mukozadan displazilere ve displazik lezyonlardan malign oluşumlara doğru geçişlerde, normal dokulara kıyasla çok daha fazla eksprese olması, dokuların premalign veya malign transformasyonları hakkında bilgi verebildiği ve böylece prognostik önemlerinin bulunduğu sonucuna varıldı.

7. KAYNAKLAR

- 1) Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin*, 51: 15-36, 2001.
- 2) World Health Organization. The World Oral Health Report 2003. World Health Organization, Geneva, pp 6-7, 2003.
- 3) Shibuya K, Mathers CD, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJ. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer*, 2: 37, 2002.
- 4) Milaro M, Ghali GE, Larsen PE, Waite PD. *Oral and Maxillofacial Surgery*. (2nd ed.) Vol:1, BC Decker, Hamilton, pp 617-630, 2004.
- 5) T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı. *Kanserle Savaş Politikası ve Kanser Verileri (1995-1999)*. Bakanlık Yayın No:618, 145, Ankara, 2002.
- 6) T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı. *Türkiye Geneline Kanser Olgularının Dağılımı (2003)*, Ankara, 2004.
- 7) Şengelen M. *Türkiye’de Kanser İstatistikleri*. Hacettepe Üniversitesi Sağl. Bil. Ens., Kanser Epidemiyolojisi Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2002.
- 8) Kılıç S, Kömürcü Ş, Rzayev M, Özet A, Kır T, Arpacı F, Açıklı CH, Öztürk B, Oğur R, Ataerđin S, Kuzhan O, Hasde M. *GATA Tıbbi Onkoloji Bilim Dalında İzlenen Hastaların Bazı Sosyodemografik Özellikleri ve Tanıları*. *Gülhane Tıp Dergisi*, 46(2): 115-124, 2004.
- 9) Regezi JA, Sciubba JJ. *Oral Pathology: Clinical Pathologic Correlations*. (3rd ed.) W.B. Saunders, Philadelphia, pp 69-82, 1999.
- 10) Centers for Disease Control and Prevention. Preventing and controlling oral and pharyngeal cancer. Recommendations from a national strategic planning conference, *MMWR*, 47(RR-14): 1-12, 1998.
- 11) Massano J, Regateiro FS, Januario G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 102: 67-76, 2006.
- 12) Tanyeri H, Ak G. *Kanser Tedavisi Gören Hastalarda Oral Lezyonlar*. (1st ed.) Dişhekimî Kütüphanesi-5, Vestiyer Yayıncılık, pp 7-10, 2006.
- 13) Galitis ON. *Oral lesions in the oncology patients*. Bonnissel Publications, Athens, 2001.

- 14) Khuri FR, Kim ES, Lee JJ, Winn RJ, Benner SE, Lippman SM, Fu KK, Cooper JS, Vokes EE, Chamberlain RM, Williams B, Pajak TF, Goepfert H, Hong WK. The impact of smoking status, disease stage, and index tumor site on second primary tumor incidence and tumor recurrence in the head and neck retinoid chemoprevention trial. *Cancer Epidemiol Biom Prevent*, 10: 823–829, 2001.
- 15) Kerawala CJ. Oral cancer, smoking and alcohol: The patients' perspective. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 37: 374-376, 1999.
- 16) Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer*, 73: 187–190, 1994.
- 17) Leon X, Quer M, Diez S, Orus C, Lopez-Pousa A, Burgues J. Second neoplasm in patients with head and neck cancer. *Head Neck*, 21: 204–210, 1999.
- 18) Kane MA. The role of folates in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Detection and Prevention*, 29: 46–53, 2005.
- 19) Gonzalez MA, Pinder SE, Callagy G, Vowler SL, Morris LS, Bird K, Bell JA, Laskey RA, Coleman N. Minichromosome Maintenance Protein 2 Is a Strong Independent Prognostic Marker in Breast Cancer. *J Clin Oncol*, 21: 4306-4313, 2003.
- 20) Lo WL, Kao SY, Chi LY, Wong YK, Chang RCS. Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *J Oral Maxillofac Surg*, 61: 751-758, 2003.
- 21) Leite ICG, Koifman S. Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncol*, 34: 347-352, 1998.
- 22) Ribeiro KCB, Kowalski LP, Latorre MRDO. Perioperative complications, comorbidities, and survival in oral or oropharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 129: 219-228, 2003.
- 23) Ribeiro KCB, Kowalski LP, Latorre MRDO. Impact of comorbidity, symptoms, and patients' characteristics on the prognosis of oral carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 126: 1079-1085, 2000.
- 24) Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. *Head Neck*, 26: 31-38, 2004.
- 25) Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. *Oral Oncol*, 36: 404-413, 2000.

