



T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

RATLARDA 4-NİTROQUİNOLİNE 1-OXİDE 'İN
TETİKLEDİĞİ DİL YASSI HÜCRELİ
KARSİNOMASININ OLUŞUMUNA VE GELİŞİMİNE
PROPRANOLOLUN ETKİSİ

Dt. Seçil ÇUBUK
DOKTORA TEZİ
ANKARA/ 2014



T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

RATLARDA 4-NİTROQUİNOLİNE 1-OXİDE 'İN
TETİKLEDİĞİ DİL YASSI HÜCRELİ KARSİNOMASININ
OLUŞUMUNA VE GELİŞİMİNE PROPRANOLOLUN
ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

Dt. Seçil ÇUBUK

Danışman: Prof. Dr. Sina UÇKAN

ANKARA/ 2014

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Doktora Programı çerçevesinde Dt. Seçil Çubuk tarafından yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15/09/2014

Tez Konusu: “Ratlarda 4-Nitroquinoline 1-Oxide’in Tetiklediği Dil Yassı Hücreli Karsinomasının Oluşumuna ve Gelişimine Propranololun Etkisi ”

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. İ. Sina Uçkan

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Kenan Araz
Prof. Dr. İ. Sina Uçkan
Prof. Dr. Onur İçten
Doç. Dr. Burak Bayram
Yrd. Doç. Dr. Ufuk Ateş

Başkent Üniversitesi
Medipol Üniversitesi
Ankara Üniversitesi
Başkent Üniversitesi
Başkent Üniversitesi

[Handwritten signatures of the jury members]

ONAY: Bu tez, Başkent Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun 18.. /09.. / 2014 tarih ve 171.. Karar Sayısı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Rengin ERDAL
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının her aşamasında değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak çalışmanın tamamlanmasında büyük emeği geçen, doktora eğitimim süresince akademik ve mesleki alanda gelişme kaydetmemde çok büyük katkısı olan tez danışmanım Sayın **Prof Dr Sina Uçkan'a**,

Bu çalışmanın yoğun deney ve yazım aşamasında destekleriyle her zaman bana yardımcı olan, eğitimim sürecinde meslek hayatım açısından çok değerli bilgiler edindiğim Başkent Üniversitesi Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof Dr Kenan Araz'a**,

Özellikle infantil hemanjioma tedavisinde propranolol kullanımı ile ilgili deneyimlerini bizimle paylaşarak bu çalışmanın temelini oluşturmamız ve önemi konusunda bize ışık tutan, çalışmanın planlanması aşamasında kıymetli desteklerini bizden esirgemeyen Başkent Üniversitesi Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı'nın değerli hocalarından sayın **Prof Dr Faik Sarılioğlu'na**,

Çalışmamızın histopatolojik değerlendirme aşamasında çok büyük emekleri olan ve bu konuda pek çok bilgi ve tecrübe edinmemi sağlayan Başkent Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof Dr Handan Özdemir** ve **Asistan Doktor Firdevs Zeynep Taşlıca'ya**,

Doktora eğitimim süresince karşılaştığım her sorunda danıştığım, mesleki olarak gelişmemde çok büyük katkısı olması yanında manevi ağabeyim olarak gördüğüm sayın **Doç Dr Burak Bayram'a**, çok kıymetli bilgi ve deneyimlerini her zaman benimle paylaşan hocalarım sayın **Yard Doç Dr Ufuk Ateş** ve **Yard Doç Dr Yener Oğuz'a**

Klinik çalışmalarımızda gösterdiği özverinin yanısıra akademik çalışmalarımızda da gece gündüz gözetmeksizin bana akıl hocalığı eden, mesleki her türlü sıkıntımdaya fikirlerine çok önem verdiğim dostum sayın **Yard Doç Dr Sıdıka Akdeniz'e**,

Çalışmamızın planlanması ve hayvan deneyi süresince bilgi ve tecrübelerini bizimle paylaşan **Deney Hayvanı Üretim ve Araştırma Merkezi , Üretim Ünitesi** ekibinden Sayın **Veteriner Hekim Didem Bacanlı'ya** , hayvanların bakımında çok büyük emekleri olan teknikerler Sayın **Adem Kurtçuoğlu** ve **Sezai Kölcük'e**,

Doktora eğitimimde çalışma arkadaşlığının ötesinde dostlarım olan, tez çalışması süresince manevi destekleri ile yanımda olan **Sayın Dr Dt Nur Altıparmak** ve **Dt Serap Gülsever'e**,

Zorlu eğitim sürecimde bugünkü noktaya gelmemde sabırları ve özverileriyle en büyük destekçilerim olan annem **Serpil Çubuk**, babam **Ersen Çubuk** ve ağabeyim **Alper Çubuk'a** sonsuz teşekkürlerimi sunarım

ÖZET

Ratlarda 4-Nitroquinoline 1-Oxide 'in tetiklediği dil yassı hücreli karsinomasının oluşumuna ve gelişimine propranololun etkisi

Oral kavite karsinomaları en sık görülen neoplazmlardandır. Oral kanserlerin tedavisine yönelik pekçok çalışma yapılmış olmasına rağmen son 4-5 yıllık dekatta hastaların sağkalım oranında önemli bir değişiklik elde edilememiştir. Hastalığın kompleks tedavi yöntemleri, yüksek mortalite ve morbidite oranları göz önünde bulundurulduğunda karsinogenezis sürecinin latent dönemini uzatan kimyasal korunma yöntemlerinin geliştirilmesi önemli bir yaklaşımdır.

Propranolol non-selektif β -bloker ilaçlardır. İlacın antianjiogenezis ve β -adrenerjik reseptör baskılama özelliği sayesinde kanser gelişiminde koruyucu etkisi olabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır.

4-Nitroquinoline 1-Oxide (4NQO) modeli oral karsinogenezisten kimyasal korunma yöntemleri geliştirmek için sıklıkla kullanılan bir yöntem olmuştur. Bu çalışmanın amacı ratlarda 4NQO' nun tetiklediği dil yassı hücreli karsinogenezis süreci üzerine propranololun etkisini araştırmaktadır.

Çalışma 27 adet Sprague Dawley cinsi erkek ratlar üzerinde yapılmıştır. Bütün ratlara 50 ppm dozunda 4NQO içme suyunda uygulanmıştır. Yapılan diğer işlemler ise şöyledir (her grup için n= 9) : Grup 1, 50 mg/kg/ gün dozunda propranolol oral gavaj yoluyla 20 hafta uygulanmıştır ; Grup 2, 20 haftalık karsinogenezis süreci sonunda 2 hafta 50 mg/kg/gün dozunda propranolol uygulanmıştır; Grup 3 (kontrol grubu) , tedavi uygulanmamıştır.

Histopatolojik değerlendirme sonucu malign transformasyon riskinin bulunma oranı Grup '1 'de (%33.3) Grup 2 (%55.5) ve 3 (%77.8) ile karşılaştırıldığında daha düşüktür. İkili derecelendirme sistemine göre prekanseröz lezyonların yüksek risk kategori oranları üç grupta benzerdir. Düşük risk kategori oranları ise; 1. Grupta %22.2, 2. Grupta %33.3 ve 3. Grupta %55.5'tir. 'Likelihood ratio testi' ile

istatistiksel analiz yapıldı ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı görüldü. ($p>0.05$)

Oluşan beyaz lezyonların hiperkeratinizasyon ve vazodilatasyon dereceleri üç grupta benzerdir. (Median :2)

Her grupta birer tümöral oluşum tespit edildi. Birinci grupta oluşan tümör çapı (1.8 cm) 3. Grupta oluşanın (0.6 cm) 3 katı ve 2. Gruptaki örneğin (0.9 cm) 2 katı kadardır.

Bizim çalışmamızda propranololun dil karsinogenezisinin özellikle erken evrelerinde kimyasal korunmada etkili olabileceği gösterilmiştir. Ancak örnek sayısının daha fazla olduğu ileri çalışmalarla bu etki daha net ortaya koyulmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Propranolol, oral karsinogenezis, epitelyal displazi, 4-nitroquinoline 1-oxide, rat

Bu tez çalışması Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmıştır (Proje no: D-DA13/04).

ABSTRACT

The efficiency of propranolol on occurrence and development of 4-nitroquinoline 1-oxide induced squamous cell carcinoma of the tongue in rats.

Oral cavity cancers are one of the most frequent neoplasms. Although there have been many reported studies about treatment approach, survival rates in oral cancer patients have been similar for 4-5 decades. Chemoprevention can extend the latency period of carcinogenesis and it seems to be a crucial approach considering complex treatment procedures and high morbidity and mortality rates of oral cancers.

Propranolol is a non-selective β -blocker drugs. Many previously reported study showed that this agent can be effective for prevention of cancer development or anticancer therapies by its anti-angiogenesis and β -adrenergic reseptor (β -AR) inhibition action.

4-nitroquinoline 1-oxide model (4NQO) have been frequently used for development new chemoprevention methods for oral carcinogenesis. The aim of this study was to investigate the efficiency of propranolol on 4NQO induced squamous cell carcinogenesis of the tongue in rats.

A total of 27 male Sprague Dawley rats were received 50 ppm 4NQO for 20 weeks in drinking water. The other procedures were as follows (n=9 per group) :Group 1, treated with 50 mg/kg/day propranolol by oral gavage; Group 2, following to carcinogenesis inducement for 20 weeks, propranolol were applied for 2 weeks; Group 3 (control group), no treatment was applied.

Histopathological analysis revealed decreased risk of malignant transformation rates in Group 1 (33.3%) when compared with Group 2 (55.5%) and 3 (77.8%). According to binary system of oral precancerous lesion there were slightly difference between 3 groups regarding to high risk category (Group 1; 11.1%, Group 2 and 3; %22.2) The rates of low risk category were 22.2% in Group 1, 33.3% in Group 2 and 55.5% in Group 3. The statistical comparision was performed by likelihood ratio test and the difference between groups were not statistically significant. ($P>0.05$)

One tumor occurrence was detected for each group. Considering tumor size the sample in Group 3 (1.8 cm) was almost threefold of the sample in Group 1 (0.6 cm) and twofold of the tumor sample in Group 2 (0.9 cm)

Hiperkeratinisation and vasodilation degrees were similar for all groups (Median: 2)

As we concluded propranolol usage may provide chemoprevention especially in early carcinogenesis stages. Though there advanced studies with larger samples is required for revealing this effect more precisely.

Key Words: Propranolol, oral cardinogenesis, epithelial dysplasia, 4- nitroquinoline 1-oxide, rat

This study was approved by Baskent University Institutional Rewiev Board (Project no: D-DA13/06).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xiii
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Oral Mukozanın Yapısı ve Özellikleri.....	4
2.2 Dil Mukozasının Özellikleri	5
2.2.1. Papilla Filiformes	5
2.2.2. Papilla Fungiformes	5
2.2.3. Papilla foliata.....	6
2.2.4. Papilla vallate (Sirkumvallat papillalar).....	6
2.3 Oral Mukoza Prekanseroz Lezyonları.....	6
2.4. Hiperkeratinizasyon.....	6
2.5. Lökoplaki	7
2.5.1. Homojen lökoplakiler	8
2.5.2. Homojen olmayan lökoplakiler.....	8
2.5.3. Lökoplaki Tedavi Yöntemleri	9
2.6. Epitelyal Prekanseroz Lezyonların Histopatolojik Basamakları	10
2.6.1. Epitelyal hiperplazi	11
2.6.2. Displazi/ Skuamöz İntraepitelyal Neoplazi/ Atipik hiperplazi.....	11
2.7. Yassı Hücreli Karsinoma.....	14
2.7.1. Yassı Hücreli Karsinoma Tedavisi	15
2.8. β -Adrenerjik Reseptör Blokerleri.....	16
2.9. Hayvanlarda Oral Kanser Oluşturma Modelleri.....	18

2.10. İnsanda Oral Karsinogenezis Süreci ve 4NQO Hayvan Modelleri	19
2.10.1. 4NQO ve Doku Seçiciliği	19
2.10.2. 4NQO Hayvan Modelinin Kullanım Alanları	20
2.10.3. 4NQO'nun Kullanım Yolları, Dozu ve Süresi	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	22
3.1. Denek Sayısının Belirlenmesi	22
3.2. Karsinogenezisin İndüksiyonu ve Propranololun Uygulanması	22
3.2.1. 4NQO Sulu Çözeltilisinin Hazırlanışı.....	23
3.2.2. Propranololun Uygulanışı	23
3.3. Histopatolojik Değerlendirme.....	24
3.4. İstatistiksel Analiz Yöntemleri.....	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. Klinik Olarak Lezyonların Özellikleri	27
4.2. Histopatolojik Bulgular	29
4.3. İstatistiksel Bulgular	38
4.3.1. Hiperkeratinizasyon ve vazodilatasyon skorlamasında iki patolojik arasındaki uyumluluk.....	38
4.3.2. Hiperkeratinizasyon ve vazodilatasyon parametreleri açısından grupların karşılaştırılması	38
4.3.3. Lezyonların malign transformasyonu açısından düşük riskli ya da yüksek riskli olmalarına göre gruplar arasındaki karşılaştırma bulguları.....	39
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	45
7. KAYNAKLAR	46

SİMGELER ve KISALTMALAR

ark.	: Arkadaşları
bFGF	: Basic fibroblast growth factor
β-AR	: Beta adrenerjik reseptör
DMBA	: 9,10- dimethyl- 1,2- benzanthracene
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	: Epitelial growth factor
MMP	: Matrix metalloproteinase
NADH	: Nitroredüktaz enzimi
N	: Birey sayısı
p	: İstatistiksel anlamlılık
Ppm	: Parts per million
SİN	: Skuamöz intraepitelyal neoplazi
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
St	: Stratum
VEGF	: Vascular epithelial growth factor
YHK	: Yassı hücreli karsinoma
4NQO	: 4- nitroquinoline 1-oxide
4 HAQO	: 4-hydroxyaminoquinoline -1 oxide
20 MC	: 20 Methyl cholonthrene

ŞEKİLLER

Şekil

- 3.1:** 4NQO sarı renkli toz halinde bir madde olup karsinojenik etkisi ultraviyole ışını ile azalmaktadır 23
- 3.2:** Bilateral olarak kommissuralar hizasından yapılan kesiler yardımıyla r dilin tamamen açığa çıkarılıp eksize edilmesi 24
- 3.3:** Bilateral olarak kommissuralar hizasından kesiler yardımıyla dilin tamamen açığa çıkarılıp eksize edilmesi 24
- 3.4:** Dil örnekleri uzunlamasına iki parçaya kesilerek parafine gömüldü 25
- 4.1:** Deney süreci sonunda oluşan noduler lezyonların klinik görüntüleri 27
- 4.2:** Deney süreci sonunda oluşan noduler lezyonların klinik görüntüleri 27
- 4.3:** 1. Grupta oluşan ülser, endofitik , yaklaşık 0.6 cm çaplı tümöral yapı 28
- 4.4:** İkinci grupta oluşan çapı yaklaşık 0.9 cm olan tümöral yapı 28
- 4.5:** Üçüncü grupta oluşan çapı yaklaşık 1.8 cm olan tümöral yapı 28
- 4.6:** Grup 1 (20 hafta 4NQO+propranolol) 'de görülen tümöral oluşumun mikroskopik görüntüsü; anormal yapıda hücresel ve yapısal değişiklikler epitelin bütün tabakalarında bulunmaktadır. Karsinoma in situ tanısı koyulmuştur. (HE ,4x10) 29
- 4.7:** Grup 2 (20 hafta 4NQO+ 2 hafta propranolol) 'de görülen tümöral oluşumun mikroskopik görüntüsü keratin incisi oluşumları gösteren invaziv tümör adacıkları. Tanı yassı hücreli karsinoma (HE, 4X10) 30
- 4.8:** Derin invazyon göstermiş keratin incileri (HE, 10X10) 30

Şekil

4.9: Grup 3 (Kontrol grubu)'da görülen tümöral oluşumun mikroskopik görüntüsü. Tamı, yassı hücreli karsinoma (HE 4X10)	31
4.10: Grup 3 yassı hücreli karsinoma (HE 10X10)	31
4.11: İki patolog tarafından yapılan vazodilatasyonun '3-şiddetli vazodilatasyon' olarak derecelendirilen dil mukoza örneği	32
4.12: '1-hafif' dereceli vazodilatasyon olarak değerlendirilen örnek	32
4.13: '3-şiddetli' hiperkeratinizasyon olarak derecelendirilen dil epitel örneği	33
4.14: Hiperkeratinizasyon skorlaması '1-hafif' olarak yapılan dil örneği	33
4.15: Gruplara göre lezyonların düşük risk/yüksek risk dağılımları	35
4.16: 'Yüksek risk' kategorisinde değerlendirilen lezyona ait mikroskopik görüntü. Yapısal ve hücrel değişiklikler epitelin bütün tabakasında bulunmaktadır. DSÖ' ne göre bu lezyon şiddetli displazi sınıfındadır. (HE 4X10, 20X10)	36
4.17: 'Yüksek risk' kategorisinde değerlendirilen lezyona ait mikroskopik görüntü. Yapısal ve hücrel değişiklikler epitelin bütün tabakasında bulunmaktadır. DSÖ' ne göre bu lezyon şiddetli displazi sınıfındadır. (HE 4X10, 20X10)	36
4.18: Bazal hücre hiperplazisi ve hiperkromatizm gibi hücrel değişikliklerle düşük risk kategorisinde değerlendirilen örnek HE: 40X10	37
4.19: Düzensiz tomurcuklanmalar gösteren bulbous rete peg oluşumu ile düşük risk kategorisinde değerlendirilen örnek	37

TABLÖLAR

Tablo

2.1: DSÖ displazi sınıflaması, SİN ve Ljubljana sistemlerinin karşılaştırılması	11
2.2: DSÖ epitelyal displazi değerlendirilmesinde göz önünde bulundurulan yapısal ve hücrel değişiklikler	12
4.1: Makroskopik lezyonların gruplar arasında dağılımı	27
4.2: Hiperkeratinizasyon derecelerinin gruplar arasında dağılımı	34
4.3: Vazodilatasyon skorlamasının gruplar arasında dağılımı	34
4.4: DSÖ oral epitelyal displazi sınıflamasına göre örneklerin dağılımı	35
4.5: Gözlemciler arasında hiperkeatozis skorları açısından uyumluluk	38
4.6: Gözlemciler arasında vazodilatasyon skorlaması açısından uyumluluk	38
4.7: Gruplara göre deneklerin risk durumlarının dağılımı	39

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Yassı hücreli karsinoma (YHK) oral kanserlerin en sık karşılaşılan tipidir. Oral yassı hücreli karsinomanın tedavisinde yeni cerrahi teknikler ve destekleyici radyoterapi ve kemoterapi teknikleri gelişmiş olsa da ilerlemiş olgularda prognoz halen zayıftır ve 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık %56 olarak bildirilmiştir.

