



T. C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**DERİNİN SKUAMÖZ HÜCRELİ
KANSERLERİNDE miRNA-214 İLE PTEN, ERK-1
VE CASPASE 3 EKSPRESYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. TUĞBA ÖZBEK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Canten TATAROĞLU

AYDIN-2016

T. C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**DERİNİN SKUAMÖZ HÜCRELİ
KANSERLERİNDE miRNA-214 İLE PTEN, ERK-1
VE CASPASE 3 EKSPRESYONUNUN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. TUĞBA ÖZBEK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Canten TATAROĞLU

AYDIN-2016

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından **TPF-14036** numaralı proje olarak desteklenmiştir.

TEŞEKKÜRLER

Usta-çırak ilişkisinin belirgin olarak gözlemlendiği hekimlik mesleğinde, bilgi ve deneyimlerini bizlerle sınırsızca paylaşan saygıdeğer hocalarım, başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Nil ÇULHACI ve danışman hocam Prof. Dr. Canten TATAROĞLU olmak üzere Prof. Dr. Muhan ERKUŞ, Prof. Dr. Furuzan KACAR DÖGER ve Prof. Dr. İbrahim METEOĞLU'na;

Tezimin moleküler aşamasında sunduğu sınırsız yardımlarından dolayı Denizli Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Yavuz DODURGA'ya;

Tezimi inceleyip, değerli katkılarını sunan ve olumlu eleştirileriyle bana destek veren Denizli Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Neşe ÇALLI DEMİRKAN'a;

Asistanlık hayatımda, birlikte çok uzun bir süre çalışma fırsatımız olmasa da gelecekte özellikle mesleki konulardaki deneyimlerinden sıklıkla yararlanacağıma inandığım Yard. Doç. Dr. Nukhet ELİYATKIN, Yard. Doç. Dr. Nesibe KAHRAMAN ÇETİN ve Yard. Doç. Dr. İbrahim Halil ERDOĞDU'ya;

Birbirimize destek vererek asistanlık sürecinin daha kolay ve keyifli geçmesini sağladığımız sevgili asistan arkadaşlarıma ve özellikle bu süreçte bana, benden çok güvenip desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Ayşe Gül ÖRMECİ'ye;

Asistanlık eğitimim boyunca sağladıkları tüm kolaylıklar ve tezimin teknik konularındaki yardımlarından dolayı tüm teknisyen arkadaşlarıma, özellikle Şengül BARUTÇA, Şirin ADIGÜZEL ve aynı zamanda arkadaşlığını da sunan Seçil KOÇ'a ve sekreter arkadaşlarıma;

Hayatımın her anında, attığım her adımın ve aldığım her kararın arkasında koşulsuzca durarak sevgi, güven ve desteklerini her zaman hissettiren canım ailem ve yakın bir gelecekte eşim olacak olan Özgün'e teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Tuğba ÖZBEK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO DİZİNİ	III
ŞEKİL DİZİNİ	IV
RESİM DİZİNİ	V
KISALTMA DİZİNİ	VI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Embriyoloji	3
2.2. Histoloji	5
2.3. Deri Tümörlerinin Sınıflaması	11
2.4. Skuamöz Hücreli Karsinom	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. İmmünohistokimyasal Boyama	30
3.2. Formalinle Fikse Edilmiş Parafine Gömülü Dokulardan miRNA İzolasyonu	32
3.3. İstatistiksel Değerlendirme	36
4. BULGULAR	37
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇLAR	61
7. ÖZET	63
8. SUMMARY	64
9. KAYNAKLAR	65

TABLO DİZİNİ

Tablo I: Deri Tümörlerinin 2005 WHO Sınıflaması

Tablo II: 2005 WHO sınıflamasına göre keratinositik tümörler

Tablo III: Düşük dereceli SHK ve yüksek dereceli SHK arasındaki başlıca farklar

Tablo IV: Olguların tümör bölgesi ve dekadlara göre yaş dağılımı

Tablo V: Olguların tümör bölgelerine göre cinsiyet dağılımı, en büyük ve en küçük yaş ile ortalama yaş özellikleri

Tablo VI: Tümör gruplarının cinsiyetlere göre yaş ortalaması

Tablo VII: Olgu gruplarında PTEN ekspresyonu

Tablo VIII: Olgu gruplarında ERK1 ekspresyonu

Tablo IX: Olgu gruplarında Caspase 3 ekspresyonu

Tablo X: PTEN ve ERK1 ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması

Tablo XI: PTEN ve Caspase 3 ekspresyonlarının karşılaştırılması

Tablo XII: ERK1 ve Caspase 3 ekspresyonlarının karşılaştırılması

Tablo XIII: Olgu gruplarında miRNA-214 ekspresyon değerlerinin ortalaması

Tablo XIV: Olguların tümör yerleşim bölgelerine göre miRNA-214 ekspresyon durumlarının kontrol grubu ile karşılaştırma sonuçları

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Olgu gruplarının yaş dağılımı

Şekil 2: PTEN belirteci için ROC eğrisi

Şekil 3: ERK1 belirteci için ROC eğrisi

Şekil 4: Caspase 3 belirteci için ROC eğrisi



RESİM DİZİNİ

Resim 1: Kontrol grubu (A) ve SHK tanılı (B, C, D) olgularda PTEN ekspresyonu (x100)

Resim 2: Kontrol grubu (A) ve SHK tanılı (B, C, D) olgularda ERK1 ekspresyonu (x100)

Resim 3: Kontrol grubu (A) ve SHK tanılı (B) olgularda Caspase 3 ekspresyonu (x100)



KISALTMALAR DİZİNİ

AKT	Protein kinaz B
Bcl 2	B hücreli lenfoma 2
BHK	Bazal hücreli karsinom
CD	Cluster of differentiation
CDKN 2A	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
CEA	Karsinoembriyonik antijen
DISC	Ölüm başlatıcı sinyal kompleksi
DNA	Deoksiribonükleik asit
EMA	Epitelyal membran antijen
ERK	Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz
H&E	Hematoksilen ve eozin
HIV	İnsan immünyetmezlik virüsü
HPV	İnsan papilloma virüsü
İHK	İmmünhistokimya
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
MAPK	Mitojen-aktive protein kinaz
miRNA-214, miR-214	mikro RNA
MMP	Matriks metalloproteinaz
mRNA	mesajcı RNA
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K	Fosfoinozitol 3 kinaz
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
Rb	Retinoblastom
RISC	RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi
RNA	Ribonükleik asit
SHK	Skvamöz hücreli karsinom
TNF	Tümör nekrozis faktör
TRAIL	TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya sağlık örgütü

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Vücudumuzda ağırlık ve hacim bakımından en büyük organ olan derinin birden fazla görevi vardır. Önceleri sadece mekanik bir bariyer olduğu düşünülen derinin artık hücresel ve moleküler etkileşimler ile çok sayıda önemli yanıtı yöneten kompleks bir organ olduğu bilinmektedir (1,2). Embriyoya ait iki ayrı germ tabakasının (ektoderm, mezoderm) farklılaşması ve ileri gelişimi sonucu oluşan deri, temel olarak üç anatomik bileşen içerir: epidermis, dermis ve subkutan yağ doku (2,3). Her bir tabakanın yaş, cinsiyet, ırk ve anatomik bölgeye bağlı değişiklikler gösteren kendisine özgü ve karmaşık, yapısı ve fonksiyonu vardır (4).

Deriyi oluşturan birbirinden farklı hücrelerden köken alan deri kanserleri çok çeşitlidir ve Dünya Sağlık Örgütü (The World Health Organization; WHO) tarafından bu hücre kökenlerine göre sınıflandırılmışlardır (5). Ancak genel olarak deri kanserleri başlıca üç türde ele alınmaktadır; melanom ve melanom dışı deri kanserleri Skuamöz Hücreli Karsinom (SHK) ile Bazal Hücreli Karsinom (BHK) (6,7).

Melanom dışı deri kanserleri tüm dünyada ve ülkemizde en sık görülen kanserler arasında olup insidansı hızla artmaktadır. Atipik epidermal keratinositlerden gelişen SHK'lar bu grupta en sık görülen ikinci kanser tipidir (6).

Skuamöz hücreli kanserler çoğunlukla düşük riskli kanserler olarak kabul edilirler ve genellikle tedaviye olumlu yanıt verirler ancak nüks ve metastaz potansiyellerinin olması kötü prognoz ve yüksek mortaliteye yol açabilir. Bu nedenle, erken teşhis ve tedavi önemli olup bu konuda yeni tanı araçlarının geliştirilmesi gerekmektedir.

Deri SHK'larının, kronik güneş ışığı maruziyeti ile güçlü bir ilişkisinin bulunduğu gösterilmiş ancak yine de bu tümörlerin patogenezi henüz daha tam olarak anlaşılamamıştır. Son zamanlarda, çeşitli yayınlar SHK'larda sinyal iletim yollarında anormallikler olduğunu ortaya çıkarmıştır. Kanser hücrelerinde ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz 1 (ERK1) protein seviyesinin arttığı ve bu proteinin tümör hücrelerinin anormal çoğalmasına aracılık ettiği bulunmuştur. Daha sonra SHK'larda ERK'nin aşırı ekspresyonunun altında yatan mekanizmalar, mikroRNA (miRNA)'ya odaklanarak araştırılmıştır.

Ortalama uzunluğu sadece 22 nükleotid olan kısa ribonükleik asit (RNA) molekülleri miRNA'lar, mesajcı RNA'nın (mRNA) kodlanmayan bölgesinde (3' UTRs) tamamlayıcı dizilerine bağlanarak gen susturulmasına yol açan, transkripsiyon sonrası

düzenleyicilerdir. Yapılan bazı çalışmalarda SHK'larda miRNA-214'ün (miR-214) azalmış ekspresyonunun ERK'nin aşırı ekspresyonuna neden olduğu gösterilmiştir (7-9).

Ayrıca güneş ışığı kaynaklı ultraviyole (UV) ışınlarının, SHK'lardaki keratinositlerde tümör baskılayıcı gen olan fosfataz ve tensin homologu (phosphatase and tensin homolog; PTEN) seviyesini azalttığı gösterilmiştir. PTEN seviyesinin azalmasında iki mekanizma rol oynar: (1) PTEN, AKT (protein kinaz B) aktivasyonunun azaldığı apoptotik hücrelerde aktive Caspase tarafından parçalanır; (2) yaşayan hücrelerde PTEN transkripsiyonu bastırılmıştır. Bu bastırılma Caspase aktivasyonundan bağımsızdır ve ERK ile AKT aktivasyonlarındaki artış ile paralel gerçekleşir (10).

Çalışmamızın amacı deri SHK'lı olgularda miRNA-214'ün polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) ile, PTEN, Caspase 3 ve ERK1 ekspresyonunun ise immunhistokimyasal (İHK'sal) yöntem ile araştırılması, elde edilen sonuçların birbiriyle ilişkisinin karşılaştırılması ve olası ilişki durumunda bu belirteçlerin erken tanı ve tedaviye giden yolda pratik hayatta kullanıma geçirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

Deri, vücut ağırlığının % 15'ini oluşturan ve vücutta bulunan en büyük organdır. Epidermis, dermis ve subkutan yağ dokuyu içeren üç tabakadan oluşmaktadır. Her bir tabakanın yaş, cinsiyet, ırk ve anatomik bölgeye bağlı değişiklikler gösteren kendisine özgü ve karmaşık yapısı ve fonksiyonu vardır (2,3).

Derinin fonksiyonları son derece çeşitlidir. Dış fiziksel, kimyasal ve biyolojik zehirli maddelere karşı mekanik bir bariyer ve immünolojik bir organ olarak görev alır. Vücut sıcaklığı ve elektrolit dengesinde rol oynar (2,11). Tüm bunlara ek olarak deri sadece kendi hastalıklarını değil iç organ hastalıklarını da yansıtan bir araçtır (2).

İnsan derisinin saçlı deri ve saçsız (tüysüz, pürüzsüz) deri olmak üzere iki tipi vardır. Saçsız deri avuç içi ve ayak tabanlarında bulunur. Dermatoglifikleri (parmak izi) oluşturan, değişken kenar ve sulkusları içeren oluklu bir yüzeye sahiptir. Yüzeyde kompakt ve kalın korneal tabaka ve dermiste kapsüllü duyu organları içerir ancak hiç kıl folikülü veya sebace bez içermez. Buna karşılık saçlı deride, hem kıl folikülü hem de sebace bez bulunur duyu organı bulunmaz. Kıl folikülünün boyut, yapı ve yoğunluğu vücudun farklı bölgelerinde değişiklik gösterir (4).

2.1. Embriyoloji

Embriyolojik olarak epidermis ve ekleri ektodermden oluşur. Mezoderm ise dermis ve subkutan yağ dokunun mezenkimal elemanlarını oluşturur (2).

2.1.1. Epidermis

Başlangıçta embriyo tek katlı, multipotent epitelyal hücreleri içeren bir ektodermal hücre tabakasıyla örtülüdür (2,4). Gelişimin altı ila sekizinci haftası itibarıyla bu tabaka ikiye bölünür ve üst taraftaki hücreler “periderm” veya “epitrikyum” adı verilen yassı hücrelerden oluşan bir tabakaya farklılaşır (2). Periderm, yeni oluşan deri için koruma ve amniyon sıvısı ile madde değişimini sağlar (2,4). Mitotik aktivitenin yoğunluğu sonucu germinatif tabakaya dönüşen bazal tabakadaki hücrelerin daha ileri proliferasyonu ile üçüncü bir ara bölge oluşur. Yirmi üçüncü haftada periderm hücreleri dökülür ve amniyotik sıvı içinde bulunabilirler. Bu andan itibaren üst tabakada keratinizasyon başlar. Dördüncü ayın sonunda epidermis son ve kesin şeklini alır ve artık dört tabaka ayırt edilebilir hale gelir (2,3).

Epidermisteki hücrelerin çoğu (% 90-95) keratinositlerdir. Geri kalan hücreler (% 5-10) melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücrelerini içerir. Bu hücreler sekiz ila on haftalık embriyo epidermisinde görülmeye başlar (2).

Doğumdan sonra derinin pigmentasyonunu sağlayan melanositlerin öncül hücreleri köken aldıkları nöral krestten dermise ve oradan da melanositlere dönüşecekleri epidermise doğru, gelişimin ilk üç ayı içinde göç ederler. Göç sırasında melanositler diğer organ ve dokularda da kalabilirler. Bu hücreler, dendritik uzantılar yoluyla epidermisin diğer hücrelerine de transfer edilebilen melanin pigmentini sentezlerler. Langerhans hücreleri ise kemik iliğindeki, monosit-makrofaj-histiyosit hücre dizisi kökeninden gelişir. Karakteristik sitoplazmik belirleyicisi olan Birbeck granülleri yapısal olarak on haftalık embriyoda görülebilir ve gelişimin 12. haftasında İHK'sal olarak CD1a boyası ile gösterilebilir (2,4). Merkel hücreleri 16. hafta civarı parmak ucu, dudak, gingiva ve tırnak yatağı gibi saçsız deride belirir (4). Merkel hücrelerinin kökeni şüpheli olup bazı otörler nöral krest kaynaklı olduğunu iddia ederken diğerleri çevre keratinositlerden değişime uğradığını öne sürmektedir (2).

2.1.2. Dermis:

Dermis yüzey ektoderminin altındaki primitif mezenkimden köken alır. Üçüncü ve dördüncü aylar süresince, koryum adı verilen bu doku epidermis içine doğru uzanan sayısız düzensiz papiller yapılar, dermal papillalar, oluşturur. Bu papillalar genellikle küçük bir kapiller ve/veya sensör sinir uçlarını içerirler. Dermisin daha derin bir tabakası olan subkoryum ise önemli miktarda yağ dokusu içerir (2). İkinci ayda dermis ve subkutis henüz iki farklı deri tabakası olarak ayırt edilemez ancak üçüncü ayın sonunda dermiste kollajen lifler belirgin bir hal alır. Embriyonik dermis ilk başta oldukça sellülerdir ve 6.–14. haftalar arasında üç tip hücre içerir; yıldızlı hücreler, fagositik makrofajlar ve granül salgı hücreleri ile melanoblast ve mast hücreleri. On dördüncü haftadan 21. haftaya kadar çok sayıda aktif fibroblast, perinöral hücreler, perisitler, melanoblastlar, Merkel hücreleri ve mast hücreleri görülebilir (4). Papiller ve retiküler dermis intrauterin 120. günde tanınırlar (2,4).

2.1.3. Deri Ekleri:

Deri ekleri epidermis bazal tabakasında yerleşen foliküler epitelyal kök hücrelerinden gelişir (2). On haftalık embriyoda gelişmekte olan dermisi oluşturan bir grup

mezenkimal hücre, sıkı bir şekilde bir araya gelip tomurcuklanan bazal hücre grubunun altında kümelenir. Bu epidermal hücreler hem dermise hem de epidermise doğru büyüyerek kıl folikül kanalını oluştururlar. Büyüyen epidermal hücreler subkutan yağ dokuya ulaştınca alt kısım bülböz bir hal alır ve beraberindeki dermal hücrelerle birlikte kıl folikülünün dermal papillasını oluştururlar. İlk kıl (lanugo) üçüncü ayın sonunda kaş ve dudağın üst bölgesinde belirir (2,4). Bu lanugo kıllar doğum esnasında dökülür. Gelişen kıl folikülleri sebace ve apokrin bezlerin de oluşmalarını sağlarlar (2). Sebace bezler 13.-15. gebelik haftasında ortaya çıkarken apokrin bezler beş ila altıncı ayda oluşurlar. Ekrin bezler kıl folikülünden bağımsız fetal epidermisten gelişirler. İlk ekrin bezler üçüncü - dördüncü ay itibariyle avuç içi ve ayak tabanında, beşinci ay itibariyle aksillada ve son olarak da tüm saçlı deride ortaya çıkar (2,4).

Doğumda deri, sebace bezlerin salgıları, dejenere olmuş epidermal hücre ve kıllardan oluşan beyazımsı bir tabaka olan “verniks kazeoza” ile örtülüdür. Bu tabaka deriyi, amniyotik sıvının zedeleyici etkisinden korur (4).

2.2. Histoloji

Vücuttaki en büyük organ olan deri, epidermis, dermis ve subkutan yağ dokuyu içeren üç tabakadan oluşmaktadır (2,3). Epidermis esas olarak keratinositlerden oluşur ve tipik olarak 0,05–0,1 mm kalınlığındadır. Dermis, kollajen ve elastik lifler ile destek doku içerir ve kalınlığı değişkendir. Göz kapağı ya da skrotum derisinde 0,5 mm iken sırt derisinde 5 mm’ye dek ulaşabilir. Vücut ağırlığının büyük bir kısmını oluşturan yağ dokunun ise % 80’i subkutan yerleşimlidir (4).

2.2.1. Epidermis

Epidermis düzenli olarak kendini yenileyen ve deskuamasyon ile normal kalınlığını koruyan çok katlı keratinize skuamöz epiteldir (2,3). Vücudun dış yüzünü kaplayan koruyucu keratin tabakayı oluşturur (3). Epidermisteki hücreler; keratinositler, melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleridir (2-4,12).

Melanositler bazal tabakada yer alan nöral krest kökenli, dentritik, berrak sitoplazmalı hücrelerdir. Öncelikli fonksiyonları melanin üretimidir (2,12). Langerhans hücreleri, görevleri immünolojik T hücrelerine antijen sunmak olan kemik iliği kökenli dentritik hücrelerdir. Skuamöz tabakanın üst kısmı boyunca dağılmış olarak bulunurlar ve rutin Hematoksilen & Eozin (H&E) boyalı kesitlerde görülmeleri zordur. Ultrastrüktürel

olarak, Birbeck granül adı verilen ve rakete benzeyen karakteristik sitoplazmik inklüzyonları vardır. Merkel hücreleri de H&E ve özel boyalı kesitlerde tanınmaları zor olan ve özellikle saçsız deride yoğun olarak bulunan hücrelerdir (2,3,12). Bu hücrelerin yanısıra epidermiste ektrin bezlerin yüzeye açıldığı duktuslar olan akrosiringiumlar ve kıl folikülleri de bulunur. Ayrıca son İHK'sal çalışmalar epidermiste Langerhans hücreleri ile ilişkili serbest sinir aksonları bulunduğunu göstermiştir (2).

Epidermisteki keratinositler aşağıdan yukarıya doğru dört tabaka halinde dizilirler; bazal tabaka (stratum bazale/germinativum), skuamöz tabaka (dikensi hücre tabakası, stratum spinozum), granüler tabaka (stratum granülozum), kornifiye tabaka (stratum korneum) (2-4).

Histolojik kesitlerde papiller dermisin dermal papillaları oluşturmak üzere yukarı doğru uzanım göstermesi sonucu dermoepidermal bileşke düzensiz konturlu bir hal alır. Dermal papillalar arasında kalan epidermis bölmelerine rete çıkıntıları (ridges) denir (2,3). Bu çıkıntıların yapı ve boyutları bölgeden bölgeye değişir. Yaşla birlikte boyutları azalır ve dermoepidermal bileşke düz bir hal almaya başlar (3).

Bazal Tabaka

Stratum bazale (bazal hücre tabakası) dar sitoplazmalı küboidal ya da kolumnar hücrelerin oluşturduğu ve epidermisin yenilenmesi için çoğalabilen hücreler içeren kıvrımlı bir tabakadır (12). Histolojik kesitlerde, bazal hücreler bazal membran üzerinde yerleşmiş, boyut, şekil ve melanin içeriği bakımından farklılık gösteren tek tabaka halinde sıralanmış hücrelerdir (2). Bu hücrelerin nükleusları yuvarlak veya oval olup kaba kromatinli ve belirsiz nükleollüdür. Bazal hücrelerin sitoplazmalarında komşu melanositlerden gelen melanin pigmenti bulunur (2,4). Birbirleriyle ve diğer keratinositlerle desmozomlar aracılığıyla bağlantı kurarlar (2). Bu hücreler diğer keratinositlerin oluşumunda rol alan mitotik olarak aktif hücrelerdir (2,3). Dermisten, hemidesmozomlarla tutundukları bir bazal membranla ayrılırlar. Bazal membran ışık mikroskobunda homojen eozinofilik bir şerit şeklinde görülür ancak ultrastrüktürel boyutta çok katlı, birçok kutanöz hastalıkta önemli rol oynayan karmaşık, antijenik bir yapı olduğu dikkati çeker (3,12). Temel olarak dört tabakadan oluşur: bazal hücre hemidesmozomu, lamina lusida, lamina densa ve sublamina densa (12).

Skumöz tabaka

Skumöz tabaka, bazal hücrelerden daha iri, yaklaşık 5 ila 10 katmandan oluşan keratinositlerden oluşur (2,3). Suprabazal keratinositler polihedral şekilli olup hafif bazofilik sitoplazmalı, yuvarlak ve ovoid nükleusludur (2,4,12). Daha yüzeydeki hücreler daha iri, yassılaştırmış, eozinofilik sitoplazmalı olup yüzeye paralel dizilmişlerdir (2-4). Eozinofilik görünüm, hücrelerde keratin prekürsörü olan intrasitoplazmik filaman birikimi ve ribozom sayısında azalma ile koreledir (3). Keratinositler sitoplazmalarında bir ya da iki belirgin nükleol ve tonofilaman içerirler. Skumöz tabaka aynı zamanda spinöz tabaka ya da hücreden hücreye uzanan kısa uzanımların karakteristik görünümü nedeniyle dikenli hücre tabakası olarak da isimlendirilir. Bu uzanımlar doku takip işlemi sırasında plazma membranının retraksiyonu sonucu oluşur (2). Hücreler fiksasyon, dehidrasyon veya intersellüler ödem sonucuyla birbirlerinden ayrıldıklarında desmozomlar intersellüler köprüler olarak görünürler (3). Spinöz tabakada görülen berrak sitoplazmalı hücreler Langerhans hücreleridir. Çok nadiren Merkel hücreleri de mevcut olabilir ama bunları H&E boyalı kesitlerde görmek kolay değildir (4). Bu, ara sıra skumöz tabakada görülen berrak, vakuole veya soluk sitoplazmalı hücreleri tanımak önemlidir. Bu hücreler paget hastalığının neoplastik hücrelerinden ve melanositlerden ayırt edilmelidir (2,3). Benign berrak hücrelerin berrak bir halo ile çevrili piknotik nükleusları ve dar berrak sitoplazmaları vardır. Pleomorfizm ve paget hücrelerinde görülen nükleer morfoloji ve yoğun kromatin boyanması göstermezler.

Skumöz tabakada sık görülen reaktif değişiklikler: (a) spongioz; hücreler arası ödem, (b) akantoz; epidermisin kalınlaşması, (c) atrofi; epidermisin incilmesi, (d) akantoliz; hücreler arası bağlantıların etkilenmesiyle keratinositlerin ayrılması, (e) diskeratoz; anormal keratinizasyondur (2). Stratum spinosum ve bazal hücre tabakası birlikte malpighi tabakası olarak isimlendirilir (12).

Granüler tabaka

Granüler tabaka deri yüzeyine paralel yerleşmiş bir ila üç kat yassılaştırmış hücre katmanından oluşmaktadır (2,3). Sitoplazmalarında yoğun bazofilik boyanan keratohyalin granülleri içerirler (2). Bu kaba, oldukça bazofilik granüller, keratin filamanlarının kornifiye tabaka içinde kümelenmesinden sorumlu olan, histidinden zengin, flagrin proteininin öncülünü temsil etmektedirler (2,3). Keratohyalin granülleri granüler hücre tabakası için tipiktir (4). Granüler tabaka otolitik değişiklikler için çok önemli olan lizozomal enzimler

bakımından zengindir. Granüler tabaka kalınlığının artması ya da azalması farklı patolojik durumların ayırıcı tanısında önemlidir (2).

