

**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**YASSI HÜCRELİ KANSER ve BAZAL HÜCRELİ KANSERLERDE  
'HEDGEHOG' SİNYAL YOLAĞI : SHH, PTCH-1, GLİ-1 DÜZEYLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Ali Rıza Cenk ÇELEBİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**ANKARA**

**2010**



**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**YASSI HÜCRELİ KANSER ve BAZAL HÜCRELİ KANSERLERDE  
'HEDGEHOG' SİNYAL YOLAĞI : SHH, PTCH-1, GLİ-1 DÜZEYLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Ali Rıza Cenk ÇELEBİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Hayyam KIRATLI**

**ANKARA**

**2010**



07.04.2010

Hacettepe Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,

Dr. Ali Rıza Cenk Çelebi'nin 07 Nisan 2010 tarihinde jürimiz önünde savunmasını yaptığı  
"YASSI HÜCRELİ KANSER VE BAZAL HÜCRELİ KANSERLERDE "HEDGEHOG" SİNYAL  
YOLAĞI: SHH, PTCH-1, GLI-1 DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ" başlıklı çalışma,  
Jürimiz tarafından Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Uğur ERDENER  
HÜTF Göz Hast. Anabilim Dalı

Danışman

Prof. Dr. Hayyam KIRATLI  
HÜTF Göz Hast. Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Ali Şefik SANAÇ  
HÜTF Göz Hast. Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Murat İRKEÇ  
HÜTF Göz Hast. Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Bora ELDEM  
HÜTF Göz Hast. Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Mehmet ORHAN  
HÜTF Göz Hast. Anabilim Dalı

**ONAY**

Bu tez, Tababet/Tıp'ta Uzmanlık Tüzüğü'nün ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki Jüri üyeleri tarafından görülmüş ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı tarafından görülmüş ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Serhat ÜNAL  
Tıp Fakültesi Dekanı

## TEŞEKKÜR

Göz Hastalıkları Uzmanlığı Programı eğitimim süresince desteğini ve yol göstericiliğini esirgemeyen tez danıőmanım Prof. Dr. Hayyam Kıratlı'ya ve her konuda desteğini gördüğüm Hacettepe Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerine içtenlikle teşekkür eder, her zaman destekleri ile yanımda olan sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından desteklenmiştir.

Dr. Ali Rıza Cenk Çelebi

## ÖZET

**Çelebi, A.R.C Yassı hücreli kanser ve bazal hücreli kanserlerde ‘hedgehog’ sinyal yolağı: Shh, Ptch-1, Gli-1 düzeylerinin değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi. Ankara, 2010.**

Ciltteki kök hücreleri yavaş bir şekilde sürekli bölünmeye devam etmekte mikroçevrede bir değişiklik olduğu zaman hücrelerin kendini yenileme döngüsü hızı artmaktadır. Derideki kök hücrelerinin kendini yenileme ve tamirinde çeşitli sinyal iletim yolları rol oynamaktadır. Bu sinyalizasyon yolları; Wnt, Notch, TGFβ, EGF, FGF, IGF, ve Hedgehog sistemleri ve bunların salgı ürünleri oluşturmaktadır. Hedgehog yolağının yanlış düzenlenmesinde hücrelerin kendini yenileyebilme döngüsü aksamakta ve tümör oluşum süreci başlamaktadır. Sonic Hedgehog memeli gelişiminde uygun hücrel proliferasyon için çok önemli bir morfojendir. Bu sinyalizasyon ağındaki Ptch-1 12 döngülü bir transmembran protein olup Shh reseptörü olarak iş görür, ancak kendisi direk olarak hücre içine sinyal gönderemez. Ptch-1 inaktivasyonunun sonuç olarak görüldüğü hedgehog yolağı aşırı ekspresyonu; derinin bazal hücreli kanseri oluşumunda sorumlu olan Gli-1 hedef genlerinin aşırı ekspresyonuna neden olmaktadır. Bu çalışmada konjonktival invaze YHK ve göz kapağı YHK tanılı toplam 22 kesite, konjonktival in situ kanser tanılı toplam 12 kesite, göz kapağı BHK tanılı toplam 41 kesite indirekt İHK inceleme yöntemiyle değerlendirme yapıldı. Shh, Ptch-1 ve Gli-1 primer antikorlar kullanılarak preparatlardaki hedgehog sinyalizasyon ağı elemanlarının ekspresyonlarına bakıldı. Tümör yüzdesindeki puan ve boya intensitesinden elde edilen puanın çarpımı ile elde edilen skorlar istatistik değerlendirmede kullanıldı. SHh intensitesinin BHK grubundaki düşüklüğü istatistiksel olarak anlamlı bulundu bu durum seçilen preparatların kayıtlı olduğu hasta gruplarında nihai cerrahinin eksizyon olduğu düşünüldüğünde invazyon derinliğinin azlığı ile ilişkili olabilir. Yine Ptch-1 skorunun BHK grubundaki düşüklüğü istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup bu durum BHK grubundaki hastalarda Ptch-1 mutasyonunun olabileceğini düşündürmektedir. Ancak konjonktival YHK grubundaki %25 hastada Ptch-1 skorunun 0 olması ve Gli-1 skorunun %66 hastada 4 ve üzerinde olması ile in situ kanser grubundaki %66 hastada Ptch-1 skorunun 2 ve üzerinde olup % 87.5 hastada Gli-1 skorunun 4 ve altında olması in situ kanserden invaze YHK dönüşümde hedgehog sinyalizasyonunun rolü olabileceğini düşündürmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Yassı Hücreli Kanser, Bazal Hücreli Kanser, Hedgehog sinyalizasyonu

## ABSTRACT

**Celebi. A.R.C. Evaluation of the 'hedgehog' signalling pathways: Shh, Ptch-1, Gli-1 levels in squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Ophthalmology. Ankara, 2010.**

Skin stem cells continue to divide slowly. When there is any change in its microenvironment, rate of cell renewal cycle increases. Various signal transduction pathways are involved in the self-renewal and repair of stem cells in the skin. These signaling networks include those of the Wnt, Notch, TGF $\beta$ , EGF, FGF,

IGF, and most recently, the Hedgehog (Hh) families of secreted ligands. Hedgehog pathway mis-regulation can disrupt the cells renewal cycle and as a result of the process; tumor formation begins. Sonic hedgehog (Shh) is a secreted morphogen crucial for appropriate cellular proliferation during mammalian development. Ptch-1, a 12-transmembrane protein, functions as a receptor for Shh, but does not itself transduce the intracellular signals. Constitutive activation of hedgehog signaling, often caused by Ptch-1 inactivation and leading to inappropriate activation of Gli-1 target genes, is crucial for the development of several human tumors including basal cell carcinoma of the skin. In this study, 22 sections diagnosed as conjunctival and eyelid SCC, 12 sections with the diagnosis of conjunctival in situ carcinoma and 41 sections diagnosed as eyelid BCC were evaluated with indirect method of IHC examination. Shh, Ptch-1 and Gli-1 primary antibodies were used to search for the hedgehog signaling network in tumor sections. The percentage of tumor score multiplied with the dye intensity scores; obtained in the use of statistical evaluation. The low SHH intensity that was found in BCC group was statistically significant. This was explained with the limited depth of invasion that was understood from the final excisional surgery. Low Ptch-1 score in the BCC group was statistically significant and this may suggested that Ptch-1 mutation is the probable explanation for this result. The results of 25% patient's Ptch-1 score 0 and 66% of the patient's Gli-1 score 4 and more in conjunctival invaded SCC group's and 66% of the patient's Ptch-1 scores 2 and more and 87.5% patient's Gli-1 scores of 4 and less in the conjunctival in situ carcinoma group made us believe that hedgehog signaling has a role in the transformation of cancer invasion from in situ cancer to invaded SCC.

**Keywords: Squamous Cell Carcinoma, Basal Cell Carcinoma, Hedgehog Signalling**

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	x
ŞEKİLLER .....	xi
TABLolar .....	xii
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Bazal Hücreli Kanser .....	3
2.1.1 Epidemiyolojik Özellikler ve Risk Faktörleri .....	3
2.1.2 Patogenez .....	4
2.1.3 Klinik Bulgular .....	4
2.1.4 Patoloji .....	5
2.1.5 Tedavi .....	5
2.1.5.1 Cerrahi .....	5
2.1.5.2 Radyoterapi .....	5
2.1.5.3 Kriyoterapi .....	6
2.1.5.4 CO2 lazer .....	6
2.1.5.5 Farmakolojik Tedavi .....	6
2.2 Yassı Hücreli Kanser .....	6
2.2.1 Epidemiyolojik Özellikler ve Risk Faktörleri .....	6
2.2.2 Patogenez .....	7



2.2.3	Klinik Bulgular .....	7
2.2.4	Patoloji.....	7
2.2.5	Tedavi.....	8
2.2.5.1	Cerrahi.....	8
2.2.5.2	Radyoterapi.....	8
2.2.5.3	Kriyoterapi.....	8
2.3	Konjonktiva Epitelinin Pigmentsiz Malign Tümörleri (Oküler Yüzeyin Skuamöz Neoplazileri).....	8
2.3.1	Keratotik Plak.....	9
2.3.2	Aktinik Keratoz.....	9
2.3.3	Konjonktival İntraepitelyal Neoplazi .....	9
2.3.4	İnvazif Skuamöz Hücreli Karsinom.....	10
2.4	Hedgehog sinyal yolağı.....	11
2.4.1	SHH.....	12
2.4.2	PTCH1.....	12
2.4.3	GLİ 1.....	13
<b>3</b>	<b>BİREYLER ve YÖNTEM.....</b>	<b>14</b>
3.1	Etik Kurul İzni.....	14
3.2	Çalışma Grubunun Nihai Cerrahisi.....	14
3.3	Preparatların Hazırlanması ve kullanılan IHK yöntemi.....	14
3.4	Kullanılan primer antikolar.....	15
3.4.1	SHH primer antikoru.....	15
3.4.2	PTCH-1 primer antikoru.....	15
3.4.3	GLİ-1 primer antikoru.....	15
3.5	Skorlama.....	15
3.5.1	Tümör Yüzdesi.....	16

