

# Oral Kanserde Tümör Nekrozis Faktör- Alfa (Tnf- $\alpha$ ) Ekspresyonunun Moleküler Subtipleme ile İlişkisi

## The Association Between Tumor Necrosis Factor-Alpha (Tnf-A) Expression and Molecular Subtype in Oral Cancer

<sup>1</sup>İpek Atak, <sup>2</sup>Leyla Bozdağ, <sup>3</sup>Reinhard Buettner, <sup>1</sup>Sibel Elif Gültekin

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Oral Patoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>3</sup>Köln Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Enstitüsü, Köln, Almanya

**Özet:** Oral kavitenin en sık izlenen malign tümörü olan oral skuamöz hücreli karsinomun (OSHK) gelişmesi ve ilerlemesi, genetik alterasyonların birikmesinden kaynaklanmaktadır. Diğer taraftan Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- $\alpha$ )'nın tümör invazyonunda önemli rol oynadığı da bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, oral kanserdeki genetik alterasyonları saptayıp, moleküler alttipleme ile inflamasyon ve TNF- $\alpha$  ekspresyonu arasındaki ilişkiyi incelemektir. Çalışma, 25'i OSHK tanısı almış toplam 39 doku örneği üzerinde gerçekleştirildi. Parafine gömülü bloklardan elde edilen DNA izolasyonunu takiben, 28 adet kanser ilişkili gene ait genetik değişiklikler yeni nesil dizileme analizi (NGS) ile tayin edildi. Dokulardaki TNF- $\alpha$  ekspresyonu immünohistokimyasal çalışmalar ile tayin edildi. İnflamasyon skorlaması, her vaka için hemotoksilen-eosin kesitlerde yapıldı. Toplam 25 adet OSHK vakasının 18'inde (%72) bir veya birden fazla mutasyon izlenmiştir. En sık mutasyonu görülen gen, P53 geni olarak saptanmıştır. Tüm vakalardan 3 tanesi (%12) üç ve daha fazla gen mutasyonu göstermiştir. TNF- $\alpha$  ekspresyonu mutasyon saptanan tümörlerde daha fazla izlenmiştir. Yeni nesil dizileme analizi (NGS) ile ortaya çıkan mutasyon spektrumu, OSHK'deki genetik değişikliklerin ne kadar çeşitli ve karmaşık olduğunu göstermektedir. Çalışma sonuçları genetik değişiklikler ile inflamasyon ve TNF- $\alpha$  ekspresyonu arasında ilişki olduğunu düşündürmektedir. OSHK'nin tanı ve tedavisinde histopatolojik incelemenin yanı sıra, genetik alterasyonları da ortaya koymak hedefe yönelik tedavide yeni alternatifler sunacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** NGS, Oral kanser, TNF- $\alpha$ , yeni nesil dizileme analizi

**Abstract:** Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignant tumor of the oral cavity and the development and progression of this tumor is due to the accumulation of genetic alterations. On the other hand, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) is known to play an important role in tumor invasion. The aim of this study was to detect genetic alterations in oral cancer and to investigate the possible relationship between molecular subtype, inflammation and TNF- $\alpha$  expression. The study was conducted on 39 tissue samples, 25 of which were diagnosed as OSCC. All were subjected to DNA isolation from paraffin embedded blocks and followed by next-generation sequencing (NGS) platform that examined the complete coding sequence of in 28 cancer-related genes. TNF- $\alpha$  expression in tissues was determined by immunohistochemical studies. Inflammation scoring was performed in hematoxylin & eosin sections for each case. Eighteen of 25 (72%) OSCC cases showed alterations in at least in one gene. P53 was the most frequent altered gene in all lesions. Three or more gene alterations were detected in 3 of all cases (12%). TNF- $\alpha$  was overexpressed in tumors with mutation. The mutation spectrum revealed by the next-generation sequence analysis (NGS) suggests that genetic alterations in OSCC are diverse and complex. The results of the study suggest that there is a relationship between genetic alterations and inflammation/TNF- $\alpha$  expression.