Kornifiye tabaka

Kornifiye tabaka epidermisin en dış katmanıdır (12). Epidermiste hücrelerin ileri matürasyonu keratinositlerin nükleuslarını kaybetmesine ve keratin tabakasını (stratum korneum, kornifiye tabaka) oluşturmak üzere yassılaşmasına neden olur (4). Kornifiye tabaka, nükleus ve sitoplazmik organel içermeyen, polihedral eozinofilik keratinositlerden oluşur (2,3,12). Bu hücreler keratinizasyon sisteminin en çok diferansiye olmuş hücreleridir (2). Kornifiye tabaka, histolojik kesitlerde sepet şeklinde görülür (2,3). Ancak akral bölgelerde daha kalın ve kompakttır (3). Zaman içinde bu hücreler deri yüzeyinden dökülürler. Keratinizasyon süreci ortalama 20 ila 45 gün sürer (2,3). Birçok dermatoz da bu sürecin hız ve paterninde değişiklik olması sonucu meydana gelir (3). Kornifiye tabakada sık görülen anormallikler: (a) hiperkeratoz; kalınlığının artması, (b) parakeratoz; kornifiye tabaka içinde nükleus bulunması ve (c) fungal organizmaların varlığıdır (2,3).

Avuç içi ya da ayak tabanından alınan derinin histolojik kesitlerinde kornifiye tabakanın en alt kısmında, granüler tabaka ile arasında homojen eozinofilik bir zon vardır ve bu zon stratum lusidum olarak bilinir (2-4,12).

2.2.2. Deri Ekleri

Deri ekleri kıl folikülleri, sebace bezler, ter (ekrin) bezleri ve apokrin bezlerden oluşur (3,12). Kıl folikülleri, sebace bezler, arektör pili kası ve (belirli bölgelerde) apokrin bezler pılar ünit olarak bilinen fonksiyonel kompleksi oluştururlar (3). Kıl folikülleri, üç aşamada gerçekleşen bir süreç olan kıl oluşumundan sorumludur: anagen veya büyüme fazı, katagen veya involuting faz ve telogen veya dinlenme fazı (3,12).

Sebace bezler, zamanla içeriye doğru göçerek intrasitoplazmik yağ damlacıkları şeklinde kümelenen germinatif hücrelerden oluşan bir dış tabakaya sahip lobüler görünümlü yapılardır (3). Sebace bezlerin boşaltım kanalları kıl folikülünün infundibulumuna açılır.

Ter bezleri üç çeşittir: eklin (termoregülasyondan sorumlu gerçek ter bezleri), apokrin ve miksed (apoekrin bezler). Eklin ter bezleri salgılama ve boşaltım bölümleri içeren tübüler yapılardır. Derin dermis ve bazen subkutiste yerleşen bu salgı birimi, salgı hücreleri

(daha berrak ve koyu hücreler) ve myoepitelyal hücrelerden oluşur. Boşaltım bölümü ise dermal (düz) ve akrosiringium olarak adlandırılan epidermal (spiral) bölümlerden oluşur.

Apokrin bezler aksilla, kasık ve perinede bol miktarda bulunmakla beraber az sayıda yüz ve diğer bölgelerde de bulunur. Bu bezlerin de ekrin bezler gibi salgı ve boşaltım bölümleri vardır. Bunlara karakteristik görünümelerini veren salgılama bölümleridir ve hücreler lipid, demir ve lipofuksin içerebilen yoğun asidofilik sitoplazmaya sahiptirler (3,12). Apokrin bezlerin insanlardaki fonksiyonu henüz bilinmemektedir (12).

2.2.3. Dermis

Dermis, kollajen ve elastik liflerden oluşan ve adneksiya yapıları, damarları ve sinirleri içeren bağ doku yapısıdır. Dermis iki zon içerir: papiller ve retiküler dermis (2,3). Adventisyal dermis, epiderminin hemen altında, reteler arasında yer alan papiller dermis ve deri ekleri çevresinde yer alan periadneksiya dermisi içerir (2,3,12). Papiller ve periadneksiya dermis, baskın olarak tip III kollajen ve biraz tip I kollajen ile elastik liflerin oluşturduğu ince ve gevşek bir ağ örgüsünden ibarettir. Papiller dermis zengin bir destek doku ve fibroblastlar ile yüzeyel arterial ve venöz pleksusların kapillerlerini içerir (2). Papiller derminin derin sınırı yüzeyel damar pleksuslarına ve retiküler dermise dek uzanır. Dermisin küçük bir kısmını oluştursa da papiller derminin birçok inflamatuvar deri hastalığında önemli rolü vardır ve epidermis ve retiküler dermis arasında anatomik tampon bölge olarak görev alır (12). Perivasküler-periadneksiya alanlar ve papiller dermis inflamatuvar hücrelerin en çok kümелendiği alanlardır (3). Elastik lifler papiller dermiste ince ve dallanmış olarak, retiküler dermiste ise kalın ve parçalı olarak bulunur (2,12).

Retiküler dermis, derminin büyük bir kısmını oluşturur (12). Retiküler dermis papiller dermisten daha kalındır ve yüzeye paralel dizilim gösteren, tip I kollajenden baskın, iyi organize, kalın eozinofilik kollajen demetlerden oluşan katmanlar içerir. Bu katmanlar aynı boyutlardaki ayrı ayrı liflerin üstüste dizilmesiyle oluşur. Ayrıca özel elastik doku boyaları ile saptanabilen, parçalanmış görünümde kalın elastik lifler, destek doku ve derin yerleşimli pleksusların damarları da bulunur (2). Dermiste bulunan diğer başlıca hücreler dermal dentritik hücreler, fibroblastlar ve mast hücreleridir (2,3). Fibroblastlar, derminin destek doku ve tüm lif çeşitlerini sentezleyen dinamik ve temel hücreleridir. İğsi şekilli ya da yıldızsı hücreler olarak görünürler ve H&E boyalı kesitlerde diğer dermal iğsi hücreler ve dentritik hücrelerden kesin ayrımlarını yapmak zordur. Fibröz doku ve hücresel içeriğin

yanısıra dermis, liflerin ve hücrelerin arasındaki boşluğu dolduran amorf destek doku içerir. Bu destek doku esas olarak glikozaminoglikanlar veya sülfatlanmamış asit mukopolisakkaritler ve daha az oranda da sülfatlanmış asit mukopolisakkaritler içerir. Bu az miktardaki destek doku rutin H&E boyalı kesitlerde kollajen lifler arasında boşluklar olarak görülür ve bazen Alcian blue ve Toluidine blue gibi özel boyalarla güçlükle gösterilebilir (2). Deri eklerinin çoğu retiküler dermiste bulunur. Retiküler dermisten subkutise, kademeli olarak daralan, ağa benzer şekilde uzanımlar vardır ve bu uzanımlar retinaküler dermisi oluşturur (12). Dermisin kalınlığı bölgeden bölgeye değişebilir (3).

2.2.4. Subkutanöz Doku

Subkutanöz doku (subkutis, hipodermis) derinin en derin tabakasıdır (12). Termal regülasyon, yalıtım, enerji sağlanması ve mekanik hasarlardan korunmada çok önemlidir (2). Lobüller halinde dizilim gösteren matür adipöz dokudan oluşur (2,3,12). Lobüller halindeki matür adipositler, bol miktarda sitoplazmik lipid içeren, nükleusu hücre membranının bir tarafına itilmiş yuvarlak hücrelerdir (2). Lobüller, interlobüler septaları oluşturan, ince, dermal bağ doku bantları ile birbirlerinden ayrılırlar (2,3,12). Böylece subkutanöz dokuyu tutan inflamatuvar değişiklikler septal pannikülit ve lobüler pannikülit olarak sınıflandırılabilir (2).

2.2.5. Kan damarları, Lenfatikler, Sinirler Ve Kas

Epidermiste kan damarı bulunmazken dermis kan damarı ve lenfatikler açısından zengindir (12). Deriyi besleyen büyük arterler subkutanöz dokuda, genellikle interlobüler septalarda yer alır ve büyük venlerle birliktelik gösterirler (2,12). Daha küçük arterler, venüller ve kapillerler ise dermiste ve subkutanöz yağ doku lobüllerinde görülen başlıca damar sistemini oluştururlar (2). Bu küçük damarların ağları papiller dermiste (süperfisyal pleksus) ve derin retiküler dermiste (derin pleksus) yer alır (2,3,12). Yüzeyel pleksus papiller dermisi retiküler dermisten ayırırken derin pleksus retiküler dermis ve subkutanöz doku arasındaki sınırı tanımlar. Yüzeyel ve derin pleksusların ayrımı derinin, karakteristik olarak yüzeyel, derin ya da yüzeyel ve derin pleksuslar çevresinde yer alabilen birçok inflamatuvar hastalıklarının sınıflandırılması ve tanınmasında önemlidir. Vaskülit kan damarlarını tutan inflamatuvar bir süreçtir. Kutanöz vaskülit tanısı için gerekli kriterler: (a) damar duvarı içinde inflamatuvar hücre varlığı, (b) ödem, eritrosit ekstrevasyonu, lökositoklasis, trombüs ve

damar duvarının fibrinoid nekrozunu içerebilen vasküler hasarın varlığıdır. Damar duvarının fibrinoid nekrozu gerçek vaskülit tanısı koymak için gereklidir. Perivasküler inflamasyon tek başına vaskülit bulgusu değildir (2).

Başlıca akral bölgelerin derisinde, retiküler dermiste, glomus cisimciği olarak bilinen özel arteriovenöz anastomoz yapıları bulunur. Her bir glomus cisimciği venöz sistemle doğrudan bağlantısı olan arteriyel segmentten (Sucquet-Hoyer kanalı) oluşur (2,3). Her bir Sucquet-Hoyer kanalı, sfinkter gibi görev alan vasküler düz kas hücreleri olarak kabul edilen, dört ila altı glomus hücre tabakasından oluşur (2). Glomus hücreleri yuvarlak şekilli, berrak sitoplazmalıdır ve sitoplazmik sınırları iyi belirlenmiştir (3). Glomus cismi termal regülasyonda rol oynar (2).

Derinin lenfatikleri venüllere eşlik eder ve aynı zamanda derin ve yüzeysel pleksuslarda yer alır (2,3). Büyük sinir lifleri subkutan yağ dokuda ve derin retiküler dermiste görülür ancak küçük sinir lifleri deri boyunca uzanır ve papiller dermise dek uzanabilir (2). Schwann hücrelerinden oluşan Meissner korpüskülleri papiller dermiste görülür ve dokunma duyusunun hızlı mekanik reseptörleri olarak görev alırlar. Ağırlık taşıyan alanlarda, derin dermis ve subkutan yağ doku yerleşimli, konsantrik olarak dizilmiş schwann hücrelerinden oluşan Vater-Pacini korpüskülleri bulunur. Bunlar derin basınç ve titreşim duyularının reseptörleri olarak görev alırlar (2,3,12). Sinir lifleri derin dermiste kan damarlarına eşlik ederler (12).

Deride düz kas, dermis bağ dokusunda ortaya çıkan ve yağ bezleri altındaki kıl köklerinin içine yerleşen arektör pili kasları ile temsil edilir. Düz kas ayrıca dış genital (tunika dartos) bölge derisinde ve areolada görülür.

Çizgili kas iplikçikleri ise boyun, yüz ve özellikle göz kapağı derisinde mimik kasları olarak bulunurlar (2).

2.3. Deri Tümörlerinin Sınıflaması

Kendisini oluşturan farklı hücrelerden köken alan deri kanserleri çok çeşitlidir ve WHO tarafından bu hücre kökenlerine göre sınıflandırılmışlardır (Tablo I) (5).

Tablo I: Deri Tümörlerinin 2005 WHO Sınıflaması

KERATİNOSİTİK TÜMÖRLER Bazal hücreli karsinom Skvamöz hücreli karsinom Bowen hastalığı Aktinik keratoz Verrüler Akantomlar
MELANOSİTİK TÜMÖRLER
DERİ EKİ TÜMÖRLERİ
HEMATOLENFOİD TÜMÖRLER
YUMUŞAK DOKU TÜMÖRLERİ
NÖRAL TÜMÖRLER
KALITSAL TÜMÖR SENDROMLARI

Dünya sağlık örgütünün 2005 yılında yaptığı bu sınıflama günümüzde hala geçerliliğini korumaktadır. Ancak genel olarak deri kanserleri başlıca üç türde ele alınmaktadır; melanom ve melanom dışı deri kanserleri olarak gruplandırılan skuamöz hücreli karsinom ile bazal hücreli karsinom (6,7).

Keratinositik tümörler

Keratinositik tümörler epidermal ya da adneksiyal keratinositlerden köken alırlar. Akantom gibi benign lezyonlardan skuamöz hücreli karsinom gibi agresif büyüme gösterebilen ve metastaz potansiyeli bulunan malign lezyonlara kadar değişebilen geniş bir tanı spektrumunu içine alır (Tablo II).

Tablo II: 2005 WHO sınıflamasına göre keratinositik tümörler

KERATİNOİTİK TÜMÖRLER	
Bazal hücreli karsinom	Süperfisyal BHK Nodüler BHK Mikronodüler BHK İnfiltratif BHK Fibroepitelyal BHK Deri eki yönünde diferansiyasyon gösteren BHK Bazoskuamöz karsinom Keratotik BHK
Skumöz hücreli karsinom	Akantolitik SHK İğsi hücreli (sarkomatoid) SHK Verrüköz SHK Psödovasküler SHK Adenoskuamöz karsinom
Bowen hastalığı	Bowenoid papülozis
Aktinik keratoz	Arsenik keratozu PUVA keratozu
Verrüler	Verrüka vulgaris Verrüka plantaris Verrüka plana
Akantomlar	Epidermolitik akantom Warty diskeratom Akantolitik akantom Lentigo simpleks Seboreik keratoz Melanoakantom Berrak hücreli akantom Büyük hücreli akantom Keratoakantom Liken planus benzeri keratozis

Keratinositik tümörler çok sık görülürler ve düşük mortalite oranlarına rağmen önemli bir sağlık problemidirler. Etiyolojideki temel faktör deoksiribonükleik asit (DNA) hasarına neden olabilen güneş ışınlarıdır. p53 tümör baskılayıcı geninde meydana gelen mutasyonlar yanısıra çok basamaklı bir süreç olan deri kanserlerinin oluşumunda rol alan diğer genler PTCH ve RAS onkogenleridir. Human papilloma virüs (HPV) ile meydana gelen verrüka ve epidermal proliferasyonlar da bu bölümde yer almaktadır (5). Keratinositik tümörler arasında en sık görülen malign tümörler BHK'lardır. Bunu en sık görülen ikinci deri kanseri tipi olan SHK'lar takip eder (6).

Dünya sağlık örgütü derinin SHK'larını, iğsi hücreli (sarkomatoid) SHK, akantolitik SHK, verrüköz SHK, psödovasküler SHK ve adenoskuamöz karsinom olmak üzere histolojik alt tiplerine göre sınıflamıştır. Dünya sağlık örgütü sınıflamasına dahil edilmeyen nadir görülen varyantlar ise; papiller SHK, berrak hücreli SHK, küçük hücreli SHK, posttravmatik (marjolin ülseri) metaplastik (karsinosarkomatöz) SHK, taşlı yüzük hücreli, pigmente, bazaloid, inflamatuvar, infiltratif, dezmoplastik ve rabdoid tiplerdir (5).

2.4. Skuamöz Hücreli Karsinom

Skuamöz Hücreli Karsinom deri ve mukozalardaki epitelyal keratinositlerden köken alan malign neoplazilerdir. Anaplazi, hızlı büyüme, lokal invazyon ve metastaz yapabilme özellikleri bulunabilen SHK'lar, deride BHK'lardan sonra en sık görülen ikinci malignitedir (6,13-16). Melanom dışı deri kanserlerinin % 80'ini BHK'lar oluştururken % 20'sini SHK'lar oluşturmaktadır (6).

2.4.1. Epidemiyoloji

Skuamöz hücreli karsinom vücudun skuamöz epitel ile döşeli herhangi bir bölgesinde gelişebilir (5,11). Ancak sıklıkla güneş ışığına maruz kalan yüz, boyun ve üst ekstremité bölgelerinde ve özellikle açık ten rengine sahip kişilerde görülür (5,13,14). Kulaklar, skalp ve alt dudak da özellikle erkeklerde sıklıkla tutulan bölgelerdir. Dudak ve kulaklarda gelişen lezyonlar daha agresif davranış sergilediği için bu alanlar tutulum açısından özel öneme sahiptir (13). Yanaklar, genital bölge ve tırnak altı gibi güneş görmeyen alanlarda da gelişebildiği bildirilmiştir (14). Açık renk tenli kişilerin güneşten hasar görmüş cilt bölgelerinde güneşin birikici etkisine bağlı olarak gelişme eğilimi vardır. Esmerlerde oldukça az görülmekle birlikte genellikle skar dokusu ile ilişkili olarak ortaya çıkar ve hemen

hemen her zaman artmış morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (5,14). Alt ekstremitedeki lezyonlar daha sık ileri yaştaki kadınlarda görülür (14). Genel olarak olguların çoğu ileri yaşta olup adölesanlarda ve çocukluk çağında nadirdir ve erkeklerde kadınlardan daha sık görülür (13,14).

Artan güneş ışığı maruziyeti ve uzayan yaşam süreleri nedeniyle SHK'ların görülme sıklığının giderek arttığını gösteren önemli kanıtlar bulunmaktadır. Günümüzde güneş ışığı ile ilişkili deri kanserlerinin, gelişmiş ülkelerdeki malignitelerin en yaygın biçimi olduğu söylenmektedir (13). Her yıl dünya çapında 400 000 ila 600 000 vakanın ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (14).

2.4.2. Etiyoloji

Skumöz hücreli karsinomlar normal görünümlü ciltte nadiren ortaya çıkarlar. Sıklıkla güneş hasarlı deride, aktinik keratoz ya da yanık skarı zemininde gelişirler (11). Nadiren kronik ülserasyon, travma, aşı izi, dövme, pyoderma gangrenozum skarı, deri greftleri, fistül hattı, dilate por, uzun süredir var olan pilonidal sinüs, epidermal kist, hidradenitis supürativa ve akne konglobata zemininde de ortaya çıkabilirler (14).

Bu tümörlerin insidansı güneş maruziyetinin miktarı ve derideki pigmentasyon eksikliği ile doğrudan ilişkilidir (3). Açık alanda çalışan ya da güneşin altında çok vakit geçiren açık renk tenli insanlar özellikle risk altındadırlar. Güneş maruziyeti sonrası uzun süre eritem gösteren ya da kolayca yanık oluşan deri tiplerinde (cilt tipi I ve II) duyarlılık artmaktadır (13). Ultraviyole ışınlarının, özellikle ultraviyole B (UVB) ışınının (güneş spektrumunda 280-320 nm) derinin SHK'larındaki en önemli etiyolojik faktör olduğu kanıtlanmış, bunun yanı sıra melanom dışı deri kanserlerinin gelişiminde genetik etkenlerin de rol aldığı bulunmuştur.

Derinin SHK'ları keratinositlerdeki protoonkogenlerin aktivasyonu ve/veya tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonlarını içeren birkaç basamaklı bir süreçte gelişir. Yüksek dozda UV ışını, DNA hasarı yanı sıra doku hasarında önemli rol oynayan reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu indükleyerek de cilt kanserlerine yol açabilir. Artmış reaktif oksijen radikallerinin varlığı ve/veya antioksidan savunma sisteminin etkinliğinin azalması kanser de dahil birçok dejeneratif sürecin gelişiminde rol oynamaktadır. Ultraviyole ışınları ayrıca pirimidin dimerleri oluşumunu ve heterozigozite kaybını uyarır (5).

Ultraviyole ışınlarının dışında diğer sık görülen ekzojenöz karsinojenik ajanlar 1) sigara kullanımı, 2) insan papilloma virüsleri (Human Papilloma Virus; HPV), 3) arsenik, 4) vinil klorit, polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi endüstriyel kimyasallar, 5) alkilleyici bir ajan MNNG (N-methyl-N'nitro-N-nitrozoguanidin), ve 6) gazolin veya gazolin buharına maruziyeti içermektedir.

Etiyolojide rol oynayan önemli faktörlerden biri de immünsupresyondur. Özellikle organ transplantasyonu yapılan hastalarda bu tümörlere yatkınlık artmıştır (5).

2.4.3. Klinik Ve Makroskopik Bulgular

Derinin SHK'ları sıklıkla ağrısız, yavaş büyüyen, çevre dokusu sertleşmiş, yüzeyi ülser, nodüler ya da verrüköz görünümde kitleler şeklinde ortaya çıkarlar. Tümörler nadiren pigmentedirler (11,13). Çoğu zaman sığ ülserler olarak görülen bu tümörlerin yüzeyi bazen hiperkeratotik olabilir. Çevre dokuda aktinik hasar özellikleri gözlenebilir. Akantolitik varyantı sıklıkla nodüler tümör olarak baş ya da boyunda yer alır ve klinik olarak BHK ile karışabilir (5,14).

2.4.4. Histopatoloji

Skuamöz hücreli karsinomlar epidermisten kaynaklanıp dermiste derin dokulara dek uzanabilen, nükleer pleomorfizm, atipik mitotik figürler, apoptotik hücre ve keratin incileri olarak tanımlanan, tamamlanmamış keratin odakları içeren skuamöz epitelyal hücrelerin invaziv neoplazileridir. Hücreler sıklıkla yuvalar, tabakalar ve kordonlar halinde dizilim gösterirler (5,11-14). Erken dönem invaziv lezyonlarda papiller dermiste sadece tek hücre invazyonu görülebilir (17). Tümör hücreleri geniş, eozinofilik sitoplazmalı ve genellikle büyük veziküle nükleusludur. Nükleus/sitoplazma oranı artmıştır. İntersellüler köprüler belirgindir. Sıklıkla tek hücre keratinizasyonu görülür (5,11,14). Tümör diferansiyasyonuna bağlı, tümör adalarında değişen oranlarda santral keratinizasyon ve keratin inci oluşumları vardır (5,14). Keratin incileri içinde keratohyalin granüller ya seyrek bulunur ya da hiç bulunmaz (11). Skuamöz hücreli karsinomların % 80'inden fazlası iyi diferansiyedir ve büyük miktarlarda keratin üretirler (3).

Tümör hücrelerindeki anaplazi derecesi tümörü derecelendirmede kullanılır. Genellikle “iyi”, “orta” ve “az” diferansiye kategorileri kullanılarak subjektif bir değerlendirme yapılır (5,13,14). Sıklıkla geçmişte kullanılan bir histolojik derecelendirme

sistemi Broders' 1932 sınıflandırma sistemidir. Ancak bu sistem çok fazla subjektif olduğu için ve tümörü derecelendirirken dikkat edilmesi gereken, en az diferansiye alana göre derecelendirme kuralına uymadığı için artık kullanılmamaktadır. Buna göre: derece 1; lezyonun % 75 ve daha fazlası iyi diferansiyedir, derece 2; lezyonun % 50 ila 75'i iyi diferansiyedir, derece 3; lezyonun % 25 ila 50'si iyi diferansiyedir ve derece 4; lezyonun % 25'ten azı iyi diferansiyedir (13,18).

Günümüzde esas alınan histolojik derecelendirme ise şu şekildedir:

Derece 1; belirgin keratinizasyon içeren, kolaylıkla tanınabilen skuamöz epitelden oluşan, iyi diferansiye tümörlerdir. İntersellüler köprüler belirgindir. Pleomorfizm hafiftir ve mitotik figürler genellikle bazalde yerleşmiştir.

Derece 2; skuamöz epitelyal görünümün daha az belirgin olduğu, daha çok yapısal disorganizasyon içeren, orta dereceli diferansiye tümörlerdir. Nükleer ve sitoplazmik pleomorfizm daha belirgindir ve mitoz daha çoktur. Keratin oluşumu; keratin incileri, keratin kistleri ve dağınık tek hücre keratinizasyonu içeren hücrelerle sınırlıdır.

Derece 3; skuamöz diferansiyasyonu tanımanın güç olduğu, nadiren hücreler arası köprü ve küçük keratinizasyon odakları içeren az diferansiye tümörlerdir.

Derece 4; anaplastik veya andiferansiye tümörlerdir (13).

Yüksek dereceli SHK ile düşük dereceli SHK arasındaki temel farklar tablo III'te özetlenmiştir (19).

Tablo III; Düşük dereceli SHK ve yüksek dereceli SHK arasındaki başlıca farklar

Düşük dereceli SHK	Yüksek dereceli SHK
İyi/orta derece diferansiye: intersellüler köprüler ve keratin incileri	Az diferansiye: berrak hücreli, sarkomatoid, tek hücre infiltrasyonu
Tümör hücreleri solid ya da tabakalar halinde dizilmiş	Tümör hücreleri tek tek infiltre olmuş görünümde
Güneş hasarı ve aktinik keratozla ilişkili	De novo veya skar zemininde gelişmiş
Perinöral ve/veya perivasküler invazyon yok	Perinöral ve/veya perivasküler invazyon var
En büyük boyutu < 2 cm	En büyük boyutu > 2 cm
Derinliği < 2 mm	Derinliği > 2 mm

Çoğu SHK'lar aktinik keratoz zemininde gelişir ve invaziv tümör çevresinde aktinik keratozun varlığı bu durumun kanıtıdır (5). Bazen tümörler keratoakantomlar gibi çanak şeklinde gelişim gösterebilirler (3). Bu olguların bir kısmında keratoakantomdan ayırım zor olabilir. Psödoglanduler varyantta lobüler yapı korunmuştur ancak skuamöz hücreler diskoheziv veya akantolitiktir (17).