Tümörögenезis karsinojen etkenin tetiklediği genetik değişimlerin birikimi ile oluşan çok aşamalı bir süreçtir. 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) karsinogenезis modelinde karsinojen maddenin ratlara içme suyu ile sistemik olarak ya da topikal uygulanması ile insanda oluşana çok benzeyen nitelikte prekanseröz ve kanseröz lezyon oluşumu sağlanmaktadır. Bu nedenle oral YHK'ler deneysel çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. 4NQO birçok organda güçlü bir karsinojendir ancak içme suyu ile düşük konsantrasyonda uygulandığında ratlarda özel olarak dilde prekanseröz lezyon ve yassı hücreli karsinoma oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir.

Epitelyal displazi bir lezyonun histopatolojik olarak prekanseröz durumunu gösteren önemli bir belirteçtir. Dünya Sağlık Örgütü oral epitelyal displazi tanısında ve derecelendirilmesinde çeşitli hücresel ve yapısal değişiklik kriterleri tanımlamıştır. Bu derecelendirme sisteminin en büyük dezavantajı değerlendirmenin subjektif olması ve histopatolojik tanıda gözlemciler arasında anlamlı farklılıklar olmasıdır. Kujan bu farklılığın en aza indirilmesi amacıyla aynı kriterleri kullanarak prekanseröz lezyonları düşük riskli veya yüksek riskli olarak sınıfladığı "ikili derecelendirme sistemi"ni oluşturmuştur. Bu yöntem ile niceliksel bir değerlendirme oluşturarak derecelendirmenin patologlar için daha kolay olduğu ve gözlemciler arasındaki farklılığın azaltılabildiği belirtilmiştir.

Anjiogenезis varolan kapillerden yeni kan damarı oluşması olayıdır ve tümör gelişimi ve metastazda önemli bir rol oynar. Nonselektif bir beta bloker ilaç olan propranolol vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve basic fibroblast büyüme faktörü (bFGF) oluşumunu engelleyerek, vazokonstrüksiyon etkisi ve kapiller

endotelial hücre apoptozunu tetikleyerek anjiogenezisi azaltabilmektedir ve bu etkisi sayesinde son dönemde infantil hemanjioma tedavisinde ilk basamak ilaç olarak kullanılmaktadır. Farklı vücut kanserlerinin gelişiminde ve ilerlemesinde vaskülarizasyonun büyük bir etkisi olduğu bilinmektedir ve bu nedenle tedavide en büyük hedeflerden biri tümör bölgesindeki vaskülarizasyonun baskılanmasıdır.

Meme, nazofarenks, akciğer, prostat, ovarium, pankreas, kolon ve oral kanserlerin yüzey hücrelerinden üretilen β -adrenerjik reseptörlerin (β AR) normal hücrelerin ürettiğinden fazla olduğu gösterilmiştir. Bu verilerden yola çıkarak farklı endikasyonlarla β -bloker kullanan hastalarda çeşitli kanser türlerinin gelişimini inceleyen kohort çalışmaları yapılmıştır. Örneğin β -bloker ilaç kullanan hastalarda pankreas kanseri oluşma riskinin kullanmayan hasta grubuna göre daha az olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca Palm ve arkadaşları yaptıkları bir hayvan çalışmasında propranololün prostat kanser hücrelerinin norepinefrine bağlı metastazını inhibe ettiğini göstermiştir.

Baş boyun bölgesi (dil, larengeal ve hipofarengeal) YHK' larında propranololün tümörün büyümesi ve tümör hücrelerinin apoptozisine etkisi ile ilgili Wolter ve ark'nın hücre kültürü çalışmaları bulunmaktadır. Bu araştırmanın sonucunda propranololün β_2 Ar'i antagonize edici özelliği ile tümör büyümesini inhibe ettiğini göstermişlerdir ve özellikle kemoterapi ve radyoterapiye dirençli baş boyun bölgesi YHK olgularında propranololün ilave tedavi olarak kullanılabileceğini önermişlerdir. Bu çalışma literatürdeki bu konuyla ilgili tek çalışmadır ve oral prekanseröz ve kanseröz lezyon gelişim sürecine propranololün etkisinin değerlendirildiği in vivo bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında ;

- 4-NQO' nun rat dillerinde tetiklediği prekanseröz ve/veya kanseröz lezyon gelişimine propranololün klinik ve histopatolojik etkisini incelemek ve karşılaştırmak,

- Belirli bir karsinogenezis süreci sonunda propranolol kullanımının, oluşan prekanseröz ve /veya kanseröz lezyona etkisini klinik ve histopatolojik olarak incelemek ve karşılaştırmak,
- 4-NQO karsinojen maddesine maruz bırakılan hayvanlarda, deneyin başından itibaren kanserojen ajanla birlikte ve karsinogenezis tamamlandıktan sonra tek başına propranolol uygulamasının dil epitelindeki vaskularizasyona ve hipekeratinizasyona etkisinin histopatolojik olarak skorlanarak gruplar arasında karşılaştırma yapmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Oral Mukozanın Yapısı ve Özellikleri

Oral mukoza yüzeyde çizgili yassı epitel ve derinde lamina propria olmak üzere iki tabakadan oluşur. Epitel tabakası oral kavitenin farklı bölgelerinde keratinize ya da nonkeratinize yapıda olabilir. Keratinize oral mukozada epitel dört tabakadan oluşur. Derinden yüzeye doğru bu tabakalar; Stratum (st) basale, st spinosum, st granulosum ve st korneum'dur.

Oral mukoza heterojen yapıdadır. Histolojik ve fonksiyonel özelliklerine göre çiğneme mukozası, yüzey örtücü mukoza ve özelleşmiş mukoza olarak isimlendirilir. Çiğneme mukozası keratinize çizgili yassı epitel yapısında olup yapışık dişetinde ve damakta bulunur ve mukoperiosteum ile kemiğe bağlanır. Geniş bağ dokusu papilleri karakteristiktir. Keratin tabaka mukozanın soluk pembe renkte görülmesine yol açar ancak travma, kronik inflamasyon gibi nedenlerle keratin tabaka kalınlaşırsa mukoza beyaz ve hafif süngerimsi görüntüde olur.

Yüzey örtücü mukoza dilin ventral yüzeyi, ağız tabanı, yumuşak damak, bukkal, labial ve vestibuler yüzeyleri örter. Yüzey örtücü mukoza non-keratinize yapıdadır ve şeffaf görülür. Mikroanatomiye fonksiyon biçimi ve gelen kuvvetin şiddeti belirler. Özelleşmiş mukoza dilin dorsal yüzeyinde dil papillerini örter ve keratinize yapıdadır (1).

Lamina propria tabakası Tip I ve III kollajen ve elastin fibriller, kan damarları ve sinir hücreleri bulunan fibröz bağ dokusudur. Lamina propria stratum papillare ve retikulare olmak üzere iki tabakadan oluşur. Epitel ve bağ dokusu arasında bazal membran adı verilen bir tabaka bulunur ve bağ dokusuna ait papillalar epitelin içine doğru çıkıntılar yaparlar.

2.2 Dil Mukozasının Özellikleri

Dil esas olarak tat duyusunun organı olmakla beraber çiğneme, yutma, emme ve fonasyon fonksiyonlarına da katkıda bulunan müsküler bir organdır. Üst yüzeyindeki “V” şeklindeki sulkus terminalis ile dil kökü ve dil gövdesi olarak ikiye ayrılır.

Dil intrinsik (vertikal, horizontal ve longitudinal kaslar) ve ekstrinsik kaslar (M. Genioglossus, M. Hypoglossus, M. Palatoglossus ve M. Styloglossus) ve bu kas kitlesini örten *facia linguae* ve mukozadan oluşur. Dil sırtı *lamina propria* sinir ağı ve kılcal damar yönünden zengindir ve *stratum papillare* tabakasında yüzeyi epitelle kaplı çıkıntılar (papillalar) bulunur. Bu papillalar şekillerine göre dört türde isimlendirilir; *papilla filiformis*, *papilla fungiformes*, *papilla foliata* ve *papilla vallata* (Şekil 2).

2.2.1. Papilla Filiformes

Dil papilları arasında en çok sayıda olanıdır ve dorsal yüzeyde eşit şekilde dağılmıştır. *Papilla filiformes* ortokeratotik epitelle kaplıdır; melanosit, langerhans hücreleri içerir ve sinir bağlantısı bakımından zengindir. Bu sinir sonlanmaları dilin mekanik duyu reseptörlerini taşıyan ve dokunma duyusunun iletiminde önemli rol oynayan çok duyarlı oluşumlardır. Filiform papillalar herhangi bir dejeneratif değişiklikte ilk önce etkilenen papillalardır.

2.2.2. Papilla Fungiformes

Lokalizasyonu genellikle dilin ucu ve laterali olan mantar şeklinde yapılardır. Çok sayıda tat alma cisimcikleri taşırlar. Bu papillerde tat cisimciklerine ulaşan sinir lifleri yanısıra mekanik ve termik reseptörler bulunur. Kırmızı nokta şeklindeki yapısı zengin damarsal bağ dokusu içeriğinden ileri gelir.

2.2.3. Papilla foliata

Dil gövdesinin arka kenarında çift taraflı, derin oluklu 5-8 tane mukoza katlantıları şeklinde yapılardır. Seröz bezlerin ağızları bu katlantılar içine açılır.

2.2.4. Papilla vallate (Sirkumvallat papillalar)

Sulkus terminalisin ön kenarında 7-12 tane bulunan en büyük dil papilleridir. Bu papiller acı tadı algılayan tat cisimciklerini taşıyan derin tabakalarında ise seröz bezler bulunur. Bu bezler Ebner bezleri olarak adlandırılır. Bu bezler tatma sırasında suya benzer bir sıvı salgılayarak papil arasındaki yarıkları temizlerler.(2)

2.3 Oral Mukoza Prekanseröz Lezyonları

Belirli bir latent süre sonra kansere dönüşebilme olasılığı bulunan lezyonlar prekanseröz lezyon olarak adlandırılır. Ağız epitel displazileri genellikle YHK öncüsüdür ve sıklıkla klinik olarak beyaz ya da kırmızı veya kırmızı-beyaz karışımı mukozal lezyonlar olarak görülürler ve çoğunluğu klinik teşhiste lökoplaki olarak adlandırılır. (3) Bu lezyonlar histopatolojik olarak hiperkeratizasyon, epitel yüzeyinde erozyon, atrofi, ülserasyon ve/veya epitel tabakalarında yapısal ve hücresel birtakım değişikliklerle seyreden displazi özelliklerine sahip olabilirler.

2.4. Hiperkeratinizasyon

Keratinizasyon st granulosumda bulunan keratinositlerin canlı olmayan yüzeyel hücrelere dönüşerek st korneumu oluşturmasıdır. Bu işlem ortokeratinizasyon ya da parakeratinizasyon şeklinde olabilir. Ortokeratinizasyonda st korneum tabakasında hücrelerin tamamı çekirdeksizdir ve bu hücreler lameller şeklinde birbirinin üzerine yığılmış durumdadır. Parakeratinizasyonda ise hücreler piknotik çekirdek ve sitoplazmik organellerin kalıntılarını içerirler. Genellikle bölgeye gelen kronik travma sonucu keratin yapımında artış olur ve histolojik olarak hiperkeratinizasyon tablosu gelişebilir. Uyarılar kimyasal ya da termik olabilir

fakat genellikle mekanik irritasyonlardır. Keratinin kolayca su absorbe etmesiyle ağızda mat beyaz bir görüntü oluşur (3).

2.5. Lökoplaki

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) oral lökoplakiyi ‘klinik ya da patolojik olarak nedeni başka bir hastalık ile açıklanamayan hiperkeratotik beyaz plak’ olarak tanımlamaktadır (4). Genellikle semptom oluşturmazlar ve silindiginde mukozadan uzaklaşmazlar. Oral lökoplakinin dünya nüfusunun yaklaşık %2’sini etkilediği bildirilmiştir (5). Lökoplaki tamamen klinik bir terimdir, histopatolojik doku değişikliğini belirtmez ve DSÖ bu lezyonların prekanseröz lezyon sınıfında olduğunu belirtmiştir.

Lökoplaki etyolojisi kesin değildir. Etiyolojisinde sigaranın ve diğer tütün maddelerinin büyük rol oynadığı bilinmektedir. Bunun yanısıra alkol kullanımı, radyasyon, mikroorganizmalar, mekanik irritasyon, okluzal travma, parafonksiyonel hareketler (yanak ısırma gibi), A vitamini ve Fe eksikliği, Candida albicans ve human papilloma virüs enfeksiyonu gibi etkenler de hastalığın gelişiminde rol oynayabilirler (5).

Lökoplaki oral ve orafarengeal kavitenin bütün bölümlerinde görülebilir. En çok görüldüğü bölgeler dudak vermillonu, yanak mukozası, dilin laterali, ağız tabanı ve dişetidir. Farklı çalışmalarda lökoplaki biyopsilerinin %5-25 aralığında displazi ile ilişkili olduğu; malign dönüşüm oranının ise %1-28 aralığında, ortalama %4 olduğu rapor edilmiştir. Genellikle tanıdan 2-4 yıl sonra malign değişim olduğu belirtilmiş ancak aylar içinde ya da daha uzun yıllar sonra da dönüşüm olabilmektedir (6-9).

Lökoplakiler klinik olarak homojen tipte ya da homojen olmayan tipte bulunabilirler.

2.5.1. Homojen lökoplakiler

Erken ve hafif Őiddette lezyonlar genellikle yüzeyden hafif kalkık gri ya da gri-beyaz sınır belirginliği olan beyaz plaklar halindedir. Hafif dereceli lezyonlar displazi göstermez, kendiliğinden kaybolurlar ya da lezyonda zamanla herhangi bir değişiklik görülmez. Ancak sigara kullanımı gibi tetikleyici etkene maruziyet devam ederse lezyon daha kalınlaŐabilir. Bu safhada lezyon homojen lökoplaki adını alır. Bu lezyonların yaklaşık üçte biri geriler ya da ortadan kalkar ancak geri kalan kısmında lezyon daha ciddi bir hal alabilir (5).

Homojen lökoplakiler düzgün yüzeyli, ince beyaz plaklar halindedir ve  evre doku ile arasında klinik olarak sınır belirginliği vardır.

2.5.2. Homojen olmayan lökoplakiler

Lökoplakiler beyaz-kırmızı renkte (eritroplaki), girintili çıkıntılı (verrüköz) ya da nodular yüzeyle sahip olabilirler.

Eritrol koplaki beyaz lezyonun çevresinde ya da kenarında belirgin olarak eritem ve eroziv alanların göze  arpıtığı tablodur. Genellikle yanma, ağrı gibi semptomlar oluşur ve yaŐlılarda görülür. Tanı koyulduğunda çoğunlukla erken invaziv oral kanser ile ilişkili olabilmektedir (10).

Verrüköz lökoplaki homojen olmayan l koplakilere bir diğer örnektir. Verrüköz lökoplaki uniform beyaz bir lezyon olmasına rağmen kendine özgü girintili çıkıntılı yüzey yapısı ile homojen l koplakilerden ayırt edilebilir. Histolojik olarak genellikle deĐiŐik derecelerde displazik değişiklikler bulunur. Verrüköz lökoplakinin klinik olarak verrüköz karsinomadan ayırt edilebilmesi genellikle mümkün olmaz. Bunun yanısıra verrüköz karsinomaya dönüşme ihtimali de vardır. Ackerman tümörü olarak adlandırılan bu tip karsinomalar infiltratif olmakla beraber ekspansif olarak da geliŐir.

Nodüler lökoplaki genellikle sınır belirginliği olan tabanı eritemli küçük kabartılar (nodüller) halindeki lökoplakilerdir. Tek başına ya da herhangi bir lökoplakinin bir bölgesinde oluşabilir.

Lökoplakilerde mikroskobik olarak yüzey epitelinde st korneum tabakasında kalınlaşma (hiperkeratozis) ve/veya st spinozum tabakasında kalınlaşma (akantozis) vardır. Sıklıkla bağ dokusunda kronik iltihabi hücrelere rastlanır. Keratin tabakası ortokeratin ya da parakeratin hücreler ya da iki hücre tipini birden içerebilir ve displazi görülebilir. Displazi varlığı ve şiddeti malign dönüşümde en büyük risk faktörüdür.

2.5.3. Lökoplaki Tedavi Yöntemleri

Lökoplaki tedavisinde klasik kitaplarda bildirilen yaklaşımlar öncelikle sigara, travma gibi olası etyolojik faktörler ortadan kaldırılması ve lezyonun gerilemesine fırsat vermek için 2-4 hafta beklenilmesidir. Displazi değerlendirmesi yapılması açısından biyopsi alma işlemi bu süreyi aşmamalıdır (5,6).

Lökoplaki semptomları gidermek ve malign transformasyonu önlemek amacıyla tedavi edilir. Yanak mukozası ve dudak gibi bölgelerde displazi mevcut değilse 6 aylık aralıklarla takip edilerek kontrol biyopsileri alınır. En çok uygulanan tedavi yöntemi cerrahi eksizyon ve lazer terapisi. Cerrahi sınırlar literatürde detaylı bir şekilde tartışılmamıştır ancak çoğu klinisyen birkaç milimetre (mm) sağlam sınırı içerecek şekilde eksizyon yapmaktadır. (11) Bu yaklaşım klinik olarak belirlenebilen lökoplakinin çevre epitelinde de hücresel değişikliklerin görülmesi nedeniyle kabul görmektedir. Rekürrens oranı çeşitli çalışmalarda %0-30 aralığında bildirilmiştir. Cerrahi eksizyon dışında uygulanan tedavi yöntemleri; kriyoterapi, lokal ya da sistemik retinoid, bazı ağız gargaraları ve fotodinamik terapidir.