3.5.2 Boya intensitesi.....	16
3.6 İstatistik.....	16
<b>BULGULAR.....</b>	<b>17</b>
4.1 Çalışma grubu Demografik Özellikleri.....	17
4.2 SHH IHK boyanma paterni ve skorları.....	17
4.3 PTCH-1 IHK boyanma paterni ve skorları.....	18
4.4 GLİ-1 IHK boyanma paterni ve skorları.....	20
4.5 Tümör gruplarına uygulanan Nihai Cerrahiler.....	21
<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>23</b>
<b>SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....</b>	<b>26</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>27</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
BHK	Bazal Hücreli Kanser
cGy	<i>Centigray</i>
Cm	Santimetre
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
DHH	Desert Hedgehog
DNA	Deoksiribonükleik Asit
GLI	Glioma Assosiyeli Onkogen Homolog
HPV	Human Papilloma Virüs
HSV	Herpes Simpleks Virüs
IHH	Indian Hedgehog
INF	Interferon
KT	Kemoterapi
PTCH	Patched Homolog
RT	Radyoterapi
SHH	Sonic Hedgehog
SMO	Smoothened Homolog
UV	Ultraviyole
YHK	Yassı Hücreli Kanser

## ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil-1: SHH, PTCH-1 ve GLI-1 in birbiriyle olan ilişkisi.....	13
Şekil-2: Primer antikorların boya intensitesi .....	22

## TABLOLAR

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1:</b> Hastaların yaş dağılımı .....	17
<b>Tablo 2:</b> SHH boya intensitesinin tümör gruplarındaki dağılımı.....	17
<b>Tablo 3:</b> Kanser gruplarında SHH boyanma yüzdeleri .....	18
<b>Tablo 4 :</b> SHH skorlarının kanser gruplarında dağılımı.....	18
<b>Tablo 5:</b> PTCH-1 boya intensitesinin tümör gruplarındaki dağılımı.....	19
<b>Tablo 6:</b> Kanser gruplarında PTCH-1 boyanma yüzdeleri .....	19
<b>Tablo 7:</b> PTCH-1 skorlarının kanser gruplarında dağılımı .....	19
<b>Tablo 8:</b> GLİ-1 boya intensitesinin tümör gruplarındaki dağılımı .....	20
<b>Tablo 9:</b> Kanser gruplarında GLİ-1 boyanma yüzdeleri.....	20
<b>Tablo 10:</b> GLİ-1 skorlarının kanser gruplarında dağılımı .....	21
<b>Tablo 11:</b> Tümör gruplarına uygulanan nihai cerrahiler .....	21
<b>Tablo 12:</b> Ekzenterasyon uygulanan 5 hastanın SHH, PTCH-1, GLİ-1 skorları ....	22

## 1. GİRİŞ

Bazal hücreli kanser insanda en sık rastlanan periokuler kanserdir (1). Yavaş gelişen bir tümör olmasına rağmen orbital yayılım nedeniyle göz çevresi yumuşak dokular için önemli bir morbidite nedenidir. Yassı hücreli kanser kapakların ikinci en sık rastlanan tümörüdür (1).

Kök hücrenin kendini yenileyebilme sürecindeki düzensizliğe yol açan herhangi bir olay karsinogenez sürecinin başlaması ile sonuçlanabilir. Gelişimsel sinyal yolağında Wnt, Notch ve SHH gibi birkaç madde hematopoietik sistem, deri, sinir sistemi ve meme dokusu gelişiminde ve yenilenme sürecinde önemli bir rol oynamaktadır (2). Yine hedgehog sinyal yolağı sindirim sistemi embriyonik gelişiminde de önemli role sahiptir. Ayrıca bu sistem postembriyonik dokuların homeostasin da sağlanmasını kök hücre ölümünü düzenleyerek de katkıda bulunmaktadır (3). Hedgehog sinyalizasyonu eritroid öncüllerin gelişimi sürecinde de etkili role sahiptir (49).

Sonic Hedgehog memeli gelişiminde uygun hücrel proliferasyon için çok önemli bir morfojendir (4). Ptch-1 12 döngülü bir transmembran protein olup Shh reseptörü olarak iş görür, ancak kendisi direk olarak hücre içine sinyal gönderemez. Ptch inaktivasyonunun sonuç olarak görüldüğü hedgehog yolağı aşırı ekspresyonu derinin bazal hücreli kanseri oluşumunda sorumlu olan Gli-1 hedef genlerinin aşırı ekspresyonuna neden olacaktır (5).

Memeli hedgehog sinyal yolağı gen ailesi Shh, Dhh, Ihh gibi bazı bağlayıcı proteinleri kodlarlar. Hedgehog sinyal yolağı membran reseptör Ptch-1 tarafından baskılanan Smo transmembran proteini tarafından aktive edilir. Hedgehog ligandı Ptch-1e bağlanınca Smo salınımı olur. Böylece Gli-1 transkripsiyon faktörlerinin nükleer translokasyonu ve aktivasyonu olur, bu olay da Ptch-1 gibi hedef genleri uyarır ve olay döngüsel olarak ilerler (6,7). Daha önceki çalışmalarda derinin bazal hücreli kanseri, medulloblastoma, akciğer kanseri, sindirim sistemi ve prostat kanseri gibi çeşitli kanserlerin gelişiminde hedgehog sinyal yolağının ilişkisi gösterilmiştir (6). Ek olarak özellikle bazal hücreli kanserde ptch-1 gen mutasyonları sonucunda hedgehog sinyal yolağındaki aşırı ekspresyon gösterilmiştir (8). Yine 9q22 kromozomundaki Ptch-1 inaktivasyonu nadir olarak görülen bazal hücreli

kanser oluşumuna eğilim oluşturan bazal hücre nevüs sendromundan sorumlu tutulmuştur (9).

Bu çalışmada; retrospektif olarak insan konjonktival YHK, konjonktival in situ kanser, göz kapağı YHK, göz kapağı BHK parafin doku bloklarında immunohistokimya yöntemi kullanılarak Shh aşırı ekspresyonunu araştırılacaktır. Ptch1 azalmış ekspresyonu Gli-1 aşırı ekspresyonları yine immunohistokimya yöntemi kullanılarak araştırılacaktır.

Bu tezin hipotezi; yassı hücreli kanser ve bazal hücreli kanser patogeneğinde Shh sinyal yolağının başlıca proteini olan Shh aşırı artışını ve bu yolağın reseptör proteini olan Ptch1 in azalmış ekspresyonu ile Gli1 in hücresel artışını gösterebilmektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Göz Kapağındaki herhangi bir yapıdan kanser gelişebilmektedir. Malign lezyonlar göz kapağı çevresinde siktir, çünkü kanser gelişim etyolojisinde önemli bir role sahip olan güneş ışığı ile çoğu meydana gelmektedir (10). Göz kapağı kanserleri sınırlı bir semptom grubu ile göz hekiminin karşısına çıkar. Göz kapağındaki yapısal değişiklikler, nodularite, üzerinde ve/veya tabanında telenjektatik damarların bulunması, üzerindeki kirpiklerin döküldüğü, meibomian kanal uçlarının silindiği ülserle kanayan ve kurutlanan bir lezyondan alınan doku tanısında yüksek oranda malign bir süreç ile karşı karşıya olunacaktır. Göz kapağı malignansileri nadiren metastaz yapımlarına rağmen lokal olarak destrüktif olabilmektedir.

Oküler yüzeyin skuamöz neoplazileri, konjonktiva ve kornea epitelinin prekanseröz ve kanseröz lezyonlarını kapsayan bir terimdir. Bu grup içerisinde; keratotik plak, aktinik keratoz, konjonktiva ve kornea intraepitelyal neoplazileri (displazi- in situ karsinom), ve invazif skuamöz hücreli karsinom yer almaktadır.

### 2.1 Bazal Hücreli Kanser

Göz Kapaklarının en sık kötü huylu tümörü olup, tüm göz kapağı tümörlerinin %90'dan fazlasını oluşturur(1). Lezyonlar sık olarak alt kapakta (%52) görülmekle birlikte bunu azalan sıklıkta iç kantus (%27), üst kapak (%15), dış kantus(%6) izlemektedir (10). BHK genellikle yavaş büyür ancak bulunduğu yerde belirgin doku tahribatına yol açarak yapısal bozukluğa neden olur.

#### 2.1.1 Epidemiyolojik Özellikler ve Risk Faktörleri

BHK lerin %99 u beyazlarda görülür, bu lezyonların % 95 i 50-80 yaş arası görülür ve ortalama tanı yaşı 60 yaş'dır. Açık tenli bireylerde UV ışık maruziyeti en önemli risk faktörüdür. Bronzlaşma yetersizliği, cilt yanıklarına bağlı skar dokusu, açık renkli veya kızıl saçlı olmak, inorganik arsenik maruziyeti, çocukluktan itibaren ciltte çillerin bulunması gibi kişisel etkenler; Gorlin sendromu, Rombo sendromu, Basex-Dupré sendromu, kseroderma pigmentozum gibi genetik hastalıklar; organ transplantasyonu, AİDS gibi immünsüpresyonun bulunması ; güneş ışınlarına uzun süre maruz kalmak en önemli risk faktörleridir. Çocukluk ve ergenlik döneminde fazla miktarda güneş ışınlarına maruz kalınması ileri yaşlarda BHK gelişim



riskini arttırmaktadır. Balıkçı, denizci ve golf oyuncusu gibi açık alanlarda uzun süre bulunanlarda kapalı ortamlarda bulunanlara göre BHK gelişme olasılığı daha yüksektir.