Dermise invazyon karsinom tanısı için olmazsa olmazdır ancak bu durum erken dönem lezyonlarda subjektif bir değerlendirmedir. Bazıları tarafından florid tipte aktinik keratoz olarak yorumlanan lezyonlar başkaları tarafından yüzeysel invaziv skuamöz hücreli karsinom olarak yorumlanabilir. Bu durum da aslında aktinik keratoz ve SHK'nın, skuamöz neoplazilerin gelişiminde süreklilik gösteren spektrumun birer parçası olduğunun yansımasıdır. Ancak her iki lezyonun da tedavi yöntemleri ve prognozları aynı olduğu için bu durumun klinik bir önemi bulunmamaktadır.

Skuamöz hücreli karsinomlar, bir kısım melanin granülünün tümör hücrelerinin sitoplazmalarına transferi sonucu neoplastik olmayan dendritik hücre grubu içerebilirler (pigmente SHK). Bu özellik BHK'da da görülebilir. Bazen de tümörde deri eki tümörlerine benzer şekilde berrak hücre değişiklikleri ve nadiren taşlı yüzük hücre görüntüsü olabilir (3).

Tümörler bazen sinir kılıfları, kan damarlarının adventisyası, lenfatikler, fasyal düzlemler ve embriyolojik birleşme düzlemleri boyunca infiltre olurlar. Perinöral lenfositlerin varlığı daha derin kesitlerde perinöral invazyon bulunduğuna dair önemli bir ipucudur. Tümör çevresinde hafiften orta dereceye kadar kronik enflamatuar hücre infiltrasyonu bulunabilir. Bazen bu infiltrat eozinofil lökositler de içerebilir ve tümör adasını infiltre edebilir (5).

2.4.5. İmmünohistokimyasal - Moleküler Özellikler Ve Patogenezi

Derinin SHK'larında, çoğu zaman tanı koymak için ek bir çalışmaya gerek duyulmamasına rağmen tümör az diferansiye ya da iğsi hücreli tipte olduğu zaman İHK'sal çalışmalar tanıda gerekli olabilir (14). Skuamöz hücreli karsinomlarda hücreler, BHK'lardakilere göre daha yüksek molekül ağırlıklı keratinler ile boyanırlar. Hücrelerin hemen hemen tamamı Sitokeratin MNF 116, Sitokeratin 5/6 ve Epitelyal Membran Antijeni (EMA) eksprese ederler (3,5,14). Büyük keratinize hücrelerde İHK'sal olarak İnvolukrin (stratum korneum'un çapraz bağlanmış zarf proteininin öncülü) varlığı gösterilebilir. Vimentin az diferansiye ve iğsi hücreli varyantında eksprese edilebilir. Bazal hücreli karsinomların aksine, SHK'lar Ber-EP4 (epitelyal hücre adezyon molekülü antikoru) ve CD10 (cluster of

differentiation 10; diferansiyasyon kümesi 10) eksprese etmezler (3,14). Karsinoembriyonik antijen (CEA) de SHK'larda sıklıkla eksprese edilir (3). Lizozim, S100 ve Desmin negatiftir. Ki-67 ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü SHK'da BHK'ya göre daha fazla eksprese edilir. Ancak Ki-67 oranı SHK'larda prognoz belirleyicisi değildir. p63 ile pozitif boyanma SHK için oldukça spesifiktir. Minikromozom Onarım 5 proteini (MiniChromosome Maintenance 5; MCM 5) SHK'larda hücrelerin yaklaşık % 80'inde eksprese edilir. Literatürde Sitokeratin 20'nin eksprese edildiği taşlı yüzük hücreli iki vaka bildirilmiştir (14). Bazen neoplastik hücrelerin bazal membranı geçip geçmediğini tayin etmek zor olabilir. Bazal membranı en fazla 5 mm geçen mikroinvaziv karsinomlarda bu zorluk daha da artar. Bu durumda bazal mebran boyalarından PAS, Laminin ve tip IV kollajen gibi belirteçler kullanılabilir (20).

Literatürde bazı İHK'sal belirteçlerin ekspresyonlarının SHK'ların malignite potansiyeli ile ilişkisini değerlendirmek için yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada MIB-1 (Ki-67) ve p53 belirteçlerinin İHK'sal olarak ekspresyonlarının aktinik keratozdan bowen hastalığına ve invaziv SHK'ya doğru arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada Matriks Metalloproteinaz-9'un (MMP-9) da öncelikle mikroinvaziv ve invaziv SHK odaklarında eksprese edildiği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise MMP-2'nin in situ lezyonlara ve aktinik keratoza göre invaziv SHK'larda arttığı bulunmuştur. Oh ve Penney (21), yaptıkları çalışmada aktinik keratoz ve bowen hastalığından invaziv SHK'ya giderken Ki-67'nin arttığını ancak p27 İHK'sal ekspresyonunun ise azaldığını bulmuşlardır. Solus ve ark.'nın (22) çalışmasında, GATA-3 ekspresyonunun aktinik keratoz, SHK in situ ve SHK'larda önemli derecede azaldığı bulunmuştur. Hu ve ark. (23) ise yaptıkları çalışmada kemokin reseptörü CXCR7'nin deri SHK'larında sıklıkla eksprese edildiğini ve bu belirtecin ekspresyonunun tümör derinliği ve kanser evresi ile korele olduğunu göstermişlerdir. Shafaei ve ark. (24) CD10'un SHK ve BHK ayırımında yararlı bir İHK'sal belirteç olduğunu ve CD10 pozitifliğinin sıklıkla BHK'da görüldüğünü saptamışlardır.

Derinin SHK'larının patogenezi hücre siklusunun, apoptozun, DNA onarımının, diferansiyasyonun, hücre yaşlanmadan kaçma ile birlikte telomeraz aktivitesinin ve siklooksijenaz 2 (COX-2) enzim ekspresyonunun düzensizliği gibi sorunlara yol açan çok sayıda lokal genetik değişikliklerle ilişkilidir (25).

Genel olarak tümörigenez, çok basamaklı bir süreçtir. Bu basamaklar temelde sırasıyla; inisiasyon (atipik hücrelerin ortaya çıkması), promosyon (prekanserojen lezyon

oluşması), konversiyon (kansere dönüşüm) ve progresyondur (invazyon ve metastaz). Skuamöz hücreli karsinom da intraepitelyal değişiklikler (hafif, orta, ağır displazi tarzında) ile başlar. Karsinoma in situ ile son bulur ve/veya invaziv SHK'ya dönüşebilir (26,27). Tüm bu aşamalarda farklı etkenler rol oynayabilir.

Ultraviyole ışınlar sıklıkla epidermal hücre DNA'sını hasara uğratar ancak UV ile tetiklenen karsinogenezde yer alan daha karmaşık mekanizmaların da olduğu düşünülmektedir (14). Deri SHK'larının gelişiminde öne sürülen patogenetik mekanizmalardan biri de p53 mutasyonlarının UV ile indüklenmesidir (3). Birçok kanserin genetiğinde yer alan ve bir tümör süpresör gen olan p53 gen mutasyonu melanom dışı deri kanserlerinde de görülebilir. Mutant p53 geni hücre nükleusunda birikir ve İHK'sal olarak gösterilebilir. İyonize radyasyon da p53 mutasyonunu uyarır (14). Öncü lezyon olan aktinik keratozda ve SHK kenarındaki normal görünümlü epidermal hücrelerde p53 mutasyonunun sıklıkla bulunması bu genetik değişimin karsinogenezdeki erken bulgu olduğunu gösterir (3). p53'ün mutasyonuna ek olarak siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A'nın (CDKN2A; Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A) ekspresyon kaybının da melanom dışı deri kanserlerinin gelişiminde rol oynadığı görülmüştür. Tümör progresyonunda ise CDKN2A'nın spontan delesyonu rol oynayabilir. Aktinik keratozun SHK'ya progresyonunda kromozom 18q'nun kaybı önemlidir. Kromozom 13q14'deki kromozomal instabilite bazı olgularda tespit edilmiştir. Bazı HPV tipleri Retinoblastom (Rb) gen inaktivasyonuna ve SHK gelişimine sebep olabilir. Melanom dışı deri kanserlerinde, özellikle SHK'da DNA yanlış eşleştirme tamir genlerinde sorun bulunabilir. Bazı deri SHK'larında ise BRCA2 heterozigozitesinin kaybı olabilir (14). Skuamöz hücreli karsinomlarda H-Ras gen ve kinaz inhibitörü 4a (Inhibitor of Kinase 4a; INK4a) lokus mutasyonu da bulunabilir (5).

Rb/p16 yolağının, mutasyona bağlı, inaktivasyonunun ya da INK4A'nın promoter (başlatıcı) hipermetilasyonunun ve nükleer faktör kappa B (Nuclear Factor kappa B; NF-κB) yolağının aktivasyonunun da SHK gelişiminde rol oynadığı görülmüştür. HRAS ve KRAS genlerinde mutasyonlar da olguların sırayla % 46 ve % 4-12'sinde bulunmaktadır. E-cadherin geni CDH1'in promoter hipermetilasyonu vakaların % 95'inde bildirilmiştir (3).

DNA üzerindeki etkilerinin yanı sıra, güneş ışığındaki UV ışınlarının Langerhans hücrelerinin antijen sunumunu etkilemek yoluyla, deri üzerinde en azından geçici immünsüpresif bir etki gösterdiği kabul edilmektedir (1). Ayrıca güneş ışığı kaynaklı UV ışınlarının, SHK'larda keratinositlerdeki tümör baskılayıcı gen olan, PTEN protein seviyesini

azalttığı gösterilmiştir (28,29). PTEN seviyesinin azalmasında temelde iki mekanizma rol oynar: (1) PTEN, AKT (protein kinaz B) aktivasyonunun azaldığı apoptotik hücrelerde aktive Caspase tarafından parçalanır; (2) yaşayan hücrelerde PTEN transkripsiyonu bastırılmıştır, bu bastırılma Caspase aktivasyonundan bağımsızdır ve ERK ile AKT aktivasyonlarındaki artış ile paralel gerçekleşir (28).

Caspase'lar (Cysteine Aspartate Specific ProteASEs-CASPASE) apoptoz esnasında önemli rol oynayan sistein bağımlı aspartata özgü proteaz grubu enzimlerdir. Öncelikli olarak inaktif proteinler olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edilirler (30). Aktive olan Caspase'lar, organel bütünlüğü için hayati öneme sahip hücre bileşenlerinin ve proteinlerinin hücre içi proteolizine ve hücrenin ölüme gitmesine neden olurlar (apoptoz) (31). Caspase 3 apoptotik kaskada erken katılır ve doğrudan apoptoz ile ilişkili görünmektedir. Ancak epidermal farklılaşma ve proliferasyondaki katkısı henüz kesin olarak bilinmemektedir. Krajewska ve ark. (32) kornifiye tabaka hariç tüm epidermal tabakalarda keratinositlerin sitoplazmalarında İHK'sal olarak Caspase 3 varlığını göstermişlerdir.

Son zamanlarda çeşitli yayınlar, SHK'larda sinyal iletim yollarında anormallikler olduğunu ortaya çıkarmıştır. Kanser hücrelerinde ERK1 protein seviyesinin arttığı ve bu proteinin tümör hücrelerinin anormal çoğalmasına aracılık ettiği bulunmuştur. Skuamöz hücreli kanserlerde rolü tam olarak aydınlatılamamış olan ERK'nin aşırı ekspresyonunun altında yatan mekanizmalar, miRNA'ya odaklanarak araştırılmış ve yapılan bazı çalışmalarda SHK'larda miR-214'ün azalmış ekspresyonunun ERK'nin aşırı ekspresyonuna neden olduğu gösterilmiştir (7-9).

2.4.6. Tedavi

Lezyonun yeri, boyutu ve tedaviyi uygulayan kişinin tecrübesi de dahil birçok faktör hastanın tedavi yönetimini etkiler. Tedavide temel yaklaşım total eksizyondur. Düşük riskli tümörler ve 2 mm'den küçük lezyonlarda, en az 4 mm'lik sağlam cerrahi sınır ile yapılan eksizyonlarda tümörün yaklaşık % 95'inin çıkartıldığı düşünülmektedir. Daha büyük çaplı lezyonların veya yüksek riskli tümörlerin mikroskopik olarak kontrol edilerek çıkartılması, daha geniş eksizyon yapılması ve 6 mm'lik temiz cerrahi sınır bırakılması önerilmektedir (14,33).

Kulak, dudak ve nazal vestibül gibi kozmetik sorunların daha önemli olduğu bölgelerdeki lezyonlar için radyoterapi uygulanabilir. Operasyon için uygun olmayan yerleşim yerleri ve yaşlı hasta popülasyonu da bu yöntem için en ideal gruptur. Hızlı büyüyen tümörlerde de en etkili tedavi yöntemi radyoterapidir (14,34). Perinöral invazyon varsa adjuvan radyoterapi yararlı olabilir ancak bu konuyla ilgili yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Lokal ileri evre lezyonlarda kemoradyasyon kullanılmıştır. Kullanılan kemoterapötik ajanlar düşük doz sisplatin ve 5-fluorourasildir. Birden fazla tümörü olan organ transplant alıcılarında elektrokoagülasyon ve küretaj, uygun olarak seçilmiş düşük riskli lezyonlarda güvenli bir tedavi seçeneği olabilir. Kriyoterapi de küçük lezyonlar için kullanılabilir ancak tekrarlayan durumlarda uygun değildir (14). Tedavi sonrası nüks, metastaz ve başka primer lezyon açısından hastaların klinik ve radyolojik takibi önerilir (34).

2.4.7. Prognoz

Derinin SHK'larında histolojik alt tipin ve yerleşim yerinin yanısıra tümörün evresini yükselten ve prognostik öneme sahip bazı yüksek dereceli histolojik özellikler vardır. Bu özellikler tümör derinliği, tümörün anatomik seviyesi, perinöral ve lenfovasküler invazyonun varlığıdır (19,35). Özellikle tümör boyutu ve invazyon derinliği rekürrens ve metastaz açısından en önemli kriterler olarak düşünülmektedir (19).

Breslow'a göre tümör derinliğini ölçerken, granüler tabaka ya da eğer lezyon ülserise ise ülser tabanı üst referans noktası olarak alınır. Alt referans noktası olarak ise tümör invazyonunun en alt noktası alınır. Clark'a göre anatomik seviyeye baktığımızda ise; seviye I'de tümör intraepidermal yerleşimli, seviye II'de tümör papiller dermiste ancak papiller dermisi doldurmamış, seviye III'te tümör papiller dermisi doldurmuş ve geçmiş, seviye IV'te tümör retiküler dermise uzanmış, seviye V'te de tümör subkutan dokuya invazidir.

Yukarıda belirtilen yüksek risk faktörlerinin yanısıra diğer prognostik özellikler; inflamatuvar cevap varlığı, aktinik keratozla, HPV ve Bowen hastalığı ile ilişki durumu, akantolitik, bazaloid, küçük hücreli, taşlı yüzük hücreli, dezmoplastik ve iğsi hücreli histolojik subtipleri ve foliküler SHK olmasıdır (36,37).

Skuamöz hücreli karsinomların çoğu sadece lokal agresiftirler (5,21). Ancak lenf noduna metastaz yapabilme yeteneği, fasya, kas ve diğer cilt altı yapılara invazyon yapma eğilimleri olduğu da bilinmektedir (38). İmmünyetmezliği olan hastalarda (insan

immünyetmezlik virüsü (Human Immunodeficiency Virus; HIV) ile enfekte olanlar da dahil) gelişen SHK'lar genellikle daha agresif seyrederek. Derin invazyonlu, az diferansiye, perinöral invazyon bulunan ve akantolitik özellikleri olan tümörler nüks etmeye ve metastaz yapmaya daha eğilimlidir (5,14).

Tümör derinliği melanomda olduğu gibi prognostik bir değişkendir (5). Derin invaziv SHK'lar, genellikle küçük ve henüz tam olarak çıkarılabilecekleri aşamada saptanırlar ve bu sayede tanı konulduğunda bu tümörlerin sadece % 5'inden azında bölgesel lenf nodu metastazı vardır. Ancak derin invazyonu bulunan tümörlerde rezeksiyon yapmakta geç kalınırsa prognoz kötüdür (1). Rekürrens ve metastaz oranları literatürde çok değişkenlik göstermekle birlikte genel olarak rekürrens oranları % 3,7-10'dur ve tedaviye göre bu oran değişmektedir (13,39). Lezyonun cerrahi sınıra yakın olarak çıkartılması da rekürrens açısından önemli bir risk faktörüdür (5,14).

Derinliği 2 mm'den az olan SHK'lar nadiren metastaz yaparlarken, 2 mm ile 5 mm arasında olanlar orta dereceli (% 5 civarı) riske sahiptir. Derinliği 5 mm'den fazla olan tümörlerde ise metastaz riski % 20 civarındadır (5,9,19,21). Derinliği 4 mm olan veya Clark'a göre seviye III (subkutanöz dokuya dek uzanan) olan tümörler daha agresif tavrı sergiler ve bu tümörlerde metastaz riski yedi kat artmıştır. Derinliği 8 mm'den fazla olan veya Clark seviye V tümörlerde ise nodal tutulum riski önemli oranda artmıştır ve bu olgularda profilaktik lenf nodu diseksiyonu önerilir (19). En büyük boyutu 2 cm'den büyük olan tümörler rekürrens ve metastaz yapmaya küçük lezyonlardan daha eğilimlidirler (5,9,19,21).

Skumöz hücreli karsinomların agresif formlarında büyüme paterni sıklıkla lobüler değil daha infiltratiftir. Bu vakalarda perinöral ve/veya lenfovasküler invazyon daha sıktır ve kötü prognozu işaret ederler. Bazı vakalar belirgin stromal dezmoplazi içerirler ve bu patern de daha agresif davranışla ilişkilidir (17).

Skumöz hücreli karsinomların histolojik diferansiyasyon derecesi, geliştiği klinik durumlar ve yerleşim yerleri de prognozu etkiler (5,9,19). Güneş görmeyen bölgelerde gelişen tümörlerde rekürrens riski % 2-3 iken, güneş hasarı olan deride gelişen tümörlerde risk % 0,5 ya da daha az bir oranla en düşüktür. Dudak, vulva, perine ve penis derisinde görülen Bowen hastalığı zemininde, Marjolin ülser, radyasyon skarı veya termal yanık zemininde gelişen tümörler için risk daha da fazladır (5,9). Özellikle kulak veya dudak yerleşimli az diferansiye tümörler, iyi diferansiye olanlara göre üç kat daha fazla metastaz ve iki kat daha fazla rekürrens riski taşırlar (19).

Tümörün malignite potansiyelini değerlendirmede kullanılan diğer önemli bir faktör ise perinöral ve perivasküler invazyon varlığıdır. Perinöral invazyonun baş-boyun bölgesi yerleşimli tümörlerin % 14'ünde bulunduğu ve bu özelliğin tümörün agresif doğasını gösterdiği düşünülür. Perinöral invazyon içeren tümörlerin (% 23) içermeyenlere (% 9) göre lokal rekürrens oranı daha yüksektir. Ayrıca bu durumun hastalığa bağlı mortalite oranını da önemli oranda arttırdığı düşünülmektedir (19,21).

İmmünyetmezlik de SHK'nın gelişimini, rekürrensini ve yayılımını önemli oranda arttıran diğer bir önemli faktördür. Yetmezlik, altta yatan bir maligniteye, organ transplantasyonu sonrası sürekli immünsüpresif ilaç kullanımına veya HIV enfeksiyonuna bağlı olabilir. Melanom dışı deri kanserleri, transplant hastalarında, uzun süreli immünsüpresif tedavi kullanımına bağlı görülen en sık yan etkilerden biridir. Genel popülasyonun aksine bu vakalarda SHK gelişme sıklığı BHK'dan daha yüksektir (19).

Genel olarak iyi prognozlu olan deri SHK'larına göre metastatik SHK'ların (alt tipten bağımsız) klinik davranışı çok kötüdür ve hastaların 5 yıllık sağkalım oranı % 35 civarındadır (5,21). Bölgesel lenf nodu tutulumu olanlarda 10 yıllık sağ kalım oranları % 20'den, uzak organ metastazı bulunanlarda ise % 10'dan azdır. Skuamöz hücreli karsinomlarda rekürrens ve metastazlar % 70 oranında ilk iki yıl, % 95 oranında ilk beş yıl içinde görülürler. Genel olarak tüm hastalarda metastaz gelişme insidansı ortalama % 2-3'tür ve hayatını kaybeden hastaların 3/4'ü metastaz nedeniyle hayatını kaybeder (5).

Malign melanom dışındaki deri kanserleri sonuç olarak kolay tedavi edilebilen ve zamanında müdahale ile ölüm oranları diğer solid tümörlere kıyasla oldukça az olan tümörlerdir (40).

2.4.8. Skuamöz Hücreli Karsinomun Varyantları

Dünya sağlık örgütü derinin SHK'larını, iğsi hücreli (sarkomatoid) SHK, akantolitik SHK, verrüköz SHK, psödovasküler SHK ve adenoskuamöz karsinom olmak üzere histolojik alt tiplerine göre sınıflamıştır. Dünya sağlık örgütü sınıflamasına dahil edilmeyen nadir görülen varyantlar ise; papiller SHK, berrak hücreli SHK, küçük hücreli SHK, posttravmatik (marjolin ülseri) metaplastik (karsinosarkomatöz) SHK, taşlı yüzük hücreli, pigmente, bazaloid, inflamatuvar, infiltratif, dezmoplastik ve rabdoid tiplerdir (5).

Akantolitik Skuamöz Hücreli Karsinom

Akantolitik SHK (adenoid SHK, psödoglanduler SHK), SHK'nın histolojik olarak akantolizle sonuçlanan intersellüler köprülerin kaybolması ile karakterize varyantıdır (3,5). Tüm deri SHK'larının % 24'ünü oluşturur. Genellikle ileri yaştaki erkek popülasyonunda görülür.

Klasik SHK gibi en önemli etiyolojik faktör ultraviyole ışınlardır. Sıklıkla baş-boyun bölgesinde özellikle kulak çevresinde yerleşirler (5). Klasik tip SHK'da olduğu gibi klinik olarak güneş gören deride, yavaş büyüyen, yüzeyi hiperkeratotik ve genellikle ülsera papül veya plak şeklinde ortaya çıkarlar (3,5). Mikroskopik olarak küçük büyütmede asimetrik ve infiltratif dermal tümör adaları ile birlikte incelmış, normal veya hiperplastik görünümlü epidermis, orta büyütmede ise suprabazal veya intratümöral akantoliz dikkati çeker. Akantoliz bölgeleri intraepidermal geniş boşluklar oluşturabilir. Akantolitik alanlar, lezyonun yanındaki foliküler alanlardan aşağı doğru uzanım gösterebilir (5). Ayrıca anjiosarkomu taklit eden psödoasküler patern oluşturabilirler (3,5). Büyük büyütmede ise tümörün diskeratoz, keratinositik atipi, artmış nükleus/sitoplazma oranı, nükleer hiperkromazi ve artmış tipik ve/veya atipik mitoz varlığı gibi tipik özellikleri seçilebilir.

Hücreler AE-2/3 gibi yüksek moleköl ağırlıklı keratinlerle boyanırlar. Ayrıca involukrin, vimentin ve EMA ile de pozitif boyanma görülebilir. Düşük moleköl ağırlıklı keratinler negatiftir (5). Akantolizin patogeneğinde, intersellüler adezyon molekölü sindekan, E-cadherin ve anhidrotik ektodermal displazi gen ürünleri gibi değişik intersellüler peptidlerin tutulduğu ve bu belirteçlerin İHK'sal olarak azaldığı saptanmıştır (3,5). Son zamanlarda p53 ve çoğalan hücrelerin nükleer antijeni (proliferating cell nuclear antigen; PCNA) İHK'sal ekspresyonlarının desmozomlardaki azalmayla korele olduğu gösterilmiştir (5).

Tümörün ayırıcı tanısına skuamöz ve glanduler diferansiyasyon gösteren gerçek adenoskuamöz hücreli karsinom ve diğer akantolitik bozukluklar girer (3,5). Tümörün davranışı diğer SHK'lar gibi derinliğine bağlıdır ve klasik tiplerden daha agresif seyredebilirler. Rekürrense neden olabilen in situ lezyonlar % 10 olguda mikroinvazyon gösterebilirler. İnvazyon derinliği 2 mm'den büyük lezyonlar % 5-19 arasında metastaz riski taşırlar (5).

İğsi hücreli skuamöz hücreli karsinom

Sarkomatoid SHK olarak da bilinen nadir görülen bir varyantıdır. Lezyonlar genellikle güneş hasarlı veya radyasyona maruz kalmış deri bölgelerinde gelişirler (5,19).

Geçmişte bu varyantın sadece radyasyon ile ilişkili olduğu düşünülmekteydi ancak günümüzde de novo olarak gelişebileceği de bilinmektedir. Eski radyasyon alanlarında gelişen tümörler daha agresif seyrederken, radyasyon ile ilişkisi olmayanlar klasik SHK'lardan daha agresif değildirler (19). Vulvada gelişen liken sklerozus et atrofikus lezyonu ile ilişkili olgu bildirilmiştir. Bu varyantın insidansı immünsuprese hastalarda daha yüksektir.