Malign değişim riskine göre diğer oral mukoza prekanseröz lezyonları; proliferatif verrüköz lökoplaki, eritroplaki, oral submüköz fibrozis, aktinik chelitis ve liken planus olarak sayılabilir (11).

2.6. Epitelyal Prekanseröz Lezyonların Histopatolojik Basamakları

Oral epitelyal displazilerden karsinoma gelişimi olabileceği gibi bazı hafif lezyonlar kendiliğinden gerileyebilir. Hiperplazi, hafif ve orta displazide tedavi yaklaşımı 'izle ve bekle' şeklindedir. Şiddetli displazi ve karsinoma in-situ durumunda cerrahi rezeksiyon ya da cerrahi olmayan ablasyon (krioterapi,lazer gibi) tedavileri önerilir. Ancak Kujan ve ark orta dereceli displazi olgularının %46' sında malign transformasyon geliştiğini rapor etmiş ve kendi oluşturdukları ikili derecelendirme sistemi ile bu tür lezyonların düşük riskli ya da yüksek riskli lezyonlar olarak kategorize edilerek tedavi yönteminin belirlenmesi gerektiğini bildirmişlerdir (12).

Displazi gösteren olgularda uygulanması gereken diğer işlemler şöyledir:

- Hastalar tütün ve benzeri madde kullanım alışkanlıklarını bırakması yönünde uyarılmalı
- Kandida enfeksiyonu, demir eksikliği gibi tetikleyici diğer hastalıklar tedavi edilmeli
- Lokal travma yapıcı faktörler (keskin kenarlı dolgular, protezler ,dental kırıklar) ortadan kaldırılmalı,
- Hastanın klinik takibinde lezyondaki renk, şekil, büyüklük gibi değişiklikler göz ardı edilmemeli,
- Displazi çeşidi histolojik olarak tekrar değerlendirilmeli (5)

Oral mukoza prekanseröz lezyonlarının derecelendirilmesinde kullanılan farklı sınıflamalar vardır. Genel olarak histopatolojik olarak bu lezyonlarda invazyon görülmez, epitelde bir miktar kalınlaşma ve hiperkeratinizasyon vardır ancak hiperkeratinizasyonun şiddetinin bir önemi yoktur. Her sınıflamada örneklerin derecelendirilmesi öncelikle epitel tabakalarındaki yapısal değişiklikler göz önüne alınarak yapılmalıdır. DSÖ'nün 2005 yılında yaptığı sınıflamada epitelyal prekanseröz lezyonların 5 histopatolojik basamağı olduğu bildirilmiştir. Bu basamaklar şu şekildedir:

2.6.1. Epitelyal hiperplazi

Hiperplazi hücre sayısında artış demektir. St spinosum tabakasında akantozis şeklinde ve/veya bazal/parabazal tabakada olabilir. Epitel tabakasında atipi olmaksızın düzenli bir kalınlaşma söz konusudur.

2.6.2. Displazi/ Skuamöz İntraepitelyal Neoplazi/ Atipik hiperplazi

Displazi normal dokudan malignensiye dönüşüm sürecindeki farklı basamakların morfolojik fenotipi olarak tanımlanabilir (12). İnsanda prekanseröz lezyon sınıflamasında en ayrıntılı çalışmalar kadın genital serviks epitelinde yapılmıştır (13). Genital serviks epitelindeki prekanseröz değişiklikler servikal intraepitelyal neoplazi (SİN) olarak adlandırılmış ve SİN I; hafif displazi, SİN II; orta displazi ve SİN III; şiddetli displazi, karsinoma in-situ olacak şekilde derecelendirme yapılmıştır (14). SİN sınıflaması oral epitelyal displazilerin sınıflanmasında kullanılan bir yöntemdir. Ancak DSÖ oral potansiyel malignensilerinin malign dönüşümünde bu sınıflamada kullanılan basamakların hepsiyle ilişkili olduğuna dair bir kanıt olmadığını belirtmekte ve bu sınıflamanın bütün dünyada kullanılan displazi sınıflamasının yerine geçebilecek nitelikte olmadığını belirtmiştir. Prekanseröz lezyonların sınıflamasında kullanılan diğer bir yöntem de Ljubljana sınıflamasıdır. Ljubljana sınıflaması larengeal patologlar tarafından geliştirilmiştir. Bu sınıflamada displazi terimi kullanılmaz; atipik hiperplazi terimi kullanılır ancak bu sınıflama da oral prekanseröz lezyonların sınıflamasında yaygın olarak kullanılmamaktadır. (Tablo 2.1)

Tablo 2.1: DSÖ displazi sınıflaması, SİN ve Ljubljana sistemlerinin karşılaştırılması

Klasik Oral Sistem (DSÖ, 2005)	Skuamöz İntraepitelyal Neoplazi (SİN)	Ljubljana sistemi
Hiperplazi		Basit hiperplazi
Hafif displazi	SİN 1	Bazal/Parabazal hiperplazi
Orta displazi	SİN 2	Atipik hiperplazi
Şiddetli displazi	SİN 3	
Karsinoma in-situ		Karsinoma in-situ

Oral epitelyal displazi sınıflaması genital serviks epitelinde oluşturulana benzer şekilde ilk olarak Smith-Pindborg tarafından yapılmış ve daha sonra Katz tarafından modifiye edilmiştir (15,16). Bu derecelendirmede lezyonlar displazi yok, hafif veya belirgin displazi var şeklinde sınıflanmıştır ancak daha sonra bu sistemlerin yetersiz kaldığı görülmüştür. Günümüzde en yaygın olarak kullanılan oral epitelyal displazi sınıflaması DSÖ'nün oluşturduğu epitel tabakalarında bir takım yapısal ve hücrel değişikliklerin kriter alındığı sınıflamadır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2: DSÖ epitelyal displazi değerlendirilmesinde göz önünde bulundurulan yapısal ve hücrel değişiklikler

	Yapısal Kriterler	Hücrel Kriterler
1	Epitelde düzensiz tabakalaşma	Anormal büyüklükte çekirdekler
2	Bazal hücrelerde polarite kaybı	Anormal şekilde çekirdekler
3	Damla şeklinde rete çıkıntıları	Anormal boyutta hücreler
4	Artmış sayıda mitotik şekillenmeler	Anormal şekilde hücreler
5	Anormal superfisiyel mitozlar	Çekirdek-sitoplazma oranında artma
6	Tek hücrede premature keratinizasyon	Çekirdek boyutunda artma
7	Reteler arasında keratin inciler	Atipik mitotik şekillenmeler
8	Bazal hücre hiperplazisi	Çekirdekçik sayısı ve boyutunda artış
9		Hiperkromatizm

Bu kriterlere göre oral epitelyal displazi derecelendirmesi şöyledir:

Hafif displazi: Genel olarak yapısal bozukluk epitel tabakasının üçte birlik kısmı ile sınırlı olması ve buna hücrel atipinin eşlik etmesi hafif displazik değişiklik olarak düşünülür.

Orta seviyeli displazi: Bu kategorideki displazi için gereken başlıca kriter epitelin orta üçlüsüne kadar uzanan yapısal bozulma olmasıdır. Ancak hücrel atipi şiddeti ile derecelendirme artabilir.

Şiddetli displazi: Yapısal bozulmaya eşlik eden hücrel atipi epitel tabakasının 2/3'ünden fazlasına uzanmışsa şiddetli displazi varlığından söz edilir.

Ancak daha önce de bahsedildiği gibi orta 1/3' lüğe uzanan yapısal bozulmaya anlamlı bir hücrel atipi eşlik etmişse bu durumda da displazinin derecesi orta seviyeden şiddetli seviyeye yükselir.

Karsinoma in-situ: Teorik olarak karsinoma in situ durumunda malign transformasyon bulunurken invazyon henüz gerçekleşmemiştir. Morfolojik olarak bunu fark etmek mümkün değildir. Karsinoma in situ tanısı için gereken kriterler; belirgin hücrel atipi ile hemen hemen bütün epitel tabakasında yapısal anormalliktir. Atipik mitotik şekillenmeler ve anormal yüzeyel mitoz genellikle karsinoma in situ geliştiğinde görülür (4).

Kujan ve ark DSÖ'nün belirlediği kriterleri kullanarak prekanseröz lezyonları malignensiye dönüşüm açısından düşük riskli/ yüksek riskli olarak sınıflamışlardır. Bu sınıflamada en az dört yapısal değişiklik ve beş hücrel değişiklik içeren lezyonlar yüksek riskli olarak; dört yapısal değişiklikten ya da beş hücrel değişiklikten az değişiklik içeren lezyonlar ise düşük riskli olarak değerlendirilmiştir. Kujan ve ark retrospektif çalışmalarında 96 adet örneği incelemişler ve örnekleri hem DSÖ oral epitelyal displazi sınıflaması hem de ikili derecelendirmeye göre sınıflamışlardır. Örneklerin takip biyopsilerini de inceleyerek malign değişim oranı ve kullanılan sınıflamaların bu değişimi tahmin oranları belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarında ikili derecelendirme sisteminin malign transformasyon riskinin belirlenmesinde yüksek sensitivite (%85) ve spesifiteye (%80) sahip olduğu gösterilmiştir. Düşük riskli lezyonların DSÖ sınıflamasında hiperplazi ve düşük dereceli displaziler olduğu, yüksek riskli lezyonların ise yüksek dereceli displazi ile karsinoma in situ içeren lezyonlar olduğu görülmüştür. DSÖ sınıflamasına göre orta seviyeli displazi içeren olguların %46'sı yüksek risk kategorisinde değerlendirilmiş ve bu örneklerden %87.5'inde malign dönüşüm gerçekleşmiştir. Bu nedenle ikili derecelendirme sisteminin bir avantajı orta seviyeli displazi olarak değerlendirilen örneklerin yüksek riskli ya da düşük riskli olarak ayrımının yapılması ve buna göre tedavi yaklaşımının belirlenmesidir (17).

Bu sınıflamanın DSÖ displazi sınıflamasına göre diğer bir avantajı prekanseröz lezyonların derecelendirilmesinin iki seçeneğe indirilmesi ile patologlar arasında görüş birliğinin sağlanma olanağının artmasıdır.

2.7. Yassı Hücreli Karsinoma

Oral yassı hücreli karsinoma (YHK) tüm dünyada en sık görülen kanser türleri arasında sekizinci sırada yer alır. Gelişmekte olan ülkelerde bu sıra üçüncülüğe kadar yükselmektedir. Hastaların %60'tan fazlasında hastalık ileri evrede iken teşhis koyulabildiği ve beş yıllık sağkalım oranının yaklaşık %56 olduğu bildirilmiştir (18,19). Erkeklerde görülme oranı kadınlardakinden fazladır. YHK genellikle orta ve ileri yaşlarda gelişmekle beraber her yaş grubunda görülebilir. Hastalığın prevalansında etkili olan faktörler sigara ve alkol kullanımı, diyet alışkanlığı, düşük sosyal statü ve zayıf oral hijyendir. Bunun yanı sıra bazı viruslerin (human papilloma virüs ve Epstein-Barr virus) ve diğer kanser türlerinde olduğu gibi genetik yatkınlığın da rol oynadığı bildirilmiştir. Pek çok oral YHK'nın özellikle lökoplaki gibi bir prekanseröz lezyonla ilişkili ya da bu lezyonların malign değişime uğraması ile geliştiği bilinmektedir. Ağız içinde en sık posterolateral ya da ventral dil bölgelerinde geliştiği bildirilmiştir (20). Diğer görüldüğü bölgeler ağız tabanı, yumuşak damak, dişeti, yanak, dudak ve sert damaktır.

YHK şu klinik özelliklerde görülebilir;

- Ekzofitik (Kitle şeklinde, papiller, verrukoform)
- Endofitik (İnvazif, ülser, oyuk şeklinde)
- Lökoplaki benzeri (Beyaz yama şeklinde)
- Eritroplaki benzeri (Kırmızı yama şeklinde)
- Eritrolökoplaki benzeri (Kırmızı-beyaz görüntüde)

YHK ağrı, kanama, dil hareketinde kısıtlılık, disfaji, parestezi veya servikal lenf nodu tutulumu şeklinde klinik bulgular verebilmektedir.

YHK histopatolojik olarak bazal membran ve subepitelyal bağ dokusuna doğru düzensiz bir şekilde epitel hücrelerinin çoğalmasıyla karakterizedir. Bu hücre toplulukları büyüdükçe daha derin dokularda, yağ dokusu, kas ve kemik dokusu gibi dokularda yıkıma yol açarlar. Damarlarda yıkım yaparak kan ve lenf yoluyla metastaz gelişebilir. Lezyon epitelinin yeni küçük kan damar yapım kapasitesi (anjiogenezis) yüksektir. Keratin yassı epitelin normal ürünüdür ve lezyon epiteli tarafından inci tanecikleri şeklinde keratin yapımı vardır ve hatta tek bir hücreden bile bireysel keratinizasyon gelişebilmektedir.

2.7.1. Yassı Hücreli Karsinoma Tedavisi

Oral YHK' larının tedavi planlamasında hastalığın derecesi ve tümörün lokalizasyonu önemlidir. Primer tedavisi geniş cerrahi rezeksiyondur. Cerrahi tümörün patolojik karakterine göre radyoterapi ve/veya kemoterapi takip edebilir. Cerrahi sınırların negatif olduğu erken evre karsinomalarda (I. ve II. evre) radyoterapinin faydalı olacağı düşünülmezken ; III - IV. evre, cerrahi sınırın pozitif olduğu ya da bir ya da daha fazla ekstrakapsüller yayılımı olan lenf nodu tutulumlu tümörler yüksek rekürrens riskli kabul edilir ve cerrahi takiben radyoterapi ya da kemoradyoterapi önerilir (21). Kemoterapi genellikle radyoterapiyle beraber, kemoradyasyon öncesi başlangıç tedavisinde ya da palyatif tedavi olarak uygulanabilir. Bunun yanısıra son 30 yıllık süreçte özellikle larenks ve orofarenks karsinomalarında 'organ koruma' amaçlı sadece kemoterapi ve radyoterapinin uygulandığı tedavi yaklaşımları bulunmaktadır. Primer kemoradyoterapinin sağkalım oranları %29-66 gibi çok geniş bir aralıkta bildirilmiştir (22).

Sık kullanılan kemoteröpatik ilaçlar; platinyum içeren birleşenler (cisplatin, carboplatin), 5-fluorouracil ve taxanlardır(paclitaxel, docetaxel). Bununla beraber pek çok ilacın; retinoid asit, garcinol, etodolak, yeşil çay polifenolleri, protokatekuik asit, troglitazon, nimesulide, YHK gelişim riskini azaltabileceği ve tedavisinde etkili olabileceği üzerine hayvan deneyleri ve hücre kültürü çalışmaları bulunmaktadır (23).

2.8. β -Adrenerjik Reseptör Blokerleri

β -bloker ilaçlar adrenerjik transmitterin beta adrenerjik reseptörler üzerindeki etkisini önleyen ilaçlardır. Beta reseptörler β -1 ve β -2 olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Propranolol, timolol, pindolol ve metaprolol beta adrenerjik reseptör blokeri ilaçlara örnektir (24).

Propranolol hem β -1 hem de β -2 reseptörleri bloke eden, selektif olmayan β -adrenerjik reseptör antagonistidir. Plazma renin aktivitesinde azalma, santral sinir sisteminden sempatik uyarı çıkışında azalma, kalp fonksiyonlarında depresyon ve baroreseptör hassasiyetinde değişiklik gibi etkileri nedeniyle propranololun hipertansiyon, anjina ve bazı aritmilerin tedavisinde önemli bir yeri vardır.

Kardiyak hastalıklarda kullanımının yanı sıra anksiyete, hipertiroidizm nedenli taşikardi kontrolünde, esansiyel tremor tedavisinde, migren profilaksisi ve bazı baş ağrısı tiplerinde de kullanılabilir.

Oral propranololün infantil hemanjioma üzerine olan küratif etkisi ilk olarak 2008 yılında Leaute-Labreze tarafından kardiyopulmoner hastalık tedavisi endikasyonu ile kullanılan çocuk hastalarda tesadüfen keşfedilmiştir (25). Daha sonra bu konuda çok sayıda raporda da propranololün farklı organ tutulumu olan infantil hemanjioma tedavisinde kullanımının olumlu sonuçları bildirilmiştir (26-28). Peridis ve ark havayolunun infantil hemanjioma tedavisi ile ilgili yaptıkları meta analizde propranololün diğer tedavi seçeneklerine göre invaziv olmama, lezyonda çabuk gerileme görülmesi, trakeostomi gerektirmemesi, uzun süreli entübasyon gerektirmemesi gibi avantajları nedeniyle ilk basamak tedavi olarak tercih edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir (29).

Propranololün bu tümör üzerine etki mekanizması tam olarak açıklanamasa da vazokonstriksiyon etkisi, VEGF gibi anjiogenetik faktörlerin üretimini baskılaması ve kapiller endotelial hücrelerin apoptozunu arttırması gibi özelliklerinin tedavide etkili olduğu söylenebilir (25,30).

Solid tümörlerin gelişmesi ve metastazında anjiogenezisin önemi çok iyi bilinmektedir. Damarlanma olmadığı durumlarda tümör 1-2 mm çaptan daha fazla büyüyemez. Yeniden damarlanma tümörün perfüzyon yoluyla beslenmesini ve oksijenlenmesini sağlayarak büyümesini uyarır. Ayrıca damarlanmanın tümörün metastazında da çok büyük rolü olduğu da bilinmektedir (31).

Yeni kapiller oluşumu tümör hücrelerinde ve tümörü infiltre eden iltihabi hücrelerden salınan çok sayıda anjiogenik faktörler sayesinde olur. Bu faktörlerden en önemli ikisi VEGF ve bFGF'dir. Tümör hücreleri aynı zamanda anjiogenezisi baskılayan trombospondin-1 gibi antianjiogenik molekülleri uyaran faktörler de üretirler. Esasen tümörün büyümesi bu iki tip faktörler arasındaki denge ile kontrol edilir.