- 26) Bettendorf O, Piffko J, Bankfalvi A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy?. *Oral Oncol*, 40: 110-119, 2004.
- 27) Greene FL, Page DL, Fleming ID. Head and neck sites. In: *AJCC cancer staging manual*. (6th ed.) Springer-Verlag, New York, pp 17-22, 2002.
- 28) Greene FL, Page DL, Fleming ID. Lip and oral cavity. In: *AJCC cancer staging manual*. (6th ed.) Springer-Verlag, New York, pp 23-32, 2002.
- 29) Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res*, 95: 229-249, 1987.
- 30) Anneroth G, Hansen LS. A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. *Scand J Dent Res*, 92: 448-468, 1984.
- 31) Hafian H, Venteo L, Sukhanova A, Nabiev I, Lefevre B, Pluot M. Immunohistochemical Study of DNA Topoisomerase I, DNA Topoisomerase II, p53, and Ki-67 in Oral Preneoplastic Lesions and Oral Squamous Cell Carcinomas. *Hum Pathol*, 35(6): 745-751, 2004.
- 32) Robbins RS, Cotran and Kumar V. *Robbins Pathological Basis of Disease*. (4th ed.) WB Saunders, Philadelphia, pp 34, 1989.
- 33) Thommes P, Fett R, Schray B, Burkhart R, Barnes M, Kennedy C, Brown NC, Knippers R. Properties of the nuclear P1 protein, a mammalian homologue of the yeast MCM 3 replication protein. *Nucl Acids Res*, 20: 1069-1074, 1992.
- 34) Freeman A, Morris LS, Mills AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH, Coleman N. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res*, 5: 2121-2132, 1999.
- 35) Pindborg JJ, Reichart P, Smith CJ, van der Waal I. *World Health Organization: histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa*. Springer-Verlag, Berlin, 1997.
- 36) Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *WHO classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours*. ARC Press, Lyon, 2005.
- 37) Speight PM, Morgan PR. The natural history and pathology of oral cancer and precancer. *Commun Dent Health*, 10: 31-41, 1993.
- 38) Çöloğlu S. *Oral Patoloji*. Yeditepe Üniversitesi Yayın No:37, İstanbul, pp 164-166, 2007.

- 39) Hellquist HB, Cardesa A, Gale N, Kambic V, Michaels L. Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. A study by members of the Working Group on Epithelial Hyperplastic Laryngeal Lesions of the European Society of Pathology. *Histopathol*, 34: 226-233, 1999.
- 40) Birchall MA, Winterford CM, Allan DJ, Harmon BV. Apoptosis in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of the oropharynx and oral cavity: a preliminary study. *Eur J Cancer Oral Oncol*, 31B(6): 380-383, 1995.
- 41) Funk GF, Karnell LH, Robinson RA, Zhen WK, Trask DK, Hoffman HT. Presentation, treatment and outcome of oral cavity cancer: a national cancer data base report. *Head Neck*, 24: 165-180, 2002.
- 42) de Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, Arranz JSL. Immunoexpression and prognostic significance of TIMP-1 and -2 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 41: 568-579, 2005.
- 43) La Vecchia C, Lucchini F, Negri E, Levi F. Trends in oral cancer mortality in Europe. *Oral Oncol*, 40: 433-439, 2004.
- 44) IARC Working Group. Tobacco smoking. In: International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. IARC Press, Lyon, Vol. 38, 1986.
- 45) Beenken SW, Urist MM. Head and neck tumors. In: Way LW, Doherty GM. Current surgical diagnosis and treatment. (11st ed.) Lange/McGraw-Hill, New York, pp 282-297, 2003.
- 46) Franceschi S, Talamini R, Bara S, Baron AE, Negri E, Brdoli Serraino D, La Vecchia C. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx and esophagus in Northern Italy. *Cancer Res*, 50: 6502-6507, 1990.
- 47) Sugerman PB, Shillitoe EJ. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. *Oral Dis*, 3: 130-147, 1997.
- 48) Goaz PW, White SC. Oral Radiology. Principles and Interpretation. (3rd ed.) Mosby, St. Louis, pp 476-477, 1994.
- 49) Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic Histology. (8th ed.) Appleton&Lange, Rio de Janeiro, pp 54-59, 1995.
- 50) DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer: Principles and Practice of Oncology. (5th ed.) Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 121-134, 1997.
- 51) Murakami MS, Strobel LMC, Vande Woude GF. Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs. In Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, et al, eds: The Molecular Basis of Cancer, W.B. Saunders, Philadelphia, pp 3-17, 1995.