Kendiliğinden kanayabilen ve santral ülserasyon içerebilen ekzofitik nodüller veya plak şeklinde ortaya çıkarlar (5,19). Klinik olarak daha sık görülen klasik varyanttan ayrımı zordur. Bazen hızlı büyüme öyküsü olabilir (5).

Tamamen iğsi hücrelerden oluşabilir veya klasik SHK komponenti de içerebilir (5,19). İğsi hücrelerin iri, veziküler nükleusu ve çoğu zaman sınırları net olarak seçilemeyen soluk eozinofilik sitoplazması vardır. Değişken oranlarda pleomorfizm ve mitoz içerirler (5). Klasik SHK'nın aksine tümör hücreleri yuva veya kordlar oluşturmada dermisi tek hücre infiltrasyonu şeklinde infiltre edebilirler. Heterolog elemanların yanı sıra çok sayıda mitoz içeren bizaar, pleomorfik dev hücreler görülebilir. Ancak stroma çok desmoplastik değildir (19).

Özellikle keratin incilerinin ve epidermisle bağlantının olmadığı durumlarda iğsi hücreli SHK'yı atipik fibroksantom, iğsi hücreli melanom, iğsi hücreli sarkom ve nadiren de leiomyosarkom gibi derinin diğer iğsi hücreli lezyonlarından ayırt etmek zordur (3,5,19). Bazı olgular bütün keratin belirteçleri ile negatif boyanır ve sadece ultrastrüktürel olarak tanınabilirler (5). Olguların 2/3'ünde Sitokeratin 5/6 pozitifdir. Sitokeratin AE1/3, CAM5.2 veya MNF116 daha az oranda pozitifdir (5,19). Bazı tümörler sitokeratin ve vimentini birlikte eksprese edebilirler ve bu durum mezenkimal karakterdeki bir tümörün metaplastik değişiklikler içerdiğini düşündürebilir (3,5). Epidermisin bazal ve spinöz tabakadaki hücrelerinin nükleuslarında eksprese olan p63, iğsi hücreli SHK'yı histolojik olarak benzer diğer durumlardan ayırt etmek için kullanılabilen yararlı bir nükleer belirteçtir (19).

İğsi hücreli SHK, SHK'nın agresif klinik gidişe sahip az diferansiye bir varyantıdır. Metastaz yapan SHK'ların 1/3'ünü oluşturur (5).

Verrüköz skuamöz hücreli karsinom

Düşük malignite potansiyelli, verrü benzeri, iyi diferansiye SHK'ların nadir görülen bir varyantıdır (3,5,19). Tüm oral karsinomların % 2-12'sini oluşturur ve erkeklerde daha sık bulunur (en sık 5. dekatta). Ekstremitelerin verrüköz karsinomu (epitelyoma kunikulatum) ise en sık 6. dekattaki erkeklerde görülür. Genital tipinin insidansı tüm penil tümörler arasında % 5-24 olup 50 yaşından daha genç erkeklerde ortaya çıkmaya eğilimlidir.

Genel olarak patogeneizde öne sürülen teoriler kronik iritasyon, enflamasyon ve yetersiz immün sistemdir. Oral verrüköz karsinomların gelişimindeki önemli faktörler kötü oral hijyen, çürük dişler, sigara ve tütün ürünlerinin çiğnenmesi ve enfiye kullanımıdır. Genital lezyonlarda kötü hijyen ve fimozis etiyojide rol oynayan esas faktörlerdir (5). Diğer faktörler düşük riskli (tip 6 ve 11) ve yüksek riskli (tip 16 ve 18) HPV enfeksiyonu (HPV 6, 11) ve kimyasal karsinojenlerdir.

Sıklıkla bukkal ve retromolar mukoza, gingiva, ağız tabanı, dil ve sert damakta yerleşirler. Ayrıca ayak tabanı ve nadiren avuç içi, parmakların distali ve ampütasyon güdüklerinde de görülebilir. Genital lezyonlar özellikle glans penis ve prepsyumda ortaya çıkar. Vajina ve perianal bölgede nadirdir. Nadiren skalp, yüz, sırt ve ekstremitelerde kronik ülserasyon ve skar ile ilişkili olarak bildirilmiştir.

Lezyonlar karnabahar şeklinde ekzofitik ve endofitik büyüme gösterirler (5,19). Yüzeyleri papillomatöz ve soluk renkli olup ara sıra drenaj sinüsleri içerebilirler (3,5). Erken evre lezyonlar eritematöz bir zeminde beyaz, yarı saydam, keratotik yamalar şeklinde ortaya çıkarlar. Yumuşak doku ve kemiğe lokal invazyonu ile birlikte sıklıkla ülserasyon ve fistülasyon görülebilir (19).

Olguların tamamında, özellikle biyopsi küçük ve yüzeysel ise, lezyonun benign olduğunu düşündürecek, çok iyi diferansiye proliferatif bir epitel gözlenir. Skuamöz epitel destrüktif veya infiltratif değil itici tarzda, asimetric ekzofitik ve endofitik büyüme paterni gösterir (5,19). Genellikle çevre epidermis/mukozadan daha derinlere penetrasyon vardır (5). Tümör hücreleri sadece hafif atipi ve çok düşük mitotik aktivite içerirler. Küçük intraepidermal abse oluşturan nötrofillerin varlığı önemli bir tanısal ipucudur. Enflamatuvar hücre ve keratin artığı içeren drenaj sinüsleri bulunabilir (5,19). Ayrıca belirgin hiperkeratoz, parakeratoz ve akantoz içeren epidermiste granüler tabaka dikkat çekicidir (19).

Benign reaktif durumlardan ve klasik SHK'dan ayrımı zordur. Orta ya da derin dermiste skuamöz epitelin küntleşmiş uzanımlarının olması verrüköz karsinom şüphesi

uyandırır. Skuamöz epitelin aşağı doğru uzanımları bülböz şekildedir ve uçlarında küçük nötrofil birikintileri bulunabilir. Klinikopatolojik korelasyon ve materyalin yeterli örneklenmesi tanıda yardımcı olabilir (5). Verrüköz karsinom sıklıkla çevre bağ doku, kas doku, kıkırdak ve kemik dokuyu destrükte edecek şekilde agresif büyüme gösterir ve klinik değişiklikler, invazyondan daha çok bu destrüktif değişikliklerle ilişkilidir (3,19).

İmmünohistokimyasal boyaların (özellikle Bcl-2, Ki-67 ve p53) kullanımı ayırıcı tanıya gitmede yardımcı olabilir. Bu boyalarla verrüköz karsinomda epitelin sadece 1/3 alt tabakasında boyanma olurken, SHK'da tüm epidermis boyanır (19).

Tümör tamamen çıkartıldığında prognoz mükemmeldir. Ancak yetersiz eksizyon durumunda rekürrens oranı yüksektir. Lezyonu uzun süredir var olan vakalarda ve radyasyon ve/veya kemoterapi sonrası tümör karakter değiştirebilir ve metastatik SHK'a dönüşebilir (5).

Adenoskuamöz karsinom

Skuamöz hücreli karsinomun, akrosiringium ile ilişkili pluripotent hücrelerden köken alan ve müsin sekrete eden gland yapıları oluşturan nadir bir varyantıdır. Bildirilen olguların çoğunda lezyon baş-boyun bölgesi yerleşimlidir. Penis de sıklıkla tutulabilir. Olguların çoğu ileri yaşta ve erkektir (5,21).

Aseptomatik, düzgün yüzeyli dermal nodül veya geniş, ülser, derin invaziv tümör olarak ortaya çıkarlar (5). Boyutları 1 cm ile 6 cm arasında değişen sert, keratotik plaklar şeklinde de görülebilirler (21). Histolojik olarak tümörler keratokist oluşturan, irili ufaklı, birbirleriyle bağlantılı anaplastik skuamoid hücre yuvaları içerir. Yüzeyde tümörün epidermisten köken aldığını gösteren epidermisle bağlantılı alanlar vardır. Epitelyal müsin sekrete eden glanduler diferansiyasyon gösteren alanlar fokal ya da difüz olabilir. Glanduler diferansiyasyon tipik olarak iyi diferansiye skuamöz yuvalar içerisinde gelişir ve küboidal ya da kolumnar epitel ile döşeli küçük kistler şeklinde görülürler. Lümenlerinde bulunan sialomüsin PAS, Müsikarmen ve Alcian blue, lümeni döşeyen hücreler ise İHK'sal CEA ile boyanır (5,21).

Ayırıcı tanıda diğer SHK tipleri ve metastatik karsinomlar yer alır (21). Ayrıca adenoskuamöz karsinomun, mukoepidermoid karsinomdan ayrımının yapılması gerekmektedir. Adenoskuamöz karsinom müsin sekrete eden bez yapıları içerir ancak goblet hücresi içermez. Mukoepidermoid karsinom ise poligonal skuamöz hücreler ve goblet hücrelerinden oluşur, bez yapısı içermez. Ayırıcı tanıda yer alan mikrokistik deri eki

karsinomları tübüler yapıların belirgin olduğu daha duktal bir görüntü sergiler ancak müsin sekrete etmezler. Ayrıca metastatik adenoskuamöz karsinomların da ekarte edilmesi gerekir (5). Akantolitik SHK da gland benzeri boşluklar oluşturduğu için ayırıcı tanıya girer. Ancak akantolitik SHK'da lümeni ve müsin üretimi olan gerçek gland yapısı yoktur (21).

Tümörler sıklıkla metastaz ve lokal nüksle seyredebilen agresif bir klinik sergilerler. Erken evre yüzeysel tümörlerde prognoz kısmen daha iyidir (5,21).

Psödovasküler Skuamöz Hücreli Karsinom

Akantolitik skuamöz hücreli karsinomun anjiosarkom benzeri (psödoanjiosarkomatöz) görüntüye yol açan belirgin akantoliz içeren agresif bir alt tipidir. Oldukça nadir görülürler (5,13,14). Yuvarlak, iyi sınırlı, beyaz-gri renkli ülser veya nodüller/pembe tümör şeklinde ortaya çıkarlar. Hemen her zaman orta ya da ileri yaşta, güneş gören bölgelerde bulunurlar (5).

Anastomozlaşan kordlar şeklinde dizilmiş, içerisinde dökülmüş tümör hücreleri ve amorf bazofilik madde bulunan bir psödolümen içeren poligonal veya yassı tümör hücreleri ile karakterizedir. Psödovasküler boşluklar içinde eritrositler görülebilir (5,13).

Anjiosarkomdan ayrımı için İHK'sal çalışma gereklidir. Bu tümörler Sitokeratin antikorları ile pozitif boyanırken, CD31 ve faktör 8 ilişkili antijen negatiftir. Klasik anjiosarkomda vasküler belirteçler pozitif, sitokeratin negatif iken epiteloid anjiosarkomda hem vasküler hem epitelyal belirteçler pozitifdir (5,13,14).

Diğer SHK varyantlarına göre prognozu daha kötüdür. Mortalite oranı % 50 civarındadır (5).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2013-2015 yılları arasında deride SHK tanısı alan 45 olgu ve olağan deri doku örneği içeren 15 olgu dahil edildi.

Her olguya ait H&E boyalı kesitler tekrar değerlendirildi. Tümörü tüm özellikleri ile birlikte en iyi gösteren kesit ile ona ait parafin blok seçildi. Seçilen doku örneğine ait arşiv preparatı, Olympus BX50 ışık mikroskopunda incelendi. Yeniden incelenen olgular orijinal raporları ile karşılaştırıldı ve olgular yaş, cinsiyet ve tümörün gelişim gösterdiği bölgelere göre değerlendirildi.

3.1. İmmünohistokimyasal Boyama

Olguların blokları Leica rotary mikrotomda 4 mikron kalınlığında kesildi ve elde edilen yeni kesitlerde PTEN, ERK1 ve Caspase 3 ekspresyonu İHK'sal olarak araştırıldı. İmmünohistokimyasal boyama Avidin-Biotin kompleks sistemi (ABC) kullanılarak yapıldı. İmmünohistokimyasal yöntem için bloklardan hazırlanan kesitler poly-L-lysin (MicroSlides Snowcoat X-tra, Surgipath, Richmond, IL, USA) kaplı lamlara alınarak bir gece 37 derecelik etüvde bekletildi. Seçilen kesitlere İHK'sal PTEN, ERK-1 ve Caspase 3 boyaları uygulandı.

Kullanılan Antiserumlar:

PTEN: PTEN/MMAC (Mutated in multiple advanced cancers)/TEP1 (TGF- β -regulated and epithelial cell-enriched phosphatase), Anti-Human PTEN Monoclonal Mouse Clone 6H2.1, Kod no: M3627, 0,2 ml 1/100 dilüsyon, DAKO, Kuzey Amerika

ERK1: Anti-ERK1 Pab, Kod no: E3560, 0,1 ml, 1/100 dilüsyon, Spring Bioscience, ABD

Caspase 3: Anti-CASP3, Kod no: HPA002643, 0,1 ml, 1/500 dilüsyon, Atlas Antibodies, İsveç

Universal Kit: DAKO, K8000

İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi:

- 1) Poly-L-lysin kaplı lama alınan kesitler bir gece 37 °C'lik etüvde bekletildi.
- 2) DAKO PTlink cihazında retrieval solüsyonu kullanılarak (Dako Envision Flex Target retrieval solution High pH 50x) 95 derecede 20 dakika inkübe edildi. Böylece antijenin açığa çıkarılması sağlandı.

- 3) Bu işlemten sonra uygulanan kaynatmanın ardından kesitler oda ısısında soğumaya bırakıldı.
- 4) Endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilebilmesi için, kesitlere süper blok (Envision FLEX Peroxidase blocking reagent, 40 ml, K8000, DAKO) damlatılarak beş dakika bekletildi.
- 5) Tüm kesitler soğumayı takiben 5 dk PBS solüsyonunda yıkandı ve kurulandı.
- 6) Her bir kesitin üzerine primer antikörler olan PTEN, ERK1 ve Caspase 3 solüsyonu dokuyu tamamen örtecek şekilde damlatıldı ve bir saat bekletildi.
- 7) Bağlanmamış antikörler 5 dk PBS solüsyonunda yıkanarak kesitlerden uzaklaştırıldı.
- 8) Sekonder antikör (DAKO, Envision FLEX/HRP) eklenerek 10 dk bekletildi.
- 9) Ardından kesitler tekrar 5 dk PBS solüsyonunda yıkandı.
- 10) Renk verecek görüntüyü sağlamak amacı ile Diaminobenzidin tetraklorid (DAB, DAKO 20 ml, K8000) damlatıldı ve kahverenk gözlenene kadar bekletildi.
- 11) Renk oluşunca çeşme suyunda 5 dk yıkandı.
- 12) Zemin boyanması için kesitlere hematoksilin ile zıt boyanma yapıldı.
- 13) Çeşme suyunda 5 dk yıkandı.
- 14) Yıkama sonrası dehidratasyon için kesitler sırası ile yükselen oranlarda alkol serilerinden geçirildi ve ksilolde saydamlaştırma sonrası balsam ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal Sonuçların Değerlendirilmesi:

İmmünohistokimyasal olarak uygulanan PTEN, ERK1 ve Caspase 3 boyalı kesitler değerlendirildi. Tüm değerlendirmeler ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Tokyo, Japan) 10, 20 ve 40'lık büyütmelede yapıldı. Değerlendirme tümör alanları ile kenardaki daha normal epidermis karşılaştırılarak yapıldı ve değerlendirilen tümör alanlarının nekroz içermemesine dikkat edildi.

İmmünohistokimyasal PTEN ile hücrelerde sitoplazmik ve/veya nükleer boyanma gözlemlendi. Değerlendirme boyanmanın yoğunluğuna göre; negatif (0), zayıf (1+), orta (2+) ve güçlü (3) olarak yapıldı (41).

Hücrelerde, ERK1 immünohistokimyasal boyası ile sadece nükleer boyanan alanlar dikkate alındı. Değerlendirme hücrelerdeki boyanma oranına göre semikantitatif olarak yapıldı. Değerlendirme skalasına göre; derece 1 (< % 5 hücrede boyanma, negatif), derece 2

(% 5-25 hücrede boyanma, 1+), derece 3 (% 26-50 hücrede boyanma, 2+) ve derece 4 (> % 50 hücrede boyanma, 3+) olarak yapıldı (42,43).

Caspase 3 ile hücrelerde nükleer daha belirgin olmak üzere nükleer ve/veya sitoplazmik boyanma izlendi. İHK'sal belirtecin ekspresyonu çevre normal epidermisle kıyaslanarak, semikantitatif olarak skorlandı. Buna göre; negatif (0), düşük (0,5), eşit (1) ve yüksek (2) olarak değerlendirildi. Normal epidermise göre negatif, düşük ve eşit oranda boyananlar (-), yüksek oranda boyananlar (+) kabul edildi (32).

3.2. Formalinle Fikse Edilmiş Parafine Gömülü Dokulardan miRNA İzolasyonu

Parafine gömülü dokulardan miRNA izolasyonu ve sonrasında PCR optimizasyonu Denizli Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yapıldı. Üretici firmanın belirttiği şekilde, formalin ile fikse edilmiş parafine gömülü (FFPE) dokulardan miRNA izolasyonu için aşağıdaki basamaklar sırası ile uygulandı:

- 1) Vakalara ait parafine gömülü dokulardan 10 mikrometre kalınlığında 5'er adet kesit alındı ve 1,5 ml'lik ependorf tüplerine konuldu.
- 2) Doku kesitlerinde bulunan fazla parafin, steril bistüri ve pens yardımı ile mekanik olarak uzaklaştırıldı.
- 3) Mekanik olarak fazla parafinlerinden arındırılan doku örnekleri yeni, steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
- 4) Örnekler deparafinizasyon amacı ile 1200 µl "Ksilen (Sigma-Aldrich)" ilave edildi ve 2200 rpm'de, kuvvetlice vortekslendi (10 kez pulse-vorteks).
- 5) Örnekler 56°C'ye ayarlı etüvde (Nüve) 3 dk inkübasyona bırakıldı.
- 6) Inkübasyon sonrasında doku örnekleri oda sıcaklığında (15-25°C), 14 000 rpm'de, 5 dk santrifüj edildi.
- 7) Süpernatant mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı (Peletin dağılmamasına dikkat edildi).
- 8) Pelete tekrar 1200 µl ksilen ilave edildi.
- 9) Doku örnekleri oda sıcaklığında (15-25°C), 14 000 rpm'de, 5 dk santrifüj edildi.
- 10) Pelet kısmına dokunulmadan, süpernatant mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı.
- 11) Doku örneklerinde artık olarak kalan ksilen'i uzaklaştırmak için, peletlere 1200 µl "etanol (Merck) (%96-100)" eklendi ve örnekler birkaç kez kuvvetlice vortekslendi.

- 12) Örnekler oda sıcaklığında (15-25°C), 14 000 rpm’de, 5 dk santrifüj edildi.
- 13) Süpernatant mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı (Peletin dağılmamasına dikkat edildi).
- 14) 10-12. basamaklar tekrar edildi.
- 15) Etanolü uzaklaştırmak için, örneklerin bulunduğu mikrosantrifüj tüplerinin kapakları açılarak 37°C’ye ayarlı etüvde 15 dk inkübasyona bırakıldı.
- 16) Etanol tamamen buharlaştıktan sonra peletlere, kit ile birlikte sağlanan 240 µl “PKD Tamponu” ilave edilerek ön parçalama işlemi gerçekleştirildi.
- 17) Örnekler 10 000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
- 18) Örnekler, kit ile birlikte sağlanan 10 µL “Proteinaz K” ilave edildi ve örnekler vortekslendi. Ardından örnekler kısa bir santrifüj işlemi (short-spin) yapıldı.
- 19) Tüplerin kapak kısımları parafilmle sarılarak, dokunun tamamen parçalanması için 56°C’ye ayarlı kuru ısıtma bloğunda 15 dk boyunca inkübasyona bırakıldı.
- 20) Ardından örnekler kuru ısıtma bloğunda 80°C’de 15 dk inkübasyona bırakıldı.
- 21) Inkübasyonun ardından tüpler, kısa bir santrifüj işlemine (short-spin) tabi tutuldu.
- 22) Tüplerde oluşan renksiz faz, 2 ml’lik temiz mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- 23) Örnekler buz üzerinde 3 dk inkübe edildi ve 13 500 rpm’de 15 dk santrifüj edildi.
- 24) Tüplerdeki süpernatant kısmı, temiz mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
- 25) Tüplere 25 µl kit ile birlikte sağlanan “DNaz Booster Tamponu” eklendi ve vortekslendi.
- 26) Örnekler 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 27) Inkübasyondan sonra örnekler kit ile birlikte sağlanan 500 µl “RBC Tamponu” eklendi. Mikropipet yardımıyla karıştırıldı.
- 28) Örnekler 1750 µl %100 Etanol eklendi. Mikropipet yardımıyla karıştırıldı.
- 29) Kit ile birlikte temin edilen 2 ml’lik toplama tüplerine “RNeasyMinElute Spin Kolon”lar yerleştirildi ve bir önceki basamakta elde edilen karışımdan 700 µl bu kolonlara mikropipet yardımı ile aktarıldı.
- 30) Kolonlar 14 000 rpm’de 30 sn santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra kolonlar yeni 2 ml’lik toplama tüplerine yerleştirildi ve bir önceki toplama tüpleri atıldı.
- 31) 28. ve 29. basamaklar tekrar edildi.
- 32) Kolonlara 500 µl kit ile birlikte sağlanan “RPE Tamponu” eklendi.

- 33) Kolonlar 14 000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra kolonlar yeni 2 ml’lik toplama tüplerine yerleştirildi ve bir önceki toplama tüpleri atıldı.
- 34) Kolonlar 14 000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra kolonlar yeni 2 ml’lik toplama tüplerine yerleştirildi ve bir önceki toplama tüpleri atıldı.
- 35) Santrifüj işleminden sonra kolonlar, temiz 1,5 ml’lik steril mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Kolonlara kit ile birlikte sağlanan 30 µl “RNase-free su” eklendi ve oda sıcaklığında (15-25°C), 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- 36) İnkübasyon işleminden sonra kolonlar 14 000 rpm’de, 1 dk santrifüj edildi. Böylece parafine gömülü doku örneklerinden miRNA izolasyonu işlemleri tamamlanmış oldu.

cDNA sentezi:

Bir poli-A-polimeraz, miRNA dizisine bir poli-A kuyruğu ekler. Oligo(dT) içeren bir primer ve bir PCR primer sekansı poli-anedile RNA ile birleşir. Bir revers transkriptaz sentezlenir ve miRNA’ ya komplementer olan primer DNA sekansına eklenir. En son elde edilen cDNA ürünü miRNA komplement dizisi, bir poli(dT), PCR primer dizisi içerir. Böylelikle Real-time PCR yöntemi için hazır olur.

Bunun için örnek başına 500 ng ile 2000 ng arasında total RNA ya da 50 ng ile 200 ng mikroRNA ile işleme başlandı. Devamında MicroRNA RT primerlerinden 1 µl, 5X MicroRNA RT Tampondan 2 µl, MicroRNA RT Enzim Karışımından 1 µl ve 100 ml DTT’den 1 µl eklenecek ve son hacim 10 µl olacak şekilde RNase-free su ile tamamlandı. Bu karışım pipet yardımı ile karıştırılarak 37°C’ de 2 saat inkübe edilecek ve ardından 95°C’de 5 dk RNA degradasyonu ve Revers Transkriptaz’ın inaktivasyonu gerçekleştirildi. En az 1 dakika buz üzerinde bekletilen cDNA, 90 µl RNase-free su eklenerek hemen realtime PCR işlemine geçildi ve işlemlere buz üzerinde devam edildi.

Elde edilen cDNA’lar spesifik primerler ile reaksiyona girerek hedeflenen mikroRNA ekspresyon düzeyi belirlemede kullanıldı. miRNA’ların ekspresyonunun belirlenmesinde aşağıdaki karışım kullanıldı;

- 1) 10 µl Realtime PCR Master Karışım
- 2) 10 µl dilüe edilmiş cDNA
- 3) 5 µl ddH₂O; olmak üzere toplam hacim 25 µl’dir.

Primerlerin doğru olarak çalışabilmesi için gerekli olan PCR protokolü de aşağıdaki gibi ayarlandı;

Denaturasyon

95°C 10 dakika

Amlifikasyon

60°C 40 saniye

95°C 15 saniye 45 siklüs; Her 72°C' de single floresan okuma yapıldı.

72°C 30 saniye

Melting

95°C 60 saniye

65°C 120 saniye; 65°C den 95°C' ye devamlı floresan okuma yaptırıldı.

95°C 1 saniye

Cooling

40°C 30 saniye

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) moleküler biyolojide uygulanan bir teknik olup, nükleik asitlerin uygun koşullarda hızlı bir şekilde çoğaltılması olarak tanımlanabilir. Polimeraz zincir reaksiyonu bir çeşit in vitro klonlamadır. PCR, DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasına (denatürasyon), daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasına (hibridizasyon), sonra da zincirin uzamasına (polimerizasyon) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon / hibridizasyon/polimerizasyon) bir PCR siklusunu oluşturur. Her adım farklı ısılarda gerçekleştirilir. PCR'ı uygulayıp amplifikasyon yapmak için, DNA örneği (FFPE doku, kan vs izole edilmiş), çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer, dNTP'ler (A,T,C,G), ısıya dayanıklı DNA-Polimeraz enzimi, uygun pH ve iyon koşullarını (Mg²⁺) sağlayan tampon karışımı gereklidir. PCR, çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamaktadır. PCR tekniği ile laboratuvar çalışmalarında çok büyük hız ve kesinlik kazanılmıştır.