**Keywords:** Next-generation sequence analysis, NGS, oral cancer, TNF- $\alpha$

**ORCID ID of the authors:** S.E.G. 0000-0002-0732-3617, İ.A. 0000-0001-9663-5454, L.B. 0000-0002-4133-0319, R.B. 0000-0001-8806-4786

Received 17.07.2020

Accepted 20.08.2020

Online published 24.09.2020

**Correspondence:** Sibel Elif GÜLTEKİN - Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Oral Patoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye  
e-mail: [sibelg@gazi.edu.tr](mailto:sibelg@gazi.edu.tr)

**Cite this article as:**

Gultekin SE, Atak I, Bozdağ L, Buettner R, The Association Between Tumor Necrosis Factor-Alpha (Tnf-A) Expression and Molecular Subtype in Oral Cancer, Ağız Kanserleri Özel Sayısı, Eylül 2020;1-7 **Doi:** 10.20515/otd.770386

## 1. Giriş

Oral skuamöz hücreli karsinom (OSHK), oral mukozanın yüzey skuamöz epitelinden köken alan malign epitelyal tümördür. Oral kavitedeki malign tümörlerin %90'ı mukozanın yüzey skuamöz epitelinden köken aldığı için oral skuamöz hücreli karsinom, oral kanser/ağız kanserini ifade etmektedir (1).

Oral kanser, tüm kanserler içerisinde 6. sıklıkla izlenen, morbidite ve mortalitesi yüksek bir tümördür (2). Vakaların %50'si 5 yıl içerisinde yaşamlarını yitirmektedir (2). Oral kavite, diğer anatomik bölgelere göre daha göz önünde ve klinik olarak rahat ulaşılabilir bir yerde olmasına rağmen, hastaların büyük bir çoğunluğuna geç evrede tanı konabilmektedir (1).

Bu bağlamda, bu alandaki araştırmalarda erken tanı koyabilmek, prognozu belirlemek ve yapılan tedaviye verilecek yanıtı öngörebilmek için biyobelirteçlerin saptanması çok önemli bir yer tutmaktadır. Ancak bu konudaki çalışmalar, oral karsinogenezin karmaşık yapısından dolayı kesin bir sonuca ulaşabilmiş değildir.

İnflamasyon; malign transformasyon, tümör progresyonu, lokal invazyon, anjiyogenez ve metastaz gibi malign tümörlerin karakteristiğini oluşturan olayların gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (3,4). İnflamasyonun özellikle tümör mikroçevresine hem pozitif hem negatif yönde etkisi olduğu bilinmektedir (3). Proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- $\alpha$ , hücre siklusu aktivasyonu, tümör progresyonu ve metastaz gelişimi ile ilişkilendirilmiş olup

hem pro hem anti tümorojenik özellikleri açısından çokça çalışılmıştır (4–8). Yapılan son çalışmalarda diagnostik ve prognostik açıdan oral kanser için potansiyel bir biyobelirteç olarak ileri sürülmektedir (6,7,9).

Günümüzde genom dizilemeleri ile genoma dair bilgilerin elde edilmesini sağlayan yeni nesil dizileme teknolojileri, kanser araştırmalarında kullanılan en gelişmiş teknolojilerden biridir (10–12). Yeni nesil dizileme analizi, hem genleri inceler, hem de bazı mutasyonların tespit edilmesini sağlar (10). Ayrıca, bilinmeyen dizi varyasyonlarının kısa zamanda ve daha kolaylıkla belirlenmesini sağlar, böylece klinisyenlerin kanser oluşumu, ilerlemesi ve metastaz mekanizmalarını daha iyi anlamalarını mümkün kılar (10,11,13). Bu da günümüzde başta akciğer kanseri olmak üzere pek çok kanserin tedavisinde, hedefe yönelik tedavilerin uygulanabilmesini mümkün kılmıştır (14).

Ülkemizde alanında ilk verilerin elde edildiği bu çalışmanın amacı, oral kanserdeki mutasyonları inceleyip elde edilen verilerle genetik değişiklikler, inflamasyon ve TNF- $\alpha$  ekspresyonu arasındaki ilişkiyi incelemektir.