Anjiogenezis tümör gelişiminin erken evrelerinde uyarılmaz ve bu nedenle tümör uzun süre in situ derecesinde ya da küçük boyutlu kalabilir. Anjiogenik faktörlerin yapımında ya da antianjiogenik faktörlerin yıkımında artış yönünde dengenin değişmesi anjiogenezisin artmasına ve tümörün büyümesine ve metastazına yol açar. Bu nedenle tümör tedavisinde vaskularizasyonu baskılamak esas hedeflerden biridir (31).

Meme, nazofarenks, akciğer, prostat, ovarium, pankreas ve kolon kanserlerinin yanı sıra oral kavite yassı hücreli karsinomasının yüzey hücrelerinden üretilen β -adrenerjik reseptörlerin (β AR) normal hücrelerin ürettiğinden fazla olduğu gösterilmiştir. (32-40) Oral kavite ve özafagus YHK salgılanan β AR normal mukozadan salgılananın hemen hemen 4 katıdır. (%76.6 ve %20) (41, 42) Ayrıca β -AR'lerin varlığının YHK'nın ileri safhada olması ve nodal metastazla ilişkili olduğu bilinmektedir (43).

Epinefrin içeren YHK hücrelerinin stimülasyonu; hücre çoğalması ve göçünü tetikler ve bu etkiler β AR antagonistleri ile azaltılabilir. Ketakolaminlerin hücre çoğalmasını hangi mekanizma ile etkilediği tam olarak ortaya koyulamamıştır. Ancak epitelyal büyüme faktörü (EGFR), siklooksijenaz (COX) ve VEGF ile matriks

metalloproteinaz (MMP) oluşumunu arttırıp; kaspaz aktivitesini baskılayarak hücre çoğalmasına neden olabileceği bildirilmiştir.

In vitro çalışmalar β -bloker ilaçların kanser hücresi çoğalması, invazyonu ve apoptozise rezistansını azalttığını göstermiştir (44). Wolter ve ark baş boyun YHK'larının tedavisinde propranololün tek başına, cisplatin ya da gama radyasyonla beraber kullanımının etkinliğini in vitro olarak incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda proanjiojenik proteinlerin ve VEGF üretiminin inhibe olduğunu, apoptozisin arttığını ve YHK hücrelerinin sağkalımının azaldığını göstermişlerdir. Ayrıca propranololün radyasyon tedavisi ve kemoterapinin etkilerini geliştirdiği de bu çalışmanın sonuçlarındandır (45).

2.9. Hayvanlarda Oral Kanser Oluşturma Modelleri

Oral epitelyal tümörler karsinojen etkenlerin indüklediği genetik değişimlerin dokuda birikmesiyle; hiperplazi, displazi, premalign lezyon oluşumu (lökoplaki ve submukozal fibrozis gibi) gibi bir seri histolojik değişikliği takiben oluşmaktadır. Üst solunum yolu epitelyal yüzeyinin aynı karsinojen etkenlere sıklıkla maruz kalabilmesi nedeniyle bu bölgede karsinoma gelişme riskinin fazla olduğu ilk kez 1953 yılında Slaughter ve ark tarafından bildirilmiştir (46).

Hayvan modellerinde oral kanser oluşturmak için pek çok karsinojen ajan üzerinde çalışılmıştır. Kömür katranı, sigara dumanı ve 20 methyl cholonthrene (20MC) bu alanda ilk olarak kullanılan bazı kimyasallardır. Ancak bu kimyasallarla önemli derecede tümör gelişimi sağlanamamıştır (47).

DeneySEL oral karsinogenezis çalışmalarında 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) sıklıkla kullanılan bir karsinojendir. Ancak DMBA ve çözeltisi iltihabi cevap, nekroz ve kabuk oluşumuna neden olan lokal bir irritandır ve bu nedenle erken epitelyal lezyonlarda bu model ile çalışmak zordur (48). Bunun yanı sıra DMBA ile oluşturulan hamster yanak kesesi tümörleri YHK'nın histolojik özelliklerinden farklılık gösterir ve insandaki lezyonlara tam olarak benzememektedir (49, 50).

4 nitroquinoline 1-oxide (4NQO) sentetik, suda çözülebilen bir karsinojendir. İlk olarak Wallenius ve Leckholm 1973 yılında suda çözdükleri 4NQO ile damakta epitelyal displazi ve takibinde YHK oluştuğunu göstermişlerdir.(51) 4NQO ile rat modellerinde DMBA ile oluşturulandan daha iyi bir karsinogenezis modeli elde edilebilmektedir. 4NQO quinolineden türetilmiştir ve etkileri ilk olarak 1957 yılında Nakahara ve ark tarafından gözlemlenmiştir. Bu kimyasal başlangıçta kemoteröpatik ilaç olarak geliştirilmesi planlanmıştır ancak ilacın cilt kanseri oluşumuna yol açtığı görülmüştür (52). Daha sonra fare ve ratlarda oral kanser oluşturmak amacıyla kullanılmaya başlanmıştır.

2.10. İnsanda Oral Karsinogenezis Süreci ve 4NQO Hayvan Modelleri

İnsan ve rat ağız mukozası arasında çok sayıda benzerlik bulunur. Normal rat sert damak ve dil mukozası ortokeratinize, çizgili yassı epitel hücrelerinden oluşur. Epitel bazal tabaka ,st spinosum, st granulosum ve ortokeratinize tabaka içermesiyle insan oral mukoza epiteline çok benzer. İnsan ve rat ağız mukozası displazisinin benzerliğini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada 4NQO uygulanan rat mukozası ile insan displastik doku örnekleri elde edilmiştir ve 4NQO ile oluşturulan deneysel premalign aşamaların insandakiyle çok benzediğini göstermiştir (48).

2.10.1. 4NQO ve Doku Seçiciliği

4NQO, oral yolla ya da topikal uygulamayla başta dorsal ve ventral dil olmak üzere damak ve özafagusu içeren gastrointestinal sistem organlarında karsinoma oluşturmak için sıklıkla kullanılmaktadır (51, 53). Subkutanöz enjeksiyon yoluyla akciğer kanseri oluşumu için de kullanılabilir (54).

4NQO'nun ratlarda güçlü bir hücre içi oksidatif stres ve kromozomal hasar oluşturduğu gösterilmiştir. 4NQO redoks siklusüne girerek superoksit ya da hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen ürünlerinin oluşmasına neden olur. 4NQO'nun karsinojenik etkisi nitro grubunun enzimatik redüksiyonu ile başlatılır. 4NQO; NADH (nitroreduktaz) ve NAD(P)H (quinone redüktaz) ile 4HAQO'e (4-hydroxyaminoquinoline-1 oxide) indirgenir ve etkin hale gelir. 4NQO redüktaz

enzimi diaphorase olarak da adlandırılır ve 4NQO'ya duyarlılıktan sorumlu enzimdir. Bu karsinogenezis modelinde YHK gelişme oranının özellikle dilde yüksek olması diaphorase enzim miktarının dil mukozasında yüksek olmasıyla ilişkilendirilebilir (55). Bakterilerde 4NQO'nun baz çiftleri (GC-AT) arasında değişime yol açtığı ve delesyon mutasyonlarına neden olduğu gösterilmiştir (56). 4NQO birçok organizmada potent bir karsinojendir ancak içme suyu ile karıştırıldığında spesifik olarak dilde YHK'ı indüklemektedir (57).

2.10.2. 4NQO Hayvan Modelinin Kullanım Alanları

4NQO insan ağız kanserleri gelişim aşamalarında artan ya da azalan biomarkerlar üzerinde çalışmalar yapmak amacıyla geliştirilmiş; apoptozis, hücre döngüsü, hücre-hücre sinyal mekanizması gibi yollarda rol oynayan biomoleküllerin YHK 'nın gelişiminin çeşitli aşamalarında nasıl değişime uğradığını belirleyebilmek için birçok çalışmada bu kanser modeli kullanılmıştır (58). Bu moleküller oral kanserlerin erken teşhisinde ve hangi prekanseröz lezyonun karsinomaya dönüşme riskinin yüksek olduğunun tespit edilmesine olanak sağlamaları açısından önemlilerdir.

Kimyasal korunma ile karsinoma oluşumunun geciktirilmesi üzerine 4NQO ile oluşturulan model kullanılarak birçok araştırma yapılmıştır. Çeşitli dozlarda ve uygulama sürelerinde 4NQO ile oluşturulan karsinogenezis modellerinde retinoid asit, garsinol, etodolak, yeşil çay polifenollerini, protocatechuic asit, troglitazon, capsaicin, rotenone, silymarin, garlic, nimesulide, sığırlaktoferrini, flavonoid morin, ferulik asit gibi pek çok kimyasal ajanın koruyucu etkisi araştırılmıştır (58).

2.10.3. 4NQO'nun Kullanım Yolları, Dozu ve Süresi

4NQO suda çözülebilen bir madde olması nedeniyle çalışmaların çoğunda fare ya da farklı türde sıçanların içme suyuna karıştırılarak kullanılmıştır (51, 59-61). Bazı çalışmalarda ise dil yada damak yüzeyine fırça ile topikal olarak uygulanmıştır (62,63).

Dayan ve ark. çok düşük doz (0.001%) 4NQO'nun ratların içme suyuna katılmasıyla dil mukozasında hiperkeratozis, displazi ve YHK oluşumu gibi çeşitli seviyelerde kliniko-patolojik lezyonların indüklenebildiğini göstermişlerdir (64).

Literatürde 4NQO'nun 20 ile 200 ppm arasında değişen dozlarda 8-32 hafta gibi farklı sürelerde uygulanarak oluşturulan karsinogenezis modellerini içeren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda en sık uygulanan doz 50 ppm' dir (58).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Denepleri Etik Kurulu tarafından 1.4.2014 tarihinde 13/24 nolu araştırma projesi olarak onaylanmıştır ve erişkin, ortalama 350 gram ağırlığında Sprague Dawley (SD) cinsi erkek ratlarda yapılmıştır.

3.1. Denek Sayısının Belirlenmesi

Bu çalışmada gruplar için gereken minimum denek sayısının istatistiksel olarak belirlenmesinde El-Rouby 'nın çalışması referans alınmıştır (65). NCSS & PASS 2000 (NCSS LLC., Kaysville, Utah, USA) istatistik paket programı kullanılmış, %90 güç ve %5 yanılma düzeyinde istatistiksel olarak önemi test edebilmek için grupların her birine en az 9'ar olmak üzere toplam 27 adet denek gerektiği görülmüştür.

3.2. Karsinogenezisin İndüksiyonu ve Propranololun Uygulanması

Tüm hayvanlar yemek ve su için çıkışı olan sıcaklık/ nem kontrollü (22 santigrat derece, %60-%5 nem oranında) kafeslerde tutulmuştur. Bir haftalık ortama alışma süresinden sonra hayvanlar rastgele 3 gruba ayrılmıştır.

1.Grup (9 rat): 50 ppm 4NQO (Sigma Aldrich,St Louis,USA) içme suyunda çözülerek uygulanmış ve aynı zamanda 50 mg/kg dozunda propranolol (Dideral,Sanofi Aventis) oral gavaj yoluyla uygulanmıştır. 20. hafta sonunda sakrifikasyon gerçekleştirilmiştir.

2. Grup (9 rat): 50 ppm 4NQO içme suyunda çözülerek 20 hafta süreyle uygulanmıştır. Bu sürecin sonunda 50 mg/kg dozunda propranolol oral gavaj yoluyla uygulanmaya başlanmış ve 14 günlük süreç sonunda sakrifikasyon yapılmıştır.

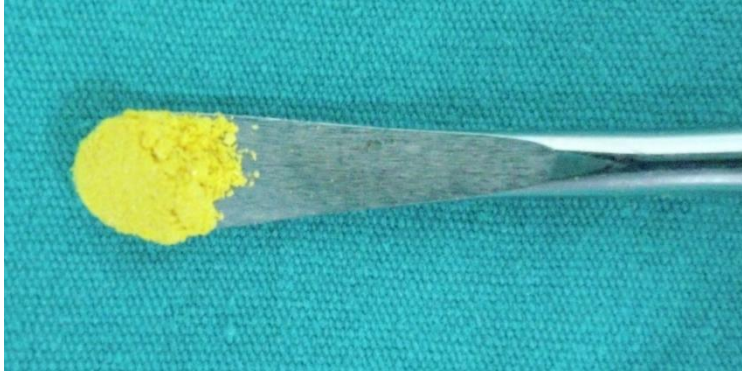
3. Grup (Kontrol grubu 9 rat) : 50 ppm 4NQO içme suyunda çözülerek uygulanmıştır. 20 hafta sonunda hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

İçme suları haftada bir kere taze karışım ile değiştirilmiştir.

3.2.1. 4NQO Sulu Çözeltisinin Hazırlanışı

Ağırlığı yaklaşık 350 gr olan SD cinsi ratın bir haftalık tükettiği su miktarının ortalama 200-250 gr olduğu ve 27 hayvanın bir haftalık süreçte yaklaşık 6000 gr su tükettikleri gözlemlenmiştir. Bu miktarın 50 ppm'lik oranının 0,3 gr/hafta olduğu hesaplanmıştır. 0,3 gr 4NQO maddesi hassas terazide ölçülerek suda homojen olarak çözülmesi sağlanana kadar (7-8 dk) santrifüje edilmiştir (Şekil 3.1). Daha sonra bu çözelti 500 gr'lık su kaplarına paylaştırılmıştır.

4NQO maddesi saklama koşullarına uygun olarak -20 santigrat derecede ışık geçirmeyen kutusunda muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1: 4NQO sarı renkli toz halinde bir madde olup karsinojenik etkisi ultraviyole ışını ile azalmaktadır

3.2.2. Propranololun Uygulanışı

Ortalama 350 gr, 9 adet rata uygulanması planlanan propranolol miktarının (Dideral, Sanofi Aventis) toplamda yaklaşık 160 mg/gün olduğu hesaplanmıştır. Buna göre 4 tablet/gün dideral toz haline getirilip bir miktar suda çözülerek her bir rata oral gavaj yoluyla eşit miktarda uygulanmıştır.

Deney süreleri sonunda intraperitoneal yüksek doz ketamine/xylazin enjeksiyonu ile sakrifikasyon yapılmıştır.

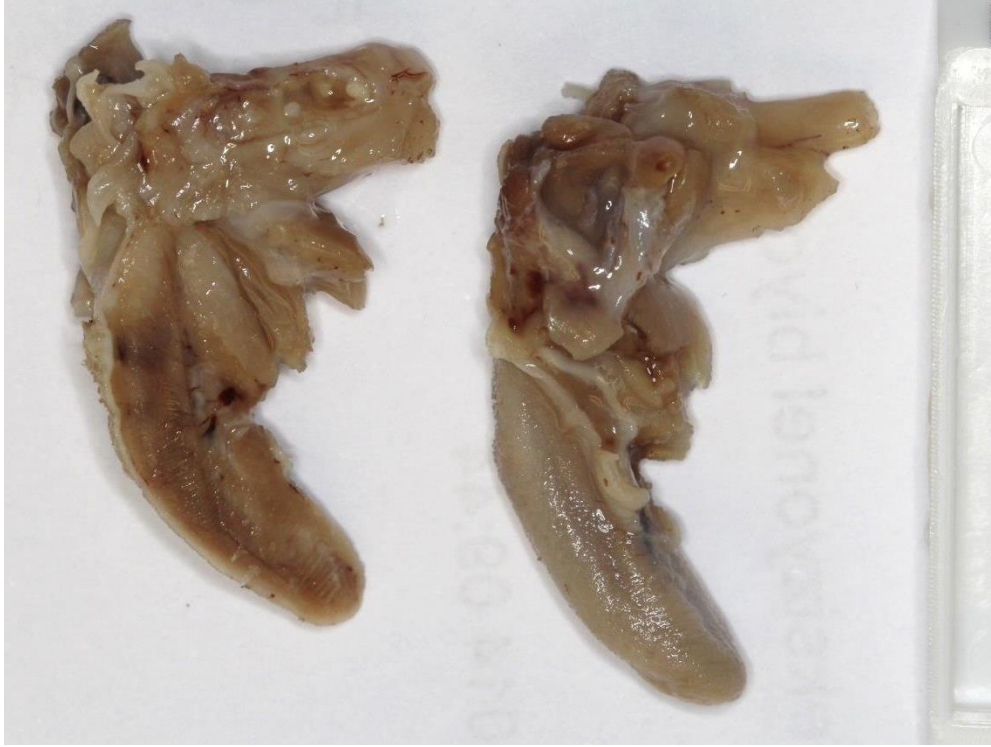
Dil ve dil kökleri bütün halde eksize edilerek makroskopik olarak belirlenen lezyonların şekli, rengi ve bölgesi incelenmiş ve beyaz plak oluşumu, papiller lezyon ve tümör oluşumu kategorileri kaydedilmiştir (Şekil 3.2, 3.3).



Şekil 3.2. ve Şekil 3.3: Bilateral olarak kommissuralar hizasından yapılan kesiler yardımıyla dilin tamamen açığa çıkarılıp eksize edilmesi

3.3. Histopatolojik Değerlendirme

Örnekler %10 buffered formalin solusyonunda fikse edilmiş, uzunlamasına ortadan iki parça halinde kesilerek parafine gömülmüştür (Şekil 3.4). Daha sonra uzunlamasına 5µ' luk kesitler alınarak hematoxylin ve eosin ile boyaması yapılmıştır.



Şekil 3.4: Dil örnekleri uzunlamasına iki parçaya kesilerek parafine gömüldü

Dil kesitleri ışık mikroskopu ile normal, hiperplazi/ hiperkeratinizasyon, displazi ve karsinoma oluşumları açısından histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca hiperkeratinizasyon ve vasküler dilatasyon oluşumu Ross ve arkadaşlarının oluşturduğu sistem örnek alınarak puanlanmıştır (66). Buna göre öncelikle deney grupları hakkında bilgisi olmayan iki patolog (Taşlıca ZF, Özdemir H) tarafından kesitlerdeki hiperkeratinizasyonun ve vazodilatasyonun en yoğun olduğu bölgeler tespit edilmiş ve bu değişiklikler hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olmak üzere üç derecede sınıflanmıştır.

Örnekler DSÖ'nün belirlediği oral epitelyal displazi kriterlerini kullanarak ikili derecelendirme sistemi ile düşük riskli ya da yüksek riskli olarak sınıflanmıştır. Ayrıca örnekler DSÖ displazi sınıflamasıyla hafif, orta, şiddetli displazi olarak da kategorize edilmiştir.