### 2.1.2 Patogenez

Bazal hücreli kanserin orjini tam anlamıyla açığa açığa kavuşturulamamıştır. Epidermisin bazal hücre taakasından köken aldığı, kıl folikülleri infindibuler hücrelerinden köken alabileceği veya epidermiste çoğalan ve farklılaşan pluripotent kök hücrelerden oluşabileceğine yönelik çeşitli görüşler mevcuttur (11). Ancak şu bir gerçektir ki BHK herhangi bir öncül lezyondan gelişmemektedir (12).

### 2.1.3 Klinik Bulgular

Göz kapağında en sık olarak alt kapakta (%52) görülmekle birlikte bunu azalan sıklıkta iç kantus (%27), üst kapak (%15), dış kantus (%6) izlemektedir. Klasik formu olan nodüler tümör sert ve yuvarlaktır. BHK yavaş büyüyen bir tümördür ve 6 ayda klinik olarak 2 katına ulaşır. Kapakta tars anatomik bariyer görevi görür ve tümör bu nedenle laterale büyüme eğilimindedir. En sık (%70) görülen ve prognozu en iyi olan morfolojik görünüm nodüler tiptir (12). Tümör üzerindeki epidermis belirgin olarak incelmıştır ve saydam görünüme sahiptir. Tümör zaman içerisinde kubbe şeklini alabilir. Tümör merkezinde kanlanma azalır bunu sonucunda merkezde çukurlaşma ve üzerinde ülserasyon gelişebilir. Bu şekline nodüloülseratif form denilmektedir. Yüzeysel plak tarzında BHK diskoid ekzema, psöriyazis gibi cilt hastalıklarını andıran eritamatoz plak tarzında bir görünüme sahiptir. Morfeik tip BHK sınırları klinik olarak belirsiz, fazla kabarık olmayan, pembe soluk beyazdan sarıya kadar değişen renklerde, skar benzeri plak görünümündedir. Tümör üzerindeki epidermis uzun süre bozulmaz ve nodüler tipteki gibi saydamlığı belirgin değildir. Özellikle iç ve dış kantal bölge yerleşimli morfeik tip tümörler orbital ve paranasal sinüslere yayılım gösterebilir (13). Çok nadiren lezyonda hassasiyet ve ağrı bulunabilir, bu perinöral invazyon belirtisi olabilir ki bu durum %1-3 olguda gözlenir. Perinöral infiltrasyon orbital yayılım için ve metastaz için risk faktörüdür ve kötü prognoz göstergesidir (13). Metastaz önce bölgesel lenf noduna olur sonra kemik, akciğer ve karaciğer metastazları gelişebilir. Metastazdan sonra prognoz kötüdür.

### **2.1.4 Patoloji**

Tümör hücreleri yüksek çekirdek-sitoplazma oranı ile monomorfik çekirdek ile karakterizedir; anaplastik özellikler ve anormal atipik mitotik figürler sık değildir. Yardımcı olabilecek tanısal bir özellik, bazı otörler tarafından dokunun işlenmesi sırasında oluştuğu düşünülse de, tümörün çevredeki stromadan karakteristik yarık şeklinde ayrılmasıdır. BHK tümör hücreleri yuvalar ve kordonlar halinde stromada yer alırlar, her bir yuvadaki perifer hücresele radyal palizatlanma gösterir. BHK skuamöz, keratotik, adenoidal, foliküler, ve sebasöz alt tipleri başta olmak üzere en az 20 farklı histolojik alt tipte farklılaşma gösterebilir (14). BHK ile YHK arasında orta derecede skuamöz farklılaşma gösteren BHK de rekürens ve metastaz daha sıktır.

### **2.1.5 Tedavi**

#### **2.1.5.1 Cerrahi**

Lezyonun tamamen çıkartılması tercih edilen tedavi seçeneğidir (15). Cerrahi eksizyondan sonra cerrahi sınırlarda tümör bulunmadığı histopatolojik inceleme ile doğrulanmalıdır. Geniş eksizyon uygulandıktan sonra rekonstrüksiyon teknikleri uygulanmalıdır. Uygulanan cerrahi kesi tümör kesi sınırından 3-4 mm uzaktan geçmelidir. Bu yöntem nüksü %5'e kadar düşürmektedir. Perinöral invazyon, iç veya dış kantal yerleşim, morfeik histoloji, rekürens orbital tümör varlığında ekzenterasyon en uygun tedavi seçeneğidir.

#### **2.1.5.2 Radyoterapi**

Hastanın genel durumu cerrahi tedaviye uygun değilse veya tümörün çıkarılması mümkün değilse 3000-6000 cGy radyoterapi uygulanabilir. RT cerrahi tedaviye göre rekürensi daha fazladır, kozmetik görünümü kötüdür ve de RT uygulanan sahalara cerrahi uygulamak zordur. RT sonrası kirpiklerin tamamen kaybı, ektropion, nazolakrimal kanal tıkanıklığı, kuru göz sendromu, katarakt ve korneal ülserasyon gibi komplikasyonlar gelişebilmektedir (16).

### **2.1.5.3 Kriyoterapi**

Periorbital bölge dışındaki BHK lerin tedavisinde sıklıkla kullanılır. 1 cm'den büyük lezyonlarda, iç kantal lezyonlarda, morfeik lezyonlarda kontrendikedir. Tedavi sonucunun histolojik inceleme ile doğruluğunun yapılamaması, skar ve pigmentasyon değişikliği nedeniyle rekürensi takip etmenin zorluğu nedeniyle fazla tercih edilmemektedir (17).

### **2.1.5.4 CO2 lazer**

Sadece yüzeysel tümörlerde uygulanır, dokuda pigmentasyon değişikliğine neden olmaz.

### **2.1.5.5 Farmakolojik Tedavi**

Sistemik veya lokal KT uygulanabilir. Geniş cerrahi eksizyon gerektiren ve bunu hastanın istemediği durumlarda, hastanın genel durumu cerrahi tedavi için uygun olmadığı durumlarda ve sistemik metastazda KT uygulanabilir. Topikal imiquimod ve asitretin (18), intralezyonel INF, topikal sidofovir, topikal veya oral retinoidler, bleomisin, paklitaksel, sisplatinum (19) kullanılan kemoterapotik ajanlardır.

## **2.2 Yassı Hücreli Kanser**

Göz kapağı malign tümörleri arasında BHK den sonra %2-5 sıklıkta görülür (20). Göz kapağında bulunan prekanseröz bir lezyondan gelişebileceği gibi primer olarak da gelişebilmektedir. Metastaz riski BHK dan daha yüksektir. YHK lerin çoğu güneşten hasarlanmış ciltlerde oluşmakta (21), alt göz kapakları üst göz kapağından daha sık tutulur.

### **2.2.1 Epidemiyolojik Özellikler ve Risk Faktörleri**

YHK ileri yaş açık tenli bireylerde daha sık görülür. Olguların %80i 60 yaş üzerindedir (21). Aktinik keratoz, radyasyon dermatiti, yanık skarı, kronik inflame cilt lezyonu, Bowen Hastalığı gibi cilt rahatsızlıkları olanlarda daha sık görülmektedir.

### 2.2.2 Patogenez

YHK patogenezinde kesin bir mekanizma bilinmemekle birlikte çevresel ve içsel stimuluslarla hücre büyüme ve regülasyonunu sağlayan kontrol mekanizmalarının bozulması ana neden olarak düşünülür (21). Etkili çevresel faktörler; UV radyasyon, iyonize radyasyon, arsenik maruziyeti, daha önceden PUVA tedavisi almak ve HPV infestasyonudur. İçsel faktörler; otozomal resesif geçişli kseroderma pigmentozum ve okulokutanöz albinizmdir. Siyah ırkta en önemli içsel faktör skar dokusuna sahip olmaktır (21).

### 2.2.3 Klinik Bulgular

Klinik olarak ülser, plak, mantar veya nodüler büyümeler şeklinde çeşitli görünümde olabilir. Patognomonik bir klinik görünümü yoktur. Birçok lezyonla karışabilir, şüpheli lezyonlardan mutlaka biyopsi yapılarak patolojik tanı ile doğrulanmalıdır. Tümör genellikle ortası ülser ve kabuklu, sınırlarında endürasyon olan, kabarık, eritematöz lezyonlar şeklinde görülür. Derin orbital dokulara direk yayılım gösterebilir. İntrakranial yayılım mümkündür. Periosta ulaşan tümör periostu geçerek orbital kemik dokulara yayılabilir veya periost boyunca ilerleyip derin orbital dokuları etkileyebilir. Trigeminal ve fasyal sinirler yoluyla orbita içine yayılım mümkündür. Başlangıçta herhangi bir belirti olmazken perinöral yayılım (%4-8) varlığında bu sinirlerin dağılım alanında ağrı, yanma ve hissizlik meydana gelebilir (22). Perinöral invazyon varlığında nüks oranı %47, metastaz oranı %35'e çıkmaktadır. Nükslerin %95 i 5 yıllık süreçte görülmektedir (23). Bu nedenle cerrahi tedavi sonrası hastaların en az 5 yıllık takipleri önemlidir. Dış kantal yerleşimli tümörler preaurikular, iç kantal yerleşimli tümörlerdaha çok submandibuler lenf nodlarına yayılım gösterir ki bu BHK den daha siktir (%2-20). Yanık skarı, kronik inflame cilt lezyonu ve RT zeminide gelişen tümörler ile, immünitesi baskılanmış hastalarda gelişen YHK de hematojen yolla uzak organ metastazı görülebilir (24).