## Gereç ve Yöntem

Çalışma, Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan OSHK tanısı almış toplam 22 vakaya ait formaldehitte tespit edilmiş parafin bloklardaki doku örnekleri üzerinde yürütüldü. Vakalara ait tüm demografik veriler kaydedildi. (Tablo 1)

**Tablo 1.** Vakaların demografik verileri

No.	Yaş	Cinsiyet	Lokalizasyon	Biyopsi türü
1	58	E	Bukkal mukoza	Eksizyon
2	50	E	Dudak mukozası	Eksizyon
3	56	E	Damak mukozası	Rezeksiyon
4	45	K	Ağız tabanı	Rezeksiyon
5	85	K	Damak mukozası	İnsizyonel
6	67	K	Mandibular dişeti	Eksizyon
7	40	K	Dil	Rezeksiyon
8	43	E	Dil	Rezeksiyon
9	51	K	Mandibular dişeti	İnsizyonel
10	63	K	Dil	Rezeksiyon

11		E	Damak mukozası	Rezeksiyon
12	53	K	Mandibular dişeti	İnsizyonel
13	64	E	Damak mukozası	Pars.Rezeksiyon
14	40	E	Mandibular dişeti	Rezeksiyon
15	52	E	Dil	Eksizyon
16	39	E	Damak mukozası	İnsizyonel
17	40	K	Dudak mukozası	Eksizyon
18	67	K	Mandibular dişeti	İnsizyonel
19	55	K	Dil	İnsizyonel
20	76	K	Bukkal mukoza	Eksizyon
21	68	E	Dil	Rezeksiyon
22	38	E	Mandibular dişeti	İnsizyonel

(E: Erkek, K:Kadın)

Vakalara ait hemotoksilen-eozin boyalı camlar ışık mikroskopunda tekrar değerlendirilip moleküler çalışma için uygun bloklar tespit edildi ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) histolojik derecelendirme sistemine göre skorlamalar yapıldı. Buna göre; tümör alanındaki hücrelerin keratinizasyon derecesi, hücresel ve nükleer pleomorfizm, artmış ve atipik mitoz gibi kriterlere göre derecelendirme yapılmaktadır (15,16). Daha sonra tümörler iyi derece diferansiye, orta derece diferansiye ve az diferansiye (anaplastik) olarak sınıflandırıldı (15).

İmmünohistokimyasal çalışma avidin-biyotin kompleksi yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. (Neomarkers Ultravision Detection system Anti-Polyvalent,HRP/DAB kit). Bu amaçla, parafin bloklardan alınan 4 µ'luk kesitler deparafinizasyon, rehidrasyon, antijen retrieval (citrate tampon), %3'lük hidrojen peroksit blok aşamalarından sonra

TNF-α (mouse poliklonal E-AB-40020 Elabscience China) antikoruna +4 derecede tüm gece inkübe edildi. Daha sonra sekonder antikorlar uygulanarak DAB (3,3'-Diaminobenzidine. ACH500-IFU. Scytek Laboratories U.S.A.) kromojen kiti ile görüntüleme ve Harris hemotoksilen ile zemin boyama yapıldı. Pozitif kontrol olarak inflamatuvar dişeti dokusu kullanıldı.

Değerlendirme ışık mikroskopu altında histolojik derecelendirme sistemi ile yapılmıştır. (Tablo 2 ve 3). Bu amaçla,camlardaki 5 büyük büyütme alanında (x400) sayılan immunpozitif tümör hücrelerinin yüzdesi ve boyanma yoğunlukları aşağıdaki tablolarda gösterildiği şekilde hesaplanarak skorlama yapılmıştır. Final histolojik derecelendirme bu iki skorun çarpımıyla elde edildi ve vakalar 0-12 arasında skorlandı (6).