3.4. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Veri analizi SPSS (SPSS Inc, Windows, version 11.5 ,Chicago, IL, United States) programı kullanılarak yapılmıştır. Hiperkeratinizasyon ve vazodilatasyon parametrelerinin histopatolojik olarak derecelendirilmesinde gözlemciler arasındaki uyumluluğu belirlemek için kappa katsayısı hesaplanmıştır. Buna göre; kappa<0; gözlemciler arasında uyuma olmadığını, 0-0.20 arasında hafif, 0.21-0.40 arasında orta, 0.41-0.60 arasında ekseriyetle, 0.61-0.80 arası önemli derecede ve 0.81-1 arası neredeyse mükemmel uyumluluk olduğunu göstermektedir.

Hiperkeratinizasyon ve vazodilatasyon parametreleri için Kruskal Wallis testi uygulanmış ve gruplar arasında farklılık istatistiksel olarak anlamlı ya da anlamlı değil şeklinde değerlendirilmiştir. Prekanseroz lezyonların malign transformasyon risklerinin analizi için Likelihood Ratio testi uygulanmıştır ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Olarak Lezyonların Özellikleri

Makroskopik olarak lezyonların hepsinin dil kökünde olduğu ve çoğunun lökoplakiyi andıran beyaz plak ya da papiller/nodüler yüzey özelliğinde olduğu görüldü (Tablo 4.1). Her grupta birer örnekte ülser, ekzofitik ve/veya papiller kitle şeklinde tümöral oluşum tespit edildi (Şekil 4.1- 4.5).

Tablo 4.1: Makroskopik lezyonların gruplar arasında dağılımı

	Grup 1	Grup 2	Grup 3
Beyaz plak	4	4	4
Papiller/nodüler	4	4	4
Lezyon			
Tümöral Oluşum	1	1	1
Toplam örnek	9	9	9



Şekil 4.1. ve Şekil 4.2: Deney süreci sonunda oluşan nodüler lezyonların klinik görüntüleri



Şekil 4.3: 1. Grupta oluşan ülsere, endofitik , yaklaşık 0.6 cm çaplı tümöral yapı



Şekil 4.4: İkinci grupta oluşan çapı yaklaşık 0.9 cm olan tümöral yapı

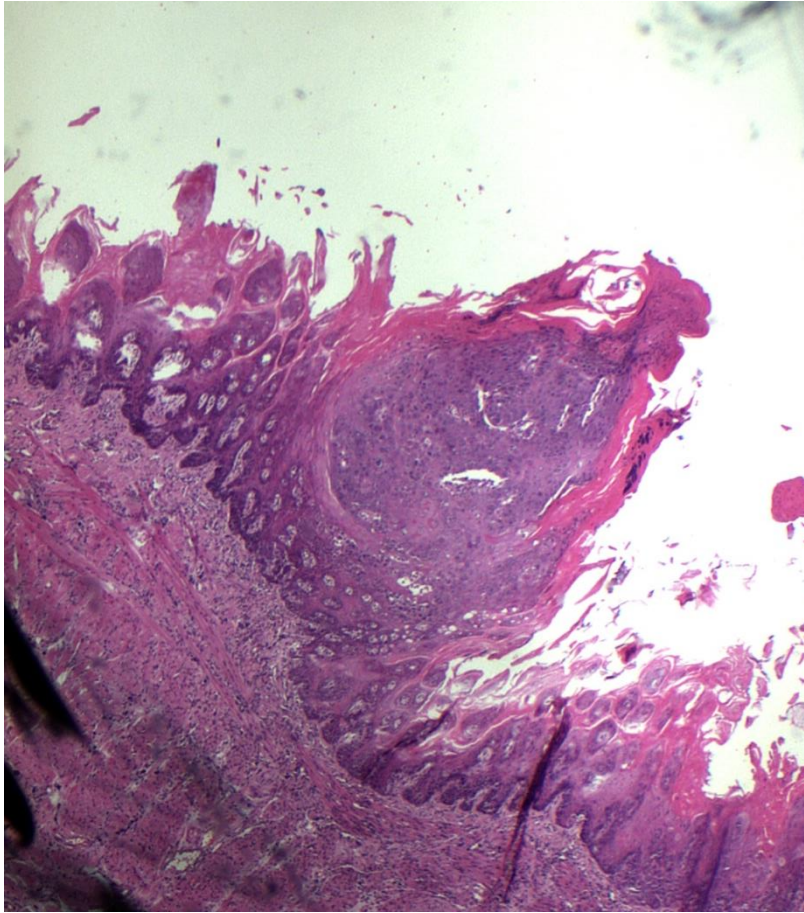


Şekil 4.5: Üçüncü grupta oluşan çapı yaklaşık 1.8 cm olan tümöral yapı

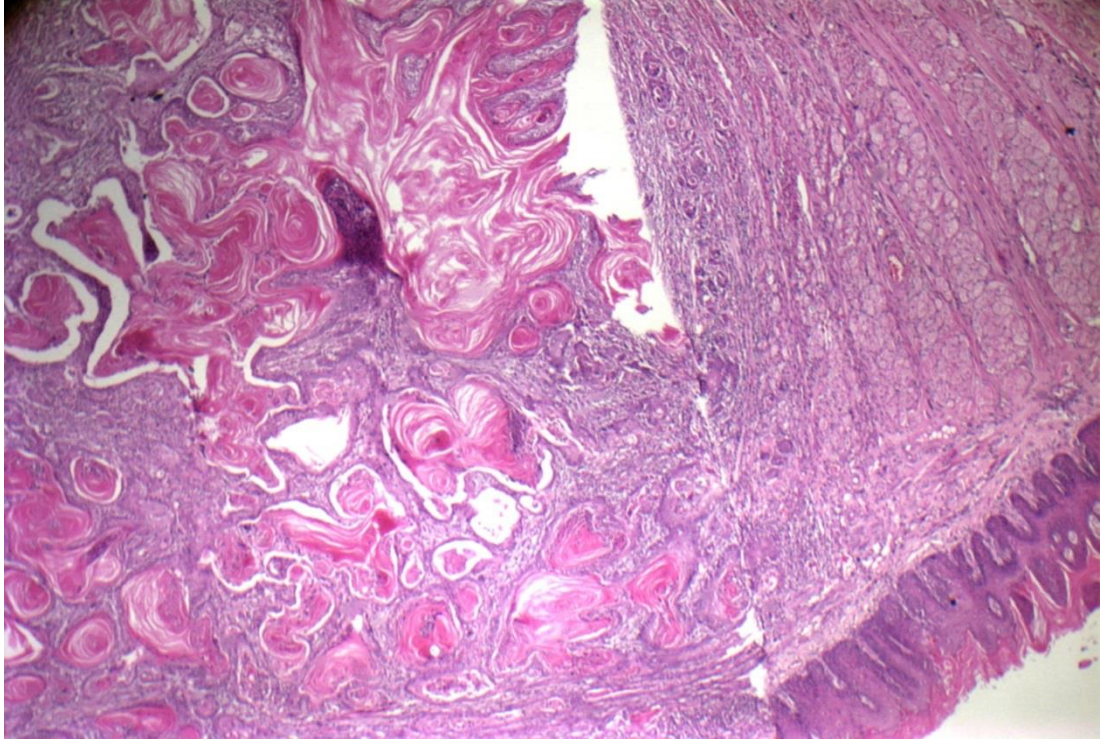
4.2. Histopatolojik Bulgular

Öntanısı YHK olan lezyonların histopatolojik görüntüleri resim 4.6-4.10'da gösterilmektedir. Grup 2 ve 3' te görülen tümöral oluşumların histopatolojik tanısı invaziv YHK iken; grup 1'de yer alan örneğin tanısı karsinoma in-situ şeklindedir.

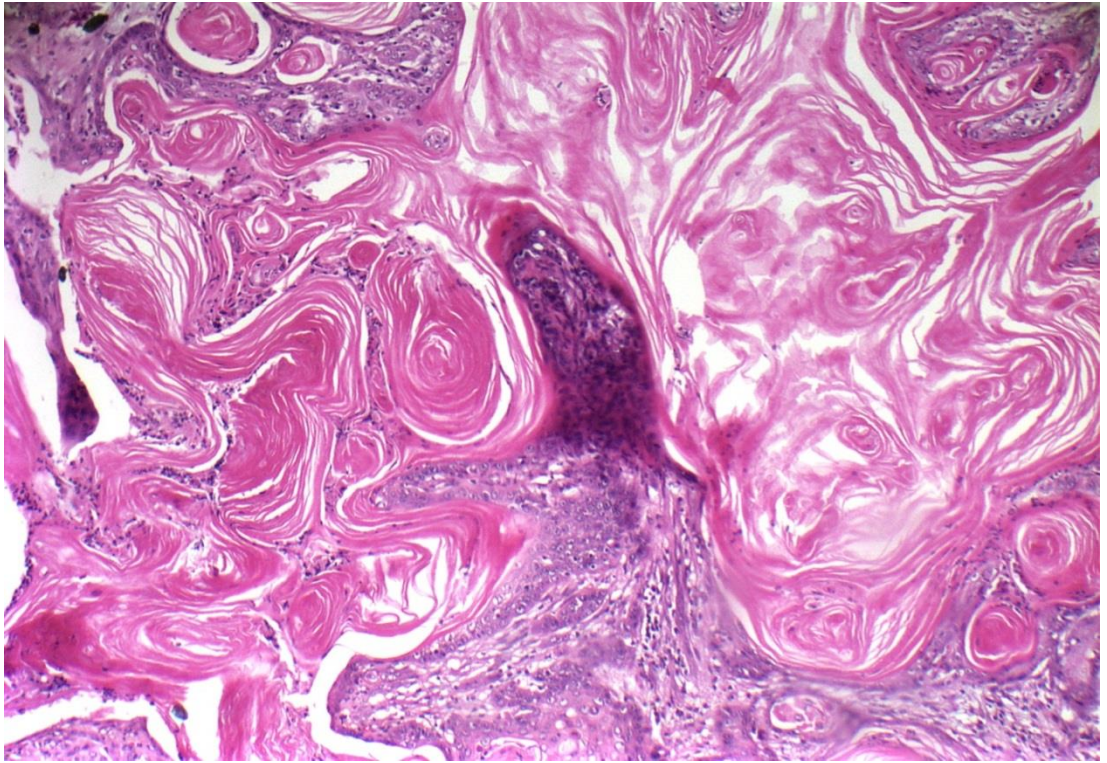
Hiperkeratinizasyon ve vazodilatasyon skorlamasına ait veriler tablo 4.2. ve tablo 4.3'de; iki patoloğun vazodilatasyon ve hiperkeratinizasyon puanlaması ile ilgili örnekler şekil 4.11-4.14' te gösterilmiştir. Lezyonların malign transformasyon riski açısından değerlendirme verileri şekil 4.1'de gösterilmektedir.



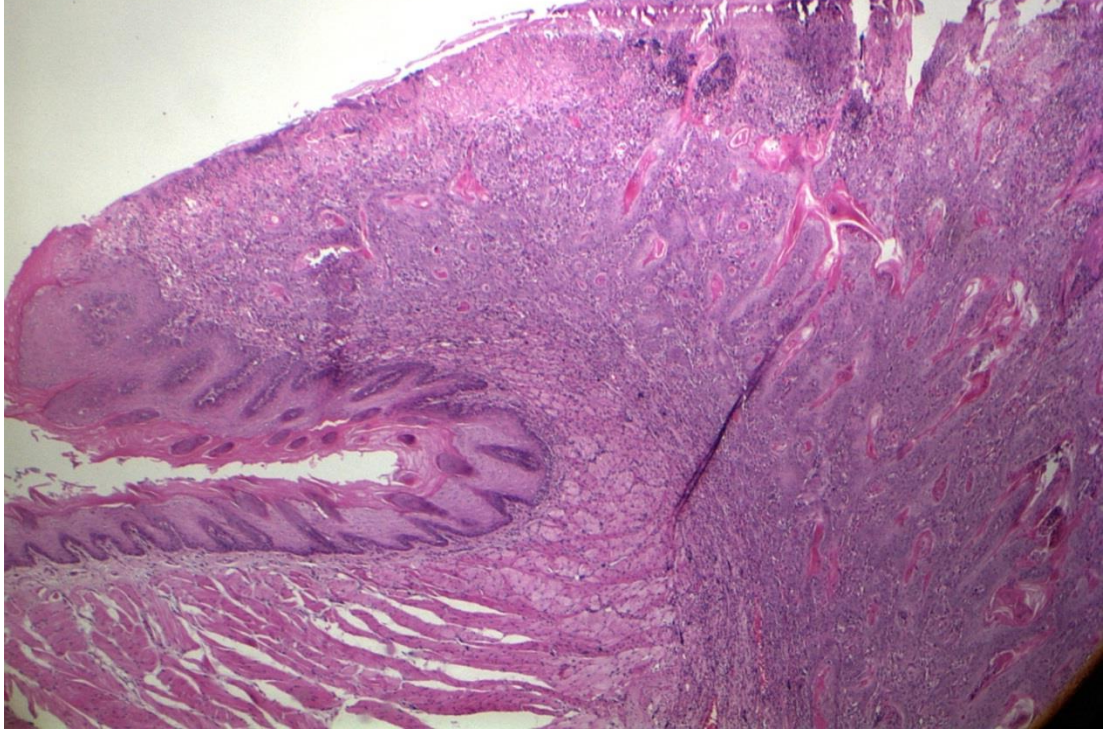
Şekil 4.6: Grup 1 (20 hafta 4NQO+propranolol)' de görülen tümöral oluşumun mikroskopik görüntüsü; anormal yapıda hücresel ve yapısal değişiklikler epitelin bütün tabakalarında bulunmaktadır. Karsinoma in situ tanısı koyulmuştur. (HE ,4x10)



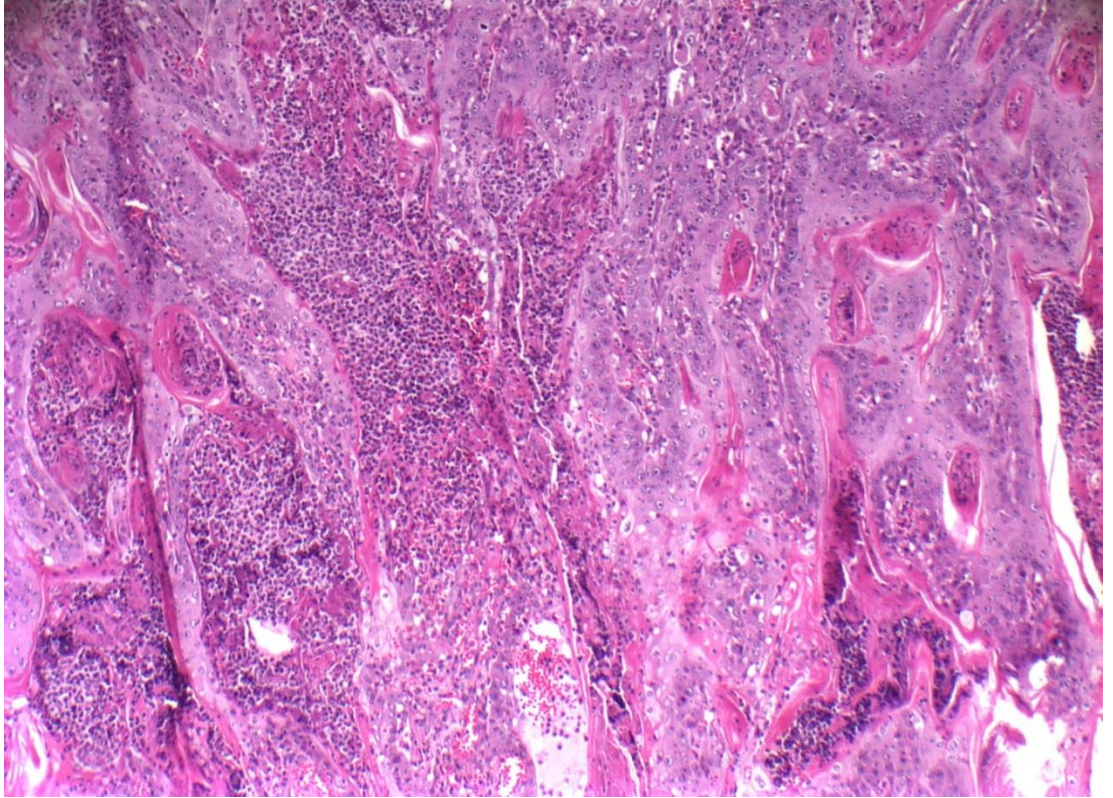
Şekil 4.7: Grup 2 (20 hafta 4NQO+ 2 hafta propranolol) 'de görülen tümöral oluşumun mikroskobik görüntüsü keratin incisi oluşumları gösteren invaziv tümör adacıkları. Tanı yassı hücreli karsinoma (HE, 4X10)



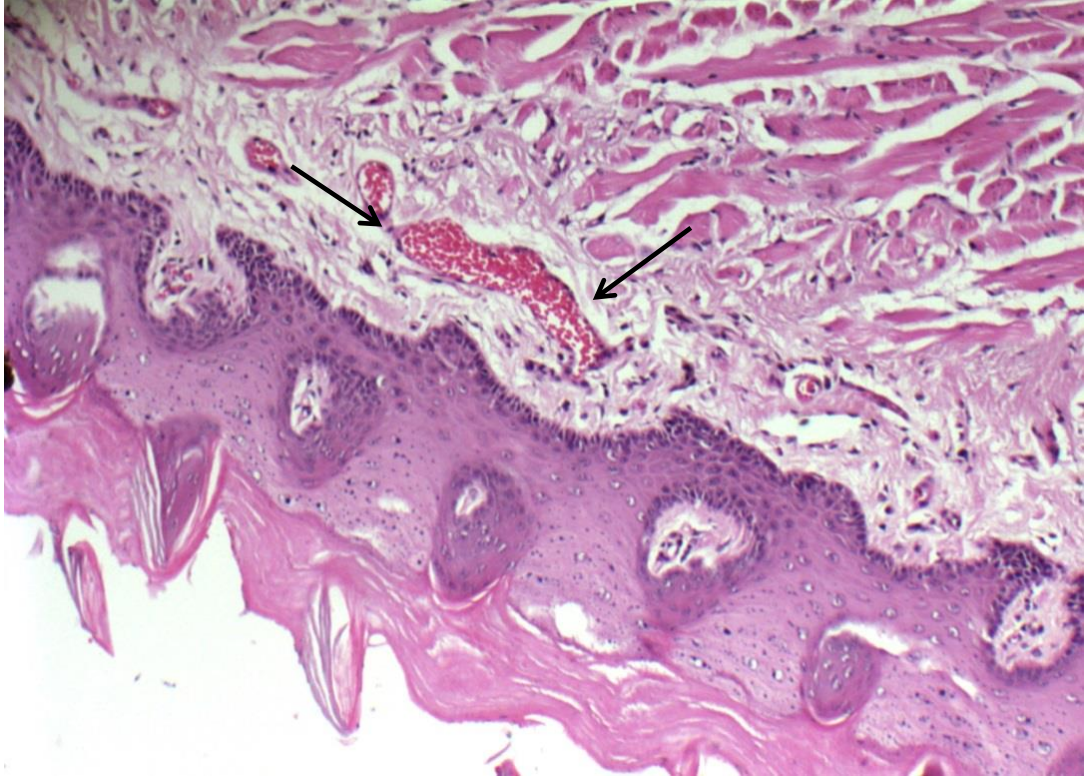
Şekil 4.8: Derin invazyon gösteren keratin incileri (HE, 10X10)