### 2.2.4 Patoloji

Büyüyen tümör hücreleri dermis epidermis sınırındaki bazal membranı geçerek dermis tabakası içinde düzensiz kitleler oluşturur. Yüzeyde ise aktinik değişikliklerden daha ileri düzeyde epitel değişikliğine neden olur. Tümör çevresinde lenfosit ve plazma hücrelerinden oluşan kronik inflamatuvar reaksiyon gelişir. İyi

diferansiye YHK de eozinofilik sitoplazma ve hiperkromatik nükleus içeren poligonal hücreler içerir. Diskeratoz, keratin incileri, hücreler arası köprüleşme ve anormal mitotik aktivite sıkça görülür. Zayıf diferansiye lezyonlar daha az keratinizasyon ve köprüleşme gösterir.

## **2.2.5 Tedavi**

### **2.2.5.1 Cerrahi**

Geniş sınırla cerrahi eksizyon en uygun tedavi seçeneğidir. Orbital yağ dokusu tutulumu, kemik dokusu tutulumu veya perinöral yayılım varsa orbital ekzenterasyon gerekir (25).

### **2.2.5.2 Radyoterapi**

Cerrahi tedaviye uygun olmayan veya cerrahi tedaviyi kabul etmeyen hastalara uygulanabilir. Postoperatif radyoterapi mikroskopik perinöral invazyonu olan tüm hastalara önerilmektedir (26).Uzak metastazı olan orbital yayılımın palyatif tedavisi için de RT uygulanabilir. RT BHK den daha dirençli olduğu için daha yüksek doz daha uzun süreli verilmelidir. Santral sinir sistemi tutulumu gelişirse en uygun tedavi seçeneğidir. Ancak etkisi palyatiftir. Kemiğe infiltre YHK RT yumuşak dokudaki YHK den daha dirençlidir. RT uygulanmış alanlarda gelişen doku atrofisi ve damar yapısındaki bozulma rekonstrüksiyon cerrahisini zorlaştıran etkenlerdir.

### **2.2.5.3 Kriyoterapi**

İç kantus yerleşimli olmayan, iyi sınırlı, 1 cm den küçük, konjonktival forniks ve kemiğe ulaşmamış tümörlerde, cerrahiye kabul etmeyen hastalarda bir tedavi alternatifi olabilir.

## **2.3 Konjonktiva Epitelinin Pigmentsiz Malign Tümörleri (Oküler Yüzeyin Skuamöz Neoplazileri)**

Etyolojide en önemli etkenler; güneşin UV ışınları, HPV tip16-18 enfeksiyonu, AIDS, travma, kronik inflamasyon, vitamin-A eksikliği, HSV-1 enfeksiyonudur. İleri yaş, beyaz ırk, sıcak iklim, yoğun güneş ışığı, sigara, petrol ürünleri ile temas, uzun süreli kontakt lens kullanımı, kseroderma pigmentozum risk

faktörleri olarak yer almaktadır (27). UV-B ışınları epitel hücrelerinde DNA hasarına yol açmakta, DNA'nın tamir mekanizmasındaki bozulma ve somatik mutasyon ile oküler yüzey skuamöz neoplazileri gelişmektedir. Konjonktiva ve kornea epitelinin kök hücreleri limbusda yer almaktadır. Oküler yüzeyin skuamöz neoplazileri de limbustan başlama eğilimindedir. Kök hücre teorisine göre dış etkenler, dokudaki değişimler nedeni ile bu anatomik bölgede değişen koşullar, kök hücrelerinde kontrol mekanizmasını bozmakta, anormal epitel ve skuamöz neoplazilerin gelişimine yol açmaktadır (28).

Oküler yüzeyin skuamöz neoplazileri göz tümörlerinin %14 nü oluşturur (28). Gözde kızarıklık, yanma batma gibi şikayetler olabilir. Klinik olarak lezyonları birbirinden ayırmak güçtür, kesin tanı histopatoloji ile konulmaktadır.

### **2.3.1 Keratotik Plak**

Kapak aralığında bulbus ve limbus konjonktivasında görülür. Düz beyaz bir plak şeklindedir. Hızlı bir büyüme eğilimi yoktur. Konjonktiva epitelinde hiperkeratoz, akantoz, parakeratoz vardır. Diskeratoz ve karsinoma dönüşüm eğilimi yoktur.

### **2.3.2 Aktinik Keratoz**

Kapak aralığında limbusta lokalize lökoplakik bir lezyondur. Kronik inflamasyonu olan pinguekula ve pterijyumlar üzerinde gelişir. Prekanseroz olarak kabul edilir.

### **2.3.3 Konjonktival İntraepitelyal Neoplazi**

Skuamöz displazi ve in situ karsinom konjonktival intraepitelyal başlığı altında izlenen iki antidedir. Histopatolojide bazal epitel hücre tabakasında artış, hücre diziliminde bozulma, nükleuslarda atipi, mitoz görülür.

Skuamöz displazide çoğalan bazal epitel hücreleri ve epitel hücrelerindeki değişim epitelin sadece alt bölümünde yer alır. Bazal epitelden itibaren epitel kalınlığının %25-33 ü etkilenmişse hafif, %33-75 etkilenmişse orta, %75 ve daha fazlası etkilenmişse ağır displaziden söz edilir.

İn situ karsinomda çoğalan bazal epitel hücrelerie epitel hücrelerindeki değişimler, epitel kalınlığının tümünü kapsamıştır.

Her iki lezyonda da bazal membran sağlamdır. Normal ve anormal epitel yapıları arasında keskin sınır vardır.

Konjonktival intraepitelyal neoplazi prekanseröz bir lezyondur.

#### 2.3.4 İnvazif Skuamöz Hücreli Karsinom

İntraepitelyal neoplaziden daha büyük, daha seyrek ve daha kötü seyirlidir. Genellikle yaşlı kişilerde görülür. Daha çok limbusda, kapak aralığına uyan bölgede başlar. Konjonktiva ve korneayı birlikte tutar, fornikslere ve kapak konjonktivasına yayılabilir. Açık griden pembe kırmızıya kadar değişen renklerde olabilir. Tümörün papillomatöz, lökoplakik, jelatinöz ve pajetoid klinik tipleri vardır. Papillomatöz ve lökoplakik tipler, nodüler veya difüz gelişebilirler. Nodüler tipte invazyon ve metastaz daha siktir. Difüz olanlar ise kronik bir seyir gösterir. Gelişimi yüzeyel ve yavaştır. Bazen tüm kornea yüzeyini örtebilir. Çok ilerlemiş olduğunda kapak aralığından dışa doğru taşabilir. Kornea, sklera ve göz küresi içine %2-13, orbitaya %12-16 oranlarında yayılım bildirilmektedir (29). Bölgesel lenf bezlerine, parotise, akciğere ve kemiklere metastaz yapabilir.

Histopatolojide; normal epitelin yerinde keratinizasyon, akantoz ve mitotik aktivite gösteren anormal epitel hücreleri görülür. Bazal membran bozulmuştur, atipik epitel hücreleri konjonktiva stromasına inmiştir.

Konjonktiva ve korneaya lokalize yüzeyel tümörlerde başta gelen tedavi yöntemi eksizyon ya da eksizyonla birlikte kriyoterapidir. Ekzizyon kriyoterapi ile birlikte uygulandığında nüks oranı % 30 dan %9 a düşmektedir (30). Konjonktiva ve korneaya lokalize yüzeyel tümörlerde son yıllarda birincil ya da nüksleri önlemek amacıyla eksizyonla birlikte ek tedavi olarak topikal KT ve topikal immunoterapi gibi yöntemler uygulanmaktadır. Bu amaçla mitomisin -C ve 5-florourasil kullanılmaktadır, her iki kemoterapötik ajan da hücrede DNA yapımını inhibe etmektedir. INF-2a ve INF-2b topikal olarak kullanılan immunoterapotiklerdir. Oküler yüzeyin skuamöz neoplazileri düşük dereceli malign tümörler olmalarına rağmen prognozları değişkendir. Prekanseröz olan intraepitelyal neoplaziler invazif skuamöz karsinoma nadiren dönüşür ancak eksizyon sonrası nüksleri siktir ve genellikle ilk 2 yıl içerisinde gelişir (31). Skuamöz neoplazilerin göz içine invazyonları ve metastazları nadirdir. Metastazlar geç tanı konmuş ve geç tedavi edilmiş hastalar ile sık nüks eden agresif seyirli tümörlerde görülebilir. Metastazlar

en sık preauriküler, submandibüler lenf nodları ile parotislere, akciğerlere ve kemiklere olur.

#### 2.4 Hedgehog sinyal yolağı

Hedgehog sinyal yolağı böceklerin segmental gelişimi ve büyümesinin kontrolünün gösterilmesi bağlamında ilk kez *Drosophila*'da tanımlanmıştır. Derideki kök hücrelerin kaynağı olarak epidermisin bazal hücre tabakası günümüze kadar bilinegelen bir gerçektir.

Deri kanserlerinde kök hücre kaynağı olarak keratinosit kök hücreleri kıl folikülü şişkin kısmında, interfoliküler epidermis ve sebace bez yer almaktadır. Bazal hücreli kanserin bu kök hücre gruplarından köken aldığı düşünülmektedir (32). Ciltteki kök hücreleri yavaş bir şekilde sürekli bölünmeye devam etmekte mikroçevrede bir değişiklik olduğu zaman hücrelerin kendini yenileme döngüsü hızı artmaktadır (53). Bu hücrelerin yenilenme döngüsünün tamamlanmasında yaklaşık 57 çeşit gen rol almaktadır (33). Bu genler büyümenin uyarılması, çoğalmanın sağlanması ve farklılaşmada çeşitli protein ligandlar eksprese ederek bu sürecin tamamlanmasında katkıda bulunmaktadır. Bu sürecin artan yenilenme süreci ile sonuçlanacak çeşitli genlerin mutasyonları tümör oluşum sürecini başlatabilecektir.