Data Analiz

Veriler delta delta CT ($\Delta\Delta CT$) metodu ile analiz edildi ve "Light Cycler® 480 Quantification Software" olarak isimlendirilen bir bilgisayar programı ile kantitasyonları yapıldı.

Genlerin Kantitasyon Değerlerinin İstatistiksel Analizi

miRNA'ların ekspresyon değişimlerinden elde edilen veriler sistemin bize sağlamış olduğu istatistiksel analiz programı ile değerlendirildi.

3.3. İstatistiksel değerlendirme

İstatistik çalışmaları Windows için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 22.0 programı kullanılarak yapıldı. Nicel verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi. Normal dağılıma uyan değişkenlerin ikiden fazla gruba göre karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi kullanıldı ve tanımlayıcı istatistikler ortalama $\pm$ standart sapma biçiminde gösterildi. Normal dağılıma uymayan değişkenlerin ikiden fazla gruba göre karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı ve tanımlayıcı istatistikler medyan (25-75 persantil) biçiminde gösterildi. Değişkenler arasındaki ilişkinin incelenmesinde Sperman korelasyon analizi kullanıldı. Gen ekspresyon değerlerinin grupları ayırmadaki kesim değerlerini hesaplamak için ROC Eğrisi analizi kullanıldı ve ROC Eğrisi Altında Kalan Alan hesaplanarak kesim değerlerinin duyarlılık ve özgüllük oranları hesaplandı. Nitel verilerin kıyaslanmasında Ki-kare testi kullanıldı ve tanımlayıcı istatistikler sayı olarak verildi. Yöntemler arasındaki uyumun araştırılmasında Kappa istatistiği hesaplandı. Anlamlılık seviyesi olarak 0,05 alındı ve p değerinin $<0,05$ olması durumunda farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtildi.

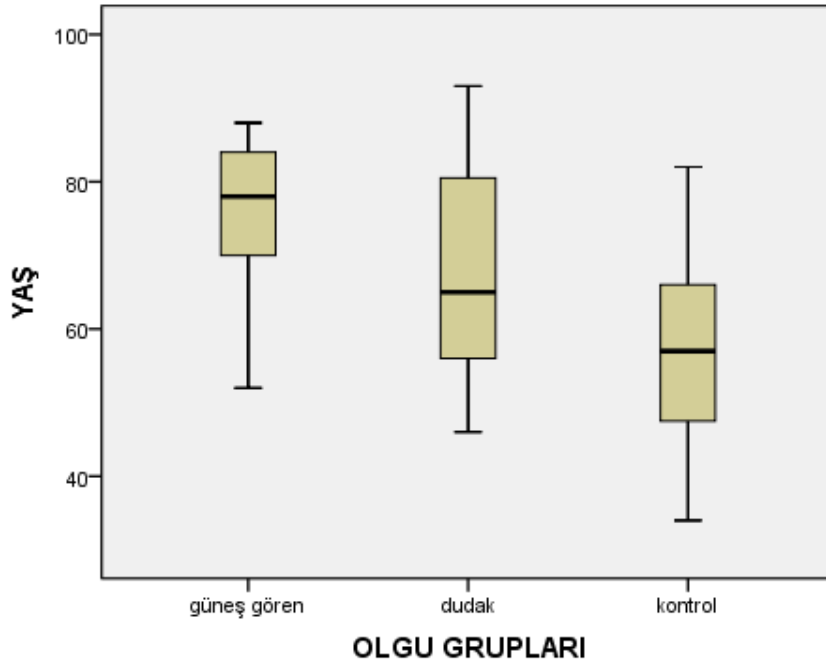
4.BULGULAR

Bu çalışmada, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında üç senelik süre içerisinde tanı alan toplam 45 deri skuamöz hücreli karsinom tanılı olgu ve 15 olağan deri dokusuna sahip olgu, immünohistokimyasal PTEN, ERK1 ve Caspase 3 ekspresyonu yanı sıra PCR ile miRNA 214 ekspresyonu açısından incelendi.

Demografik veriler:

Skuamöz hücreli kanser tanısı alan olguların en genci 46 yaşında, en yaşlısı ise 93 yaşındaydı (ort.72,53 $\pm$ 12,35). Yüzün güneş gören (dudak dışında) bölgesinde tümör tanısı alan olgulardan en genci 52, en yaşlısı 88 (ort.75,92 $\pm$ 9,2); dudakta tümör tanısı olan olgulardan en genci 46, en yaşlısı 93 yaşındaydı (ort.68,30 $\pm$ 14,55). En büyük olgu grubunun sekizinci ve dokuzuncu dekadlarda bulunduğu görüldü. Kontrol grubundaki olguların ise en genci 34, en yaşlısı 82 yaşında idi (ort.56,13 $\pm$ 13,21) (Şekil 1).

Kontrol grubu olarak, travmatik amputasyona uğrayan, olağan görünümdeki alt ve üst ekstremitate materyalleri olan olgular seçildi. Karsinom tanılı olgulardan 20 tanesinde tümör dudakta, kalan 25 tanesinde ise yüzün güneş gören diğer bölgelerinde yer almaktaydı ve hepsi iyi diferansiye idi. Olguların 16'sı kadın (% 36), 29'u erkekti (% 64).



Şekil 1: Olgu gruplarının yaş dağılımı

Olguların tümör bölgesi ve dekadlara göre yaş dağılımı Tablo IV’te, cinsiyet ve diğer belirtilen parametreler açısından dökümü ise Tablo V’te sunulmaktadır.

Tablo IV: Olguların tümör bölgesi ve dekadlara göre yaş dağılımı

	Güneş Gören Bölge	Dudak	Toplam
5. dekad	0	2	2
6. dekad	2	5	7
7. dekad	4	4	8
8. dekad	10	4	14
9. dekad	9	4	13
10. dekad	0	1	1
Toplam	25	20	45

Tablo V: Olguların tümör bölgelerine göre cinsiyet dağılımı, en büyük ve en küçük yaş ile ortalama yaş özellikleri

	Güneş Gören Bölge	Dudak	Total
Olgu sayısı	25	20	45
Kadın	10	6	16
Erkek	15	14	29
En büyük yaş	88	93	93
En küçük yaş	52	46	46
Ortalama	75,92	68,30	72,53
Standart sapma	9,22	14,55	12,35

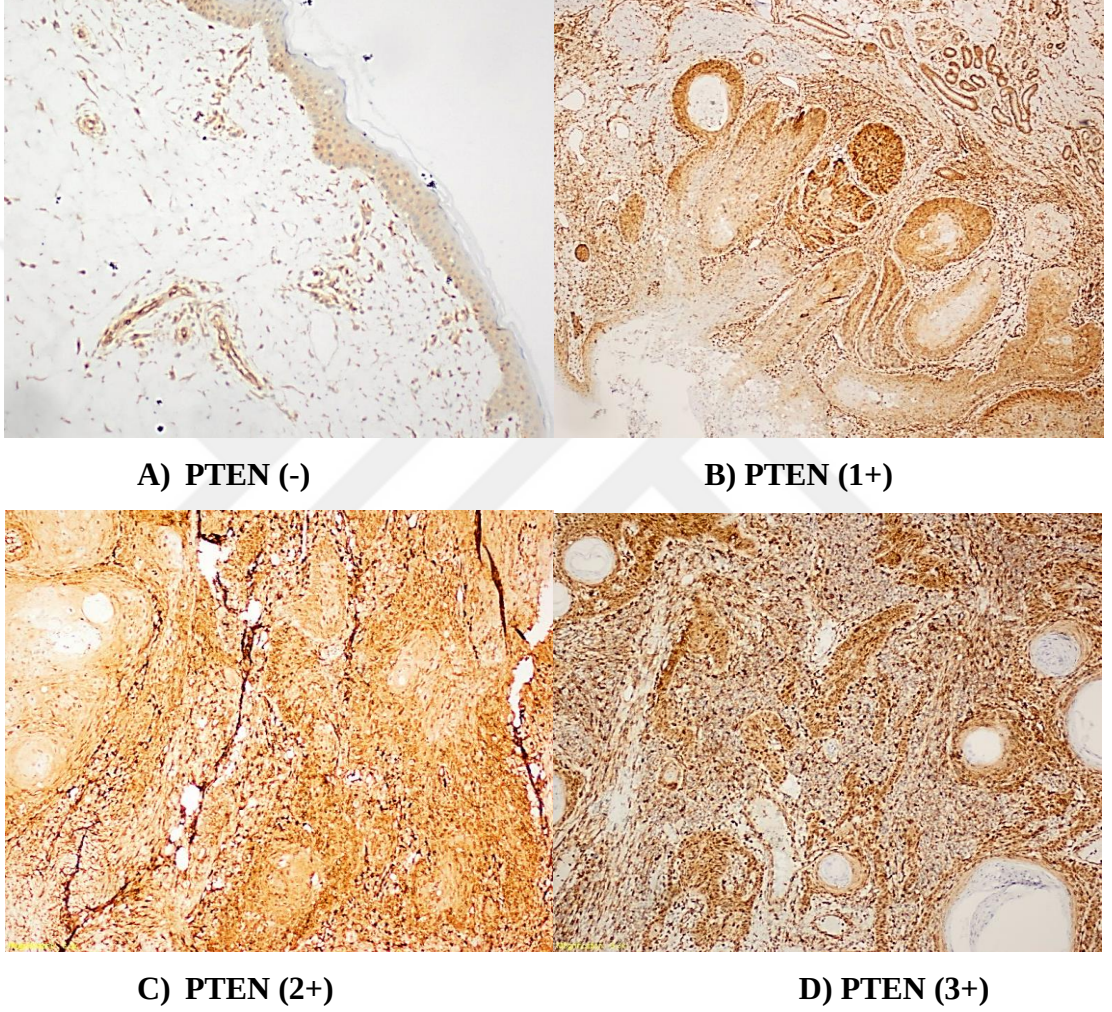
Kadınların genel yaş ortalaması $79,56 \pm 6,6$, erkeklerin genel yaş ortalaması $68,65 \pm 13,11$ ’dir. Tümör gruplarının cinsiyetlere göre yaş ortalamaları ise Tablo VI’da gösterildi.

Tablo VI: Tümör gruplarının cinsiyetlere göre yaş ortalaması

	Güneş gören bölge	Dudak
Kadın	$77,2 \pm 6,10$	$83,50 \pm 6,02$
Erkek	$75,06 \pm 10,95$	$61,78 \pm 11,96$

İmmünohistokimyasal Boyanma Özellikleri

PTEN ekspresyonu; SHK tanısı alan 45 olgudan 44'ü (% 97,8) PTEN ile pozitif boyanır iken, bunların 16'sı (% 35,6) zayıf, 21'i (% 46,7) orta, 7'si (% 15,6) güçlü ekspresyon gösterdi. Kontrol grubuna ait 15 olgunun hiçbirinde PTEN ekspresyonu gözlenmedi (Resim 1).



Resim 1: Kontrol grubu (A) ve SHK tanılı (B, C, D) olgularda PTEN ekspresyonu (x100)

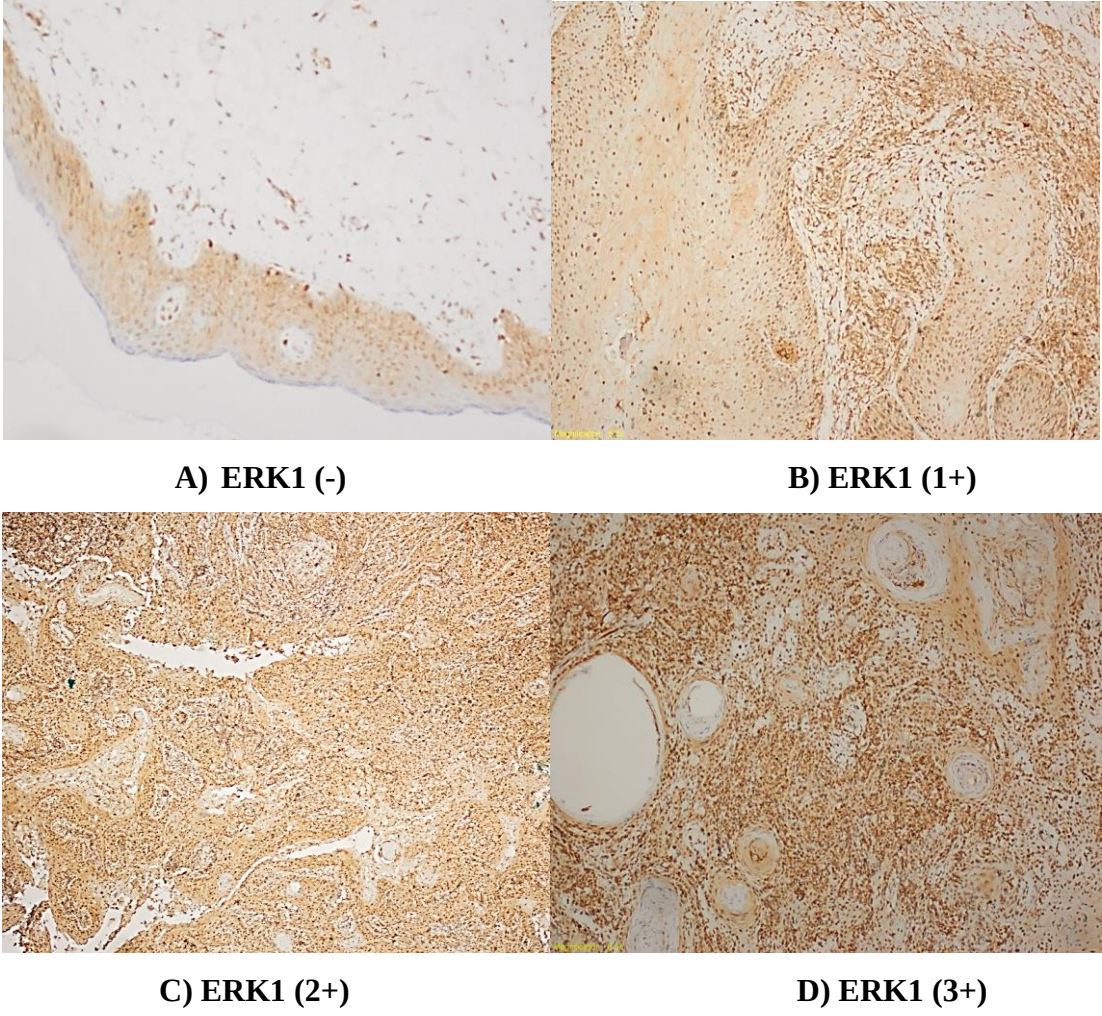
Olgu gruplarına ait PTEN ekspresyonlarının, yoğunluklarına göre değerlendirilmesi Tablo VII'de gösterildi.

Tablo VII: Olgu gruplarında PTEN ekspresyonu

PTEN ekspresyonu	SHK tanıli olgular		Kontrol grubu	Total
	Güneş Gören Bölge	Dudak		
Negatif (-)	1	0	15	16
Zayıf (1+)	8	8	0	16
Orta (2+)	11	10	0	21
Güçlü (3+)	5	2	0	7
Toplam	45		15	60

PTEN ekspresyonu açısından SHK tanıli olgular ile kontrol grubu arasındaki farklılık anlamlı ($p=0.00$) bulundu.

ERK1 ekspresyonu; SHK tanısı alan 45 olgudan 43'ü (% 95,6) ERK1 ile pozitif boyanır iken, bunların 20'si (% 44,4) zayıf, 15'i (% 33,3) orta, 8'i (% 17,8) güçlü ekspresyon gösterdi. Kontrol grubuna ait 15 olgunun bir tanesi (% 6,7) zayıf derecede ekspresyon gösterirken 14'ünde (% 93,3) ERK1 ekspresyonu saptanmadı (Resim 2).



Resim 2: Kontrol grubu (A) ve SHK tanılı (B, C, D) olgularda ERK1 ekspresyonu (x100)

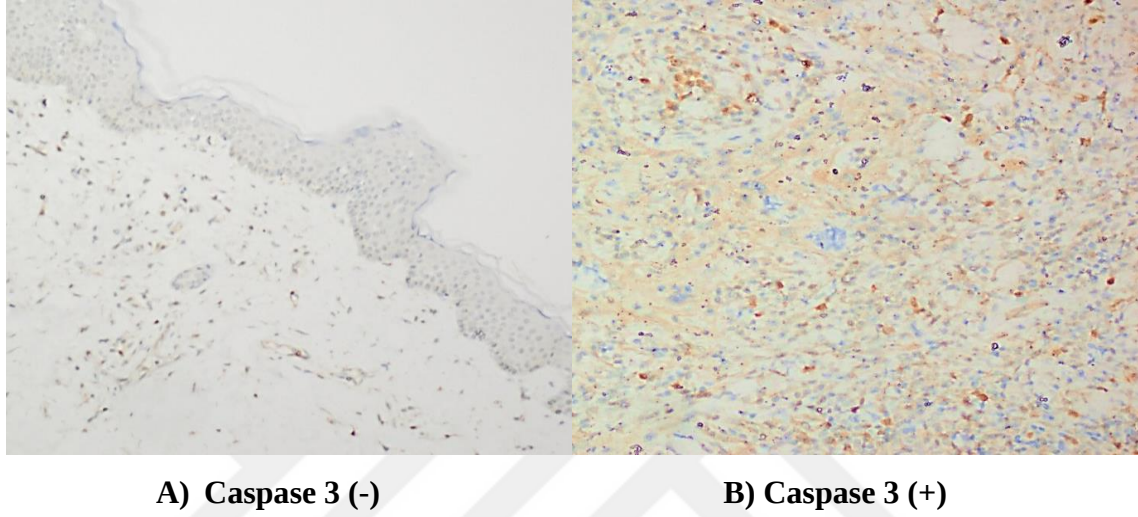
Olgu gruplarına ait ERK1 ekspresyonlarının yoğunluklarına göre değerlendirilmesi Tablo VIII’de gösterildi.

Tablo VIII: Olgu gruplarında ERK1 ekspresyonu

ERK1 ekspresyonu	SHK tanılı olgular		Kontrol grubu	Total
	Güneş Gören Bölge	Dudak		
Negatif (-)	2	0	14	16
Zayıf (1+)	12	8	1	21
Orta (2+)	9	6	0	15
Güçlü (3+)	2	6	0	8
Toplam	45		15	60

ERK1 ekspresyonu açısından SHK tanılı olgular ile kontrol grubu arasındaki farklılık anlamlı ($p=0.00$) bulundu.

Caspase 3 ekspresyonu; SHK tanısı alan 45 olgudan 11'i (% 24,4) Caspase 3 ile pozitif boyanır iken, 34 olguda (% 75,6) boyanma gözlenmedi. Kontrol grubuna ait 15 olgudan hiçbiri boyanmadı (Resim 3).



Resim 3: Kontrol grubu (A) ve SHK tanılı (B) olgularda Caspase 3 ekspresyonu (x100)

Olgu gruplarına ait Caspase 3 ekspresyonlarının değerlendirilmesi Tablo IX'da gösterildi.

Tablo IX: Olgu gruplarında Caspase 3 ekspresyonu

Caspase ekspresyonu	SHK tanılı olgular		Kontrol grubu	Toplam
	Güneş gören bölge	Dudak		
Negatif (-)	16	18	15	49
Pozitif (+)	9	2	0	11
Toplam	45		15	60

Caspase 3 ekspresyonu açısından SHK'lı olgular ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.079$). Skuamöz hücreli karsinom tanılı hastaları kendi içlerinde gruplara ayırdığımızda ise; dudak bölgesinde SHK tanısı alan 20 olgudan 2'si (% 10) Caspase 3 ile pozitif boyanırken, 18 (% 90) olguda boyanma gözlenmedi ve bu grup ile

kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.496$). Ancak yüzün güneş gören diğer bölgelerinde SHK tanısı alan 25 olgudan 9'u (% 36) caspase3 ile pozitif boyandı, 16 (% 64) olguda boyanma saptanmadı ve bu grup ile kontrol grubu arasında Caspase 3 ekspresyonu açısından saptanan farklılık anlamlı bulundu ($p=0.015$).

Olguların PTEN ve ERK1 ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılmasında, boyanma oranları arasında doğrusal bir korelasyon olduğu ve bu durumun istatistiksel olarak da anlamlı olduğu saptandı ($p=0,000$, kappa değeri=0,830) (Tablo X).

Tablo X: PTEN ve ERK1 ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması

		ERK1 grup		Total
		-	+	
PTEN	-	14	2	16
	+	2	42	44
Total		16	44	60

Olguların PTEN ve ERK1 ekspresyonlarının her birinin Caspase 3 ekspresyonu ile ayrı ayrı karşılaştırılmasında ise, boyanma oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı görüldü ($p=0,259$, kappa değeri=-0,080) (Tablo XI ve XII).

Tablo XI: PTEN ve Caspase 3 ekspresyonlarının karşılaştırılması

		Caspase 3		Total
		-	+	
PTEN	-	15	1	16
	+	34	10	44
Total		49	11	60

Tablo XII: ERK1 ve Caspase 3 ekspresyonlarının karşılaştırılması

		Caspase 3		Total
		-	+	
ERK1	-	15	1	16
	+	34	10	44
Total		49	11	60

miRNA-214 Ekspresyon Özellikleri

Tüm hastaların ve kontrol grubunun parafine gömülü dokularından miRNA-214 izolasyonu yapıldı. Kontrol grubuna ait miRNA-214 ekspresyon değerlerinin ortalaması ortalaması $22,3072 \pm 2,70$ olarak (en düşük; 18,03, en yüksek; 27,60) olarak, SHK tanılı hastalara ait miRNA-214 ekspresyon değerlerinin ortalaması ise $20,1973 \pm 1,629$ (en düşük; 16,717, en yüksek; 23,25) olarak bulundu. Kontrol grubuna kıyasla SHK tanılı hastalarda ekspresyonun azaldığı saptandı. Skuamöz hücreli karsinom tanısı olan olgular ile kontrol grubu arasında miRNA-214 ekspresyonu açısından gözlenen fark istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p=0,001$). Olgu gruplarının miRNA-214 ekspresyon değerlerinin ortalaması Tablo XIII'te gösterildi.

Tablo XIII: Olgu gruplarında miRNA-214 ekspresyon değerlerinin ortalaması

GRUP	Olgu sayısı	Ortalama değer	Standart sapma
Kontrol grubu	15	22,3072	2,70782
SHK tanılı olgular	45	20,1973	1,62974

Ancak kontrol grubu ile dudak yerleşimli SHK tanısı olan ve kontrol grubu ile güneş gören bölge yerleşimli SHK tanısı olan olgular ayrı ayrı karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki miRNA-214 ekspresyon farkı anlamlı bulunmadı ($p > 0,005$) (Tablo XIV).

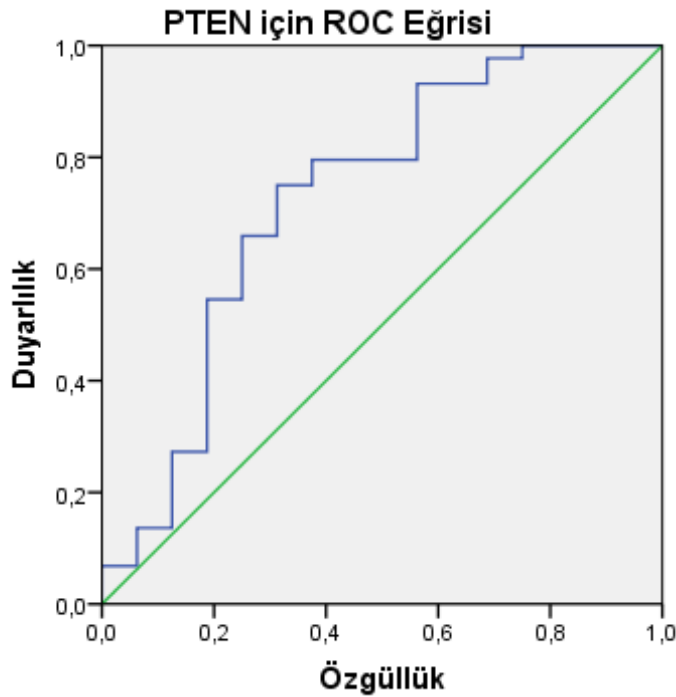
Tablo XIV: Olguların tümör yerleşim bölgelerine göre miRNA-214 ekspresyon durumlarının kontrol grubu ile karşılaştırma sonuçları

Grupların kontrole göre miR-214 ekspresyon değişimi				
	Grup 1 (Güneş Gören)		Grup 2 (Dudak)	
	Kat değişimi	p değeri	Kat değişimi	p değeri
miR-214	-3,7519	0,065986	1,1764	0,823177

İmmünohistokimyasal Sonuçlar Ve miRNA-214 Sonuçları

Skumöz hücreli karsinom tanımlı olgular ve kontrol grubu olmak üzere tüm olgular, immünohistokimyasal belirleyicilerle hiç boyanmayanlar bir grup; zayıf, orta ve güçlü boyananlar diğer grup olacak şekilde iki gruba ayrıldı. İlk grup negatif, ikinci grup pozitif olarak kabul edilerek tümörlerin immünohistokimyasal boyanma özellikleri ve miRNA-214 ekspresyon özellikleri istatistiksel olarak ROC Eğrisi analizi ile incelendi.