- 52) Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis. Genetic controls of cell death. *Cell*, 74: 777-779, 1993.
- 53) Wyllie AH. Apoptosis. *Br J Cancer*, 67: 205-208, 1993.
- 54) Eissa S. Tumor Markers. Chapman and Hall Medical, London, pp 131-144, 1995.
- 55) Hall PA, Levison DA. Review: Assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol*, 43: 184-192, 1990.
- 56) Akerman M, Brandt L, Johnson A, Olson H. Mitotic activity in non-Hodgkin's lymphoma. Relation to the Kiel classification and to prognosis. *Br J Cancer*, 55: 219-223, 1987.
- 57) Ellison DJ, Nathwani BN, Metter GE, Turner RR, Burke JS, Miller TP, Mann RB, Barcos M, Kjeldsberg CR, Winberg CD. Mitotic counts in follicular lymphomas. *Hum Pathol*, 18:502-505, 1987.
- 58) Silverberg SG. Reproducibility of the mitosis count in the histologic diagnosis of smooth muscle tumours of the uterus. *Hum Pathol*, 7: 451-454, 1976.
- 59) Young GAR, Hedley DW, Rugg CA, Iland HJ. The prognostic significance of proliferative activity in poor histology non-Hodgkin's lymphoma: a flow cytometry study using archival material. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 23: 1497-1504, 1987.
- 60) Joensuu H, Klemi PJ, Korkeila E. Prognostic value of DNA ploidy and proliferative activity in Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol*, 90: 670-673, 1988.
- 61) Rose DSC, Maddox PH, Brown DC. Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *J Clin Pathol*, 47: 1010-1014, 1994.
- 62) Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during cell cycle. *Exp Cell Res*, 166: 209-219, 1986.
- 63) Guler N, Uckan S, Celik I, Oznurlu Y, Uckan D: Expression of Fas and Fas-ligand and analysis of argyrophilic nucleolar organizer regions in squamous cell carcinoma: relationships with tumor stage and grade, and apoptosis. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 34: 900-906, 2005.
- 64) Pession A, Farabegoli F, Trere D, Novello F, Montanaro L, Sperti S, Rambelli F, Derenzini M. The AgNOR proteins transcription and duplication of ribosomal genes in mammalian cell nucleoli. *Chromosoma*, 100: 242-250, 1991.
- 65) Maggino T, Gadducci A. Serum markers as prognostic factors in epithelial ovarian cancer: an overview. *Eur J Gynaecol Oncol*, 21: 64-69, 2000.

- 66) Gadducci A, Cosio S, Carpi A, Nicolini A, Genazzani AR. Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer. *Biomed & Pharmacother*, 58; 24-38, 2004.
- 67) Chrysomali E, Nikitakis NG, Tosios K, Sauk JJ, Papanicolaou SI. Immunohistochemical evaluation of cell proliferation antigen Ki-67 and apoptosis-related proteins Bcl-2 and caspase-3 in oral granular cell tumor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 96: 566-572, 2003.
- 68) Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, 133: 1710-1715, 1984.
- 69) Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol*, 133: 579-584, 1987.
- 70) Duchrow M, Gerdes J, Schultze C: The proliferation-associated Ki-67 protein: Definition in molecular term. *Cell Prolif*, 57: 235-242, 1997.
- 71) Raybaud-Diogenè H, Fortin A, Morency R, Roy J, Monteil RA, Têtu B. Markers of radioresistance in squamous cell carcinoma of the head and neck: A clinicopathologic and immunohistochemical study. *J Clin Oncol*, 15: 1030-1038, 1997.
- 72) Liu SC, Klein-Szanto AJP. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol*, 36: 145-151, 2000.
- 73) Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*, 168: 357-363, 1992.
- 74) Bartkova J, Lukas J, Muller H, Strauss M, Gusterson B, Bartek J. Pattern of D type cyclin expression and G1 regulation in human head and neck cancer. *Cancer Res*, 55: 949-956, 1995.
- 75) Coltera MD, Zarbo RJ, Sakr WA, Gown AM. Markers for dysplasia of upper aerodigestive tract: suprabasal expression of PCNA, P53, and CK19 in alcohol-fixed, embedded tissue. *Am J Pathol*, 141: 817-825, 1992.
- 76) Matsuda M, Hirakawa N, Nakashima T, Kuratomi Y, Komiyama S. Cyclin D1 overexpression in primary hypopharyngeal carcinomas. *Cancer*, 78: 390-395, 1996.
- 77) Ananthanarayanan V, Deaton RJ, Yang XJ, Pins MR, Gann PH. Alteration of Proliferation and Apoptotic Markers in Normal and Premalignant Tissue Associated with Prostate Cancer. *BMC Cancer*, 6: 73-102, 2006.