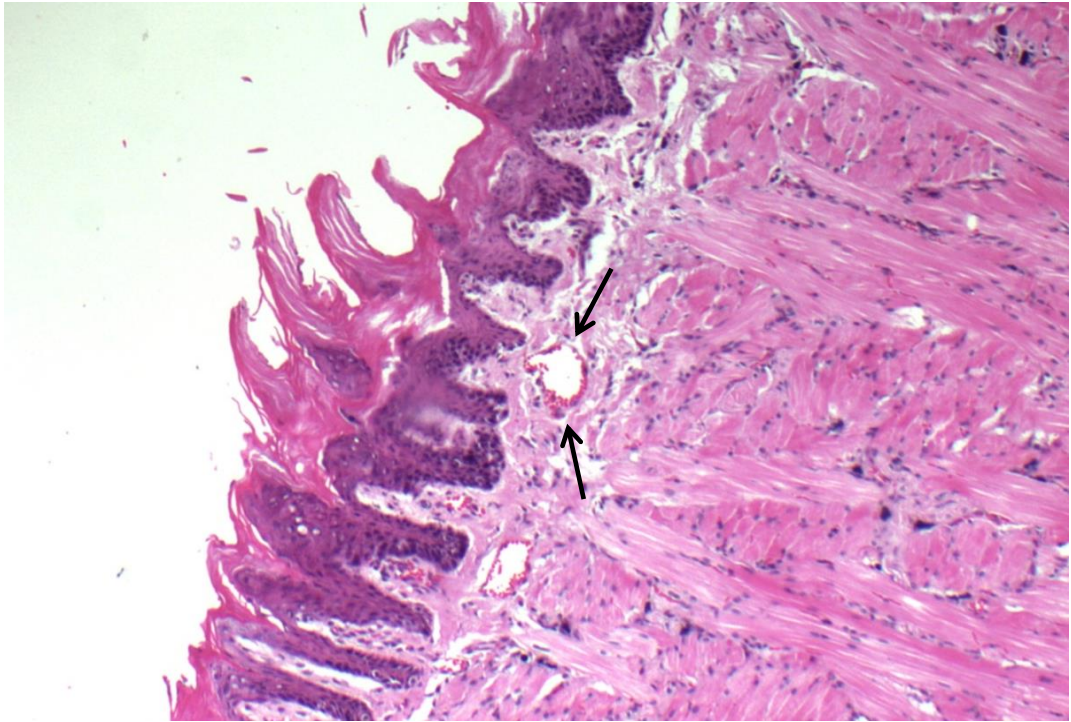
Şekil 4.9: Grup 3 (Kontrol grubu)'da görülen tümöral oluşumun mikroskopik görüntüsü. Tanı, yassı hücreli karsinoma (HE 4X10)



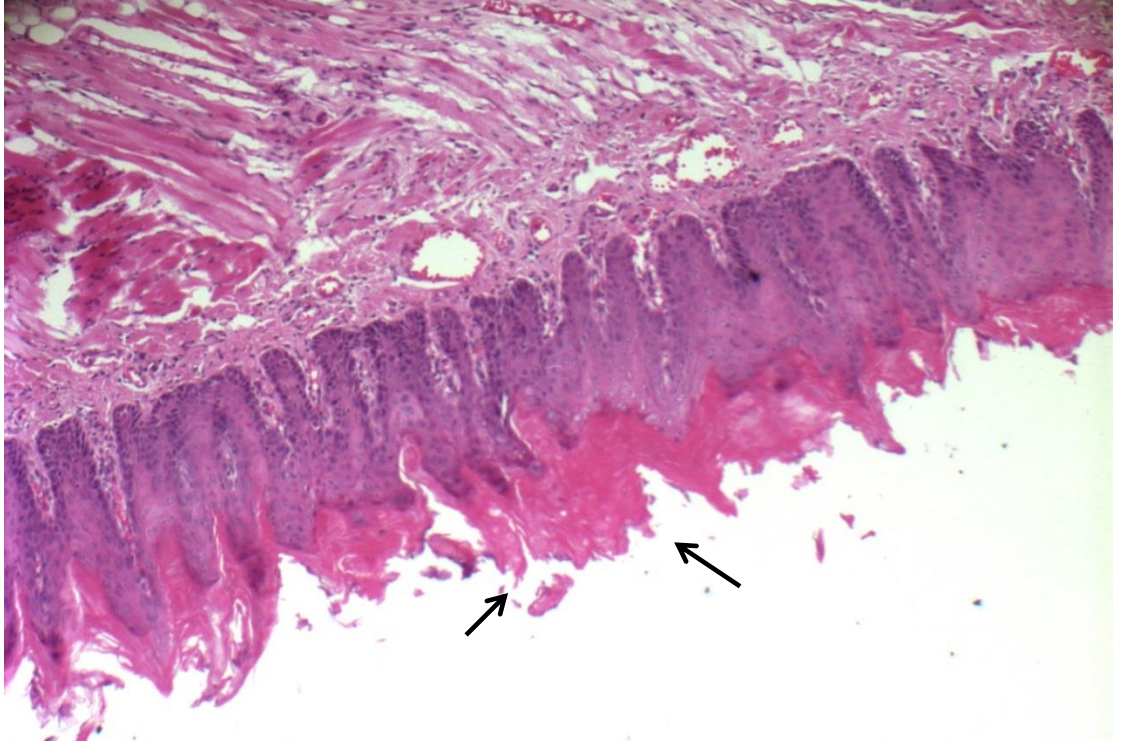
Şekil 4.10: Grup 3 Yassı hücreli karsinoma (HE 10X10)



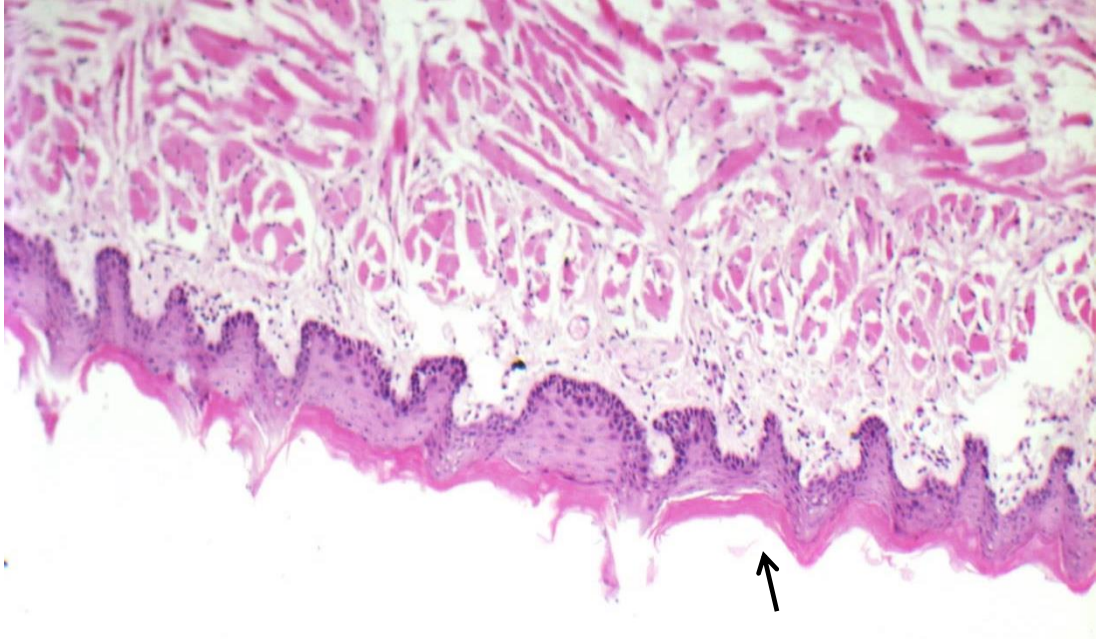
Şekil 4.11: İki patolog tarafından yapılan vazodilatasyonun ‘3-şiddetli vazodilatasyon’ olarak derecelendirilen dil mukoza örneği



Şekil 4.12: ‘1-hafif’ dereceli vazodilatasyon olarak değerlendirilen örnek



Şekil 4.13: '3-şiddetli' hiperkeratinizasyon olarak derecelendirilen dil epitel örneği



Şekil 4.14: Hiperkeratinizasyon skorlaması '1-hafif' olarak yapılan dil örneği

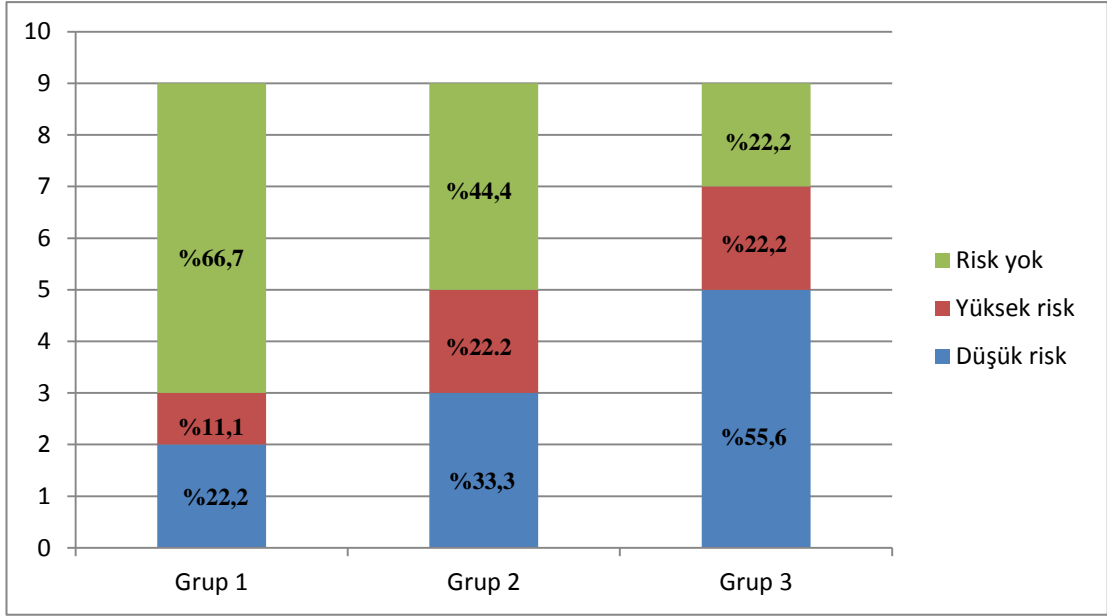
Malign transformasyon riski yüksek olarak değerlendirilen örneklerin DSÖ derecelendirilmesine göre tanısının şiddetli displazi olduğu belirlenmiştir (Resim 4.11). Düşük risk grubundaki örneklerin hepsinde bazal hücre hiperplazisi, bulbous rete peg yapısı ve/veya epitelde düzensiz tabakalaşma şeklinde yapısal bozukluklar olduğu görülmüştür (Resim 4.12). Düşük risk grubundaki örneklerin DSÖ derecelendirmesine göre hiperplazi ya da hafif displazi sınıfında olduğu görülmüştür (Tablo 4.3). Malign transformasyon riski olmayan örneklerde sadece hiperkeratinizasyon oluşumu bulunmaktadır.

Tablo 4.2: Hiperkeratinizasyon derecelerinin gruplar arasında dağılımı

Hiperkeratinizasyon Dereceleri		Grup 1	Grup 2	Grup 3	Toplam
1	Örnek Sayısı	3	4	2	9
	Yüzde	%33.3	%44.4	%22.2	%33.3
2	Örnek Sayısı	5	4	6	15
	Yüzde	%55.6	%44.4	%66.7	%55.6
3	Örnek Sayısı	1	1	1	3
	Yüzde	%11.1	%11.1	%11.1	%11.1
Toplam		9	9	9	27

Tablo 4.3: Vazodilatasyon skorlamasının gruplar arasında dağılımı

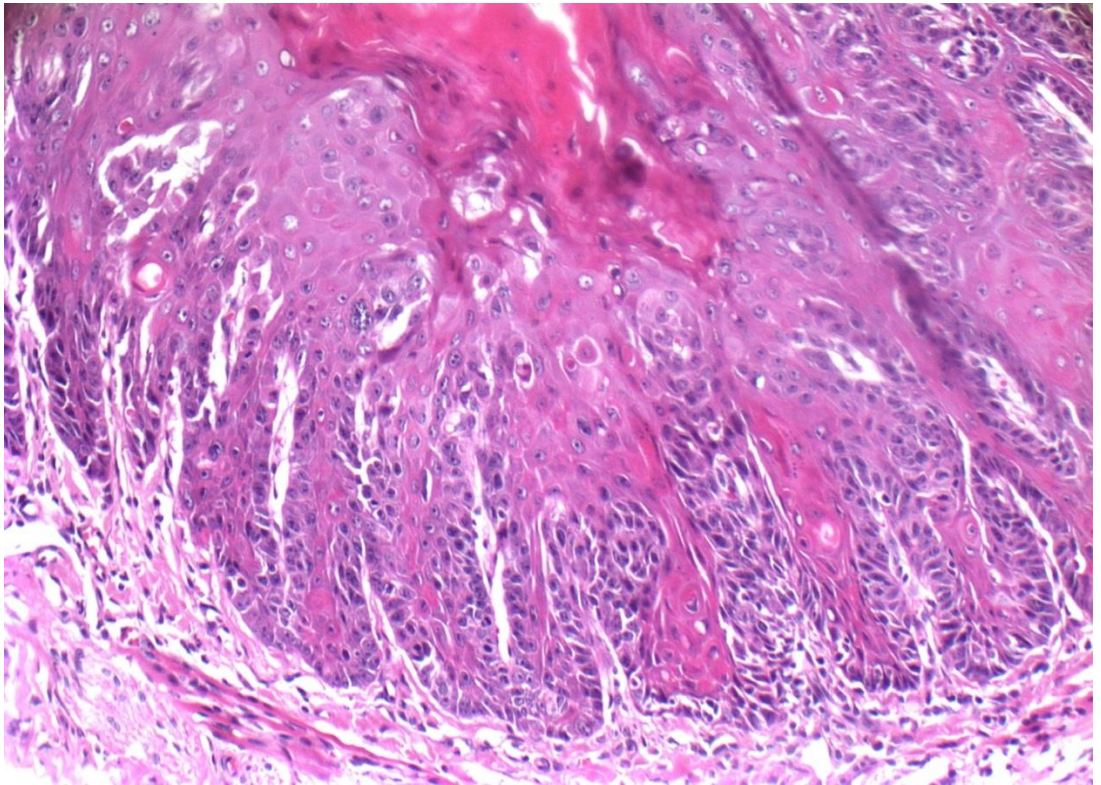
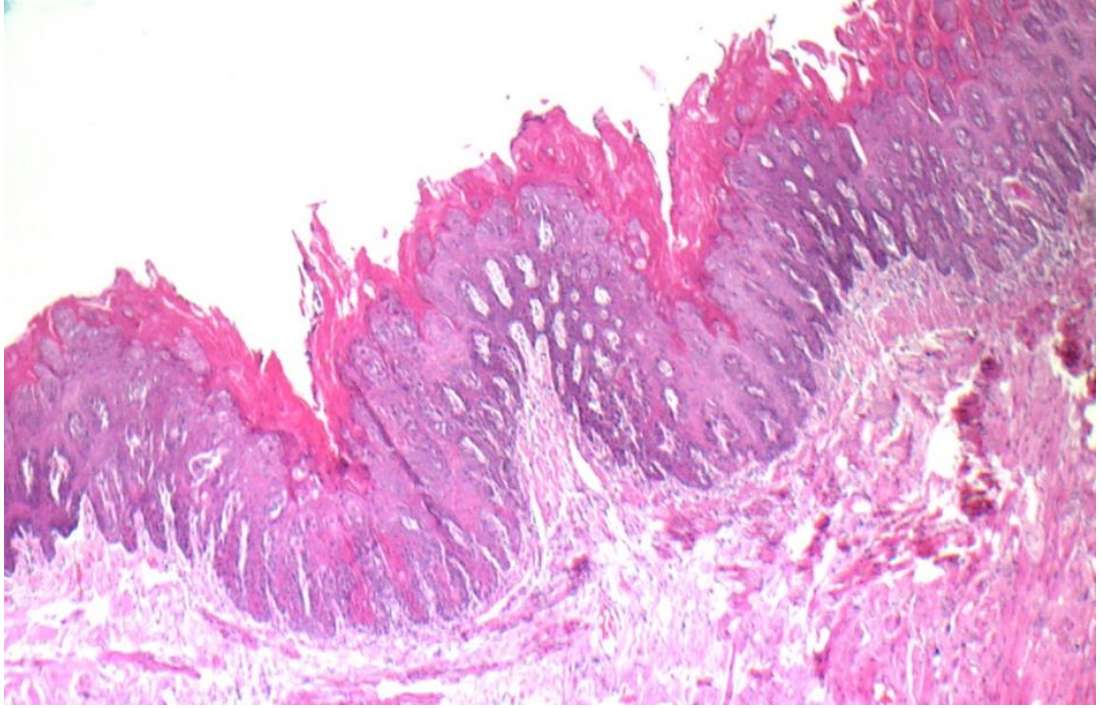
Vazodilatasyon Dereceleri		Grup 1	Grup 2	Grup 3	Toplam
1	Örnek Sayısı	3	2	0	5
	Yüzde	%33.3	%22.2	%0	%18.5
2	Örnek Sayısı	5	6	6	17
	Yüzde	%55.6	%66.7	%66.7	%63
3	Örnek Sayısı	1	1	3	5
	Yüzde	%11.1	%11.1	%33.3	%18.5
Toplam		9	9	9	27