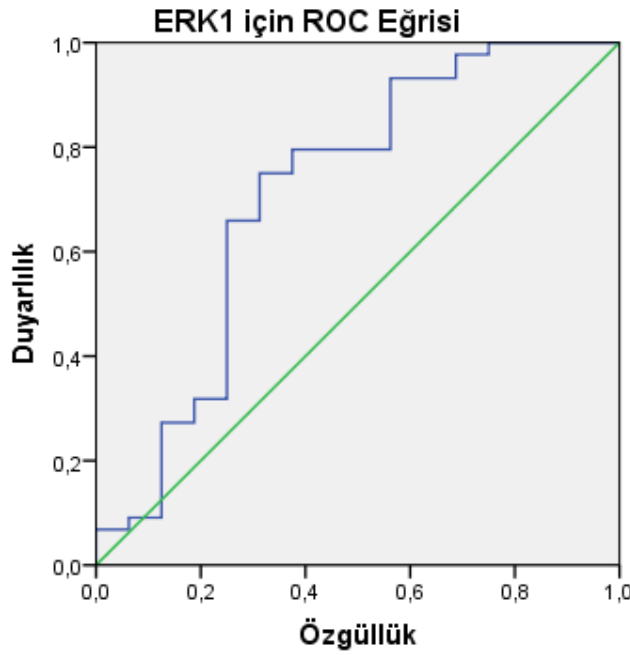
Buna göre PTEN ekspresyonu olan ve olmayan grupları ayırmada miRNA-214 ekspresyonu eşik değeri 21,4602 olarak saptandı ve bu eşik değerde duyarlılık % 75 ve özgüllük % 68 bulundu (Eğri altında kalan alan = 0,729, $p=0,007$, Güven Aralığı: 0,567 - 0,890) (Şekil 2).



Şekil 2: PTEN belirteci için ROC eğrisi

Elde edilen bu sonuçlara göre immünohistokimyasal olarak PTEN boyanması olan SHK vakalarının % 75'inde, miRNA-214 ekspresyon değerinin 21,4602 ve daha aşağısında olmak üzere azaldığı söylenebilir.

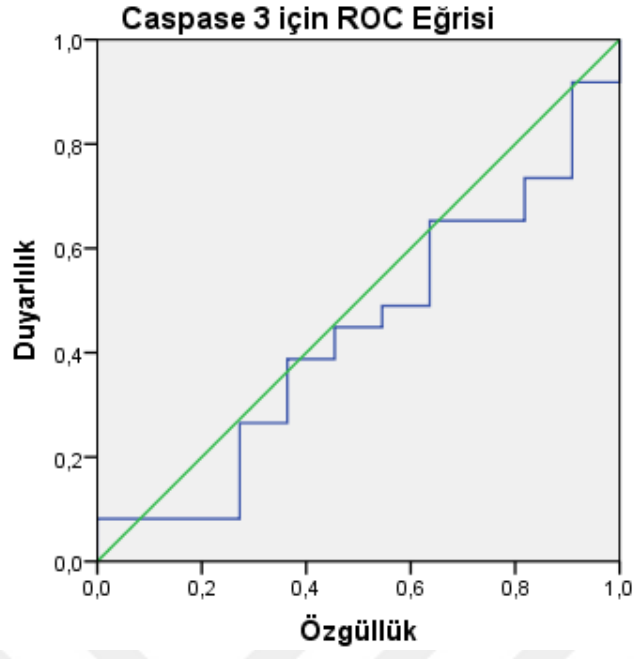
ERK1 ekspresyonu olan ve olmayan grupları ayırmada da eşik değer 21,4602 olarak saptandı ve duyarlılık % 75, özgüllük % 68 olarak bulundu (Eğri altında kalan alan=0,712, $p=0,013$, Güven Aralığı: 0,543 - 0,881) (Şekil 3).



Şekil 3: ERK1 belirteci için ROC eğrisi

Elde edilen bu sonuçlara göre immünohistokimyasal ERK1 boyanması olan SHK vakalarının % 75'inde de miRNA-214 ekspresyon değerinin 21,4602 ve daha aşağısında olmak üzere azaldığı söylenebilir.

Caspase 3 ekspresyonu olan ve olmayan gruplar ile miRNA-214 ekspresyonu arasında ise anlamlı bir ilişki bulunmadı (Şekil 4).



Şekil 4: Caspase 3 belirteci için ROC eğrisi

5. TARTIŞMA

Deri SHK'ları BHK'lardan sonra en sık görülen ikinci deri kanseri türü olup melanom dışı deri kanserlerinin %20'sini oluşturmaktadır (6,15,44-48). Amerika Birleşik Devletleri'nde SHK için yaşam boyu insidansın % 7-11, BHK için % 28-33 olduğu tahmin edilmektedir (15,49). Ayrıca her yıl tüm dünyada 400 000 ila 600 000 SHK'lı olgunun ortaya çıktığı düşünülmektedir (14).

Skuamöz hücreli karsinom tüm deri yüzeyinde ve müköz membranlarda gelişebilir (5). Tipik olarak ileri yaş gruplarında ve açık ten rengine sahip kişilerde ortaya çıkar ve erkeklerde kadınlardan daha sık görülür (5,6,14,15,48). Adölesan çağda ve çocuklarda çok nadirdir.

Açık renk tenli kişilerin güneşten hasar görmüş cilt bölgelerinde, güneşin birikici etkisine bağlı olarak gelişme eğilimi vardır (5,14). Çoğu SHK alın, yüz, boyun ve el sırtı gibi direkt güneş ışığına maruz kalan bölgelerde gelişir. Özellikle erkeklerde kulak, kafa derisi ve alt dudakta da görülebilirler. Bazen genital bölge, tırnak yatağı gibi direkt güneş maruziyeti olmayan bölgelerde de tümör gelişebilir. Alt ekstremitelerdeki lezyonlar daha agresif bir klinik seyre sahip olmakla birlikte sıklıkla ileri yaştaki kadınlarda görülür.

Esmerlerde oldukça az görülür ve bu olguların sadece % 35'inde SHK baş-boyun bölgesinde gelişir. Genellikle skar dokusu ile ilişkili olarak ortaya çıkar ve hemen hemen her zaman artmış morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (5,14,48). Nadiren SHK'lar, kronik ülserasyon, travma, yanık, böcek ısırığı, aşı izi, dövme, fistül traktları ve hidradenitis süpürativa gibi lezyon zemininde ortaya çıkabilirler. Marjolin ülseri terimi, skar, ülser, sinüs gibi kronik hasar veya iritasyon alanı çevresinde gelişen kanserler için kullanılır. Bu alandan gelişen tümörler bazen çok agresif seyirli olabilir ve nüks ve metastazla seyredebilirler (14).

Bizim çalışmamızda da SHK tanısı almış olan olgularımızın çoğunluğunu (% 64) erkek popülasyonu oluşturmaktaydı ve yaş ortalaması $72,53 \pm 12,35$ idi. Demografik bulgularımız literatürle uyumlu bulundu.

Ultraviyole-B ışınları SHK gelişimindeki en önemli etiyolojik faktördür (5,14). Dış ortamda çalışıp uzun süre güneş ışınlarına maruz kalanlarda, özellikle güneş yanığının kolay geliştiği deri tipine (tip I ve II) sahip olanlarda SHK gelişme riski artar (13). Ultraviyole-A ışınlarının etkisi daha azdır (14). Etiyolojide daha az karşılaşılan faktörler ise radyasyon terapisi, arsenik ve kömür katranı, endüstriyel karsinogenez, immünsupresyon ve

HPV enfeksiyonudur. İmmün yetmezliği olan hastalarda, özellikle organ transplantasyonu yapılanlarda, bu tümörlerin gelişimine yatkınlık vardır (5,14).

Literatürde SHK gelişimi ile ilgili bazı teoriler yer alır. Örneğin bazı otörler aktinik keratozu SHK'ya dönüşen premalign ya da prekanseröz bir lezyon olarak kabul etse de diğerleri SHK'nın de novo geliştiğini iddia ederler. Ayrıca güneş görmeyen bölgelerde de SHK gelişimine neden olabilen farklı moleküler mekanizmaların da olduğu bilinmektedir. Bazı SHK olgularında ise herhangi bir etioloji saptanamamıştır (14).

Çalışmamıza dahil olan hastaların lezyonlarının, lokalizasyonları nedeni ile, gelişimlerdeki en önemli risk faktörünün de güneş ışınlarına fazla maruziyet olduğu düşünüldü ve bu durum da literatür ile uyumlu bulundu.

Klinik olarak genellikle ağrısız, yavaş büyüyen, kenarları kalkık, sertleşmiş, yüzeyi ülserle lezyonlar şeklinde ortaya çıkarlar (12,13). Çoğu zaman sığ ülserler olarak görülen bu tümörlerin yüzeyi bazen hiperkeratotik olabilir. Çevre dokuda aktinik hasar özellikleri gözlenebilir (14). Çoğu zaman aktinik keratoz zemininde gelişirler. Aktinik keratozla ilişkili bu tümörler genellikle 1 cm'den küçük, eritematöz ve hiperkeratotik görünümlü olup birden fazla sayıda bulunabilirler. Aktinik keratozun yaşam süresince SHK'ya dönüşme riski % 8 olarak hesaplanmıştır (14,48). Sıklıkla baş-boyun bölgesinde gelişen akantolitik SHK ise nodüler bir tümör olarak görülebilir ve klinik olarak BHK ile karışabilir. Bu varyant klasik SHK'dan daha agresif seyreder. Nadiren SHK'nın pigmente varyantları da görülebilir (14).

Klasik SHK epidermisten başlayıp subkutan yağ dokuya kadar uzanabilen skuamöz epitelyal hücre kümelerinden oluşur. Tümör hücreleri geniş eozinofilik sitoplazmaya ve büyük, genellikle veziküle nükleuslara sahiptir. Tümörün diferansiyasyonuna bağlı olarak tümör adalarında, değişen oranlarda santral keratinizasyon ve keratin inci formasyonları bulunur. Tek hücre keratinizasyonu hemen hemen her zaman görülür. Tümör hücrelerindeki anaplazi, SHK'ları derecelendirmede kullanılır.

SHK'lar bazen sinir kılıfları boyunca, damar adventisyası, lenfatikler, fasiyal düzlem ve embriyolojik birleşme düzlemleri boyunca infiltre olabilirler (5,14). Literatürde SHK'nın vasküler invazyonundan çok az söz edilmektedir (14). Perinöral lenfositlerin varlığı perinöral invazyonun varlığı açısından önemli bir ipucudur. Tümör çevresinde hafiften orta dereceye kadar kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu olabilir. Bu infiltrat, arasıra tümör adalarına dek de yayılabilen, eozinofil lökositlerden zengindir (5,14). Tümör hücreleri stromal

dezmozplastik yanıtı uyandırabilir. Stromal bileşenler bazı tümörlerin gelişiminde önemli rol oynarlar.

Tümör çok az diferansiye ya da işçi hücreli tipte olduğu zaman tanıda İHK'sal çalışmalar yardımcı olabilir. Skuamöz hücreli karsinomlar BHK'lara göre daha yüksek molekül ağırlıklı keratinleri eksprese ederler. Hücreler epitelyal membran antijeni, sitokeratin MNF 116 ve sitokeratin 5/6, p63 ve MCM5 ile pozitif boyanırlar. İnvolukrin büyük keratinize hücrelerde bulunabilir. Vimentin az diferansiye ve işçi hücreli varyantında eksprese edilebilir. Ki-67 ve vasküler endotelyal büyüme faktörü SHK'da BHK'dan daha fazla eksprese edilir. Literatürde sitokeratin 20'nin eksprese edildiği taşlı yüzük hücreli iki vaka bildirilmiştir. Tümör hücreleri BHK'nın aksine Ber-EP4 veya CD10 eksprese etmezler. Lizozim, S100 ve desmin negatiftirler (14). Bazen neoplastik hücrelerin bazal membranı geçip geçmediğini tayin etmek zor olabilir. Bu durumda bazal mebran boyalarından PAS, Laminin ve TipIV Kollajen gibi belirteçler kullanılabilir (20).

Skuamöz hücreli karsinomlar işçi hücreli (sarkomatoid) SHK, akantolitik SHK, verrüköz SHK, psödoasküler SHK ve adenoskuamöz karsinom olmak üzere histolojik alt tiplere ayrılır. Bu alt tipler dışında nadir görülen varyantlar ise; papiller SHK, berrak hücreli SHK, küçük hücreli SHK, taşlı yüzük hücreli, pigmente, bazaloid, inflamatuvar, infiltratif, dezmozplastik ve rabdoid tiplerdir (5).

Lezyonun yeri, boyutu ve tedaviyi uygulayan kişinin tecrübesi de dahil birçok faktör hastanın tedavi yönetimini etkiler. Tedavide temel yaklaşım total eksizyondur. Düşük riskli tümörler ve 2 mm'den küçük lezyonlarda, en az 4 mm'lik sağlam cerrahi sınır ile yapılan eksizyonlarda tümörün yaklaşık % 95'inin çıkartıldığı düşünülmektedir. Daha büyük çaplı lezyonların veya yüksek riskli tümörlerin mikroskopik olarak kontrol edilerek çıkartılması, daha geniş eksizyon yapılması ve 6 mm'lik temiz cerrahi sınır bırakılması önerilmektedir (14,33).

Kulak, dudak ve nazal vestibül gibi kozmetik sorunların daha önemli olduğu bölgelerdeki lezyonlar için radyoterapi uygulanabilir. Operasyon için uygun olmayan olgular ve yaşlı hasta popülasyonu da bu yöntem için en ideal gruptur. Hızlı büyüyen tümörlerde de en etkili tedavi yöntemi radyoterapidir (14,34). Perinöral invazyon varsa adjuvan radyoterapi yararlı olabilir ancak bu konuyla ilgili yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Lokal ileri evre lezyonlarda kemoradyasyon kullanılmıştır. Kullanılan kemoterapötik ajanlar düşük doz sisplatin ve 5-fluorourasildir.

Birden fazla tümörü olan organ transplant alıcılarında elektrokoagülasyon ve küretaj, uygun olarak seçilmiş düşük riskli lezyonlarda güvenli bir tedavi seçeneği olabilir. Kriyoterapi de küçük lezyonlar için kullanılabilir ancak tekrarlayan durumlarda uygun değildir (14). Tedavi sonrası nüks, metastaz ve başka primer lezyon açısından hastaların klinik ve radyolojik takibi önerilir (34).

Skumöz hücreli karsinomların çoğu sadece lokal agresiftir (5). Ancak lenf noduna metastaz yapabilme yeteneği, fasya, kas ve diğer cilt altı yapılara invazyon yapma eğilimi olduğu da bilinmektedir (38). İmmünyetmezliği olan hastalarda (HIV ile enfekte olanlar da dahil) gelişen SHK'lar genellikle daha agresif seyrederler. Derin invazyonlu, az diferansiye, perinöral invazyonlu ve akantolitik özellikleri olan tümörler nüks etmeye ve metastaz yapmaya daha eğilimlidir (5,14). Derin invaziv SHK'lar, genellikle küçük ve henüz tam olarak çıkarılabilecekleri aşamada saptanırlar. Bu sayede tanı konulduğunda bu tümörlerin sadece % 5'inden azında bölgesel lenf nodu metastazı vardır. Ancak rezeksiyon yapmakta geç kalınırsa prognoz kötüdür (1).

Rekürrens ve metastaz oranları literatürde çok değişkenlik göstermekle birlikte genel olarak rekürrens oranları % 3,7-10'dur ve tedaviye göre bu oran değişmektedir (13,39). Lezyonun cerrahi sınıra yakın olarak çıkartılması rekürrens açısından önemli bir risk faktörüdür (5,14). Güneş maruziyeti olmayan bölgelerde gelişen tümörlerin rekürrens riski % 2-3 iken, güneş hasarlı deride gelişen tümörler en az riske sahiptirler (< % 0.5). Dudak, vulva, perine ve penis derisinde Bowen hastalığı zemininde, Marjolin ülser, radyasyon skarı ya da yanık skarı zemininde gelişen tümörlerde de risk artmaktadır.

Tümör kalınlığı melanomda olduğu gibi prognostik değişkendir. Kalınlığı 2 mm'yi geçmeyen tümörler nadiren metastaz yaparlarken 2 ila 5 mm arasında olanlar orta risk grubundadır (% 5). Kalınlığı 5 mm'yi geçenler ise % 20 oranında metastaz riski taşımaktadırlar. En büyük boyutu 2 cm'yi geçen tümörler küçüklere göre nüks etmeye ve metastaz yapmaya eğilimlidirler (5,9).

Metastatik hastalığı olanlarda prognoz kötüdür. Bölgesel lenf nodu tutulumu olanlarda 10 yıllık sağ kalım oranları % 20'den, uzak organ metastazı bulunanlarda ise % 10'dan azdır. SHK'larda rekürrens ve metastazlar % 70 oranında ilk iki yıl, % 95 oranında ilk beş yıl içinde görülürler. Deride SHK tanısı olan tüm hastalarda metastaz gelişme insidansı ise % 2-3 olarak bulunmuştur ve SHK gelişimi sonucu hayatını kaybeden hastaların 3/4'ünün nedeni metastaz gelişimidir (5).

Malign melanom dışındaki deri kanserleri sonuç olarak erken tanınmaları halinde kolay tedavi edilebilen ve ölüm oranları diğer solid tümörlere kıyasla oldukça az olan tümörlerdir. Bu nedenle erken tanınmaları ve tedavi edilmeleri önemlidir (40).

Genel olarak tümörigenez, çok basamaklı bir süreçtir. Bu basamaklar temelde sırasıyla; inisiasyon, promosyon (proliferasyon), konversiyon, progresyon ve metastazdır. Skuamöz hücreli karsinom da hafif, orta, ağır displazi tarzında intraepitelyal değişiklikler ile başlar. Karsinoma in situ ile son bulur ve/veya invaziv SHK'ya dönüşebilir (26,27).

Tüm bu aşamalarda farklı etkenler rol oynayabilir. Ultraviyole ışınlar epidermal hücre DNA'sını hasara uğratar ancak UV ile tetiklenen karsinogenezde yer alan daha karmaşık mekanizmaların da olduğu düşünülmektedir (14). DNA üzerindeki etkilerinin yanı sıra, güneş ışığındaki UV ışınlarının Langerhans hücrelerinin antijen sunumunu etkilemek yoluyla da, deri üzerinde en azından geçici immünsüpresif bir etki gösterdiği kabul edilmektedir (1).

Günümüzde deri kanserlerinin gelişiminde gen mutasyonlarının da rolü araştırılmaya başlanmıştır. Birçok kanserin genetiğinde yer alan ve bir tümör süpresör gen olan p53 gen mutasyonu melanom dışı deri kanserlerinde de görülür. Mutant p53 geni hücre nükleusunda birikir ve immünohistokimyasal olarak gösterilebilir. İyonize radyasyon da p53 mutasyonunu uyarır. Kromozom 9p21'de yer alan CDKN2A geni de p53 ve Rb tümör baskılayıcı gen yollarında aktif rol alır. p53'ün mutasyonuna ek olarak CDKN2A'nın ekspresyon kaybının da melanom dışı deri kanserlerinin gelişiminde rol oynadığı görülmüştür. Tümör progresyonunda ise CDKN2A'nın spontan delesyonu rol oynayabilir. Aktinik keratozun SHK'a progresyonunda kromozom 18q'nun kaybı önemlidir. Kromozom 13q14'deki instabilite bazı olgularda tespit edilmiştir. Bazı HPV tipleri de Rb gen inaktivasyonuna ve SHK gelişimine sebep olabilir. Melanom dışı deri kanserlerinde, özellikle SHK'da DNA yanlış eşleştirme tamir genlerinde sorun bulunduğu gösterilmiştir (14).

Ultraviyole ışınlar DNA hasarı oluşturarak ve onkojenik sinyal yollarını aktive ederek tümör gelişimini uyaran gerçek birer karsinojendirler (28). Ayrıca güneş ışığı kaynaklı ultraviyole ışınlarının, skuamöz hücreli kanserlerde, keratinositlerdeki tümör baskılayıcı gen olan, PTEN seviyesini azalttığı gösterilmiştir (10,29). Ming ve ark.'nın (10) yaptığı çalışmada aktinik keratozlu bölgede PTEN ekspresyonunun, güneşten korunan tümörsüz deriye oranla azaldığı saptanmış ve PTEN baskılanmasının UV hasarının bir sonucu olduğu gösterilmiştir.

PTEN, PI3K/AKT (fosfatidilinozitol-3-kinaz/protein kinaz B) yolağını olumsuz yönde düzenleyen bir tümör baskılayıcı gendir (10,28). Tüm dokularda bulunan bu sinyal kaskadı hücre büyümesi, yaşaması, üremesi, göçü ve metabolizması gibi birçok fonksiyonu etkiler (29). Delesyon, mutasyon ve/veya ekspresyon kaybı sonucunda azalmış PTEN fonksiyonu insanlarda sporadik kanserlerde ve herediter kanser sendromlarında saptanmıştır. Ayrıca Cowden Hastalığı olanlarda PTEN fonksiyon kaybına yol açan germline mutasyonları gözlenmiştir (10,28,29). Yapılan birçok çalışma PTEN'in deri kanserleri için de önemli bir tümör baskılayıcı gen olduğunu ve kaybının deride karsinogenezi indüklediğini göstermiştir.

Akut UVC (100-280 nm) maruziyeti sonrası uyarılan Erken Büyüme Yanıtı-1 proteini (Early growth response protein 1; Egr-1), PTEN mesajcı RNA'sının (mRNA) ve proteininin ekspresyonunu artırır ve apoptoza yol açar. Çoğu karsinomda görülen Egr-1 ekspresyon kaybı PTEN geninde düzensizliğe ve kimi kanser hücrelerinin radyasyona karşı direnç kazanmasına yol açar.

Kronik UVA (320-400 nm) radyasyon maruziyeti ise PTEN ekspresyonunu azaltır. Normal koşullarda PTEN ultraviyole ışınları, tümör nekrozis faktör α tedavisi gibi çok sayıda apoptotik uyarana yanıt olarak, PI3K/AKT yolağını olumsuz yönde düzenleyerek hücre ölümüne duyarlılığı artırır. Bu nedenle PTEN'de meydana gelen değişikliklerin UV ile indüklenen deri kanserlerinde rol oynadığı düşünülür.

Normal şartlar altında UVB ile aktive olan PI3K/AKT onkojenik yolağı PTEN tarafından baskılanır ve AKT inhibisyonu kanser de dahil UVB ile uyarılan deri hasarlarının oluşumunu önler (28,29). Ancak UVB'nin (280–320 nm) dermal fibroblastlardaki PTEN fosforilasyonunu artırarak PTEN'i baskıladığı da bildirilmiştir (29). Bu şekilde PTEN fonksiyonunun UV aracılığı ile inhibisyonu, ayrıca UV ile de indüklenen AKT aktivasyonunun daha da çok artmasına neden olur (28,29).

Moleküler düzeyde UVB'nin PTEN'i iki mekanizma ile baskıladığı bulunmuştur: (1) PTEN, AKT (protein kinaz B) aktivasyonunun azaldığı apoptotik hücrelerde aktive Caspase tarafından parçalanır; (2) yaşayan hücrelerde PTEN transkripsiyonu bastırılmıştır, bu bastırılma Caspase aktivasyonundan bağımsızdır ve ERK ile AKT aktivasyonlarındaki artış ile paralel gerçekleşir.

UVB ile uyarılmış apoptotik hücrelerde PTEN baskılanması Caspase bağımlıdır (28). Apoptoz normal homeostazın devamlılığı için önemlidir. Keratinositler, yüksek dozda

UVB'ye maruz kalınca, Caspase'ların aktive olması sonucu apoptoza giderler. Apoptoz sırasında aktive olan Caspase 3, PTEN'i parçalar.

PTEN aktive Caspase 3 için çok sayıda hedef bölge içerir. Torres ve ark.'nın (50) yaptığı çalışmaya göre UVB sonrası apoptoza giden keratinositlerde PTEN baskılanmasının, Caspase'ların aktivasyonunu gerektirdiğini destekleyen kanıtlar; (1) Caspase aktivasyonu gibi UVB'ye bağlı PTEN baskılanmasının da doz ve zaman bağımlı olması, (2) Caspase 3 pozitif hücrelerde PTEN seviyesinin diğerlerine göre belirgin olarak daha düşük olması, (3) Caspase 3'ün ya da tüm Caspase'ların aktivasyonlarının inhibisyonunun PTEN'i baskılanmaktan korumasıdır (28,50).

Ancak yaşayan hücrelerde ise UVB kaynaklı PTEN baskılanması Caspase'dan bağımsızdır ve ERK/AKT bağımlıdır. Ultraviyole B maruziyeti sonrası kalan canlı hücrelerde Caspase 3 inaktiftir ancak PTEN seviyesi yine de UV ışını görmeyen hücrelere göre daha düşüktür. UVB sonrası PTEN seviyesinde azalma hem apoptotik hem de canlı hücrelerde görülse bile artmış AKT aktivasyonu sadece canlı hücrelerde görülebilir, apoptotik hücrelerde görülmez. UVB ile aktive olan ERK ve AKT yolakları PTEN seviyesinin azalmasına neden olurlar. Ayrıca canlı keratinositlerdeki UVB maruziyeti sonrası, Caspase'dan bağımsız olarak azalan PTEN seviyeleri de AKT aktivasyonunun artmasına yol açar. Ming ve ark. (10) yapmış oldukları çalışmada UVB ile uyarılan ERK ve AKT'nin PTEN'in baskılanmasının hem başlatılmasında hem de devamında kritik öneme sahip olduğunu göstermişlerdir (10,28,51).