- 78) Kropveld A, Slootweg PJ, Blankenstein MA, Terhaard CHJ, Hordijk GJ. Ki-67 and p53 in T2 Laryngeal Cancer. *Laryngoscope*, 108: 1548-1552, 1998.
- 79) Macluskey M, Ogden GR, Green M, Chisholm DM, Schor SL, Schor AM. The association between epithelial proliferation and disease progression in the oral mucosa. *Oral Oncol*, 35: 409-414, 1999.
- 80) Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Iezzi G, Santinelli A. Prevalence of p53, bcl-2, and Ki-67 Immunoreactivity and of Apoptosis in Normal Oral Epithelium and in Premalignant and Malignant Lesions of the Oral Cavity, *J Oral Maxillofac Surg*, 60: 532-540, 2002.
- 81) Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182(3): 311-322, 2000.
- 82) Verheijen R, Kuijpers HJ, van-Driel R, Beck JL, van-Dierendonck JH, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC. Ki-67 detects a nuclear matrix proliferation-related antigen. *J Cell Sci*, 92: 531-540, 1989.
- 83) Baisch H, Gerdes J. Simultaneous staining of exponentially growing versus plateau phase cells with the proliferation-associated antibody Ki67 and propidium iodide: analysis by flow cytometry. *Cell Tissue Kinet*, 20: 387-391, 1987.
- 84) Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki67: its use in histopathology. *Histopathol*, 17: 489-503, 1990.
- 85) Hofstadter F, Knachel R, Raschoff J. Cell proliferation assessment in oncology. *Virchows Arch*, 427: 323-341, 1995.
- 86) Maiorano D, Lutzmann M, Mechali M. MCM proteins and DNA replication. *Curr Opin Cell Biol*, 18: 130-136, 2006.
- 87) Newlon CS. Putting it all together: building a prereplicative complex. *Cell*, 91: 717-720, 1997.
- 88) Romanowski P, Madine MA. Mechanisms restricting DNA replication to once per cell cycle: the role of Cdc6 and ORC. *Trends Cell Biol*, 7: 9-10, 1997.
- 89) Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*, 71: 333-374, 2002.
- 90) Bailis JM, Forsburg SL. MCM proteins: DNA damage, mutagenesis and repair. *Curr Opin Gen Devel*, 14: 17-21, 2004.
- 91) Williams GH, Romanowski P, Morris LS, Madine M, Mills AD, Stoeber K, Marr J, Laskey RA, Coleman N. Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 95: 14932-14937, 1998.

- 92) Meng MV, Grossfeld GD, Williams GH, Dilworth S, Stoeber K, Mulley TW, Weinberg V, Carroll PR, Tlsty TD. Minichromosome maintenance protein 2 expression in prostate: characterization and association with outcome after therapy for cancer. *Clin Cancer Res*, 7: 2712-2718, 2001.
- 93) Ramnath N, Hernandez FJ, Tan DF, Huberman JA, Natarajan N, Beck AF, Hyland A, Todorov IT, Brooks JS, Bepler G. MCM2 is an independent predictor of survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 19: 4259-4266, 2001.
- 94) Wharton SB, Chan KK, Anderson JR, Stoeber K, Williams GH. Replicative MCM2 protein as a novel proliferation marker in oligodendrogliomas and its relationship to Ki67 labelling index, histological grade and prognosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 27: 305-313, 2001.
- 95) Kruger S, Thorns C, Stöcker W, Müller-Kunert E, Böhle A, Feller AC. Prognostic Value of MCM2 Immunoreactivity in Stage T1 Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Eur Urol*, 43: 138-145, 2003.
- 96) Yang J, Ramnath N, Moysich KB, Asch HL, Swede H, Alrawi SJ, Huberman J, Geradts J, Brooks JSJ, Tan D. Prognostic significance of MCM2, Ki-67 and gelsolin in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 6: 203-212, 2006.
- 97) Dudderidge TJ, Stoeber K, Loddo M, Atkinson G, Fanshawe T, Griffiths DF, Williams GH. Mcm2, Geminin, and KI67 define proliferative state and are prognostic markers in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 11: 2510-2517, 2005.
- 98) Hashimoto K, Araki K, Osaki M, Nakamura H, Tomita K, Shimizu E, Ito H. MCM2 and Ki-67 expression in human lung adenocarcinoma: prognostic implications. *Pathobiol*, 71: 193-200, 2004.
- 99) Chatrath P, Scott IS, Morris LS, Davies RJ, Rushbrook SM, Bird K, Vowler SL, Grant JW, Saeed IT, Howard D, Laskey RA, Coleman N. Aberrant expression of minichromosome maintenance protein-2 and Ki67 in laryngeal squamous epithelial lesions. *Br J Cancer*, 89: 1048-1054, 2003.
- 100) Scott IS, Odell E, Chatrath P, Morris LS, Davies RJ, Vowler SL, Laskey RA, Coleman N. A minimally invasive immunocytochemical approach to early detection of oral squamous cell carcinoma and dysplasia. *Br J Cancer*, 94: 1170-1175, 2006.
- 101) Thompson CB. Apoptosis. In: Paul WE, *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers, 1999.