**Tablo 2.** İmmünohistokimyasal değerlendirme

Boyanan hücre sayısı (x400/ 5 alanda)	
<b>Skor 0</b>	İmmun pozitif hücre yok
<b>Skor 1</b>	İmmunreaktivite gösteren pozitif tümör hücresi oranı 0-%25
<b>Skor 2</b>	İmmunreaktivite gösteren pozitif tümör hücresi oranı %26-50 arası
<b>Skor 3</b>	İmmunreaktivite gösteren pozitif tümör hücresi oranı %51-75 arası
<b>Skor 4</b>	İmmunreaktivite gösteren pozitif tümör hücresi oranı %75'ten fazla

**Tablo 3.** Boyama yoğunluğunun değerlendirilmesi

Boyama yoğunluğu	
Skor 0	immün pozitif hücre yok
Skor 1	hafif yoğunlukta boyanma
Skor 2	orta yoğunlukta boyanma
Skor 3	yoğun olarak boyanma

Yeni nesil dizileme Analizi: Vakalara ait gen analizleri, her bir vaka için en az %30 oranında tümör dokusu içeren alanlar bulunduran parafin bloklardan seçilerek yapılmıştır. Değerlendirmeye uygun parafin bloklardan, lamlara 10  $\mu$ 'luk doku kesitleri alınarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen cDNA miktarı Real Time PCR kullanılarak ölçülmüştür. Rutin akciğer kanseri ve melanom panelinde kullanılan ALK, BRAF, CDK4, CDKN2A, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, FGFR2, FGFR3, GNA11, GNAQ, HRAS, IDH1, KEAP1, KIT, KNSTRN, KRAS, MAP2K1, MET, NFE2L2, NRAS, OXA1L, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, RAC1 ve TP53 olmak üzere 28 adet kanser ilişkili gene ait genetik değişiklikler yeni nesil dizileme analizi (NGS) ile tayin edilmiştir. Sekanslama MiSeq (Illumina) üzerinde gerçekleştirilmiştir.

## Bulgular

### 1-Demografik veriler

Çalışmaya dahil edilen vakaların cinsiyet bakımından eşit olarak dağıldığı görülmüştür. (11 Erkek, 11 Kadın) Vakaların yaş ortalamalarının 56 olduğu saptanmıştır. Vakalar en sık mandibular dişeti (%27,27) ve dilde (%27,27); sonra sırasıyla damak mukozası (22,72), bukkal mukoza (%9,09), dudak mukozası (%9,09) ve ağız tabanında (%4,54) görülmüştür. Örneklerin çoğunu rezeksiyon materyali oluşturmaktadır (%36).

### 2-Histolojik değerlendirme

Dünya Sağlık Örgütü'nün malign epitelyal tümörler için verdiği histolojik

derecelendirme kriterlerine göre (15), vakaların 2 tanesinin verrüköz karsinom; 2 tanesinin de erken invaziv karsinom olduğu görülmüş olup geri kalan 18 adet vaka konvansiyonel OSHK'dir. Bu 18 adet vakanın 13 tanesi iyi diferansiye, 5 tanesi orta diferansiye olarak sınıflandırılmıştır, az diferansiye izlenmemiştir.

Histolojik derecelendirme sistemleri ile demografik veriler değerlendirildiğinde verrüköz karsinom ve erken invaziv karsinomların cinsiyet dağılımı eşit olarak bulunmuştur. İyi diferansiye OSHK'larda cinsiyet dağılımının eşit olduğu görülmüştür. (6 kadın, 6 erkek). Vakaların yaş ortalamaları 52 olarak bulunmuştur. Orta diferansiye OSHK'lerde, 3 kadın, 2 erkekte görüldüğü bulunmuştur. Vakaların yaş ortalamaları 58 olarak saptanmıştır.

### 3-İmmünohistokimyasal değerlendirme

Çalışmaya dahil edilen toplam 22 vakanın 15'inde immünohistokimyasal değerlendirme yapıldı. Işık mikroskopu altında nukleer ve stoplazmik boyanma gösteren tümör hücreleri pozitif olarak kabul edildi. Vakalar arasında skor 0 olan 4 vaka (%27), skor 1 olan 1 vaka (%7), skor 2 olan 1 vaka (%7), skor 3 olan 7 vaka (%47), skor 6 olan 2 vaka (%13) izlenmiş olup skor 6'dan daha büyük derecelerde boyanması olan vaka gözlenmemiştir (Tablo 4).