Derideki kök hücrelerin kendini yenileme ve tamirinde çeşitli sinyal iletim yolları rol oynamaktadır (50). Bu sinyalizasyon yolları ; Wnt, Notch, TGF $\beta$ , EGF, FGF, IGF, ve Hedgehog sistemleri ve bunların salgı ürünleri oluşturmaktadır. Hedgehog yolağının yanlış düzenlenmesinde hücrelerin kendini yenileyebilme döngüsü aksamakta ve tümörigenezis süreci başlamaktadır ( 6).

SHh hücre-hücre iletişimi, hücre çoğalması, hücre ölümü, kök hücreleri devamlılığının sağlanması, hücrenin kendini yenileme sürecini hematopoietik, deri, sinir sistemi ve meme dokusunda sağlamaktadır(34). Bu yolda *Sonic Hedgehog (Shh)*, *Indian Hedgehog (Ihh)*, veya *Desert Hedgehog (Dhh)* salınan ligandları oluştururken, *Patched-1 (PTCH1)* ve *Patched-2 (PTCH2)* bu ligandların reseptörlerini oluşturmaktadır.

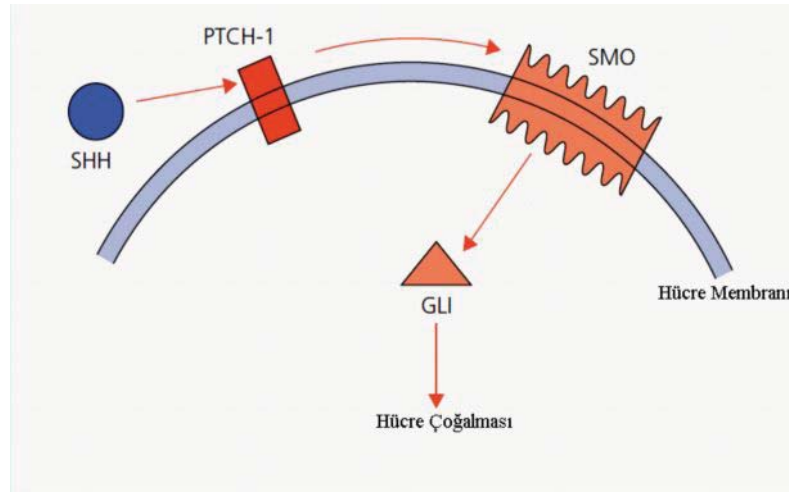


### 2.4.1 SHH

Hedgehog sinyal yolağının 3 önemli proteininden en çok çalışılmış olanı ve iyi bilinen bir protein ligand tır. Shh embriyonik organogeneziste, beyin ve ekstremite gelişiminde önemli role sahiptir. Kök hücre bölünmesi ve hücre bölünmesinin düzenlenmesinde etkilidir. 7. Kromozom uzun kolunda eksprese edilir. Shh yolağındaki aksama kök hücrelerin anormal gelişiminde etkin role sahiptir. Shh sinyalizasyonunun artışı epidermal tümörlerde görülür (5,35) Shh sinyalizasyonu artışı beyin, cilt, kas, küçük hücreli akciğer, gastrointestinal sistem, prostat, meme ve pankreas kanserlerinden sorumlu tutulmuştur (36).

### 2.4.2 PTCH-1

Tümör oluşum sürecinin erken basamakları ile direk bağlantılı bir tümör baskılayıcı genin protein ürünüdür. Ptch-1 9. Kromozom uzun kolunda, Ptch-2 1.kromozomun kısa kolunda eksprese edilir. Ptch-1 protein ürünü hücre membranını kateden 12 segmentli membran proteinidir. Shh ailesi sinyal molekülleri için bir reseptör görevi görür (8). Shh ligandları varlığında hedgehog sinyalizasyon yolağının diğer bir proteini olan Smo üzerindeki baskı kalkmakta, Shh Ptch-1 e bağlanarak Smo aracılığı ile hücre içine sinyal gönderilecek ve kök hücrenin çoğalması uyarılıcaktır. Şekil-1 de bu ilişki gösterilmektedir. SMO Ptch-1 in negatif kontrolü altındadır. SHH ortamda arttığında Ptch-1 e bağlanacak ve SMO serbest kalacaktır.Ptch-1 inaktivasyonu BHK ile giden nadir görülen bazal hücre nevus sendromundan sorumludur (9). PTCH geni sporadik BHK (PTCH-1) ve bazı medulloblastomlar (PTCH-2) ile rabdomiyom ve rabdomiyosarkomlarda da mutasyona uğramıştır (8,37). Birçok deri-dışı kanserde de Ptch-1 mutasyonu önemli rol oynamaktadır (52).



Şekil-1: SHH, PTCH-1 ve GLİ-1 in birbiriyle olan ilişkisi

### 2.4.3 GLİ 1

Çinko parmak proteinlerinden birisidir. İlk kez glioma da ekspresyonunun artışı görüldüğü için GLIOMA-ASSOCIATED ONCOGENE HOMOLOG adını almıştır. Gli-1 12. Kromozomun uzun kolunda eksprese edilir. Gli-1 kök hücre proliferasyonunun regulasyonunda hücre ölümünü düzenleyerek katkıda bulunmaktadır (38). Gli 1 aşırı aktivasyonu BHK gelişimi ile ilişkili bulunmuştur (39) Smo Ptch supresyonu altında olan Gli aktivatördür. Sonic Hedgehog ligandların varlığında Ptch ın Smo üzerindeki süpresyonu kalkmaktadır. Bu durumda Smo Gli sitoplazmik transkripsiyon faktörlerinin nükleusa geçip, hücrelerin çoğalmasına için gereken proteinlerin ekspresyonunu artırmasına neden olacaktır.Şekil-1 de bu durum gösterilmiştir.

### 3. BİREYLER ve YÖNTEM

Çalışma Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Onkoloji Birimi hasta kayıt defterinden retrospektif olarak 01,01,1998 ile 01,01,2009 arasında Konjonktival invaze YHK, göz kapağı YHK, Konjonktival in situ kanser ve Göz kapağı BHK tanılı hastaların patoloji kayıtlarına ulaşıldı. 01,01,1998 ile 01,01,2009 arasında konjonktival invaze YHK ve göz kapağı YHK tanılı toplam 22 kesite, konjonktival in situ kanser tanılı toplam 12 kesite, göz kapağı BHK tanılı toplam 41 kesite İndirekt İHK inceleme yöntemiyle değerlendirme yapıldı.

#### 3.1 Etik Kurul İzni

Çalışmaya başlamadan önce “H.Ü. Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulundan” LUT 09/26 – 1 numara ile 16 Nisan 2009 tarihinde onay alındı.

#### 3.2 Çalışma Grubunun Nihai Cerrahisi

Retrospektif olarak Hacettepe Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden ulaşılan preparatların kayıtlı olduğu hastalara uygulanan nihai cerrahiler eksizyon veya ekzenterasyon olarak not edildi.

#### 3.3 Preparatların Hazırlanması ve kullanılan İHK yöntemi

Parafin bloklardan mikrotom ile 3-4 micrometre kesitler alındı. 75 °C etüvde 40 dk bekletildi. Daha sonra preparatlar ksilen solüsyonunda 10 dk boyunca bekletildikten sonra sırasıyla %95-%85-%75 lik alkol solüsyonlarından geçirildi. %3 hidrojen peroksit ve metanol solüsyonunda nonspesifik bağlanmaları bloke etmek için 20 dk bekletildi.%10 sitrat veya %10 edta ile 3 dk basınçlı tencerede beklenerek antijen retrieval yapıldı. %10 fosfat tampon (PBS+tween 20) çözeltisi ile preparatlar üzerindeki yüzey gerilimi azaltıldı. Preparatlar ‘chamber’ a dizildi. Dokudaki zemin boyanmasını engellemek için ‘Süper block’ solusyon damlatılarak 5 dk beklendi. Slaytlar PBS ile yeniden yıkandı. Primer antikorlar antikor seyreltici ile 1/100 derişime getirildi. Antikorların akmaması için preparat üzerindeki dokuların etrafı silindi. Primer antikorlar damlatıldı ve 1 saat beklenildi. Daha sonra sekonder antikor slaytlara damlatılıp 10 dk beklenildi.

Antikor geçişlerinde slaytlar PBS ile 3 kez yıkandı. Daha sonra tersiyer antikor chromogenin bağlanması için damlatıldı 10 dk beklenildi. DAB chromogen solusyonu hazırlanıp damlatıldı ve 10 dk beklenildi. Preparatlar hematoksilin boyamaya hazırlamak için eşme suyunda yıkandı. Hematoksilin ile boyanan preparatlar alkolden geçirildikten sonra kurumaya bırakıldı, ksilende 15 dk bekletildi. 30 dk sonra balsam damlatılarak üzerleri lameller ile kapatıldı ve mikroskop altında incelemeye hazır hale getirildi.

### **3.4 Kullanılan primer antiorlar**

#### **3.4.1 SHH primer antikoru**

Abcam firmasından AB73958 klon numarasına uyan antikor kullanıldı. İnsan akciğer dokusunda sitoplazmik/membranöz boyanma pozitif kontrol olarak kabul edildi. 1/100 derişimde hazırlanan antikor solusyonu preparatlarda kullanıldı.

#### **3.4.2 PTCH-1 primer antikoru**

Abcam firmasından AB53715 klon numarasına uyan antikor kullanıldı. İnsan beyin dokusunda sitoplazmik/membranöz boyanma pozitif kontrol olarak kabul edildi. 1/100 derişimde sitrat önişlemleri hazırlanan antikor solusyonu preparatlarda kullanıldı.