- 102) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-257, 1972.
- 103) Wyllie AH, Duvall E. Cell death. In: McGee JO'D, Issacson PG, Wright N, eds. *Oxford Textbook of Pathology*, Oxford University Press, USA, 1: 142-147, 1992.
- 104) Afford S, Randhawa S. Demystified. Apoptosis. *Mol Pathol*, 53(2): 55-63, 2000.
- 105) Mountz JD, Zhou T. Apoptosis and Autoimmunity. In: Koopman WJ ed. *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions*. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- 106) Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors*, 8: 1-5, 1998.
- 107) Hızal N. Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü). *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 6: 196-197, 1997.
- 108) Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *The Oncologist*, 4: 332-339, 1999.
- 109) Thompson EB. The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 60: 575-600, 1998.
- 110) Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. *Sendrom*, 13: 102-107, 2001.
- 111) Tomatır AG. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin Tıp Bil*, 23: 499-508, 2003.
- 112) Pellegata NS, Antoniono RJ, Redpath JL, Stanbridge EJ. DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: A reevaluation. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 93: 15209-15214, 1996.
- 113) Kozomara R, Jovic N, Magic Z, Brankovic-Magic M, Minic V. p53 mutations and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas: correlation with overall survival. *J Cranio-Maxillofac Surg*, 33: 342-348, 2005.
- 114) Abbas NF, El-Sharkawy SL, Abbas EA, El-Shaer MAM. Immunohistochemical study of p53 and angiogenesis in benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 103(3): 385-390, 2007.
- 115) Hollstein M, Shomer B, Greenblatt M, Soussi T, Hovig E, Montesano R, Harris CC. Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res*, 24: 141-146, 1996.

- 116) Chomchai JS, Du W, Sarkar FH. Prognostic significance of p53 gene mutations in laryngeal cancer. *Laryngoscope*, 109: 455-459, 1999.
- 117) Hollstein MC, Peri L, Mandard AM, Welsh JA, Montesano R, Metcalf RA, Bak M, Harris CC. Genetic analysis of human esophageal tumors from two high incidence geographic areas; frequent p53 base substitutions and absence of ras mutation. *Cancer Res*, 51: 4102-4106, 1991.
- 118) Nakopoulou L, Vourlakou C, Zervas A, Tzonou A, Gakiopoulou H, Dimopoulos MA. The prevalence of bcl-2, p53, and Ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates. *Hum Pathol*, 29: 146-154, 1998.
- 119) Kerdpon D, Sriplung H, Kietthubthew S. Expression of p53 in oral squamous cell carcinoma and its association with risk habits in southern Thailand. *Oral Oncol*, 37: 553-557, 2001.
- 120) Max Robinson C, Prime SS, Paterson IC, Guest PG, Eveson JW. Expression of Ki-67 and p53 in cutaneous free flaps used to reconstruct soft tissue defects following resection of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 43(3): 263-271, 2007.
- 121) Chiang CP, Huang JS, Wang JT, Liu BY, Kuo YS, Hahn LJ, Kuo MY. Expression of p53 protein correlates with decreased survival in patients with areca quid chewing and smoking-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med*, 28(2): 72-76, 1999.
- 122) Saranath D, Tandle AT, Teni TR, Dedhia PM, Borges AM, Parikh D, Sanghavi V, Mehta AR. p53 inactivation in chewing tobacco-induced oral cancers and leukoplakias from India. *Oral Oncol*, 35(3): 242-250, 1999.
- 123) Kudo Y, Kitajima S, Sato S, Miyauchi M, Ogawa I, Takata T. Establishment of an oral squamous cell carcinoma cell line with high invasive and p27 degradation activities from a lymph node metastasis. *Oral Oncol*, 39: 515-520, 2003.
- 124) Langlois NEI, Lamb J, Eremin O, Heys SD. Apoptosis in colorectal carcinoma occurring in patients aged 45 years and under: relationship to prognosis, mitosis, and immunohistochemical demonstration of p53, c-myc and bcl-2 protein products. *J Pathol*, 182(4): 392-397, 1997.
- 125) Hindermann W, Berndt A, Wunderlich H, Katenkamp D, Kosmehl H. Quantitative evaluation of apoptosis and proliferation in renal cell carcinoma: Correlation to tumor subtype, cytological grade according to Thoenes-classification and the occurrence of metastasis. *Pathol Res Pract*, 193(1): 1-7, 1997.