Bununla beraber UV, reaktif oksijen radikallerinin üretimine ve dolayısıyla fotokarsinogenezde önemli rol oynayan oksidatif stres gelişimine de yol açar. Reaktif oksijen radikalleri de PTEN aktivitesini baskılayabilirler ve UV ile uyarılmış tümörigenezde rol oynayabilirler (29).

Bizim çalışmamızda ilk defa, PTEN ekspresyonunun, literatürde yer alan çoğu yayının aksine, SHK tanısı alan 45 olgunun % 97,8'inde arttığı görülmüştür. Bir tümör baskılayıcı gen olan ve birçok tümörde azaldığı gözlenen PTEN ekspresyonunun, genel olarak iyi prognozlu olan deri SHK'larında ve özellikle iyi diferansiye tümörlerden oluşan bizim olgu grubumuzda artmış olması bu tümörlerin gelişiminde rol alan birçok farklı mekanizmanın olduğunu gösteriyor olabilir.

Segrelles ve ark. (52), farelerle yaptıkları bir çalışmada deri SHK'larında PTEN ekspresyonunun, diferansiyasyonun çok olduğu bölgelerle sınırlı olduğunu bulmuşlardır. Az diferansiye olan daha infiltratif alanlarda ise PTEN boyanmasında kayıp olduğunu ve böylece

PTEN'in deri karsinogenezinde farklı aşamalarda rol oynadığını saptamışlardır. Ming ve ark.'nın (51) çalışmasında, PTEN ekspresyonunun, normal deri örnekleri ile karşılaştırıldığında aktinik keratoz ve SHK'larda azaldığı, PTEN seviyesi ile UVB maruziyeti arasında tümörigenez ve tümör süpresyonu açısından önemli bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Odar ve ark. (53) da normal epitelle karşılaştırıldığında SHK'larda PTEN boyanmasının azaldığını bulmuşlardır. Kurasawa ve ark. (41) oral SHK'larda normal epitele kıyasla daha zayıf, sitoplazmik bir reaksiyon olduğunu ve bu farkın istatistiksel olarak da anlamlı olduğunu saptamışlardır. Lee ve ark.'nın (54) intrahepatik kolanjiokarsinomlu olgular ile yaptığı çalışmada ise PTEN ekspresyonunun arttığı görülmüş ve bu artışın bağımsız, iyi prognostik faktör olduğu bulunmuştur. Shoman ve ark.'nın (55) meme karsinomlu olgularla yaptıkları bir çalışmada da yine olguların % 81'inde PTEN ile güçlü boyanma gözlenmiş ancak PTEN kaybının rekürrens ile ilişkili olduğu saptanmıştır.

Caspase'lar (Cysteine Aspartate Specific ProteASEs-CASPASE) özellikle apoptoz esnasında önemli rol oynayan sistein bağımlı aspartat spesifik proteaz grubu enzimlerdir (31,56). Aktif merkezlerinde sistein bulunan Caspase'lar, hedef proteini, aspartat aminoasidinden sonra keserler ve bu şekilde proteinin aktivasyon veya inaktivasyonuna neden olabilirler (56). Doku homeostazında kritik rol oynarlar. Caspase'ların anormal aktivasyonu, kalp yetmezliği, organ nakli reddi, kanser gelişimi ve otoimmünite gibi birçok durumla ilişkilendirilmiştir (31).

Caspase 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12 ve 13 inisiyator (başlatıcı) Caspase'lar, Caspase 3, 6, 7 ve 14 efektör (sonlandırıcı) Caspase'lar olarak bilinir (56). Öncelikli olarak inaktif proteinler olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edilirler (30,31,56). Aktive olan Caspase'lar, organel bütünlüğü için hayati öneme sahip hücre bileşenlerinin ve proteinlerinin hücre içi proteolizine ve hücrenin ölüme gitmesine neden olur (apoptoz). Apoptozun gerçekleşmesinde ekstrinsek (ölüm reseptörü-aracılı) ve intrinsek (mitokondriyal) olmak üzere iki temel yolak vardır (31,32,56).

Ekstrinsek yolak, bir ligandın, tümör nekrozis faktör (TNF) süperailisine ait transmembranöz ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla aktive olur. Ekstrinsek yolda görev alan ligandlar TNF- α , Fas ligand (CD95L) ve TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand'dır (TRAIL). Ligand bağlanması üzerine reseptörler, intrasellüler bağdaştırıcı proteinler için afinite artışı ve reseptör-protein kompleksi [ölüm başlatıcı sinyal kompleksi; DISC (death initiation signaling complex)] oluşumu gibi değişikliklere gider. DISC'in anahtar bileşenleri

inisiyatör proCaspase'lar olan Caspase 8 ve 10'dur. Bu başlatıcı Caspase'lar efektör Caspase 3, 6 ve 7'yi parçalar ve bu şekilde DISC ile aktive olmuş inisiyator Caspase 8, temel efektör Caspase 3'ün aktivasyonunu sağlamış olur (31,56).

İntrensek yolak, hipoksi, reaktif oksijen radikalleri veya büyüme faktörlerinin mevcut yetersizliği gibi çeşitli hücrel stres faktörlerine cevap olarak mitokondriyal geçirgenlikte artış ve sonuç olarak sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımı ile başlar. İntrasellüler stres, proapoptotik B hücreli lenfoma 2 (Bcl2) ailesi üyeleri olan Bad ve Bim'i aktive eder. Bu proteinlerin fonksiyonu antiapoptotik Bcl-2 ailesinden, Bcl-xL ve Puma/Noxa proteinlerini inhibe etmek ve Bax ve Bak proteinlerini mitokondriyal membranın dışına taşımaktır. Sonuçta mitokondriyal içerik sitozole salınır. Sitokrom c ve Caspase 9 birlikte apoptozom kompleksini oluştururlar (31). Apoptozom, inaktif haldeki Caspase 3'ten proteoliz ile küçük alt ünitenin ayrılmasına ve böylece bu enzimin aktivasyonuna neden olur (56).

Caspase 3 apoptotik kaskada erken aşamada katılan temel efektör Caspase'dır (32). DNA fragmentasyonunu ve apoptozun morfolojik değişikliklerini kontrol ettiği saptanmıştır (57). Ancak epidermal farklılaşma ve proliferasyondaki katkısı henüz kesin olarak bilinmemektedir (32).

Bizim çalışmamızda kontrol grubumuza ait 15 olgunun hiçbirinde epidermiste Caspase 3 ekspresyonu saptanmazken, SHK tanılı olgularımızın % 24,4'ünde nükleer Caspase 3 ekspresyonu olduğu görülmüştür. Olgu gruplarımız arasındaki bu fark bize SHK tanılı olgularda tümöre yanıt olarak apoptozun artmış olabileceğini ve bu enzimin SHK gelişim ve progresyonunda önemli olabileceğini göstermektedir. Ancak kullandığımız vaka sayısının azlığı ve tümör gelişiminde çeşitli mekanizmaların rol almış olma ihtimali nedeniyle Caspase 3 ekspresyonu açısından bulunan fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır.

Takahashi ve ark. (58) keratinositlerde Caspase 1, 2, 3, 4 ve 7'ye ait mRNA varlığını saptamışlardır. Krajewska ve ark. (59), kornifiye tabaka hariç tüm epidermal tabakalarda keratinositlerin sitoplazmalarında immünohistokimyasal olarak Caspase 3 varlığını göstermişlerdir. Cousin ve ark.'nın (32) yaptığı çalışmada ise normal deride, bazal, spinöz ve granüler tabaka ile kıl folikülü, ekrin bez ve sebace bez keratinositlerinde homojen sitoplazmik Caspase 3 immünreaktivitesi gösterilmiştir. Kornifiye tabakada boyanma saptanmamıştır. Çalışmadaki deri SHK'larının büyük bir kısmında, tümöre komşu olağan epidermise kıyasla, daha yoğun Caspase 3 immünreaktivitesi eksprese edildiği gösterilmiştir. Bazı SHK'larda, keratin incileri çevresindeki gibi daha diferansiye olan alanlarda, Caspase 3

ekspresyonunun daha güçlü eksprese edildiği bulunmuştur. Normal epidermiste ve SHK'larda Caspase 3 ekspresyonunun farklı olması bu enzimin deri homeostazında rol aldığını düşündürmektedir (32). Hoshi ve ark. (60), mide dokusu ile yaptıkları çalışmada hem sitoplazmik hem de nükleer Caspase 3 immünreaktivitesi saptamışlardır. Bressenot ve ark. (57) ise apoptotik hücrelerde aktive Caspase 3 ve Caspase 7 antikorları ile sitoplazmik boyanma olduğunu görmüşler, aynı zamanda Caspase 3 ile nükleer boyanma olduğunu da saptamışlardır.

Son zamanlarda çeşitli yayınlar, skuamöz hücreli karsinomlarda sinyal iletim yollarında anormallikler olduğunu ortaya çıkarmıştır. Kanser hücrelerinde ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz 1 (extracellular signal-regulated kinase1; ERK1) protein seviyesinin arttığı ve bu proteinin tümör hücrelerinin anormal çoğalmasına aracılık ettiği bulunmuştur (7).

Mitojen-aktif protein kinazlar (Mitogen-Activated Protein Kinase; MAPK) çeşitli ekstrasellüler uyarılara yanıt olarak aktive olan serin/treonin kinaz grubu proteinlerdir ve sinyallerin hücre yüzeyinden nükleusa iletilmesini yönetirler. Hücrelerde MAPK'lara ait üç çeşit iyi tanımlanmış grup bulunur: ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinazlar (ERK), c-Jun N-terminal kinazlar (JNK) ve p38 MAPK'ları (42).

ERK'ler birçok büyüme faktörü tarafından aktive edilirler ve farklı hücre tiplerinde hem proliferasyon hem de farklılaşma sürecinde kilit düzenleyiciler olarak görev alırlar (42,43,61). Kemik, prostat, meme ve akciğer gibi çeşitli kanser tiplerinde, hücrelerin proliferasyon, diferansiyasyon, hayatta kalma ve apoptoz sürecinde kritik rol oynayan ERK1/2 sinyal yolağı baş-boyun bölgesi yerleşimli SHK, glial neoplaziler ve melanomda da rol oynamaktadır (43,61). JNK'lar ve p38 MAPK'lar çeşitli hücresel stres etkenleri ile aktive edilirler ve hücresel stres, enflamasyon ve/veya apoptoza cevapta baskın olarak rol oynarlar (42).

Son çalışmalar ERK'nin aktivasyonunun kanser hücrelerinin çoğalmasında kritik rol oynadığını göstermiştir (42,43). Çeşitli uyarılarla aktive olan ERK1/2 yolağı çok sayıda transkripsiyon faktörünün (Ets-1, c-Jun, c-Myc ve HIF1 α) uyarılmasına yol açar. Bu transkripsiyon faktörlerinin her biri kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağlayan genleri düzenler (61). Düzensiz hücre proliferasyonlarından sorumlu olan ERK yolağı, kanser gelişimi ile yakından ilişkilidir. Ancak ERK'nin deri SHK'larındaki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır.

Çalışmamızda olgularımızdan SHK tanısı olanların % 95,6'sında ERK1 ekspresyonu olduğu gözlenirken kontrol grubunun % 93,3'ünde ERK1 ekspresyonu görülmemiştir. ERK1 ekspresyonu açısından SHK ile kontrol grubu arasındaki farklılık anlamlı ($p=0.00$) bulunmuştur. Düzensiz hücre proliferasyonuna yol açarak, birçok kanserde rol aldığı görülen ERK1 proteinini için bu sonuç literatür ile de uyumludur. Bu sonuçlar ERK1 proteininin, SHK'lardaki anormal hücre proliferasyonunda rol alan temel yolaklardan biri olduğunu göstermektedir.

Handra-Luca ve ark. (43) tükrük bezi ile yaptıkları çalışmada, mukoeypidermoid karsinomlarda, normal tükrük bezi alanlarına göre, İHK'sal olarak artmış ERK1/ERK-2 immünreaktivitesi bulmuşlardır. Yamane ve ark. (7), SHK'larda, ERK protein seviyesinin yüksekliğinin, anormal hücre proliferasyonunun temel yolaklarından biri olduğunu saptamışlardır.

Zhang ve ark.'nın (42) yaptığı çalışmada literatürdeki önceki çalışmalarla uyumlu olarak deri SHK'larında ERK protein seviyesinin arttığı ve bu artmış ERK seviyesinin daha agresif tümör davranışı ve yüksek proliferasyon aktivitesiyle uyumlu olduğu bulunmuştur. Çalışmada incelenen tüm SHK materyallerinde nükleer ERK boyanması saptanmış, az diferansiye ve iyi diferansiye SHK'lardaki ERK ekspresyon seviyesinin ise belirgin farklı olduğu gözlenmiştir. ERK ekspresyonu az diferansiye SHK'larda, iyi diferansiye olanlara göre önemli oranda artmıştır. Hatta iyi diferansiye SHK'larda da daha az diferansiye olan alanlarda ve nadiren de hücre kümelerinin ortasındaki iri, keratinize hücrelerde ERK ekspresyonu olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar ERK protein ekspresyon seviyesinin tümörün azalan histolojik derecesi ile uyumlu olarak arttığını ve dolayısıyla artmış ERK seviyesinin SHK'nın yüksek proliferatif aktivitesini ve yüksek dereceli bir maligniteyi yansıttığını düşündürmektedir. Özetle deri SHK'larında artmış olan ERK proteininin özellikle hücrelerin proliferatif aktivitesi ile ilişkili olduğu ve ERK sinyal yolağının inhibisyonu ile hücre proliferasyonunun ortadan kaldırılabilceği saptanmıştır (42,43).

Olguların PTEN ve ERK1 ekspresyonlarının karşılaştırmasında, boyanma oranları arasında doğrusal bir korelasyon olduğu ve bu durumun, literatürün aksine, istatistiksel olarak da anlamlı olduğu saptanmıştır ($p=0,000$, kappa değeri=0,830). Çalışmamızda değerlendirdiğimiz PTEN ve ERK1 ile Caspase 3 ekspresyonları arasında da olumlu bir korelasyon olduğu görülmüş ancak bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Literatüre bakıldığında skuamöz hücreli kanserlerde rolü tam olarak aydınlatılamamış olan ERK aşırı ekspresyonunun altında yatan mekanizmaların, mikroRNA (miRNA)'ya odaklanarak araştırıldığı görülmüş ve yapılan bazı çalışmalarda skuamöz hücreli kanserlerde miR-214'ün azalmış ekspresyonunun ERK'nin aşırı ekspresyonuna neden olduğu gösterilmiştir (7-9). Bizim çalışmamızda da deri SHK'larında azalan miRNA-214 ekspresyonu ile ters korelasyon gösteren artmış ERK1 ekspresyonu saptanmıştır.

MikroRNA'lar (miRNA, miR-), küçük, tek sarmallı, ortalama uzunluğu sadece 19-22 nükleotid olan ve protein kodlamayan ribonükleik asit (RNA) molekülleridirler (7-9,62-65). Hedef genleri baskılayarak gelişim, farklılaşma, çoğalma, apoptoz, metastaz gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol alırlar (64,65).

İlk mikroRNA, Lee ve çalışma arkadaşları tarafından 1993 yılında Victor Ambros laboratuvarında keşfedilmiş olup, mikroRNA terimi 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır.

MikroRNA'lar, birbirini izleyen üç adımlık işlem süreci sonucunda meydana gelir (63). İlk adımda miRNA genlerinden primer miRNA(primiRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci adımda primiRNA'lar nükleus içinde prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara dönüştürülür. Üçüncü ve son adımda olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir (63,64).

MikroRNA'lar, primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'dan sentezlenir. Pri-miRNA (500-3000 baz), "cap" ve "poli A" kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısındadır. Çekirdekte pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha, tarafından yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA'ya dönüştürülür. Pre-miRNA molekülü bir nükleer taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nükleer bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır. Sonrasında, pre-miRNA'lar sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden Dicer adlı endonükleaz ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA: miRNA dubleksine çevrilir. Dicer, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır. Dicer, pre-miRNA'nın sap-ilmliğini kestikten sonra, miRNA: miRNA dubleksinden sadece 5' ucu daha kararlı olanı seçilip RISC kompleksine dahil edilir. Bu iplik kılavuz iplik (guide strand) olarak adlandırılır. Diğer iplik RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir (9,63). MikroRNA'lar, aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra ya mesajcı RNA'ların (mRNA) yıkımına ya da mRNA'nın

kodlanmayan bölgesinde (3' UTRs) tamamlayıcı dizilerine bağlanarak gen susturulmasına ve protein kodlayan genlerin ekspresyonunun baskılanmasına neden olurlar (62,63). Bu şekilde posttranskripsiyonel gen susturulmasını sağlarlar (8).

MikroRNA'ların her birinin birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve mRNA'ların her birinin de birden fazla mikroRNA tarafından hedeflenebildiği görülmüştür (63).

Son çalışmalar miRNA'ların, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre onkogenik veya tümörsüpresör özellik kazanabildiğini göstermiştir (63,65). Normal dokularda, miRNA'ların bazılarının protoonkogenlerin translasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir. Fonksiyonları bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan bu miRNA'lar "tümör süpresör miRNA'lar" (TS-mir) olarak ifade edilmektedir. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olur. Bunun tersi olarak, "onko-mir" olarak ifade edilen bazı miRNA'ların direkt kendilerinin kanser gelişimini arttırdığı görülmektedir. Bu miRNA'lar bir tümör süpresörün baskılanmasını sağlarlar (63).

Serviks, akciğer, özofagus, farenks, ağız içi mukozası ve dil gibi farklı bölgelere ait SHK'larda miRNA'ların rolü daha önce araştırılmıştır. Ancak deri SHK'larının miRNA disregülasyonu ile ilişkisi üzerine çalışmalar yeni başlamıştır (9). Bununla beraber, Dziunycz ve ark. (66) deri SHK'larında UV ile ilişkili bir dizi farklı miRNA (miR-21, miR-203, miR-205 ve miR-184) grubu saptamışlardır. Deri SHK'larında miR-21 ve miR-184 ekspresyonlarında önemli oranda artış gözlemişler, ayrıca UVA'nın miR-21, miR-203 ve miR-205 ekspresyonlarını arttırdığını, UVB'nin ise miR-203 ekspresyonunu arttırdığını, miR-205 ekspresyonunu ise azalttığını bulmuşlardır (9,66).

MikroRNA-214 farklı tümörlerde birbirine zıt şekilde davranabilir. Bazı kanserlerde miR-214 onkogenik rol oynarken bazılarında tümör baskılayıcı rol oynar (67). Over kanseri, pankreatik kanser, prostat, mide, akciğer kanserleri, nazofarengeal kanser, sezary sendromu ve melanom gibi tümörlerde miR-214 ekspresyonu artarken, serviks kanseri, kolorektal kanserler, hepatosellüler kanser, mesane ve meme kanserlerinde azaldığı gösterilmiştir (65,67).

Bizim çalışmamızda PCR ile değerlendirilen miR-214 ekspresyonunun SHK tanısı alan olgularda (ortalama miR-214 ekspresyon değeri; 20,1973) kontrol grubuna göre (ortalama miR-214 ekspresyon değeri; 22,3072) belirgin azaldığı görülmüş ve gruplar

arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı (p ; 0,001) saptanmış ve literatür ile uyumlu bulunmuştur. Olgularımızı lezyonlarının yerleşim yerlerine göre dudak ve yüzün güneş gören diğer bölgeleri olarak ayırdığımız zaman kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmada miR-214 ekspresyonunda yine azalma olduğu görülmüş ancak istatistiksel olarak bu fark, muhtemel vaka sayısının azlığı nedeniyle, anlamlı bulunmamıştır.

Yamane ve ark. (7) yaptıkları çalışmada miR-214'ün ERK1'in düzenleyicisi, miR-124 ile miR-214'ün ise birlikte ERK2'nin düzenleyicisi olduğunu ve her ikisinin ekspresyonunun da deri SHK'larında azaldığını göstermişlerdir (7,9,67,68). miR-124 ve miR-214 ekspresyonunun arttırılması ise ERK1/2 düzeylerini normalize ederek tümör hücrelerinin proliferasyonunu baskılar. Anormal keratinositlerin proliferasyonlarında miR-124/214'ün rolü olduğunun gösterilmesi erken tanı ve etkili tedavi yöntemleri geliştirilmesine yol açabilir (67).

Sand ve ark. (8) da miRNA-214 ekspresyonunun deri SHK'larında azaldığını bulmuşlardır. Zhang ve ark. (65) ise miR-214 ekspresyonunun nazofarengeal karsinomlarda arttığını ve ekspresyonunun azaltılmasının apoptozu uyarak hücre proliferasyonunu baskıladığını göstermişlerdir. Bruegger ve ark. (68) da deri SHK'larında ekspresyonları artan üç farklı miRNA (miR-21, miR-31 ve miR-205) saptamışlardır. Xu ve ark. (69) deri SHK'ları ile baş-boyun bölgesi SHK'ları arasında, miR-31, miR-21 ve miR-223 ekspresyonunun artması ve miR-99a/100, miR-375 ve miR-125b ekspresyonunun azalması gibi miRNA ekspresyon profilleri açısından benzerlikler olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada da deri SHK'larında hücrelerin proliferasyon, migrasyon ve invazyonunu baskılayan miR-125b ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir (69). Ahmed ve ark. (70) miR-214'ün, deride β -catenin ekspresyonunu, Wnt sinyal yolağının aktivitesini, normal doku homeostazı, rejenerasyon ve yaşlanmasında kök hücrelerin fonksiyonlarını kontrol eden kilit faktör olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda SHK tanılı olgular ve kontrol grubu olmak üzere olgular kendi içlerinde immünohistokimyasal belirleyicilerle hiç boyanmayanlar bir grup; zayıf, orta ve kuvvetli boyananlar diğer grup olacak şekilde iki gruba ayrıldı. İlk grup negatif, ikinci grup pozitif olarak kabul edilerek tümörlerin immünohistokimyasal boyanma özellikleri ile miRNA214 ekspresyon özellikleri karşılaştırıldı. PTEN ve ERK1 için ekspresyon olan ve olmayan grupları ayırmada miR-214 ekspresyon eşik değeri 21,4602'dir. Bu eşik değerde her iki immünohistokimyasal belirleyici için duyarlılık % 75 ve özgüllük % 68 bulunmuştur.

ERK1 ve PTEN ile miR-214 arasında istatistiksel olarak da anlamlı olan negatif bir korelasyon bulunduğu görülmüştür.

Literatürde deri SHK'larında PTEN ekspresyonu ve miR-214 ekspresyonu arasındaki ilişkiye yönelik bir çalışma bulunmamakta olup bizim çalışmamız bu konu üzerine yapılmış ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Bununla birlikte deri SHK'larında hem tümör baskılayıcı gen olarak işlev gören miR-214 ekspresyonunun hem de yine tümör baskılayıcı bir gen proteini olan PTEN ekspresyonunun literatürde yer alan farklı çalışmalarda azaldığı görülmüştür. Ancak bizim çalışmamızda anlamlı oranda azalmış olan miR-214 ekspresyonu ile beraber PTEN seviyesinde, literatürün aksine, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak da anlamlı, belirgin bir artış bulunmuştur.

Daha önce üzerinde sınırlı sayıda çalışma yapılmış olan miR-214 ekspresyonu ve ERK1 protein ekspresyonu arasındaki ilişkiye yönelik bizim bulgularımız da literatür ile uyumlu bulunmuştur. Buna göre miRNA-214 ekspresyon kaybının ERK1 protein ekspresyonunu arttırdığı ve SHK hücrelerinin proliferasyonunu uyardığı düşünülmüştür.

Çalışmamız Caspase 3 proteini ile miRNA214 ekspresyonu arasındaki ilişkiye yönelik de şu ana kadar yapılmış olan tek çalışmadır. Elde edilen Caspase 3 immünohistokimyasal sonuçları ile miR-214 ekspresyon sonuçları arasında negatif bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, deri SHK'larında, ayrı ayrı çalışmalarda değerlendirilen Caspase 3 ve miRNA-214 ekspresyon durumları ile uyumludur. Ancak bu ilişki, muhtemel vaka sayısının azlığı nedeniyle, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu apoptotik belirleyiciye yönelik, daha fazla olgu içeren gruplar üzerinde çalışmalar yapılmalıdır.

Çalışmamızda deri SHK'larında miR-214 ekspresyonunun, immünohistokimyasal PTEN, ERK1 ve Caspase 3 ekspresyonu ile karşılaştırılmasında, ERK1 ile literatür ile uyumlu ve istatistiksel olarak da anlamlı olan negatif bir korelasyon olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre ERK1 immünohistokimyasal sonucu ile olgunun miR-214 ekspresyon durumu hakkında yorum yapılabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Ancak Caspase 3 ve PTEN ekspresyonu için elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı ya da literatür ile uyumlu bulunmamış, bu immünohistokimyasal belirteçler kullanılarak miR-214 ekspresyon durumu ile ilgili güvenilir bir veri elde edilemeyeceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak deri SHK'larının patogenezinde pek çok yolak bulunmakta olup son yapılan çalışmalarla bu yolakların her biri aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Ancak bilimin

ilerlemesiyle tüm tıp alanında olduğu gibi patolojide de, her ne kadar pahalı ve zor bir yöntem olsa da, moleküler düzeyde yapılmış çalışmalara ve geliştirilmiş tanı ve tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Son dönemde birçok tümörün patogenezinde rol oynadığı keşfedilen, izolasyonu çok zor ve incelikli olan miRNA'lar da moleküler bilim dünyasının önemli birer parçalarıdır. Ancak pahalı ve çalışılması zor bir yöntem olması nedeniyle, özellikle deri SHK'larında miRNA ekspresyon durumlarıyla ilgili, literatürde henüz daha yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır.