İmmünohistokimyasal inceleme ve histolojik derecelendirme arasında ilişkilendirme yapıldığında skor 0 olan vakaların yarısı orta diferansiye, yarısı iyi diferansiye olarak

bulundu (%50) (n:4). Skor 3 olan vakaların 3 tanesi iyi diferansiye (%43), 2 tanesi orta diferansiye (%28), 1 tanesi verrüköz karsinom (%14), 1 tanesi erken invaziv karsinom (%14) olarak izlendi (n:7).

#### 4- Yeni nesil dizileme analizi değerlendirilmesi

Yirmi iki adet vakanın 6 tanesinde mutasyon izlenmemiştir (%27,27). Mutasyonu izlenen 16 vakanın 9 tanesinde tekli mutasyon (%56,25), 4 tanesinde ikili mutasyonlar (%25), 3 tanesinde (%18,75) ise üç ve üçten fazla mutasyonlar görülmüştür. En sık mutasyonun TP53 tümör supresör geninde olduğu görülmüştür (%69). Bunu 5 vakada görülen ALK mutasyonu izlemektedir (%32). Mutasyonu en sık izlenen diğer genlerin sırasıyla DDR2 (%25), PTEN (%19), PIK3CA (%19), KRAS (%19) olduğu saptanmıştır. TP53 çoklu mutasyon görülen vakalarda %54 oranında alterasyon göstermiştir. ALK geni ise çoklu mutasyonu saptanan genlerin %80'inde mutanttır.

Moleküler verilerin demografik verilerle olan ilişkisine bakıldığında, tekli mutasyonlar, 5'i erkek, 5'i kadın olmak üzere 10 vakada görülmüştür. Bu vakaların yaş ortalaması, 57 olarak bulunmuştur. İkili mutasyonlar, 3 tanesi erkek, biri kadın olmak üzere toplam 4 vakada saptanmıştır. Bu vakaların yaş ortalamasının 46 olduğu görülmüştür. Üç veya üçten fazla mutasyon saptanan vakaların 2'si

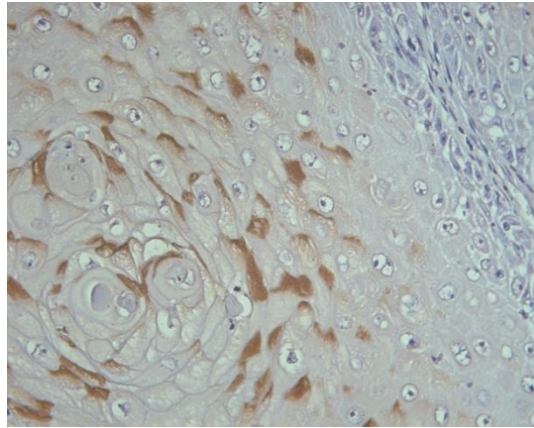
erkek, biri kadındır. Bu vakaların yaş ortalaması ise 54 olarak izlenmiştir.

Çalışmamızda gen alterasyonları ile anatomik lokalizasyon arasında belirli bir ilişki izlenmemiştir.

Diğer taraftan, mutasyon saptanmayan vakalar incelendiğinde, 6 vakanın, 4 tanesi kadın, 2 tanesi erkektir. Vakaların yaş ortalamasının 58 olduğu bulunmuştur. Vakaların biri ağız tabanında, ikisi mandibular dişetinde ve ikisi dilde olmak üzere çoğunlukla alt çene bölgesinde olduğu saptanmıştır.

Mutasyonların histolojik derecelendirme ile ilişkisi incelendiğinde, verrüköz karsinomların %50'sinde mutasyon olduğu görülmüştür. Erken invaziv karsinomların ise hepsinde tekli mutasyon olduğu saptanmıştır. İyi diferansiye OSHK'larda 4 tane vakada tekli mutasyon (%31), 3 tane vakada ikili mutasyon (%23) ve 2 tane vakada ise üçten fazla mutasyon (%15) görülmüştür. Orta diferansiye OSHK'larda ise çoklu mutasyon saptanmamıştır. Vakaların %56,25'inde tekli mutasyon varlığı gözlenmiştir.