- 126) Xie X, Angelis PD, Clausen OPF, Boysen M. Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*, 35: 502-509, 1999.
- 127) Stoll C, Baretton G, Ahrens C, Löhns U. Prognostic significance of apoptosis and associated factors in oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*, 436: 102-108, 2000.
- 128) Cawson RA, Binnie WH, Everson JW. *Oral disease*. Wolfe, London, pp 13.6-13.14, 1994.
- 129) Weiss SW, Goldblum JR. *Enginzer and Weiss's Soft Tissue Tumours*. Mosby, St. Louis, 2001.
- 130) Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R. Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and survival. *Anti Cancer Res*, 18(6B): 4779-4786, 1998.
- 131) Scagliotti GV, Micela M, Gubetta L, Leonardo E, Cappia S, Borasio P, Pozzi E. Prognostic significance of Ki67 labelling in resected non small cell lung cancer. *Eur J Cancer*, 29A: 363-365, 1993.
- 132) Tye BK. MCM proteins in DNA replication. *Annu Rev Biochem*, 68: 649-686, 1999.
- 133) Fiebiger W, Wiltschke C. Tumor markers. *Acta Med Austriaca*, 28: 33-37, 2001.
- 134) Cüre E, Baştürk A, Şahin M, Cüre MC, Coşkun HŞ, İşler M. The evaluation of tumor markers in acute pancreatitis. *Turk J Cancer*, 37(1): 11-15, 2007.
- 135) O-charoenrat P, Pillai G, Patel S, Fisher C, Archer D, Eccles S, Rhys-Evans P. Tumor thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. *Oral Oncol*, 39(4): 386-390, 2003.
- 136) Al-Rajhi N, Khafaga Y, El-Husseiny J, Saleem M, Mourad W, Al-Otieschan A, Al-Amro A. Early stage carcinoma of oral tongue: prognostic factors for local control and survival. *Oral Oncol*, 36(6): 508-514, 2000.
- 137) Genden EM, Ferlito A, Bradley PJ, Rinaldo A, Scully C. Neck disease and distant metastases. *Oral Oncol*, 39: 207-212, 2003.
- 138) Tiwari R. Squamous cell carcinoma of the superior gingivolabial sulcus. *Oral Oncol*, 36: 461-465, 2000.
- 139) WHO Collaborating Center for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesion: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 46: 518-539, 1978.