#### **3.4.3 GLI-1 primer antikoru**

Santacruz firmasından SC20687 klon numarasına uyan antikor kullanıldı. Testiküler doku seminifer kanalda nukleer boyanma leydig hücrede sitoplazmik boyanma pozitif kontrol olarak kabul edildi. 1/50 derişimde edta önişlemleri hazırlanan antikor solusyonu preparatlarda kullanıldı.

### **3.5 Skorlama**

Tümör yüzdesindeki puan ve boya intensitesinden elde edilen puanın çarpımı ile elde edilen skorlar istatistik değerlendirmede kullanıldı.

### 3.5.1 Tümör Yüzdesi

Nihai cerrahi olarak eksizyon veya ekzenterasyon uygulanan olguların patoloji raporlarındaki cerrahi sınırın intakt olarak ifade edilen preparatlar %100 tümör alanı olup kullanılan primer antikorun tümör alanının yüzde kaçını boyadığı deneyimli bir patolog tarafından 4x veya 10x mikroskop büyütmesi altında 3 guptan birine sokularak ifade edildi (%10dan küçük, %10-%50, %50den büyük). %10dan küçük olan preparatlar 1, %10-%50 olanlar 2, %50den büyük olanlar 3 puan aldılar.

### 3.5.2 Boya intensitesi

Boya intensitesi deneyimli bir patolog tarafından zayıf, orta ve kuvvetli olarak ifade edilmektedir. Zayıf boyanma ancak 40x mikroskop büyütmesinde primer antikorun boyanma paterni seçilebilen preparat için kullanılmıştır ve 1 puan almıştır. Orta derecede boyanan preparatlar 20x mikroskop büyütmesinde primer antikorun boyanma paterni seçilebilen preparatlar için kullanılmış olup bu tür preparatlar 2 puan almıştır. Kuvvetli boyanma 10x mikroskop büyütmesinde primer antikorun boyanma paterni seçilebilen preparatlar olup bunlar da 3 puan almıştır. Şekil-2 de örneklerle gösterilmiştir.

### 3.6 İstatistik

İstatistiksel analiz SPSS sürüm 11.5 programına veri girişi yapıldı. Biyoistatistik Bölümü tarafından grupların yaş ve cinsiyetleri için tanımlayıcı istatistikler, üç grup arasındaki farkın anlamlılık testi için veriler sıralı dizilim gösterdiği için Kruskal-Wallis testi kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Çalışma grubu Demografik Özellikleri

Kapak ve konjonktival YHK grubunda 10'u erkek, 12'si kadın ortalama yaşları  $61.27 \text{ y} \pm 19.34$  (15 - 83) yıl olan 22 hasta; konjonktiva in situ kanser grubunda 9'u erkek, 3'ü kadın ortalama yaşları  $58.9 \text{ y} \pm 19.9$  (8-75) yıl olan 12 hasta; kapak BHK grubunda 23'ü erkek, 18'i kadın ortalama yaşları  $60.7 \text{ y} \pm 12.7$  (29-78) yıl olan 41 hasta dâhil edilmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1: Hastaların Yaş Dağılımı**

Grup / Yaş	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart sapma
<b>Kapak ve Konjonktiva YHK</b>	15	83	61.27	19.34
<b>Konjonktival in situ kanser</b>	8	75	58.9	19.9
<b>Kapak BHK</b>	29	78	60.7	12.7

Gruplar arasında yaş ve cinsiyet açısından fark yoktu, dağılımları birbirine benzerdi.

### 4.2 SHH IHK boyanma paterni ve skorları

SHH boya intensitesinin her 3 kanser grubundaki dağılımı Tablo 2 de özetlenmiş olup gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

**Tablo 2: SHH boya intensitesinin tümör gruplarındaki dağılımı (p=0.043)**

İntensite / Tümör grubu	0	1+	2+	3+	Toplam
<b>Kapak konjonktiva YHK</b>	8	8	5	1	22
<b>Konjonktival in situ kanser</b>	3	3	5	1	12
<b>Kapak BHK</b>	21	16	2	2	41

Kanser gruplarındaki SHH boyanma yüzdeleri tablo 3 de gösterilmiştir. Hiçbir preparatta %50'nin üstünde boyanma görülmemiştir.

**Tablo : 3 Kanser gruplarında SHH boyanma yüzdeleri**

Tümör yüzdesi / Tümör grubu	<10	10-50	>50	Toplam
Kapak ve konjonktiva YHK	6	8	0	14
Konjonktival in situ kanser	3	6	0	9
Kapak BHK	12	8	0	20

SHH skorları tümör gruplarında belirgin değişiklik göstermedi, ancak genel olarak SHH skorları tüm gruplarda genelde düşük saptandı ve tablo 4 te özetlendi.

**Tablo 4 :SHH skorlarının kanser gruplarında dağılımı (p=0.182)**

Skor / Tümör grubu	1	2	4	6	Toplam
Kapak ve konjonktiva YHK	5	4	4	1	14
Konjonktival in situ kanser	3	0	5	1	9
Kapak BHK	11	6	1	2	20

#### 4.3 PTCH-1 IHK boyanma paterni ve skorları

PTCH boya intensitesinin her 3 kanser grubundaki dağılımı Tablo 5 de özetlenmiş olup gruplar arasında farklılık saptanmamıştır. Ancak BHK grubundaki zayıf boyanma dikkati çekmektedir.

**Tablo 5: PTCH-1 boya intensitesinin tümör gruplarındaki dağılımı (p=0.170)**

İntensite / Tümör grubu	0	1+	2+	3+	Toplam
Kapak konjonktiva YHK	6	12	3	1	22
Konjonktival in situ kanser	4	3	5	0	12
Kapak BHK	18	19	4	0	41

Kanser gruplarındaki PTCH boyanma yüzdeleri tablo 6 da gösterilmiştir.

**Tablo 6 :Kanser gruplarında PTCH-1 boyanma yüzdeleri**

Tümör yüzdesi / Tümör grubu	<10	10-50	>50	Toplam
Kapak ve konjonktiva YHK	3	11	2	16
Konjonktival in situ kanser	0	6	2	8
Kapak BHK	7	15	1	23

PTCH-1 skorlarının tümör grupları arasındaki değişimi istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiştir ve tablo 7 te özetlenmiştir.

**Tablo 7: PTCH-1 skorlarının kanser gruplarında dağılımı (p=0.030)**

Skor / Tümör grubu	1	2	4	6	Toplam
Kapak ve konjonktiva YHK	3	9	2	2	16
Konjonktival in situ kanser	0	3	3	2	8
Kapak BHK	7	12	3	1	23



#### 4.4 GLİ-1 IHK boyanma paterni ve skorları

GLİ-1 boya intensitesinin her 3 kanser grubundaki dağılımı Tablo 8 de özetlenmiştir

**Tablo 8: GLİ-1 boya intensitesinin tümör gruplarındaki dağılımı (p=0.135)**

İntensite / Tümör grubu	0	1+	2+	3+	Toplam
Kapak konjonktiva YHK	7	5	8	2	22
Konjonktival in situ kanser	4	7	1	0	12
Kapak BHK	8	15	13	5	41

Kanser gruplarındaki GLİ-1 boyanma yüzdeleri tablo 9 de gösterilmiştir.

**Tablo : 9 Kanser gruplarında GLİ-1 boyanma yüzdeleri**

Tümör yüzdesi / Tümör grubu	<10	10-50	>50	Toplam
Kapak ve konjonktiva YHK	3	9	3	15
Konjonktiva in situ Ca	3	5	0	8
Kapak BHK	4	18	10	32

GLİ-1 skorları tümör grupları arasında belirgin değişiklik göstermedi, ancak BHK grubunda GLİ-1 skorları tüm gruplara kıyasla daha yüksekti. Dağılım tablo 10 da özetlendi.

**Tablo 10: GLİ-1 skorlarının kanser gruplarında dağılımı (p=0.064)**

Skor / Tümör grubu	1	2	4	6	9	Toplam
<b>Kapak ve konjonktiva YHK</b>	3	2	6	3	1	15
<b>Konjonktival in situ kanser</b>	3	4	1	0	0	8
<b>Kapak BHK</b>	5	10	7	7	4	33

#### 4.5 Tümör gruplarına uygulanan Nihai Cerrahiler

Genel olarak tümör gruplarına uygulanan cerrahi eksizyonel biyopsi olarak görülse de YHK ve BHK kanser gruplarındaki 5 hastaya ekzenterasyon uygulanmıştır. Tablo 11 de sonuçlar özetlenmiştir. Tablo 12 de ekzenterasyon uygulanan 5 hastanın IHK skorları özetlenmiştir.