İyi diferansiye OSHK'ların çoğunlukla TNF alfa açısından skor 3 olduğu bulunmuştur (%57). Orta diferansiye OSHK'lerin %60 oranında TNF alfa skor 3 olduğu gözlenmiştir (Tablo 4). TNF alfa boyaması yapılan çoklu mutasyona sahip vakaların hepsinin derecelendirme skoru 6'nın üzerinde izlenmiştir (Resim 1).



Resim 1. TNF alfa pozitif tümör hücrelerinin görünümü. (DAB kromojen x200)

**Tablo 4.** OSHK vakalarında gen alterasyonu, histolojik derecelendirme ve TNF- $\alpha$  skoru

No.	Yeni nesil Dizileme verileri	Histolojik Derecelendirme	TNF- $\alpha$ Skoru
1	PTEN, TP53, ALK	Verrüköz Ca	6
2	TP53, ALK, DDR2	İyi Dif.	6
3	ALK	Orta Dif.	0
4	Wt	İyi Dif.	0
5	PIK3CA	Orta Dif.	0
6	DDR2	İyi Dif.	3
7	TP53	İyi Dif.	-
8	PIK3CA, TP53	Orta Dif.	3
9	Wt	Verrüköz Ca	3
10	TP53, KRAS	İyi Dif.	-
11	TP53	İyi Dif.	-
12	ALK,DDR,EGFR,ERBB2, KRAS, NRAS, PIK3CA, PTEN, TP53	İyi Dif.	-
13	Wt	İyi Dif.	3
14	TP53	İyi Dif.	0
15	TP53	Erken İnv.	-
16	PTEN, DDR2	İyi Dif.	2
17	TP53	Orta Dif.	3
18	Wt	Orta Dif.	1
19	Wt	İyi Dif.	3
20	KRAS	Erken İnv.Ca	3
21	Wt	İyi Dif.	-
22	ALK, TP53	İyi Dif.	-

## 2. Tartışma ve Sonuç

Çalışmamızda yeni nesil dizileme analizi sonucunda, mutasyonu en sık izlenen gen TP53 olmuştur ve vakaların %69'unda saptanmıştır. Bilindiği gibi OSHK'lerde en sık mutasyonu görülen gen TP53 dür, bu bağlamda çalışma bulgularımız literatür ile uyumluluk göstermektedir (16,17).

Çalışmamızda mutasyonu izlenen diğer genler ALK, DDR2, PTEN, PIK3CA ve KRAS'dır. Bu genlerin hepsi OSHK için çokça çalışılmış olan genlerdir. Tüm insan kanserleri göz önüne alındığında, KRAS mutasyonları en yaygın Ras mutasyonu türüdür (17). Ras yolakları, Raf yolunu ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) yolunu içerir. OSHK'lerde PI3K

yolunun aşırı aktivasyonu, PIK3CA mutasyonları veya PTEN kaybı yoluyla meydana gelebilmektedir (17). Diğer yandan ALK ve DDR2 mutasyonları OSHK için invazyon ve metastazla ilişkilendirilen genlerdir (18,19). TP53 geninin 5 vakada tekli, 6 vakada çoklu mutasyonlarda varlığı izlenmiştir. TNF-alfa skorlamalarına göre vakaların çoğunlukla skor 3 olduğu görülmüştür (%60). Çoklu mutasyon varlığı görülen vakaların hepsinde TNF alfa düzeyleri yüksek olarak bulunmuş ve hepsinde TP53 ve ALK geninin beraber mutant olduğu saptanmıştır. Bu bulgular bize TNF-alfanın çoklu mutasyonlarla ilişkilendirilebileceği ve tümörün biyolojik

davranışı açısından fikir verebileceğini düşündürmektedir. Nitekim, TNF alfa pozitifliğinin yüksek oluşu literatürde düşük sağ kalım oranlarıyla ilişkilendirilmiştir ve OSHK'ler için potansiyel bir prognostik bir belirteç olabileceği ileri sürülmektedir (4–8).