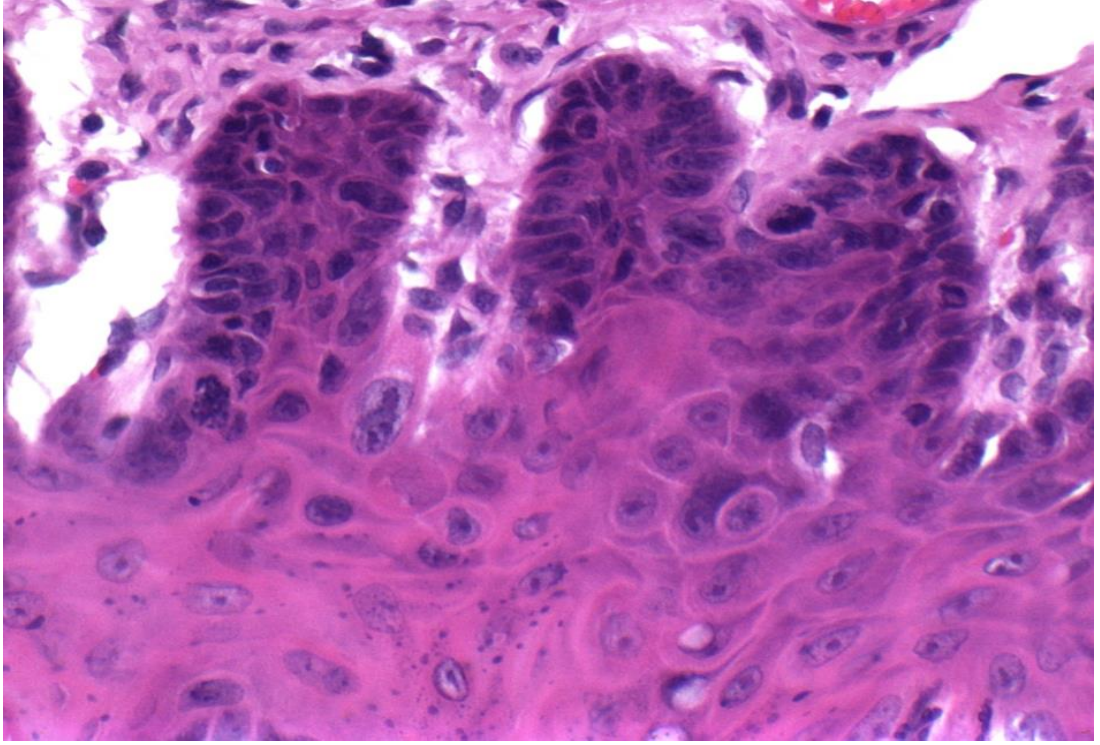
Şekil 4.15: Gruplara göre lezyonların düşük risk/yüksek risk dağılımları

Tablo 4.4: DSÖ oral epitelyal displazi sınıflamasına göre örneklerin dağılımı

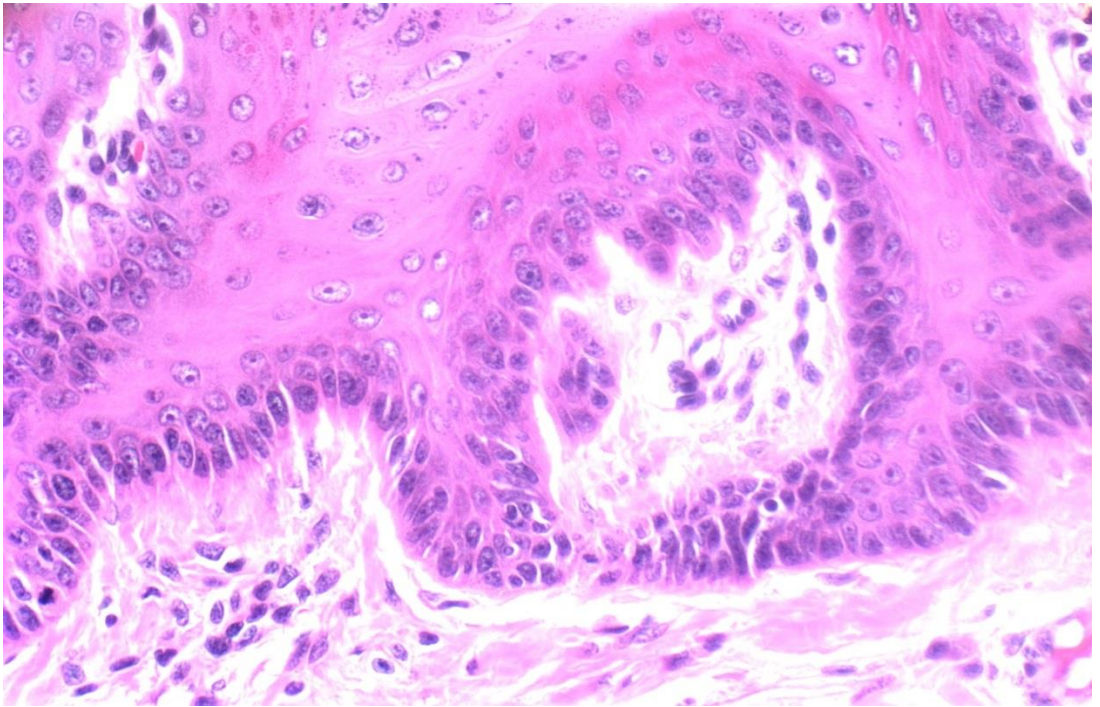
	1. Grup	2. Grup	3. grup
Hiperplazi	1 (%11,1)	2 (%22,2)	3(%33,3)
Hafif displazi	1 (%11,1)	1 (11,1)	2(%22,2)
Orta Displazi	-	-	-
Şiddetli Displazi	1 (%11,1)	2 (%22,2)	2 (%22,2)
Toplam	3 (%33,3)	5 (%55,5)	7 (%77,7)



Şekil 4.16. ve Şekil 4.17: ‘Yüksek risk’ kategorisinde değerlendirilen lezyona ait mikroskopik görüntü. Yapısal ve hüresel değişiklikler epitelin bütün tabakasında bulunmaktadır. DSÖ’ ne göre bu lezyon şiddetli displazi sınıfındadır. (HE 4X10, 20X10)



Şekil 4.18: Bazal hücre hiperplazisi ve hiperkromatizm gibi hüresel değışikliklerle düşük risk kategorisinde değlendirilen örnek HE: 40X10



Şekil 4.19: Düzensiz tomurcuklanmalar gösteren bulbous rete peg oluşumu ile düşük risk kategorisinde değlendirilen örnek

4.3. İstatistiksel Bulgular

4.3.1. Hiperkeratinizasyon ve vazodilatasyon skorlamasında iki patoloğ arasındaki uyumluluk

İki patoloğun hiperkeratinizasyon derecelendirmesine ait kappa katsayısı 0.731, vazodilatasyon derecelendirmesine ait kappa katsayısı 0.683 olarak hesaplandı ve bu değerler iki patoloğ arasında hiperkeratinizasyon ve vazodilatasyon derecelendirmesi açısından “önemli derecede uyumluluk olduğu” şeklinde yorumlandı (Tablo 4.5-4.6).

Tablo 4.5: Gözlemciler arasında hiperkeratozis skorları açısından uyumluluk

Hiperkeratozis Derecesi	1. Gözlemci				Kappa	p-değeri
	1	2	3	Toplam		
2. Gözlemci					0.731	<0.001
1	7 (%25,9)	-	-	7 (%25,9)		
2	2 (%7,4)	14 (%51,9)	1 (%3,7)	17 (%63,0)		
3	-	1 (%3,7)	2 (%7,4)	3 (%11,1)		
Toplam	9 (%33,3)	15 (%55,6)	3 (%11,1)	27 (%100,0)		

Tablo 4.6: Gözlemciler arasında vazodilatasyon skorlaması açısından uyumluluk

Vazodilatasyon Derecesi	1. Gözlemci				Kappa	p-değeri
	1	2	3	Toplam		
2. Gözlemci					0.683	0.002
1	4 (%14,8)	3 (%11,1)	-	7 (%25,9)		
2	1 (%3,7)	13 (%48,2)	-	14 (%51,9)		
3	-	1 (%3,7)	5 (%18,5)	6 (%22,2)		
Toplam	5 (%18,5)	17 (%63,0)	5 (%18,5)	27 (%100,0)		

4.3.2. Hiperkeratinizasyon ve vazodilatasyon parametreleri açısından grupların karşılaştırılması

İki patoloğ arasında önemli derecede uyum olduğu belirlendikten sonra deneyimli olan patoloğun (H.Ö.) hiperkeratinizasyon ve vazodilatasyon derecelendirmelerine istatistiksel analiz uygulandı. Kruskal Wallis testi ile yapılan

analiz sonucu hiperkeratinizasyon (p:0.725) ve vazodilatasyon (p:0,132) dereceleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

4.3.3. Lezyonların malign transformasyonu açısından düşük riskli ya da yüksek riskli olmalarına göre gruplar arasındaki karşılaştırma bulguları

Lezyonların malign taransformasyon açısından düşük ya da yüksek riskli olmalarına göre değerlendirilmeleri ki kare testi ile yapılmıştır. Buna göre gruplar arasında risk varlığı ve yokluğu yönünden, düşük risk varlığı yönünden ve yüksek risk varlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir. (p>0.05)

Tablo 4.7: Gruplara göre deneklerin risk durumlarının dağılımı

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	p-değeri
Risk Yok	6 (%66,7)	4 (%44,4)	2 (%22,2)	0,154
Düşük Risk	2 (%22,2)	3 (%33,3)	5 (%55,6)	0,327
Yüksek Risk	1 (%11,1)	2 (%22,2)	2 (%22,2)	0,769

5. TARTIŞMA

Oral kanserler yüksek mortalite ve morbidite oranları nedeniyle toplum sağlığı açısından önemli risk faktörü olan hastalıklardır. Moleküler biyoloji, onkoloji ve cerrahi alanlarında yapılan geniş araştırmalara rağmen oral kanser hastalarının sağkalımında son 4-5 dekatlık süreçte değişiklik görülemediği (58). Bu nedenle karsinogenezis sürecindeki bir takım genetik ve epigenetik olaylar serisinin kontrol altına alınarak malignensi gelişiminde latent sürenin uzatılması ya da kanser oluşumunun durdurulmasına yönelik kimyasal korunma yöntemleri ile ilgili araştırmalar önem kazanmıştır. 4NQO modeli bu araştırmalarda en sık kullanılan karsinogenezis yöntemi olmuştur (58).

Literatürde 4NQO modelinde ajanın uygulama yolu, dozu ve süresine yönelik farklı yöntemler bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda 4NQO'nun dozu ve uygulama süresi bu karsinogenezis modeli üzerinde pek çok araştırma yapmış olan Ribeiro ve ark.'nın kullandıkları yöntem referans alınarak belirlenmiştir (59). Bu araştırmacılar Wistar türü ratlara 50 ppm dozunda 4NQO uygulamış 4., 12. ve 20. haftalarda sakrifikasyon gerçekleştirerek dil epitelinde oluşan histopatolojik değişiklikleri incelemişlerdir. On ikinci haftada sakrifiye edilen hayvanların %70'inde sadece hiperplazi ve hiperkeratinizasyon, %30'unda ise bu değişikliklerin yanında hafif/ orta dereceli displazi oluşumu görülmüştür. Yirminci haftada ise örneklerin çoğunda (%70) YHK oluşmuş geri kalanında (%30) displazi oluşumu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda 20. haftada kontrol grubunda gelişen lezyonların çoğunun (%44.4) hafif ve şiddetli displazi olduğu, %11.1'inde ise YHK oluştuğu görülmüştür.

Literatürde farklı dozlarda 4NQO uygulamasıyla ilgili araştırmalara bakıldığında dozun 4 katına çıkartıldığı (200 ppm) ve uygulama süresinin aynı tutulduğu (20 hafta) bir çalışmada karsinoma oluşum insidansının Ribeiro ve ark.'nın modeli ile benzer olduğu (%70'e karşılık %68,8) gösterilmiştir (59, 67). Bu iki araştırma ile birlikte bizim çalışmamız da karsinogenezis sürecinin multifaktöriyel bir olay olduğunu göstermekte ve buna bağlı olarak aynı karsinojen madde ile

indüklenen deneysel modellerde hayvan üretimindeki ya da laboratuvar şartlarındaki farklılıkların bu sürece etki ederek prekanseröz lezyon ve tümör oluşum insidansını değiştirebilmektedir.

İnsanda oral YHK'nın gelişiminde klinik değişikliklere bakıldığında erken lezyonların parlak beyaz-gri renkte, iyi sınırlı mukoza kalınlaşmaları şeklinde ve lökoplaki benzeri olduğu ve bu oluşumların ileri safhalarda ekzofitik olarak kolayca farkedilebilen nodül ya da endofitik bir şekilde gelişen nekroze, ülserle bir lezyona dönüştüğü bilinmektedir. 4-NQO ile oluşturulan karsinogenezis modelinde lezyonların klinik görünümü insanda oluşan değişikliklerle benzerdir (64).

Bizim çalışmamızda da oluşan lezyonların klinik görüntüsü literatürde bildirildiği gibi beyaz plak ve papiller/nodüler yüzey özelliği gösteren lezyonlardır. Bu lezyonların klinik ön tanısında lökoplaki terimi kullanılabilir. Ancak lezyonun malign transformasyon potansiyelini belirtmemesi ve klinik uygulamalarda tanı, tedavi ve takip süreçlerinde karmaşaya yol açması nedeniyle lökoplaki teriminin kullanımının sadece ön tanıyla sınırlı kalması gerektiği ve lezyonun histopatolojik karakteri ile (displazi içeren /displazi içermeyen lezyon) tanımlanması gerektiği belirtilmiştir (68, 69). Bu nedenle bizim çalışmamızda da prekanseröz beyaz lezyonların adlandırılmasında lökoplaki terimi kullanılmamıştır.

β -blokerler kardiyovasküler hastalık tedavisinde, anksiyete, migren ve glukoma tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Birçok tümör türünde, meme, nazofarenks, akciğer, prostat, yumurtalık, pankreas ve kolon, β -adrenoreseptör bulunması ve bunun yanısıra tümörler tarafından proanjiojenik faktörlerin salınması nedeniyle β -bloker kullanan hastalarda kanser gelişme ve metastaz riskinin azalabileceğine yönelik klinik çalışmalar yapılmıştır (32-40). Algazi ve ark 839 kardiyovasküler sistem hastasını içeren kohort çalışmalarında β -bloker ile tedavi gören hastalarda %0.51 oranında kanser gelişimi olduğunu buna karşılık başka yöntemlerle tedavi gören hastalarda ise bu oranın %6 olduğunu bildirmişlerdir (70). Barron ve ark ise epidemiyolojik çalışmalarında beta bloker kullanan meme kanserli hastalarda sağkalım oranının daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (71).

Solid tümörlerin büyümesi ve metastazında anjiogenezisin rolü çok iyi bilinmektedir. Bu nedenle tümör tedavilerinde vaskularizasyonun baskılanması hedef alınır ve neovaskularizasyonu önlemek için antianjiogenik ajanlar kullanılır. Propranololun infantil hemanjioma tedavisindeki etkisinin yanısıra farklı tür vücut kanserlerinin görülme insidansındaki azaltıcı etkisinin en önemli nedenlerinden birisinin ilacın anjiogenezisi baskılaması olduğu düşünülmektedir (72).

Baş boyun bölgesi (dil, larengeal ve hipofarengeal) YHK'larda propranololun tümörün büyümesi ve tümör hücrelerinin apoptozisine etkisi ile ilgili yapılan in vitro çalışmada propranololun β_2 Ar'i antagonize edici özelliği ile tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada propranololun apoptozisi indüklediği ve radyoterapi ve kemoterapinin etkisini arttırdığı görülmüştür. Araştırmacılar özellikle kemoterapi ve radyoterapiye dirençli baş boyun bölgesi YHK olgularında propranololun yararlı olabileceğini önermektedir ve bu çalışma literatürdeki bu konuyla ilgili tek çalışmadır (45).

Bizim çalışmamız propranololun antianjiogenik ve β AR sentezini azaltma özelliği sayesinde oral YHK gelişiminde koruyucu ve tedavi edici etkisini göstermek amacıyla oluşturulan ilk in vivo çalışmadır. Deney süreci sonunda kontrol grubunda oluşan tümöral yapının çapı (1.8 cm) 1. grupta oluşan tümörün çapının (0.6 cm) 3 katı kadardır. Histopatolojik değerlendirmede 1.gruba ait örnekteki malignansinin invazyon görülme, henüz karsinoma in-situ durumunda olduğu; kontrol grubundaki tümörün ise derin invazyon gösteren YHK olduğu görülmüştür.

Klinik olarak prekanseröz lezyon olan diğer örneklerde histopatolojik olarak değişikliklerin değerlendirmesi Kujan ve ark'larının geliştirdiği ikili derecelendirme sınıflamasına göre yapılmıştır (12). Bu sınıflamanın DSÖ'nün oluşturduğu sınıflamaya göre bazı avantajları olduğu bildirilmiştir. DSÖ sınıflamasında prekanseröz lezyonlar beş derecede sınıflanmaktadır ve displazi derecelendirmesinde patolojiler arasında daha fazla çeşitlilik olduğu ve yöntemin tekrarlanabilirliğinin daha az olduğu bildirilmiştir. İkili derecelendirme sisteminde prekanseröz lezyon sınıflaması iki kategoriye indirilmiş ve DSÖ oral epitelyal displazi sınıflamasına göre daha kolay ve niceliksel bir değerlendirme sistemi oluşturulmuştur. Ayrıca bu

sistem ile gözlemciye bağlı değişkenliğin azaltıldığı bildirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre yüksek risk grubundaki lezyonların malign transformasyon miktarının düşük risk grubundaki lezyonlardan 3-4 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (73-76).