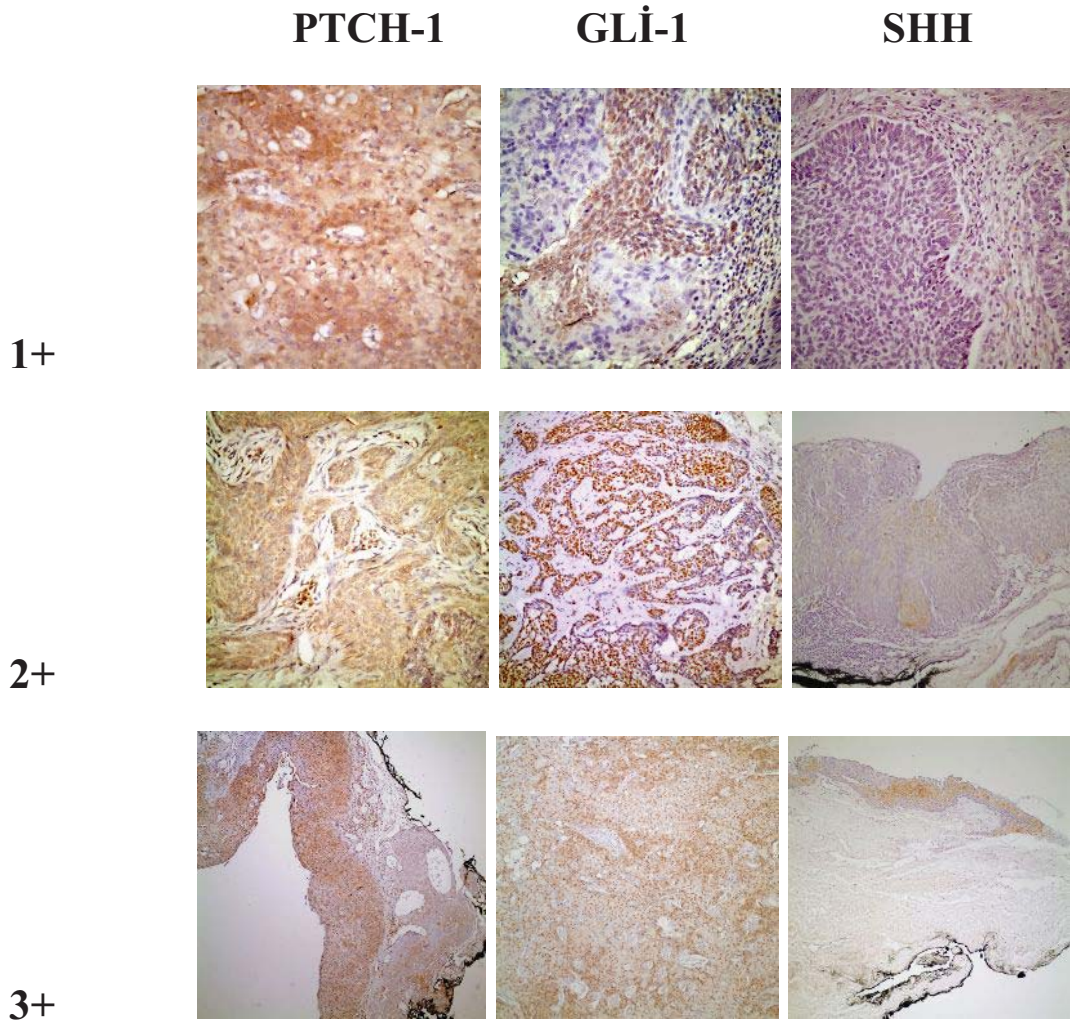
**Tablo 11 : Tümör gruplarına uygulanan Nihai Cerrahiler**

Cerrahi / Tümör grubu	Eksizyon	Ekzenterasyon	Toplam
<b>Kapak konjonktiva YHK</b>	17	5	22
<b>Konjonktival in situ kanser</b>	12	0	12
<b>Kapak BHK</b>	36	5	41

Ekzenterasyon uygulanan her iki gruptaki 5 hastada da IHK skorları farklılık göstermedi.

**Tablo 12: Ekzenterasyon uygulanan 5 hastanın SHH, PTCH-1, GLİ-1 skorları**

Antikor tipi / IHK skoru (BHK GRUBU)	SHH	PTCH-1	GLİ-1	Antikor tipi / IHK skoru (YHK GRUBU)	SHH	PTCH-1	GLİ-1
0	2	1	2	0	1	2	0
1	1	3	0	1	2	1	1
2	1	1	1	2	1	1	0
4	1	0	2	4	1	1	3
6	0	0	0	6	0	0	1



**Şekil-2 Primer antikorların boya intensitesi**

## 5. TARTIŞMA

Kök hücrelerinin kendini yenileme, tamirinde çeşitli sinyal iletim yolları rol oynamaktadır. Bunlar; Wnt, Notch, TGF $\beta$ , EGF, FGF, IGF, ve Hedgehog (HHh) sistemleri ve bunların salgı ürünleridir. HHh yolağının aşırı aktivasyonunda hücrelerin kendini yenileyebilme döngüsü aksamakta ve tümör oluşum süreci başlamaktadır (6,48). Shh sinyalizasyonu artışı beyin, cilt, kas, küçük hücreli akciğer, gastrointestinal sistem, prostat, meme ve pankreas kanserlerinden sorumlu tutulmuştur (36).

Michiko ve arkadaşlarının 19 nodüler, 6 yüzeysel sporadik BHK içeren çalışmasında nodüler BHK hücre yuvalarında ptch mRNA ekspresyonunun arttığı, yüzeysel BHK da in situ hibridizasyon yöntemi ile saptanamayacak düzeyde olduğunu göstermişler ve bunun dermise invazyon ile ilişkili olabileceğini öngörmüşlerdir. Güçlü mitotik aktiviteye sahip kıl folikülünde hedgehog sinyalizasyonu artışı gösterir (40). St-Jacques ve arkadaşları da kıl folikülü gelişimi için hedgehog sinyal yolağının mutlak gerekliliğini vurgulamışlardır (51).

Çalışmamızda Ptch-1 skorunun BHK grubundaki düşüklüğü istatistiksel anlamlı bulundu, bu durum Kim ve arkadaşlarının ortaya koyduğu sporadik BHK gelişiminde Ptch-1 mutasyonunu destekler nitelikte olmuştur. Bu çalışmada mutasyon gösterilmiştir ancak bizim çalışmamız mutasyona uğramış Ptch-1 geninin nihai protein ürününün IHK yöntemi ile 18/41 (~%40) hastada Ptch-1 skoru: 0 olması biz de bu mutasyonun bu vakalarda gerçekleştiğini düşündürmüştür (41). De Grujil ve arkadaşları yaptığı çalışmada Ptch-1 mutasyonunun UV radyasyonla oluşturulabileceğini vurgulamıştır. Sonuçta BHK gelişiminde yıllardır bilinegelen UV radyasyonun etkisi UV nin Ptch-1 mutasyonu üzerinden etkili olabileceği yönünde bir fikir oluşturmuştur (42).

BHK grubundaki ekzenterasyonun nihai cerrahi olarak uygulandığı 5 vakada da Ptch-1 skoru  $\leq 1$  olması, muhtemel gelişen Ptch-1 mutasyonunun BHK gelişiminde rolü olduğunu destekler niteliktedir, ancak daha sonraki çalışmalarda bu mutasyonun RNA in situ hibridizasyon yöntemleri ile gösterilmesi gerekmektedir. Zuzahana ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Ptch1 mutasyonu saptanan sporadik

BHK da artmış inaktif *ptch1* mRNA in situ hibridizasyon yöntemi ile sitoplazma bulmuştur ve de özellikle dış palizatlanan tabakada daha fazla saptanmıştır, bu çalışmada *Gli1* mRNA artışı da tümörijenik sahalarda görülmüştür. *Ptch* mutasyonu *Shh* sinyalizasyonunu artırarak *Gli* ailesi transkripsiyonel faktörleri aracılığı ile hücre çoğalmasını başlatmaktadır görüşünü vurgulamışlardır (43). Bizim çalışmamızda da 18/41 (~%45) hastada *Gli-1* skoru  $\geq 4$  saptanmış olup *Gli-1* in IHK yöntemi ile nükleer artışı gösterilmiştir. Green ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada BHK gelişiminde *Gli-1* nükleer transkripsiyon faktörlerinin artışı önemli rol oynamaktadır (47). Omar Lupi tek bir somatik mutasyon sonrası BHK gelişimini SHH yolağı üzerinden açıklamakta ve *Ptch-1* mutasyonunu sporadik ve herediter BHK gelişiminden sorumlu olduğunu vurgulamıştır (44).

Çalışmamızdaki SHH intensitesinin BHK grubundaki düşüklüğü istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu durum 36 hastada nihai cerrahinin eksizyon yapıldığı düşünülürse invazyon derinliğinin azlığı ile ilişkili olabilir. 41 hastanın 21 de SHH boyanması görülmedi. Çalışmamızda YHK grubundaki 6/22 hastada (~%25) *Ptch-1* skoru 0 bulunmuş olup SHH yolağının YHK gelişimini destekler nitelikte bulunmamıştır. Ancak Xuan ve arkadaşlarının uterus servikal kanserlerinde hedgehog sinyalizasyon artışının HPV-16 enfeksiyonu artışı ile beraber olarak göstermişler ve bu çalışmalarında servikal kanserin %95 de *Shh* ekspresyonu artışını göstermişlerdir ve *Shh* ekspresyonu artışının lenf nodu metastazı sıklığı ile beraberliğini vurgulamışlardır, bizim çalışmamızdaki kanser gruplarında genel olarak *Shh* ekspresyon düşüklüğü çoğunlukla nihai cerrahinin eksizyon olduğu düşünülünce ve lenf nodu tutulumunun hasta muayene kayıtlarında belirtilmemesi, *Shh* ekspresyonu artışının ilerlemiş ve lenf noduna metastazın görüldüğü gözkapağı kanserlerinde daha etkili olabileceğini düşündürmektedir (45). Xuan ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada uterin serviksın yassı hücreli kanserinde *Shh* ekspresyonunun öncü olan servikal intraepitelyal lezyondan invaze yassı hücreli kansere geçişte yaklaşık 2 kat artışını göstermişlerdir (46). Bizim çalışmamızda in situ yassı hücreli kanser grubunda *Shh* skoru 6/9 (%66) hastada  $\geq 4$  olarak saptanmıştır. Yine bu kanser grubundaki 12 hastanın 11 de *Gli-1* intensitesi  $\leq 1$  olup insitu kanserden invazyona geçişte tek başına *shh* artışının yeterli olmayıp hedgehog sinyal yolağının nihai efektörü olan *Gli-1* transkripsiyon faktörünün artışı gerekmektedir. Konjonktival YHK grubundaki 22 hastanın 6'da (~%25) *Ptch-1*

skorunun 0 olması ve Gli-1 skorunun 15 hastanın 10'da (%66) 4 ve üzerinde olması ve in situ kanser grubundaki 12 hastanın 8'de (%66) Ptch-1 skorunun 2 ve üzerinde olup 8 hastanın 7'de (% 87.5) hastada Gli-1 skorunun 4 ve altında olması in situ kanserden invaze YHK dönüşümde hedgehog sinyalizasyonunun rolü olabileceğini düşündürmüştür.