Literatür bilgilerimizin ışığında, çalışmamız ülkemizde OSHK'larda yeni nesil dizileme

yöntemi ile gen analizinin yapıldığı ilk çalışmadır. OSHK'lerin genetik karakterizasyonu ile birlikte TNF alfanın potansiyel biyobelirteç olarak ilişkilendirilmesi, vaka sayısının daha geniş olduğu ileriki çalışmalarla ortaya konacaktır.

## KAYNAKLAR

- Jayaprakash C, Varghese VK, Jayaram P, Chakrabarty S, Kudva A, Ray S, et al. and actionable mutational spectrum in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2020;49(5):427-34.
- Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009;45:309–16.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. Goertzen C, Mahdi H, Laliberte C, Meirson T, Eymael D, Gil-Henn H, et al. Oral inflammation promotes oral squamous cell carcinoma invasion. *Oncotarget.* 2018;9:29047–63.
- Krishnan R, Thayalan DK, Padmanaban R, Ramadas R, Annasamy RK, Anandan N. Association of serum and salivary tumor necrosis factor- $\alpha$  with histological grading in oral cancer and its role in differentiating premalignant and malignant oral disease. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2014;15:7141–8.
- Dantas TS, de Barros Silva PG, Verde MEQL, Ribeiro Júnior A de L, Cunha M do PSS, Mota MRL, et al. Role of inflammatory markers in prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2019;20:3635–42.
- Deepthi G, Nandan SRK, Kulkarni PG. Salivary tumour necrosis factor- $\alpha$  as a biomarker in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2019;20:2087–93.
- Nakano Y, Kobayashi W, Sugai S, Kimura H, Yagihashi S. Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in oral squamous cell carcinoma. *Japanese J Cancer Res.* 1999;90:858–66.
- Scheff NN, Ye Y, Bhattacharya A, Macrae J, Hickman DH, Atul K, et al. Tumor necrosis factor alpha secreted from oral squamous cell carcinoma contributes to cancer pain and associated inflammation. *Pain.* 2017;158(12):2396-409.
- Yangın S, Tanman Zıplar Ü, Cansaran-Duman D. Pharmaceutical Applications Based on Next Generation Sequencing Technology in Oncologic Drug Development. *Turkish Bull Hyg Exp Biol.* 2019;76:473–86.
- Sharma V, Nandan A, Sharma AK, Singh H, Bharadwaj M, Sinha DN, et al. Signature of genetic associations in oral cancer. *Tumor Biol.* 2017;39:1–9.
- Jessri M, Farah CS. Next generation sequencing and its application in deciphering head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2014;50(4):247-53.
- Nakagaki T, Tamura M, Kobashi K, Koyama R, Fukushima H, Ohashi T, et al. Profiling cancer-related gene mutations in oral squamous cell carcinoma from Japanese patients by targeted amplicon sequencing. *Oncotarget.* 2017;8:59113–22.
- Hagemann IS, Devarakonda S, Lockwood CM, Spencer DH, Guebert K, Bredemeyer AJ, et al. Clinical next-generation sequencing in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer.* 2015;121:631–9.
- Thompson LDR. World health organization classification of tumours: Pathology and genetics of head and neck tumours. *Ear, Nose Throat J.* 2006;85:74.
- Sawazaki-Calone I, Rangel ALCA, Bueno AG, Morais CF, Nagai HM, Kunz RP, et al. The prognostic value of histopathological grading systems in oral squamous cell carcinomas. *Oral Dis.* 2015;21:755–61.
- Loyo M, Li RJ, Bettgowda C, Pickering CR, Frederick MJ, Myers JN, et al. Lessons learned from next-generation sequencing in head and neck cancer. *Head Neck.* 2013;35:454–63.
- Gonzales CB, De La Chapa JJ, Saikumar P, Singha PK, Dybdal-Hargreaves NF, Chavez J. et al. Co-targeting ALK and EGFR parallel signaling in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2016;59:12-19.
- Xu J, Lu W, Zhang S, Zhu C, Ren T, Zhu T, et al. Overexpression of DDR2 contributes to cell invasion and migration in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2014;15:612–22.