Yukarıda bahsedilen avantajları nedeniyle bizim çalışmamızda da prekanseröz lezyonların sınıflaması ikili derecelendirme sistemi ile yapılmıştır. Buna göre yüksek malignensi dönüşüm riski taşıyan örneklerin yüzdesi kontrol grubu ve 2. grupta %22.2 iken; 1. grupta %11.1'dir. Düşük risk taşıyan örneklerin yüzdeleri ise 1. grupta %22.2, 3. grupta %55.6 olarak belirlenmiştir. İkinci grupta ise bu oran %33.3'tür. Malignensiye dönüşüm risk değerlendirilmesinde ise uzun dönem propranolol kullanımının bu riski hemen hemen yarıya indirdiği belirlenmiştir.

Örnek sayısının az olması ve istatistiksel olarak fark görülmemesine rağmen karsinojen etkenin epitelde oluşturduğu bazal hücre hiperplazisi, rete peg yapısında değişiklik ve epitel stratifikasyonunda değişiklikler gibi yapısal değişikliklerin oluşumunda yukarıda bahsedilen oranlar (%55.6 ya karşı %22.2) ve tümöral yapıların büyüklük ve invazyon dereceleri göz önünde bulundurulduğunda prekanseröz ve kanseröz lezyonların gelişim sürecinde propranololun koruyucu bir etkisi olduğu söylenebilir ve bu çalışma ileri araştırmalar için bir başlangıç noktası olabilir.

Propranololun neovaskularizasyonu baskılamasının yanında vazokonstriksiyon yolu ile de infantil hemanjioma gibi vasküler tümörlerde tedavi edici etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada bütün örneklerde kan damarlarının çaplarındaki değişiklikler Ross ve ark'nın oluşturdukları standart skorlama ile değerlendirilmiştir ve şiddetli vazodilatasyon gösteren örnek sayısının kontrol grubunda 3 (%33.3), 2. Grupta 2 (%22.2) ve 1. Grupta 1 (%11.1) adet olduğu görülmüştür (66). Bu yüzde oranları göz önünde bulundurularak uzun süre (20 hafta) uygulanan propranololün dil mukozasında vazodilatasyon oluşma derecesini azaltmada etkili olduğu ve bu nedenle tümör gelişiminde ve enflamatuar olaylarda baskılayıcı etkisinin olabileceği söylenebilir.

Standart skorlama sistemi ile değerlendirilen bir diğer parametre ise hiperkeratinizasyondur. Bizim alışmamızda örneklerin hepsinde klinik görüntüleri ile uyumlu olarak histopatolojik olarak keratinizasyon artışı görülmüştür ancak şiddetli hiperkeratinizasyon oranı (%11.1) tüm gruplarda aynıdır; hafif ve orta şiddetli hiperkeratinizasyon yüzdeleri ise üç grupta da benzerdir. DSÖ malign transformasyon riski açısından hiperkeratinizasyonun şiddetinin bir önemi olmadığını belirtmiştir ve bu çalışma sonucunda da oluşan hiperkeratinizasyon miktarında gruplar arasında farklılık olmadığı görülmüştür.

Ross ve ark' nın yukarıda bahsedilen skorlama yöntemi subjektif bir değerlendirme sistemi oluşturmasına rağmen örnekler arasında derecelendirme yapmak ve sadece gruplar arasında kıyaslama yapmak amacıyla kullanılabilir bir yöntemdir. Tüm örneklere patoloğun eşzamanlı bakması ve farklı patoloğların örnekleri değerlendirmesi ile gözlemciler arasında oluşan farklılığın en aza indirilmesi bu yöntemin güvenilirliği arttırmaktadır. Bizim alışmamızda örnekler histopatolojik olarak iki araştırmacı tarafından değerlendirilmiştir ve kappa katsayısı hesaplanarak iki araştırmacı arasında “nemli derecede uyum” olduğu görülmüştür. Bu alışma deneysel oral prekanseröz lezyonlarda hiperkeratinizasyon ve vazodilatasyon derecelendirilmesinin bu yöntemle yapıldığı ilk çalışmadır ve bu alanda ileride yapılacak araştırmalara ışık tutacak niteliktedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

.Bu çalışmada propranolol gibi oldukça güvenli, ucuz ve uzun süredir etkileri bilinen bir β - blokerin antianjiyogenezis etkisi ile infantil hemanjioma tedavisinde ilk basamak ilaç olarak kullanılmasına dayanarak damarlanmanın çok yoğun olduğu oral YHK'nın gelişimine etkisi incelenmiş ve propranololun prekanseröz durumdan malignensiye dönüşüm sürecinde baskılayıcı etkisi olabileceğine dair bir ön veri elde edilmiştir.

Bu çalışma 4NQO oral karsinogenezis modelinin Türkiye'de kullanıldığı ilk çalışmadır. Benzer çalışmaların daha fazla denekte daha uzun süreli ve de en önemlisi daha yüksek propranolol dozuyla yapılması ile bu ilacın kanser gelişimi ya da oluşumu üzerine etkisi daha net ortaya koyulabilecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Sloan P, Böcking A. Oral Cavity. Diagnostic Cytopathology (Gray W, Kocjan G) Third edition. Elsevier. 253, 2010.
2. Ünür M, DOĞAN Ö. Ağız Hastalıklarının Tanı ve Tedavisi. İkinci baskı. İstanbul Quintessence, 2008.
3. Özbayrak S. Ağız Hastalıkları Atlası. İkinci baskı. İstanbul. Quintessence, 2010.
4. Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D, ed. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the head and neck. Lyon: IARC Press; 2005 sf: 177
5. Yücetaş Ş. Ağız ve Çevre Dokusu Hastalıkları. Birinci baskı. Ankara, Atlas, 2005.
6. Neville B, Damm D, Allen C, Bouquot J. Oral and maxillofacial pathology, 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2002
7. Schepman KP, Van Der Meij EH, Smeele LE. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital based population of 166 patients with oral leukoplakia from the Netherlands. Oral Oncol. 34: 270-5, 1998
8. Silverman Jr S, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation: a follow-up study of 257 patients. Cancer. 53: 563-8, 1984.
9. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. Oral Oncol. 39: 770-80, 2003.
10. Mashberg A, Samit AM. Early detection, diagnosis, and management of oral and oropharyngeal cancer. Cancer J Clin. 39: 67-88, 1989
11. Speight PM, Farthing PM, Bouquot JE. The pathology of oral cancer and precancer. Curr Diag Path. 3:165-7, 1997.
12. Kujan O, Oliver RJ, Khatib A. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. Oral Oncology. 42: 987-993, 2006
13. Ferenczy A. Pathology of the female genital tract. Second edition. New York, Heidelberg, Berlin. Springer Verlag, 1982
14. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Robbins Temel Patoloji. Kadın genital sistemi ve meme. (Crum CP, Lester SC, Cotran RS). Yedinci baskı. İstanbul. Nobel. 686, 2003.
15. Smith C, Pindborg JJ. Histologic grading of oral epithelial atypia by the use of photographic standards. Copenhagen, WHO Reference Centre for Oral Precancerous Conditions, 1969
16. Katz HC, Shear M, Altini M. A critical evaluation of epithelial dysplasia in oral mucosal lesions using the Smith-Pindborg method of standardization. J Oral Pathol. 14: 476-482, 1985
17. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. J Oral Pathol Med. 37:127-133, 2008
18. Clark JI, Eisner RM, Hofmeister C. Phase I: adjuvant radiation with docetaxel in high-risk head and neck cancer. Am J Clin Oncol 32:396-400, 2009.

19. Zhou H, Tang Y, Liang X. RNAi targeting urokinase type plasminogen activator receptor inhibits metastasis and progression of oral squamous cell carcinoma in vivo. *Int J Cancer*. 125: 453-462, 2009.
20. Mostaan LV, Khorsandi MT, Sharifian SMR. Correlation between E-cadherin and CD44 adhesion molecules expression and cervical lymph node metastasis in oral tongue SCC: Predictive significance or not. *Pathology-Research and Practice*. 207: 448-451, 2011.
21. Brown JS, Shaw RJ, Bekiroglu F, Rogers SN. Systematic review of the current evidence in the use of postoperative radiotherapy for oral squamous cell carcinoma. *Brith J Oral Maxillofac Surg*. 50: 481-489, 2012.
22. Crombie AK, Farah C, Tripcony L. Primary chemoradiotherapy for oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 48: 1014-8, 2012.
23. Kanojia D, Vaidya MM. 4- Nitroquinoline-1-Oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncology*. 42: 655-667, 2006
24. Özalp Dural EA. *Farmakoloji*. İstanbul. Nobel. Dördüncü baskı, 2008.
25. Leaute-Labreze C, Dumas de la Rooque E, Hubiche T. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med* 358:2649-2651, 2008
26. Truong MT, Chang KW, Berk DR. Propranolol for the treatment of a life-threatening subglottic and mediastinal infantile hemangioma. *J Pediatr*. 156: 335-8, 2010.
27. Jacobson D, Nayan S, Macnay R. Intrathyroidal hemangioma- a rare congenital anomaly: Case presentation and literature review.
28. Greene AK, Mulliken JB, Rogers GF. Management of parotid hemangioma in 100 children. *Plastic Reconstructive Surgery*. 113: 53-60, 2004.
29. Peridis S, Pilgrim G, Athanasopoulos . A meta-analysis on the effectiveness of propranolol for the treatment of infantile airway haemangiomas. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 75: 455-460, 2011.
30. Lamy S, Lachambre MP, Lord-Dufour S. Propranolol suppresses angiogenesis in vitro: Inhibition of proliferation, migration, and differentiation of endothelial cells. *Vasc Pharmacol* 53: 200-208, 2010.
31. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Robbins Temel Patoloji. Neoplazi Yedinci baskı. İstanbul .Nobel. 190, 2003.
32. Vandewalle B, Revillion F, Lefebvre J. Functional beta-adrenergic receptors in breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 116: 303-6, 1990.
33. Kobilka BK. Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 32: 213-8, 2011.
34. Yang EV, Sood AK, Chen M. Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Cancer Res*. 66: 10357-64, 2006.
35. Schuller HM, Cole B. Regulation of cell proliferation by beta- adrenergic reseptors in a human lung adenocarcinoma cell line *Carcinogenesis*. 10: 1753-5, 1989.
36. Palm D, Lang K, Niggermann B. The norepinephrine –driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by β -bloklers. *Int J Cancer*. 118: 2744-9, 2006.

37. Thaker PH, Han LY, Kamat AA. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med.* 12: 939-44, 2006.
38. Zhang D, Ma Q, Shen S. Inhibition of pancreatic cancer proliferation by propranolol occurs through apoptosis induction. *Pancreas.* 38: 94-100, 2009.
39. Weddle DL, Tithoff P, Williams M. Beta-adrenergic growth regulation of human cancer cell lines derived from pancreatic ductal carcinomas. *Carcinogenesis.* 22: 473-9, 2001.
40. Perrone MG, Notarnicola M, Caruso MG. Upregulation of beta (3) –adrenergic receptor m RNA in human colon cancer: a preliminary study. *Oncology.* 75: 224-9, 2008.
41. Shang ZJ, Liu K, Liang DF. Expression of β 2- adrenergic receptor in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 38: 371-6, 2008.
42. Liu X, Wu WKK, Yu L Epinephrine stimulates esophageal squamous cell carcinoma cell proliferation via β -adrenoceptor –dependent transactivation of extracellular signal-regulated kinase/ cyclooxygenase-2 pathway. *J Cell Biochem.* 105: 53-60, 2008.
43. Bravo- Calderon DM, Oliveira DT, Marana AN. Prognostic significance of beta-2 adrenergic receptor in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Biomarkers.* 10: 51-9, 2012.
44. Pasquier E, Ciccolini J, Carre M. Propranolol potentiates the antiangiogenic effects and anti-tumor efficacy of chemotherapy agents; implication in breast cancer treatment. *Oncotarget.* 2: 797-809, 2010.
45. Wolter NE, Wolter JK, Enepekides DJ. Propranolol as a novel adjunctive treatment for head and neck squamous cell carcinoma. *J Otolaryngology-Head&Neck Surgery.* 41: 334-344, 2012.
46. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. *Cancer (Phila.).* 6: 963–968, 1953.
47. Eveson JW. Animal models of intraoral chemical carcinogenesis: a review. *J Oral Pathol.* 10: 129-146, 1981.
48. Nauta JM, Roodenburg JL, Nikkels PG. Epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of wistar rat palatal mucosa: 4 NQO model. *Head Neck.* 18: 441-449, 1996.
49. MacDonald DG. Comparison of epithelial dysplasia in hamster cheek pouch carcinogenesis and human oral mucosa. *J Oral Pathol.* 10: 186-191, 1981.
50. Nauta JM, Roodenburg JL, Nikkels PG. Comparison of epithelial dysplasia: the 4NQO rat palate model and human oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 24: 53-58, 1995.
51. Wallenius K, Lekholm U. Oral cancer in rats induced by the water soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. *Odontol Revy.* 24: 39-48, 1973.
52. Nakahara W, Fukuoka F, Sugimura T. Carcinogenic action of 4- nitroquinoline – N-oxide. *Gann.* 48: 129, 1957.
53. Vered M, Yarom N, Dayan D. 4NQO oral carcinogenesis: Animal models, molecular markers and future expectations. *Oral Oncol.* 41: 337-339, 2005.
54. Imaida K, Sato H, Okamiya H. Enhancing effect of high fat diet on 4-nitroquinoline -1-oxide induced pulmonary tumorigenesis in ICR male mice. *Jpn J Cancer Res.* 80: 499-502, 1989.

55. Booth DR. A relationship found between intraoral sites of 4NQO reductase activity and chemical carcinogenesis. *Cell Tissue Kinet.* 23: 331-340, 1990.
56. Fachin AL, Ferreira- Nozawa MS, Maccheroni Jr W. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *trichophytonrubrum*. *J Med Microbiol.* 55: 1093-1099, 2006.
57. Fracalossi AC, Comparini L, Funabashi K. Ras gene mutation is not related to tumor invasion during rat tongue carcinogenesis induced by 4- nitroquinoline 1-oxide. *J Oral Pathol Med.* 40: 325-333, 2011.
58. Kanojia D, Vaidya MM. 4-Nitroquinoline-1- oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol.* 42: 655-667, 2006.
59. Ribeiro DA, Salvadori DM, da Silva RN. Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cells can predict risk during 4-nitroquinoline 1-oxide induced rat tongue carcinogenesis. *Oral Oncol.* 40: 910-915, 2004.
60. Tamura I, Sakaki T, Chaqour B. Correlation of P- cadherin and β -catenin expression and phosphorylation with carcinogenesis in rat tongue cancer induced with 4- nitroquinoline-1-oxide. *Oral Oncol.* 39: 506-514, 2003.
61. Sato K, Okazaki Y, Tonogi M. Expression of beta-catenin in rat oral epithelial dysplasia induced by 4- nitroquinoline-1-oxide. *Oral Oncol.* 38: 772-778, 2002.
62. Tang XH, Knudsen B, Bemis D. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen treated mice. *Clin Cancer Res.* 10: 301-313, 2004.
63. Gannot G, Buchner A, Keisari Y. Interaction between the immune system and tongue squamous cell carcinoma induced by 4- nitroquinoline-N-oxide in mice. *Oral Oncol.* 40: 287-297, 2004.
64. Dayan D, Hirshberg A, Kaplan I. Experimental tongue cancer in desalivated rats. *Oral Oncol.* 33: 105-109, 1997.
65. Dalia Hussein El-Rouby. Histological and immunohistochemical evaluation of the chemopreventive role of lycopene in tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline-1-oxide. *Arch Oral Biol.* 56: 664-671, 2011.
66. Ross R, DiGiovanna JJ, Capaldi L. Histopathologic characterization of epidermolytic hyperkeratosis: A systematic review of histology from the National Registry for Ichthyosis and Related Skin Disorders. *J Am Acad Dermatol.* 59: 86-90, 2008.
67. Li Jingi, Liang F, Yu D. Development of a 4-nitroquinoline-1-oxide model of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 49: 299-3, 2013.
68. Günhan Ö, Celasun B. Oral mukozal lezyonlarda epitelyal displazilerin değerlendirilmesi. *GÜ Dişhek Fak Derg.* 5: 237-241,1988.
69. Bouquot JE, Speight PM, Farthing PM. Epithelial dysplasia of the oral mucosa- diagnostic problems and prognostic features. *Curr Diagn Pathol.* 12: 11-21, 2006
70. Algazi M, Plu-Bureau G, Flahault A. Could treatments with beta-blockers be associated with a reduction in cancer risk? *Rev Epidemiol Sante Publique.* 52: 53-65, 2004.
71. Barron TI, Connolly RM, Sharp L. Beta blockers and breast cancer mortality: a population- based study. *J Clin Oncol.* 29: 2635-44, 2011.
72. Xu T, Xiao X, Zheng S. Antiangiogenic effect of propranolol on the growth of the neuroblastoma xenografts in nude mice. *J Pediatric Surg.* 48: 2460-2465, 2013.

73. Liu W, Wang YF, Zhou HW. Malignant transformation of oral leukoplakia: a retrospective cohort study of 218 Chinese patients. *BMC Cancer*.16: 685, 2010.
74. Liu W, Bao ZX, Shi LJ. Malignant transformation of oral epithelial dysplasia: clinicopathological risk factors and outcome analysis in a retrospective cohort of 138 cases. *Histopathology*. 59: 733-40, 2011.
75. Caldeira PC, Abreu MH, Carmo MA. Binary system of grading oral epithelial dysplasia: evidence of a bearing to the scores of an immunohistochemical study. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 41: 452-3, 2012.
76. Tonisson K. Carcinogenesis. Binary System of Grading Epithelial Dysplasia in Oral Leukoplakias (Auxiliadora M, Carmo V, Caldeira PC.) (elektronik kitap), 2013. Erişim: (<http://www.intechopen.com/books/carcinogenesis/binary-system-of-grading-epithelial-dysplasia-in-oral-leukoplakias>)