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. SHh intensitesinin BHK grubundaki düşüklüğü istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.
2. Ptch-1 skorunun BHK grubundaki düşüklüğü istatistiksel anlamlı bulunmuştur.
3. Sporadik BHK gelişiminde Shh sinyal yolağı önemli bir role sahiptir.
4. İn situ kanser'den YHK'e progresyonda Shh sinyal yolağındaki değişiklikler rol alabilir.
5. Daha geniş kapsamlı ve IHK yöntemine ek olarak in situ hibridizasyon tekniklerinin kullanılması BHK ve YHK patogenezinde hedgehog sinyalizasyonunun etkisini göstermede yardımcı rol oynayacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Singh AD. Clinical Ophthalmic Oncology Saunders Elsevier 2007 ISBN 9781416031673
2. Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NS, Jackson KW, Suri P, Wicha MS Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 2006; 66: 6063–6071
3. Cohen MM Jr. The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet* 2003; 123A: 5–28
4. Guerrero I, Ruiz i Altaba A. Development. Longing for ligand: hedgehog, patched, and cell death. *Science* 2003; 301: 774–776
5. Hutchin ME, Kariapper MS, Grachtchouk M, Wang A, Wei L, Cummings D, Liu J, Michael LE, Glick A, Dlugosz AA. Sustained Hedgehog signaling is required for basal cell carcinoma proliferation and survival: conditional skin tumorigenesis recapitulates the hair growth cycle. *Genes Dev* 2005; 19: 214–223
6. Evangelista M, Tian H, de Sauvage FJ. The hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5924–5928
7. Kasper M, Regl G, Frischauf AM, Aberger F. GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *Eur J Cancer* 2006; 42: 437–445
8. Wolter M, Reifenberger J, Sommer C, Ruzicka T, Reifenberger G. Mutations in the human homologue of the *Drosophila* segment polarity gene patched (PTCH) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res.* 1997; 57: 2581-5.
9. Chidambaram A, Goldstein AM, Gailani MR, Gerrard B, Bale SJ, Dean M. Mutations in the human homologue of the *Drosophila* patched gene in Caucasian and African-American nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Cancer Res.* 1996; 56: 4599-601.
10. Türk Oftalmoloji Derneği Eğitim Yayınları Temel okuler onkoloji No:6 2008



11. Margo CE, Waltz K. Basal Cell Carcinoma of the eyelid and periocular skin. *Surv Ophthalmol* 1993; 38: 169-192
12. Allali J, D'Hermies F, Renard G. Basal Cell carcinomas of the eyelids. *Ophthalmologica* 2005; 219: 57-71
13. Leibovitch I, McNab A, Sullivan T et al. Orbital invasion by periocular basal cell carcinoma. *Ophthalmology* 2005; 112: 717-723
14. *Clinical Ophthalmic Pathology Principles of Disease of the eye and associated structures* John Harry & Gary Misson 2001 Butterworth/ Heinemann ISBN 0750621710
15. Management of non melanoma skin cancer in 2007 Julie A Neville, Erin Welch and David J Leffell [www.nature.com/clinicalpractice/onc](http://www.nature.com/clinicalpractice/onc)
16. Avril MF, Auperin A, Margulis A et al. Basal cell carcinoma of the face: surgery or radiotherapy? Results of a nonrandomised study. *Br J Cancer* 1997; 76: 100-106
17. Lindgren G, Larko O. Long-term follow-up of cryosurgery of basal cell carcinoma of the eyelid. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36: 742-6
18. Ingves C, Jemec GBE. Combined imiquimod and acitretin for non-surgical treatment of basal cell carcinoma. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2003; 37: 293-5
19. Jefford M, Kiffer JD, Somers G et al. Metastatic basal cell carcinoma: rapid symptomatic response to cisplatin and paclitaxel. *Aust NZ J Surg* 2004; 74: 704-5
20. Green A. Changing patterns in incidence of non-melanoma skin cancer. *Epith Cell Biol* 1992; 1: 47-51
21. Donaldson MJ, Sullivan TJ, Whitehead KJ, Williamson RM. Squamous cell carcinoma of the eyelids. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 1161-5
22. Cotel WI. Perineural invasion by squamous cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol* 1982; 8: 589-600

23. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL Jr. Prognostic factors for local recurrence, metastasis, survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear and lip. Implications for treatment modality selection. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26: 976-990
24. Faustina M, Diba R, Ahmadi MA et al. Patterns of regional and distant metastasis in patients with eyelid and periocular squamous cell carcinoma. *Ophthalmology* 2004; 111: 1930-2
25. Cook BE Jr, Bartley GB. Treatment options and future prospects for the management of eyelid malignancies: an evidence-based update. *Ophthalmology* 2002; 108: 2088-98
26. McNab AA, Francis IC, Bengner R et al. Perineural spread of cutaneous squamous cell carcinoma via the orbit: clinical features and outcome in 21 cases. *Ophthalmology* 1997; 104: 1457-62
27. Pe'er J. Ocular surface squamous neoplasia. *Ophthalmol Clin North Am* 2005; 18:1-13
28. Lee GA, Hirst LW. Ocular surface squamous neoplasia. *Surv Ophthalmol* 1995; 39: 429-450
29. Iliff WJ, Marback R, Green WR. Invasive squamous cell carcinoma of the conjunctiva. *Arch Ophthalmol* 1995; 93: 119-122
30. Fraunfelder FT, Wingfield D. Management of intraepithelial conjunctival tumors and squamous cell carcinomas. *Am J Ophthalmol* 1983; 95: 359-63
31. Erie JC, Campbell RJ, Liesegang J. Conjunctival and corneal intraepithelial and invasive neoplasia. *Ophthalmology* 1986; 93: 176-183
32. Taylor, G., Lehrer, M.S., Jensen, P.J., Sun, T.T., Lavker, R.M. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 2000; 102: 451-461
33. Tumbar, T., Guasch, G., Greco, V., Blanpain, C., Lowry, W.E., Rendl, M., Fuchs, E. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 2004; 303: 359-363.

34. Toftgård R. Hedgehog signalling in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 2000; 57 1720–1731
35. Owens, D.M., Watt, F.M. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumors. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3: 444–451.
36. Ruiz, A., Altaba, I., Stecca, B., Sanchez, P. Hedgehog-Gli signalling in brain tumors: stem cells and para-developmental programs in cancer. *Cancer Lett.* 2004 ; 204: 145–157.
37. Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Toftgard R, Uden AB Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *J Pathol.* 2006; 208 (1): 17-25
38. Altaba A. Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* 1999; 126: 3205–16
39. Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Altaba A. Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature* 1997; 389: 876–81.
40. Tojo M et al. Expression of sonic hedgehog signal transducers, patched and smoothened, in human basal cell carcinoma *Pathology International* 1999; 49: 687–694
41. Kim MY, Park HJ, Baek SC, et al. Mutations of the p53 and PTCH gene in basal cell carcinomas: UV mutation signature and strand bias. *J Dermatol Sci* 2002; 29: 1–9.
42. De Gruijl FR, Van Kranen HJ, Mullenders LH. UV-induces DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J Photochem Photobiol* 2001; 63: 19–27.
43. Holíková Z, Massi D, Lotti T, and Hercogová J. Insight into the pathogenesis of sporadic basal cell carcinoma. *International Journal of Dermatology* 2004, 43, 865–869
44. Lupi O. Correlations between the Sonic Hedgehog Pathway and basal cell carcinoma. *International Journal of Dermatology* 2007,46, 1113–1117

45. Xuan YH, Li GL, Jiang HY, Lin ZH. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. Relationship between hedgehog signaling pathway molecules and HPV16 infection in uterine cervical cancers. 2009 ;38:178-82.
46. Xuan YH, Jung HS, Choi YL, Shin YK, Kim HJ, Kim KH, Kim WJ, Lee YJ, Kim SH *Mod Pathol*. Enhanced expression of hedgehog signaling molecules in squamous cell carcinoma of uterine cervix and its precursor lesions. 2006 ; 19:1139-47.
47. Green J, Leigh IM, Poulson R, et al. Basal cell carcinoma development is associated with induction of the expression of the transcription factor Gli-1. *Br J Dermatol* 1998; 139: 911–915.
48. Wicking C, McGlenn E. The role of hedgehog signalling in tumorigenesis. *Cancer Lett* 2001; 173: 1–7.
49. Detmer K, Thompson AJ, Garner RE, Walker AN, Gaffield W, Dannawi H. Hedgehog signaling and cell cycle control in differentiating erythroid progenitors. *Blood Cells Mol Dis* 2005; 34:60–70
50. Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16:700–707
51. St-Jacques B, Dassule HR, Karavanova I, Botchkarev VA, Li J, Danielian PS, McMahon JA, Lewis PM, Paus R, McMahon AP. Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr Biol* 1998; 8:1058–1068
52. Xie J, Johnson RL, Zhang X, Bare JW, Waldman FM, Cogen PH, Menon AG, Warren RS, Chen LC, Scott MP, Epstein EH Jr. Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors. *Cancer Res* 1997; 57:2369–2372
53. Athar M, Tang X, Lee JL, Kopelovich L, Kim AL. Hedgehog signalling in skin development and cancer. *Exp Dermatol* 2006; 15: 667–677.