- 140) Burkhard A. Premaligne Veraenderungen der Mundschleimhaut. *Der Pathologe*, 6: 126-132, 1985.
- 141) Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC, Burns JC, Page DG, Svirsky JA, Eisenberg E, Krutchkoff DJ, Cushing M. Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 80(2): 188-191, 1995.
- 142) Shin DM, Varavud N, Ro J, Lee J, Hong W, Hittelman WN. Sequential increase in proliferating cell nuclear antigen in head and neck tumorigenesis: a potential marker. *J Natl Cancer Inst*, 85: 971-978, 1993.
- 143) Huber MH, Lippman SM, Hong WK. Chemoprevention of head and neck cancer. *Semin Oncol*, 3: 366-375, 1994.
- 144) Silverman S, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation: a follow-up study of 257 patients. *Cancer*, 53: 563-568, 1984.
- 145) Acay RR, Felizzola CR, de Araujo NS, de Sousa SOM. Evaluation of proliferative potential in oral lichen planus and oral lichenoid lesions using immunohistochemical expression of p53 and Ki67. *Oral Oncol*, 42: 475-480, 2006.
- 146) Linder S, Parrado C, Falkmer UG, Blasjo M, Sundelin P, von Rosen A. Prognostic significance of Ki67 antigen and p53 protein expression in pancreatic duct carcinoma: a study of the monoclonal antibodies MIB-1 and DO-7 in formalin-fixed paraffin-embedded tumour material. *Br J Cancer*, 76: 54-59, 1997.
- 147) Avall-Lundquist EH, Silfversward C, Aspenblad U, Nilsson BR, Auer GU. The impact of tumour angiogenesis, p53 over-expression and proliferative activity (MIB-1) on survival in squamous cervical carcinoma. *Oral Oncol, Eur J Cancer*, 33: 1799-1804, 1997.
- 148) Barnard NJ, Hall PA, Lemoine NR, Karda N. Proliferative index in breast carcinoma determined in situ by Ki-67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. *J Pathol*, 152: 287-295, 1987.
- 149) Nagao T, Ishida Y, Kondo Y. Determination of S-phase cells by in-situ for histone H3 mRNA in hepatocellular carcinoma: correlation with histologic grade and other cell proliferative markers. *Mod Pathol*, 9: 99-104, 1996.
- 150) Cemerikic Matinovic V, Trpinac D, Ercegovac M. Correlations between mitotic and apoptotic indices, number of interphase NORs, and histological grading in squamous cell lung cancer. *Micro Res Techn*, 40: 408-417, 1998.

- 151) Middleton LP, Duray PH, Merino MJ. The histological spectrum of hemangiopericytoma: application of histochemical analysis including proliferative markers to facilitate diagnosis and predict prognosis. *Hum Pathol*, 20: 636-640, 1998.
- 152) Kruger S, Muller H. Correlation of morphometry, nucleolar organiser region, proliferating cell nuclear antigen and Ki67 antigen expression with grading and staging in urinary-bladder carcinomas. *Br J Urol*, 75: 480-484, 1995.
- 153) Kahn MA, Mincer HH, Dockter ME, Hermann-Petrin JM. Comparing flow cytometric analysis and nucleolar organizer region enumeration in archival oral premalignant lesions. *J Oral Pathol Med*, 22: 257-262, 1993.
- 154) Kushner J, Bradley G, Jordan RKC. Patterns of p53 and Ki-67 expression in epithelial dysplasia from the floor of the mouth. *J Pathol*, 183: 418-423, 1997.
- 155) Birchall M, Winterford C, Tripconi L, Gobe G, Harmon B. Apoptosis and mitosis in oral and oropharyngeal epithelia: evidence for a topographical switch in premalignant lesions. *Cell Prolif*, 29: 447-456, 1996.
- 156) Kobayashi I, Ozeki S, Ishibashi Y, Sakai H. The proliferative activity in oral epithelial dysplasia analyzed by proliferating cell nuclear antigen immunostaining and argyrophilic nucleolar organizer region staining. *Hum Pathol*, 26: 907-913, 1995.
- 157) Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31: 13-20, 1997.
- 158) Kerns BJ, Jordan PA, Faerman LL, Berchuck A, Bast RC, Layfield LJ. Determination of proliferation index with MIB-1 in advanced ovarian cancer using quantitative image analysis. *Am J Clin Pathol*, 101: 192-197, 1994.
- 159) Lam KY, Law SYK, So MKP, Fok M, Ma LT, Wong J. Prognostic implication of proliferative markers MIB-1 and PC10 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 77: 7-13, 1996.
- 160) Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P. Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer*, 71: 3926-3931, 1993.
- 161) Kearsey SE, Labib K. MCM proteins: evolution, properties and role in DNA replication. *Biochem Biophys Acta*, 1398: 113-136, 1998.