Biz de çalışmamızda miRNA-214'ün deri SHK'larının gelişiminde rolü olduğunu saptayarak literatüre bir katkıda bulunmak istedik. Azalan miRNA-214 ekspresyonunun ERK1 sinyal düzenleyici protein ekspresyonunu artırarak deri SHK'larında anormal hücre proliferasyonuna neden olduğunu gösterdik.

6. SONUÇLAR

2013-2015 yılları arasında deri skuamöz hücreli karsinom tanısı alan 45 olgu ve normal deri dokusuna sahip 15 olgunun incelenmesi ile elde edilen verilere göre;

-Çalışmaya SHK tanılı 29 erkek, 16 kadın ve olağan deri dokusuna sahip 9 erkek, 6 kadın dahil edildi.

-Skuamöz hücreli karsinom tanılı olguların yaşları 46 ile 93 arasında değişmekteydi ve ortalama yaş 72,53 idi.

-Kontrol grubundaki olguların ise yaşları 34 ile 82 arasında değişmekteydi ve ortalama yaş 56,13 idi.

-En fazla olgu 8. ve 9. dekadlarda idi.

-Skuamöz hücreli karsinom tanılı olguların 25 tanesinde tümör, yüzün güneş gören bölgelerinde (dudak dışında), 20 tanesinde ise dudak yerleşimli idi.

-PTEN ile SHK tanılı olgulardan biri (% 2,2) negatif, 16'sı (% 35,6) zayıf, 21'i (% 46,7) orta ve yedisi (% 15,6) güçlü boyanma göstermekte idi.

-ERK1 ile SHK tanılı olgulardan ikisi (% 4,4) negatif, 20'si (% 44,4) zayıf, 15'i (% 33,3) orta ve sekizi (% 17,8) güçlü boyanma göstermekte idi.

-Caspase 3 ile 34 SHK tanılı olguda (% 75,6) boyanma gözlenmezken 11 olguda (% 24,4) nükleer boyanma izlendi.

-PTEN ekspresyonu açısından SHK tanılı olgular ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptandı ($p=0.00$). PTEN ekspresyonu SHK'lı olgularda artmakta idi. SHK tanılı hastaları kendi içlerinde gruplara ayırdığımızda da; dudak bölgesinde SHK tanısı olan grup ile kontrol grubu arasında ve yüzün güneş gören diğer bölgelerinde SHK tanısı olan grup ile kontrol grubu arasında PTEN ekspresyonu açısından saptanan farklılıklar anlamlı bulundu ($p=0.000$).

-ERK1 ekspresyonu açısından SHK tanılı olgular ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptandı ($p=0.00$). ERK1 ekspresyonu SHK'lı olgularda artmakta idi. SHK tanılı hastaları kendi içlerinde gruplara ayırdığımızda da; dudak bölgesinde SHK tanısı olan grup ile kontrol grubu arasında ve yüzün güneş gören diğer bölgelerinde SHK tanısı olan grup ile kontrol grubu arasında ERK1 ekspresyonu açısından saptanan farklılıklar anlamlı bulundu ($p=0.000$).

-Caspase 3 ekspresyonu açısından SHK tanılı olgular ile kontrol grubu arasında fark olduğu ve Caspase 3 ekspresyonunun SHK'lı olgularda arttığı görüldü. Ancak saptanan

fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0.079$). Skuamöz hücreli karsinom tanılı hastaları kendi içlerinde gruplara ayırdığımızda ise; dudak bölgesinde SHK tanısı olan grup ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0.496$). Ancak yüzün güneş gören diğer bölgelerinde SHK tanısı olan grup ile kontrol grubu arasında Caspase 3 ekspresyonu açısından saptanan farklılık anlamlı idi ($p=0.015$).

-Olguların PTEN ve ERK1 ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılmasında, boyanma oranları arasında istatistiksel olarak da anlamlı doğrusal bir korelasyon var idi ($p=0,000$).

-Olguların PTEN ve ERK1 ekspresyonlarının her birinin Caspase 3 ekspresyonu ile ayrı ayrı karşılaştırılmasında ise, pozitif yönde korelasyon olduğu görüldü. Ancak boyanma oranları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

- Kontrol grubuna ait miRNA-214 ekspresyon değerlerinin ortalaması 22,3072, SHK tanılı hastalara ait miRNA-214 ekspresyon değerlerinin ortalaması 20,1973 idi.

-miRNA-214 ekspresyonu açısından SHK tanılı olgular ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir korelasyon olduğu saptandı ($p=0.001$). miRNA-214 ekspresyonu SHK'lı olgularda azalmakta idi.

-PTEN ekspresyonu olan ve olmayan grupları ayırmada miRNA-214 ekspresyonu eşik değeri 21,4602 olarak saptandı. Bu eşik değerde duyarlılık % 75 ve özgüllük % 68 idi.

-ERK1 ekspresyonu olan ve olmayan grupları ayırmada da miRNA-214 ekspresyonu eşik değeri 21,4602 olarak saptandı ve duyarlılık % 75, özgüllük % 68 idi.

-Caspase 3 ekspresyonu olan ve olmayan gruplar ile miRNA-214 ekspresyonu arasındaki ilişki anlamlı değildi.

7. ÖZET

DERİNİN SKUAMÖZ HÜCRELİ KANSERLERİNDE miRNA-214 İLE PTEN, ERK-1 VE CASPASE 3 EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Melanom dışı deri kanserleri dünya genelinde en sık görülen tümörlerden biridir. Erken tanınmaları halinde çoğunlukla kolay tedavi edilebilirler ve iyi prognozludurlar. Bu grup tümörlerden, agresif büyüme ve metastaz potansiyeli de bulunabilen skuamöz hücreli karsinomların özellikle erken tanınmaları önemlidir. Bu yüzden yeni tanı yöntemleri ve yeni tedavi yaklaşımlarına yön vermek amacıyla çok sayıda çalışma yapılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı deri skuamöz hücreli karsinomlarının patogeneğinde PTEN, ERK1, Caspase 3 ve miRNA-214 ekspresyonlarının rolünü ve bu belirteçlerin aralarında ilişki bulunup bulunmadığını araştırmaktır.

Çalışmaya Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2013-2015 yılları arasında deride skuamöz hücreli karsinom tanısı alan 45 olgu (20 olguda tümör dudak yerleşimli, 25 olguda yüzün güneş gören diğer bölgelerinde yerleşimli) ve olağan deri dokusuna sahip 15 kontrol olgusu dahil edildi. İmmünohistokimyasal olarak PTEN, ERK1 ve özellikle apoptozu belirlemede önemli olan Caspase 3 kullanıldı. Gerçek zamanlı PCR ile miRNA-214 ekspresyonu araştırıldı.

Yapılan analizlerin sonucunda tümörlü olgularda PTEN ve ERK1 immünohistokimyasal belirteçlerin istatistiksel olarak da anlamlı artmış ekspresyonu saptandı. Caspase 3 ekspresyonu ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da karsinom tanısı olan olgularda daha yüksek bulundu. Gerçek zamanlı PCR ile değerlendirilen miRNA-214 ekspresyonunun ise skuamöz hücreli karsinomlu olgularda anlamlı oranda azaldığı görüldü. miRNA-214 ekspresyonu ile ERK1 ve PTEN ekspresyonu arasındaki negatif korelasyon anlamlı idi. Caspase 3 ile miRNA-214 arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. ERK1 ve miRNA-214 arasındaki bu ilişki literatürle de uyumlu idi.

Bulgular deri skuamöz hücreli karsinomlarında miRNA-214 tümör baskılayıcı geninin ve ERK1 sinyal düzenleyici proteininin rolü olduğunu gösterdi. Bu belirleyicilerin arasında negatif bir korelasyon olduğu ve artmış ERK1 ekspresyonunun azalmış miRNA-214 ekspresyonunu işaret ettiği saptandı.

Anahtar kelimeler: Skuamöz hücreli karsinom, miRNA-214, ERK1, PTEN, Caspase 3

İletişim adresi: tugba_ozbek04@hotmail.com

8. SUMMARY

INVESTIGATION OF MIRNA-214 WITH PTEN, ERK-1 AND CASPASE 3 EXPRESSION IN SQUAMOUS CELL CANCER OF THE SKIN

Non-melanoma skin cancers are the one of the most common tumors seen in the worldwide. In case of early recognition, they have mostly good prognosis and can be easily treated. Squamous cell carcinoma, one of this group of tumors, that can indicate aggressive growth and metastatic potential is particularly important for early diagnosis. Therefore, in order to provide direction for new therapeutic approaches and new diagnostic methods, a number of studies are performed.

The aim of this study is to investigate the role of expression of PTEN, ERK1, Caspase 3 and miRNA-214 in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the skin and the correlations between these markers.

To the study, 45 cases diagnosed with squamous cell carcinoma of the skin (tumors localized in the lip in 20 patients and in the other region of face in 25 patients) between the years 2013-2015 in the Adnan Menderes University Faculty of Medicine Department of Pathology and 15 control cases with normal skin tissue were included. Immunohistochemically, PTEN, ERK1 and Caspase 3, which is especially important in determining apoptosis, was used. miRNA-214 expression was investigated by real-time PCR.

In the results of analysis, statistically a significant increase was observed in the expression of immunohistochemical markers PTEN and ERK1 in SCC patients. Caspase 3 expression was higher in patients but this result was not statistically significant. miRNA-214 expression of SCC patients evaluated by real-time PCR showed significantly reduced. Negative correlation between miRNA-214 expression and ERK1 and PTEN expression was significant. There was no significant correlation between Caspase 3 and miRNA-214. This relationship between ERK1 and miRNA-214 was consistent with the literature.

Results showed that the role of the miRNA-214 tumor suppressor genes and ERK1 signal regulatory protein in skin squamous cell carcinoma. A negative correlation was found between these markers and that the increased of ERK1 expression is pointing that decreased of miRNA-214 expression.

Keywords: Squamous cell carcinoma, miRNA-214, ERK1, PTEN, Caspase 3

Contact address: tugba_ozbek04@hotmail.com

9. KAYNAKLAR

1. Lazar AJF, Murphy GF. Chapter 25: The Skin. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basic of Disease, 9th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, 2015:1141-1155.
2. Kanik A, Li M, Urmacher CD. Chapter 1: Normal Skin. Mills SE. Histology for Pathologists, 4th ed. Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 2012:3-30.
3. Rosai J. Chapter 4: Skin, Dermatoses, Tumors and Tumorlike Conditions. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, 10 th ed. Elsevier, China, 2011:96-137.
4. McGrath JA. Chapter 1: The Structure and functions of Skin. Calonje E, Brenn T, Lazar A, McKee PH. McKee's Pathology of the Skin with Clinical Correlations, 4th ed. Saunders Elsevier, China, 2012:1-32.
5. Weedon D, Marks R, Kao GF, Harwood CA. Chapter 1: Keratinocytic Tumors. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A. World Health Organization Classification of Tumours, Pathology & Genetics, Skin Tumours, IARC Press, Lyon, 2006:9-48.
6. Alam M, Ratner D. Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. N Engl J Med, 2001;344(13):975-983.
7. Yamane K, Jinnin M, Etoh T, Kobayashi Y, Shimozono N, Fukushima S, Masuguchi S, Maruo K, Inoue Y, Ishihara T, Aoi J, Oike Y, Ihn H. Down-regulation of miR-124/-214 in cutaneous squamous cell carcinoma mediates abnormal cell proliferation via the induction of ERK. J Mol Med, 2013;91(1):69-81.
8. Sand M, Skrygan M, Georgas D, Sand D, Hahn SA, Gambichler T, Altmeyer P, Bechara FG. Microarray analysis of microRNA expression in cutaneous squamous cell carcinoma. J Derm Sci, 2012;68(3):119-126.
9. Sand M, Sand D, Altmeyer P, Bechara FG. MicroRNA in non-melanoma skin cancer. Cancer Biomarkers, 2012;11(6):253-257.
10. Ming M, Han W, Maddox J, Soltani K, Shea CR, Freeman DM, He Y. UVB induced ERK/AKT-dependent PTEN suppression promotes survival of epidermal keratinocytes. Oncogene, 2010;29(4):492-502.
11. Kirkham N, Aljefri K. Chapter 29: Tumors and Cysts of the Epidermis. Elder DE, Elenitsas R, Rosenbach M, Murphy GF, Rubin AI, Xu X. Lever's Histopathology of The Skin. 11th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2015:969-1040.

12. Patterson JW. Chapter 2: Nonmelanocytic Cutaneous Tumors. Mills SE, Greenson JK, Hornick JL, Longacre TA, Reuter VE. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology, 6th ed. Wolters Kluwer Health, Philadelphia, 2015:41-85.
13. Calonje E, Brenn T, Lazar A, McKee PH. McKee's Pathology of the Skin with Clinical Correlations, Chapter 24: Tumors of The Surface Epithelium. 4th ed. Saunders Elsevier, China, 2012:1076-1150.
14. Weedon D. Chapter 31: Tumors of the Epidermis. Weedon's Skin Pathology, 3rd ed. Churchill Livingstone Elsevier, British, 2010:668-708.
15. Kallini JR, Hamed N, Khachemoune A. Squamous cell carcinoma of the skin: epidemiology, classification, management, and novel trends. International Journal of Dermatology, 2015;54(2):130-140.
16. Coşkun BK, Çobanoğlu B. Bazal Hücreli Karsinoma ile Skuamöz Hücreli Karsinomanın Histokimyasal Özelliklerinin Bax, Bcl-2 ve Ki-67 ile Belirlenmesi. Türkderm, 2005;39:185-188.
17. Cruz DJS, Walsh SN. Chapter 23: Tumors of the Skin. Fletcher CDM. Diagnostic Histopathology Of Tumors, 4th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, 2012:1687-1796
18. Lohmann CM, Solomon AR. Clinicopathologic Variants of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. Adv Anat Pathol, 2001;8(1):27-36.
19. Yanofsky VR, Mercer SE, Phelps RG. Histopathological Variants of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review. J Skin Cancer, 2011;2011:210813.
20. Günhan Ö. Oral ve Maksillofasiyal Patoloji, Quintessence Yayıncılık, İstanbul, 2001:91-97.
21. Cassarino DS, DeRienzo DP, Barr RJ. Cutaneous squamous cell carcinoma: a comprehensive clinicopathologic classification, Part Two. J Cutan Pathol, 2006;33(4):261-79.
22. Solus JF, Hassan K, Lee SJ, Hsi AC, Rosman IS, Dehmeri S, Schaffer A. Cutaneous squamous cell carcinoma progression is associated with decreased GATA-3 immunohistochemical staining. J Cutan Pathol, 2016;43(4):347-353.
23. Hu SC, Yu H, Yen F, Chen G, Lan CE. CXCR7 expression correlates with tumor depth in cutaneous squamous cell carcinoma skin lesions and promotes tumor cell survival through ERK activation. Experimental Dermatology, 2014;23(12):902-908.

24. Shafaei S, Sharifian M, Hajian-Tilaki K. Immunohistochemical expression of CD10 in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. *Caspian J Intern Med*, 2015;6(2):103-107.
25. Feller L, Khammissa RAG, Kramer B, Altini M, Lemmer J. Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the head and face. *Head & Face Medicine*, 2016;12(1):11-17.
26. Bukhari MH, Niazi S, Khaleel ME, Sharif MA, Ghani R, Mehmood MT, Tahseen M, Chaudhry NA, Hasan M. Elevated frequency of p53 genetic mutations and AgNOR values in squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol*, 2009;36(2):220-228.
27. Farber E. Perspectives in Cancer Research The Multistep Nature of Cancer Development. *Cancer Research*, 1984;44:4217-4223.
28. Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JFM, Carnero A. PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis*, 2007;28(7):1379-1386.
29. Ming M, He Y. PTEN: New Insights into Its Regulation and Function in Skin Cancer. *J Invest Dermatol*, 2009;129(9):2109-2112.
30. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 1999;6(11):1028-1042.
31. Hensley P, Mishra M, Kyprianou N. Targeting caspases in cancer therapeutics. *Biol Chem*, 2013;394(7):831-843.
32. Cousin F, Baldassini S, Bouchany D, Claudy A, Kanitakis J. Expression of the pro-apoptotic caspase 3/CPP32 in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. *J Cutan Pathol*, 2000;27(5):235-241.
33. Falco OB, Plewing G, Wolff HH, Burgdorf WHC. Chapter 56: Malign Epithelial Tumors. *Dermatology*, 2nd ed. Springer, Italy, 2000:1463-1490.
34. Lebwohl M, Blum R, Berkowitz E. No evidence for increased risk of cutaneous squamous cell carcinoma in patients with rheumatoid arthritis receiving etanercept for up to 5 years. *Arch Dermatol*, 2005;141(7):861-864.
35. Edge SB, Byrd DR, Carducci MA, Compton CC, eds. Cutaneous squamous cell carcinoma and other cutaneous carcinomas. *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed. New York, NY: Springer; 2009.
36. Petter G, Haustein UF. Histologic subtyping and malignancy assessment of cutaneous squamous cell carcinoma. *Dermatol Surg*, 2000;26(6):521-530.

37. Lim JL, Asgari M. Epidemiology and risk factors for cutaneous squamous cell carcinoma. UpToDate, (cited 17 March, 2014). Available from URL: <http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-and-risk-factors-for-cutaneous-squamous-cell-carcinoma> (2013).
38. Farmer ER, Hood AF. Chapter 44: Malign Tumors of the Epidermis. Pathology of the Skin, 2nd ed. McGraw-Hill Professional, United States of America, 1999:568-595.
39. DeMarco SS, Vos P, Green H, Defazio J, Davis N, Fiz L, Phillips C. A 10-year review of outpatient skin biopsy results and skin cancer subtypes. Dermatology Online Journal, 2016;22(1).
40. Prior SL, Griffiths AP, Lewis PD. A study of mitochondrial DNA D-loop mutations and p53 status in nonmelanoma skin cancer. Br J Dermatol, 2009;161(5):1067-1071.
41. Kurasawa Y, Shiiba M, Nakamura M, Fushimi K, Ishigami T, Bukawa H, Yokoe H, Uzawa K, Tanzawa H. PTEN expression and methylation status in oral squamous cell carcinoma. Oncology Reports, 2008;19(6):1429-1434.
42. Zhang X, Makino T, Muchemwa FC, Lin T, Wakasugi S, Egawa K, Ihn H. Activation of the extracellular signal-regulated kinases signaling pathway in squamous cell carcinoma of the skin. BioScience Trends, 2007;1(3):156-160.
43. Handra-Luca A, Bilal H, Bertrand JC, Fouret P. Extra-Cellular Signal-Regulated ERK-1/ERK-2 Pathway Activation in Human Salivary Gland Mucoepidermoid Carcinoma, Association to Aggressive Tumor Behavior and Tumor Cell Proliferation. Am J Pathol, 2003;163(3):957-967.
44. Dornelas MT, Rodrigues MF, Machado DC, Gollner AM, Ferreira AP. Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in skin squamous cell carcinoma and actinic keratosis. An Bras Dermatol, 2009;84(5):469-475.
45. Gandhi SA, Kampp J. Skin Cancer Epidemiology, Detection, and Management. Med Clin N Am, 2015;99(6):1323-1335.
46. Stratigos A, Garbe C, Lebbe C, Malvehy J, Marmol V, Pehamberger H, Peris K, Becker JC, Zalaudek I, Saiag P, Middleton MR, Bastholt L, Testori A, Grob JJ. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. European Journal of Cancer, 2015;51(14):1989-2007.

47. Noroozi N, Zakerolhosseini A. Differential diagnosis of squamous cell carcinoma in situ using skin histopathological images. *Computers in Biology and Medicine*, 2016;70:23–39.
48. Kraft S, Granter SR. Molecular Pathology of Skin Neoplasms of the Head and Neck. *Arch Pathol Lab Med*, 2014;138(6):759–787.
49. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *British Journal of Dermatology*, 2012;166(5):1069-1080.
50. Torres J, Rodriguez J, Myers MP, Valiente M, Graves JD, Tonks NK. Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3: implications for the control of protein stability and PTEN-protein interactions. *J Biol Chem*, 2003;278(33):30652–30660.
51. Ming M, Feng L, Shea CR, Soltani K, Zhao B, Han W, Smart RC, Trempus CS, He Y. PTEN positively regulates UVB-induced DNA damage repair. *Cancer Res*, 2011;71(15):5287–5295.
52. Segrelles C, Ruiz S, Perez P, Murga C, Santos M, Budunova IV. Functional roles of Akt signaling in mouse skin tumorigenesis. *Oncogene*, 2002;21(1):53–64.
53. Odar K, Bostjancic E, Gale N, Glavac D, Zidar N. Differential expression of microRNAs miR-21, miR-31, miR-203, miR-125a-5p and miR-125b and proteins PTEN and p63 in verrucous carcinoma of the head and neck. *Histopathology*, 2012;61(2):257–265.
54. Lee D, Do IG, Choi K, Sung CO, Jang KT, Choi D, Heo JS, Choi SH, Kim J, Park JY, Cha HJ, Joh JW, Choi KY, Kim DS. The expression of phospho-AKT1 and phospho-MTOR is associated with a favorable prognosis independent of PTEN expression in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Modern Pathology*, 2012;25(1):131–139.
55. Shoman N, Klassen S, McFadden A, Bickis MG, Torlakovic E, Chibbar R. Reduced PTEN expression predicts relapse in patients with breast carcinoma treated by tamoxifen. *Modern Pathology*, 2005;18(2):250-259.
56. Yazıcı P, Alizadehshargh S, Akdoğan GG. Apoptoz: Düzenleyici Moleküller, Hastalıklarla İlişkisi ve Apoptozu Saptama Yöntemleri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 2009;29(6):1677-1686.

57. Bressenot A, Marchal S, Bezdetnaya L, Garrier J, Guillemin F, Plénat F. Assessment of Apoptosis by Immunohistochemistry to Active Caspase-3, Active Caspase-7, or Cleaved PARP in Monolayer Cells and Spheroid and Subcutaneous Xenografts of Human Carcinoma. *J Histochem Cytochem*, 2009;57(4):289–300.
58. Takahashi T, Ogo M, Hibino T. Partial purification and characterization of two distinct types of caspases from human epidermis. *J Invest Dermatol*, 1998;111(3):367-372.
59. Krajewska M, Wang HG, Krajewski S. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res*, 1997;57(8):1605-1613.
60. Hoshi T, Sasano H, Kato K, Yabuki N, Ohara S, Konno R, Asaki S, Toyota T, Tateno H, Nagura H. Immunohistochemistry of Caspase3/CPP32 in human stomach and its correlation with cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Research*, 1998;18(6A):4347-4353.
61. Chetram MA, Hinton CV. PTEN regulation of ERK1/2 signaling in cancer. *J Recept Signal Transduct Res*, 2012;32(4):190–195.
62. Aberdam D, Candi E, Knight RA, Melino G. miRNAs, ‘stemness’ and skin. *Trends in Biochemical Sciences*, 2008;33(12):583-591.
63. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. MikroRNA’lar ve kanser. *Dicle Med J*, 2011;38(1):113-120.
64. Tunalı NE, Tiryakioğlu NO. Kanserde MikroRNA’ların Rolü. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 2010;30(5):1690-1700.
65. Zhang ZC, Li YY, Wang Y, Fu S, Wang XP, Zeng MS, Zeng YX, Shao JY. Knockdown of miR-214 Promotes Apoptosis and Inhibits Cell Proliferation in Nasopharyngeal Carcinoma. *PLoS One*. 2014;9(1):e86149.
66. Dziunycz P, Iotzova-Weiss G, Eloranta JJ, Läuchli S, Hafner J, French LE, Hofbauer GFL. Squamous cell carcinoma of the skin shows a distinct microRNA profile modulated by UV radiation. *J Invest Dermatol*, 2010;130(11):2686–2689.
67. Yu X, Li Z. The role of miRNAs in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Cell Mol Med*, 2016;20(1):3-9
68. Bruegger C, Kempf W, Spoerri I, Arnold AW, Itin PH, Burger B. MicroRNA expression differs in cutaneous squamous cell carcinomas and healthy skin of immunocompetent individuals. *Experimental Dermatology*, 2013;22(6):426-428.

69. Xu N, Zhang L, Meisgen F, Harada M, Heilborn J, Homey B, Grandér D, Stähle M, Sonkoly E, Pivarsci A. MicroRNA-125b Down-regulates Matrix Metalloproteinase 13 and Inhibits Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Cell Proliferation, Migration, and Invasion. *Journal of Biological Chemistry*, 2012;287(35):29899–29908.
70. Ahmed MI, Alam M, Emelianov VU, Poterlowicz K, Patel A, Sharov AA, Mardaryev AN, Botchkareva NV. MicroRNA-214 controls skin and hair follicle development by modulating the activity of the Wnt pathway. *J Cell Biol*, 2014;207(4):549–567.