- 162) Scott IS, Morris LS, Bird K, Davies RJ, Vowler SL, Rushbrook SM, Marshall AE, Laskey RA, Miller R, Arends MJ, Coleman N. A novel immunohistochemical method to estimate cell cycle phase distribution in archival tissue: implications for the prediction of outcome in colorectal cancer. *J Pathol*, 201: 187-197, 2003.
- 163) Todorov IT, Werness BA, Wang HQ, Buddharaju LN, Todorova PD, Slocum HK, Brooks JS, Huberman JA. HsMCM2/BM28: a novel proliferation marker for human tumors and normal tissues. *Lab Invest*, 78: 73-78, 1998.
- 164) Stoeber K, Halsall I, Freeman A, Swinn R, Doble A, Morris L, Coleman N, Bullock N, Laskey RA, Hales CN, Williams GH. Immunoassay for urothelial cancers that detects DNA replication protein Mcm5 in urine. *Lancet*, 354: 1524-1525, 1999.
- 165) Rodins K, Cheale M, Coleman N, Fox SB. Minichromosome maintenance protein 2 expression in normal kidney and renal cell carcinomas: relationship to tumor dormancy and potential clinical utility. *Clin Cancer Res*, 8: 1075-1081, 2002.
- 166) Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73: 2013-2026, 1994.
- 167) Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol*, 124: 1-6, 1994.
- 168) Chandler D, El-Naggar AK, Brisbay S, Redline RW, McDonnell TJ. Apoptosis and expression of the bcl-2 proto-oncogene in the fetal and adult human kidney: evidence for the contribution of bcl-2 expression to renal cancerogenesis. *Hum Pathol*, 25: 789-796, 1994.
- 169) Stewart BW. Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst*, 86: 1286-1296, 1994.
- 170) Cordon-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators. *Am J Pathol*, 147: 545-560, 1995.
- 171) Lane DP. P53, guardian of the genome. *Nature*, 358: 15-16, 1992.
- 172) Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewska M, Wasenius VM, Niskanen E, Nordling S, Reed JC. Reduced expression of proapoptotic gene Bax is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res*, 55: 4471-4478, 1995.
- 173) Xie X, Clausen OPF, De Angelis P, Boysen M. Bax expression has prognostic significance that is enhanced when combined with AgNOR counts in glottic carcinomas. *Br J Cancer*, 78: 100-105, 1998.

- 174) Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehülsing M, Eckel HE. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol*, 35(6): 583-589, 1999.
- 175) Cabbar F. Asemptomatik gömülü üçüncü molar diş follikülünde odontojenik epitelin proliferatif potansiyelinin ve müsinöz hücre prosoplazisinin varlığının belirlenmesi. Yeditepe Üniversitesi, Master Tezi, İstanbul, 2006.
- 176) de Aguiar AF Jr, Kowalski LP, de Almeida OP. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. *Oral Oncol*, 43(6): 593-601, 2007.

ÖZGEÇMİŞ

Dişhekimî Gökhan Töre 11.04.1978 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Özel Doğuş Okulları'nda tamamladı. 2001 yılında Yeditepe Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi'nden mezun oldu. 2004 yılı güz yarıyılında Yeditepe Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Oral İmplantoloji Anabilim Dalı'nda "Master of Science" derecesini aldı. Aynı dönemde Yeditepe Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı ve halen aynı Anabilim Dalı'nda eğitimine devam etmektedir.

EK-1

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sayın Dt. Gökhan Töre tarafından Yeditepe Üniversitesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı'nda 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 yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimalla 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, Dt. Gökhan Töre, Yeditepe Üniv. Diş Hekimliği Fakültesi Bağdat Cad. No: 238 34728 Göztepe / İstanbul. Tel: 0532 6637563 'ten 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.

GÖNÜLLÜNÜN

Adı / Soyadı:

Adres:

Tel.:

İmza:

Tarih:

VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN

Adı / Soyadı:

Adres:

Tel.:

İmza:

Tarih:

AÇIKLAMAYI YAPAN ARAŞTIRMACININ

Adı / Soyadı: Gökhan Töre

Adres: Yeditepe Üniv. Diş Hekimliği Fakültesi Bağdat Cad. No: 238
34728 Göztepe / İstanbul.

Tel.: 0532 6637563

İmza:

Tarih:

RIZA ALMA İŞLEMİNDE BAŞTAN SONA TANIKLIK EDEN KURULUŞ GÖREVLİSİNİN

Adı / Soyadı: Doç. Dr. Nurhan Güler

Adres: Yeditepe Üniv. Diş Hekimliği Fakültesi Bağdat Cad. No: 238
34728 Göztepe / İstanbul.

Tel.: 0216 3636044

İmza:

Tarih:

EK-2

TARİH: / / 200

İSİM:

SOYADI:

YAŞ:

ÇİNSİYET: BAY: BAYAN:

(BU BÖLÜM HEKİM TARAFINDAN DOLDURULACAKTIR)

LEZYONUN BULUNDUĞU BÖLGE:

UYGULANAN CERRAHİ İŞLEM:

ÖN TANI:

HİSTOPATOLOJİK TANI:

TEL:

Cerrahi işlem sırasında alınması gereken dokular bulunduğunu biliyorum (Dişeti). Cerrahi işleme ve alınacak dokunun (Dişeti) incelenmesine onay veriyorum.

Tarih:

İmza:

İmza Onayı: