

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

DUDAK SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMA GELİŞİMİNDE
p16 VE p14 İFADESİNİN
TANISAL ÖNEMİ

Dr. Ayşe Nur AKATLI
UZMANLIK TEZİ

KIRIKKALE
2009

**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DUDAK SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMA GELİŞİMİNDE
p16 VE p14 İFADESİNİN
TANISAL ÖNEMİ**

**Dr. Ayşe Nur AKATLI
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Şebnem KÜPANA AYVA**

**KIRIKKALE
2009**

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

Patoloji Anabilim Dalı uzmanlık programı çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından **UZMANLIK TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:19/11/2009

Prof.Dr.Önder BOZDOĞAN
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Faköltesi
Patoloji AD
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Pınar ATASOY
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Faköltesi
Patoloji AD
Üye

Yrd. Doç. Dr. Şebnem KÜPANA AYVA
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Faköltesi
Patoloji AD
Üye

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sırasında; bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, bizlere her konuda destek olan, gerek mesleki eğitimimde gerekse tezimi hazırlama aşamasında büyük emek veren değerli tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Şebnem Ayva'ya,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, disiplinli ve titiz çalışmayı öğreten, eğitimimizde büyük katkıları olan değerli hocam, AnaBilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Önder Bozdoğan'a,

Eğitimim boyunca emeklerini esirgemeyen , bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocam Doç. Dr. Pınar Atasoy'a teşekkürler ediyor, saygılarımı sunuyorum.

Arkadaşlık ve dostluklarını esirgemeyen, mutlu ve uyumlu çalışma ortamı sağlayan asistan arkadaşlarım Ebru Mutlu' ya, Sabahat Büyükturan'a, Nurdan Tatar'a ve Sami Turan'a,

Teknik konulardaki yardım ve destekleri için Uğur Esene, Selahattin Gönaylı'ya, Hatice Keleş'e, Özlem Çakıroğlu'na ve Sinem Özdemir'e teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında sevgisini ve desteğini esirgemeyen , her zaman yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Ayşenur AKATLI

ÖZET

Akathı A, Dudak skuamöz hücreli karsinoma gelişiminde p16INK4a ve p14ARF ekspresyonları. Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, KIRIKKALE, 2009.

Amaç : Dudağın premalign lezyonu olarak kabul edilen aktinik keilitler skuamöz hücreli karsinomaya ilerleme potansiyeline sahiptirler. Bu çalışmada dudağın prekanseröz lezyonlarında ve skuamöz hücreli karsinomunda p16INK4a, p14ARF ve p53 ekspresyonlarının karsinogenezdeki rolünü açıklamayı ve skuamöz hücreli kanserlerde histopatolojik prognostik özelliklerle ilişkisini incelemeyi amaçladık.

Materyal ve metod:19 skuamöz hücreli karsinoma, 14 aktinik keilit, 13 normal mukoza olgusundan oluşan 46 formalinde fikse edilmiş parafine gömülmüş doku örneğinde nükleer p16INK4a, p53 ve nükleer/nükleolar p14ARF ekspresyonları incelendi. Aynı zamanda skuamöz hücreli karsinoma komşuluğundaki displastik alanlar da değerlendirmeye alındı.

Bulgular: Aktinik keilitlerde normal mukozaya oranla artmış p16INK4a ekspresyonu saptanmıştır(p=0.001). p14ARF H-SKOR değerleri normalden aktinik keilite ilerlerken artış göstermiş(p=0.001), aktinik keilitten karsinomaya geçişte önemli ölçüde azalmış H-SKOR değerleri izlenmiştir (p=0.003). p53 H-SKOR değerleri normalden aktinik keilite (p=0.001)ve aktinik keilitten skuamöz hücreli karsinoma ilerlerken artış göstermektedir(p=0.008). Aktinik keilitler ve karsinoma komşuluğundaki displastik alanlar arasında p16INK4a, p14ARF ve p53 ekspresyonları açısından anlamlı farklılık yoktu. Karsinoma komşuluğundaki displastik alanlarda p14ARF ve p53 arasında pozitif korelasyon saptandı. Skuamöz hücreli karsinomalarda histopatolojik prognostik faktörler ile p16INK4a, p14ARF ve p53 ekspresyonları arasında korelasyon izlenmedi.

Sonuç: Bulgularımız aktinik keilitten skuamöz hücreli karsinoma gelişimi olup olmayacağını belirlemede p16INK4a ve p14ARF'nin immunohistokimyasal boyanmasının yararlı olmadığını göstermektedir. Karsinoma komşuluğundaki displastik alanlarda p14ARF/p53 yolağının aktive olduğu ancak karsinogenezi önlemede yetersiz kaldığı düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler :aktinik keilit, dudak skuamöz hücreli karsinomu, karsinogenez, p16^{INK4a}, p14^{ARF}, p53, immunohistokimya.

ABSTRACT

Akatli A, p16INK4a and p14ARF expressions in carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the lip, University of Kırıkkale, Faculty of Medicine, Department of Pathology, Specialization Thesis, KIRIKKALE, 2009.

Aim : Actinic cheilitis is considered as a precancerous lesion of the lip that has potential to progress to squamous cell carcinoma. The goal of this study was to clarify the role of p16INK4a, p14ARF and p53 protein expressions in carcinogenesis in precancerous lesions and in squamous cell carcinomas of the lip and analyze the correlation between the results and histopathological features of squamous cell carcinomas.

Materials and methods: The nuclear expression of p53 and p16INK4a and nuclear/nucleolar expression of p14ARF protein in 46 formaline-fixed paraffine embedded tissue specimens, including 19 cases of squamous cell carcinoma, 14 cases of actinic cheilitis, and 13 cases of normal mucosa were examined. Immunoreactivity in dysplastic regions adjacent to lip squamous cell carcinomas was also evaluated.

Results : p16INK4a expression increased in actinic cheilitis in comparison with normal mucosa ($p=0.001$). p14ARF H-SCOREs increased progressively from normal to actinic cheilitis ($p=0.001$), p14ARF H-SCOREs were observed decreasing significantly during the process of transition from actinic cheilitis to carcinomas ($p=0.003$). p53 H-SCOREs increased progressively from normal to actinic cheilitis ($p=0.001$) and from actinic cheilitis to carcinoma ($p=0.008$). There was no significant difference in p16INK4a, p14ARF, and p53 H-SCORE values between actinic cheilitis and dysplastic regions adjacent to carcinomas. A significant positive correlation was found between p14ARF and p53 in dysplastic regions adjacent to carcinomas. No correlation was seen between the histopathologic prognostic factors of squamous cell carcinoma and the expression of p16INK4a, p14ARF and p53.

Conclusion : Our findings indicated that p16INK4a and p14ARF immunohistochemistry is not helpful whether to determine actinic cheilitis has a potential to develop carcinoma or not. It is thought that p14ARF/p53 pathway is activated in dysplastic regions adjacent to carcinoma but this activation is inadequate to prevent carcinogenesis.

Key Words : actinic cheilitis, squamous cell carcinoma of the lip, carcinogenesis, p16^{INK4a}, p14^{ARF}, p53, immunohistochemistry

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	IX
RESİMLER ve ŞEKİLLER.....	X
TABLOLAR.....	XII
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Dudak Anatomi ve Histolojisi.....	3
2.2. Aktinik Keilit.....	4
2.2.1. Genel Özellikler.....	4
2.2.2. Klinik Özellikler.....	5
2.2.3. Histopatolojik Özellikler.....	6
2.2.4. Tedavi ve Prognoz.....	8
2.3. Dudak Kanseri.....	9
2.3.1. Genel Özellikler.....	9
2.3.2. Etiyolojik Faktörler.....	11
2.3.3. Klinik Değerlendirme.....	12
2.3.4. Biyolojik Davranış.....	13
2.3.5. Yayılım ve Metastaz.....	13
2.3.6. Prognoz.....	14
2.3.7. Evreleme.....	14
2.3.8. Tedavi.....	16
2.3.9. Skuamöz Hücreli Karsinoma.....	19
2.3.9.1. Mikroskopik Özellikler.....	19
2.3.9.2. Diğer Histopatolojik Varyantlar.....	23
2.3.10. Moleküler ve Genetik Özellikler.....	26
2.4. Karsinogenez.....	26
2.4.1. Oral ve Baş Boyun Kanseri Kromozomal Aberasyonlar.....	27
2.5. CDKN2A Lokusu.....	28
2.5.1. p16 ^{INK4a}	29
2.5.2. p14 ^{ARF}	30
2.6. p53.....	32

GEREÇ ve YÖNTEM.	
3.1. Olgu Seçimi.	36
3.2. Histopatolojik inceleme.	36
3.3. İmmunohistokimyasal inceleme.	37
3.3.1. p16 ^{INK4a} saptanması.	37
3.3.2. p14 ^{ARF} saptanması.	38
3.3.3. p53 saptanması.	39
3.3.4. p16, p14 ve p53 immunohistokimyasal belirleyicilerin değerlendirilmesi	40
3.4. İstatiksel inceleme.	40
3.5. Etik kurul kararı.	40
BULGULAR.	41
TARTIŞMA.	58
SONUÇ ve ÖNERİLER.	71
KAYNAKLAR.	73

SİMGELER VE KISALTMALAR

ARF	: Alternative reading frame
AK	: Aktinik keilit
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
CDKI	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
CDKN2A	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2
CEA	: Karsinoembriyonik Antijen
CK	: Sitokeratin
CO ₂	: Karbon dioksit
CMV	: Sitomegalovirus
DAB	: Diaminobenzidin
DBD	: DNA bağlayıcı bölge
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EBV	: Epstein-Barr virus
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EMA	: Epitelyal membran antijen
HPV	: Human papilloma virüs
HSV	: Herpes simpleks virüs
INK4a	: Siklin bağımlı kinaz 4 inhibitörü
K	: Kontrol
MDM2	: Murine double minute 2
mRNA	: "messenger" ribonükleik asit
NES	: Nükleer eksport sinyalleri
PAS	: Periodic acid-schiff
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu
PCNA	: Proliferating cell nuclear antigen
PRD	: Prolinden zengin bölge
PTEN	: Phosphatase and tensin homolog
Rb	: Retinoblastoma
SHK	: Skuamöz hücreli karsinoma
SMA	: Smooth muscle actin
SHK-AK	: Skuamöz hücreli karsinom komşuluğundaki displastik alanlar
TA	: Transaktivasyon bölgesi
TGF β	: Transforming growth faktör beta
TNM	: Tümör, Nod, Metastaz
US	: Birleşik devletler
UV	: Ultraviyole
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
Wt-p53	: wild type p53

RESİMLER

Resim No	Sayfa No
Resim 4.1: Normal oral mukozada nükleer p16 pozitifliği (x400).	52
Resim 4.2: Aktinik keilitte nükleer p16 pozitifliği (x200).	52
Resim 4.3: Dudak skuamöz hücreli karsinomada p16 pozitifliği (x200).	53
Resim 4.4: Skuamöz hücreli karsinoma komşuluğundaki displastik alanlarda p16 pozitifliği (x200).	53
Resim 4.5: Normal oral mukozada nükleer p14 pozitifliği (x400).	54
Resim 4.6: Aktinik keilitte nükleer ve nükleolar p14 pozitifliği (x200).	54
Resim 4.7: Dudak skuamöz hücreli karsinomada nükleer ve nükleolar p14 pozitifliği (x400).	55
Resim 4.8: Skuamöz hücreli karsinoma komşuluğundaki displastik alanlarda p14 pozitifliği (x400).	55
Resim 4.9: Normal oral mukozada nükleer p53 pozitifliği (x100).	56
Resim 4.10: Aktinik keilitte nükleer p53 pozitifliği (x400).	56
Resim 4.11: Dudak skuamöz hücreli karsinomada nükleer p53 pozitifliği (x200).	57
Resim 4.12: Skuamöz hücreli karsinoma komşuluğundaki displastik alanlarda p53 pozitifliği (x400).	57

ŞEKİLLER

Şekil No	Sayfa No
Şekil 4.1: Kontrol, AK ve SHK gruplarında p16, p14 ve p53 ekspresyonlarının H-SKOR değerlerinin saplı kutu grafiği.	45
Şekil 4.2: SHK grubu ve SHK-AK grubundaki p16, p14 ve p53 ekspresyonlarının H-SKOR değerlerinin saplı kutu grafiği.	49

TABLOLAR

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1: Dudak ve oral kavite kanserlerinin TNM Klasifikasyonu.	17
Tablo 2.2: Dudak ve oral kavite kanserlerinin TNM Evrelemesi.	18
Tablo 2.3: Oral kavite ve orofarinks tümörlerinin WHO klasifikasyonu.	22
Tablo 4.1: Olguların gruplara göre yaş ve cinsiyet dağılımı özellikleri.	41
Tablo 4.2: Olguların pozitif immunohistokimyasal boyanma yüzdeleri.	43
Tablo 4.3: Olguların immunohistokimyasal boyanma lokalizasyonları.	44
Tablo 4.4: Kontrol, aktinik keilit ve skuamöz hücreli karsinoma gruplarında p16, p14 ve p53 ekspresyonunun H-SKOR değerlerinin tanımlayıcı istatistiksel bulguları.	44
Tablo 4.5: p16 ekspresyonunun ikili grup karşılaştırmalarında elde edilen H-SKOR ortalama sıralama değerleri ve p değeri.	46
Tablo 4.6: p14 ekspresyonunun ikili grup karşılaştırmalarında elde edilen H-SKOR ortalama sıralama değerleri ve p değeri.	47
Tablo 4.7: p53 ekspresyonunun ikili grup karşılaştırmalarında elde edilen H-SKOR ortalama sıralama değerleri ve p değeri.	48
Tablo 4.8: Tümör komşuluğundaki displazi (SHK-AK) alanlarının p16, p14 ve p53 ekspresyonları için tanımlayıcı istatistiksel bulgular.	48
Tablo 4.9: SHK ve SHK-AK grupları arasında p16, p14 ve p53 ekspresyonlarının H-SKOR değerlerinin dağılımı.	50
Tablo 4.10: Gruplar arasında p16, p14 ve p53 antikörleri korelasyon analizi.	51

GİRİŞ

Dudağın skuamöz hücreli kanseri oral kanserin en sık gözlenen formudur. Skuamöz hücreli karsinoma tüm oral malign lezyonların %90-95'ini oluşturur (1,2). Özellikle alt dudağı etkileyen ve güneş ışığındaki UV(ultraviyole) radyasyona kronik ve aşırı maruziyet sonucu ortaya çıkan patolojik bir durum olan aktinik keilit, dudağın skuamöz hücreli karsinomuna dönüşebilen premalign bir lezyondur (3,4).

Oral skuamöz hücreli karsinoma gelişimi 3p, 9p,11q, 13q ve 17p kromozomlarındaki heterozigosite kaybı ve allelik imbalansı içeren çok basamaklı bir süreçtir (5). Genel olarak baş-boyun skuamöz hücreli karsinomlarının ortak bir premalign projenitörden ve onu izleyen kümülatif genetik aberasyonlarla ilişkili klonal populasyonun aşırı çoğalması ve invaziv maligniteye fenotipik ilerlemesinden kaynaklandığı kabul edilmektedir (6). Bu genetik değişiklikler p16, p53, cyclin D1, p14, FHIT, RASSF1A, EGFR ve Rb(Retinoblastom) içeren çok sayıda tümör supresör genin inaktivasyonu ve proto-onkogenin aktivasyonu sonucu oluşmaktadır (7). Baş-boyun kanserlerinin %70-80'inde 9p21 kromozomunun kaybı bulunmaktadır ve bu baş-boyun skuamöz hücreli karsinomlarında ve skuamöz displazide en sık görülen genetik değişikliktir (6).

Derinin skuamöz hücreli karsinomunun başlangıcı ve progresyonu ile ilişkili moleküler olaylar halen tam olarak anlaşılamamıştır (8,9). Sadece sorumlu aberasyonlardan birkaçı tanımlanabilmiştir. En belirgin olanı UVB radyasyon ile oluşan p53 mutasyonudur. Bundan başka telomeraz aktivasyonu, cyclin D1 overekspresyonu , p16^{INK4a} inaktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (10).

9p21deki p16^{INK4a} ve 17p13'teki p53 geninin inaktivasyonu bu genlerin ürettiği protein ekspresyonlarında değişikliğe neden olmaktadır ve bu durum oral kavitenin displazi ve karsinomlarında yararlı belirleyiciler olabilme olasılıklarını akla getirmektedir (11,12). Oral kavitenin displastik lezyonlarında tümör supresör gen p16^{INK4a} mutasyonu yaygın olmakla birlikte displazi için p16^{INK4a} gen ürününün immünohistokimyasal olarak saptanmasının güvenilir bir belirteç olup olmadığı açık değildir (13).

P53 geni 17.kromozomun kısa kolunda lokalize bir tümör supresör gendir. p53 geni 53-kDa olan nükleer bir fosfoproteini kodlar ve hücre siklusunun ilerlemesini; hasarlı DNA'nın onarımını sağlamak ve apoptozisi harekete geçirmek için bloke eder (14) .

9p21 kromozomu üzerindeki siklin bağımlı kinaz inhibitörleri 2A lokusu (CDKN2A), insan kanserlerinde p53'ten sonra ikinci en sık değişikliğe uğrayan gen lokusudur (15). CDKN2A lokusu, p16^{INK4a} ve p14^{ARF} olarak adlandırılan iki farklı tümör supresör protein kodlar (16).

p16^{INK4a} hücre siklusunun progresyonunda rol oynayan Rb sinyal yolağının önemli bir üyesidir. Hücre siklusunu, CDK4 ve CDK6'ya bağlanarak ve siklin-D/CDK kompleksi oluşumunu inhibe ederek negatif olarak düzenler (17). p14^{ARF} ise hücre siklusunu G1/S ve G2/M fazlarında p53'ün regülatörü olan MDM2(murine double minute-2) onkoproteinini inhibe ederek negatif yönde düzenler (18). Bu nedenle p14^{ARF} , p53 bağımlı bir yolda tümör supresör gen gibi davranır.(19)

p16^{INK4a} nın artmış ekspresyonunun derinin ve oral kavitenin displastik lezyonlarının tanısında faydalı olabileceğini gösteren çalışmalar olduğu kadar azalmış ekspresyonunun diagnostik önemini vurgulayan çalışmalar da mevcuttur (11,12,20,21). p16^{INK4a} ve p14^{ARF} ile yapılan baş boyun kanserleri ve oral skuamöz hücreli karsinomlarındaki çalışmaların büyük kısmı protein ekspresyonlarından ziyade genetik aberasyonlar üzerine odaklanmıştır (6). İmmunohistokimyasal olarak p14^{ARF} protein ekspresyonunu çalışan çok az sayıda çalışma vardır (22).

UV ışığın deri üzerindeki etkisini araştıran çok sayıda çalışma olmasına rağmen aktinik keilit ve skuamöz hücreli karsinoma gelişimi ile ilgili yapılmış çok az sayıda çalışma bildirilmektedir (23,24). Bu nedenle aktinik keilitin gelişim mekanizması açık değildir.

Biz bu çalışmada, normal oral mukozada, aktinik keilitlerde ve dudağın skuamöz hücreli karsinomunda nükleer p16^{INK4a}, p14^{ARF} ve p53 ekspresyonlarını inceleyerek, bu belirleyicilerin erken karsinogenezdeki olası önemini ve histopatolojik prognostik faktörlerle ilişkisini belirlemeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

2.1. DUDAK ANATOMİ VE HİSTOLOJİSİ

Dudaklar, oral kavitenin ön sınırını oluştururlar ve mobil bir oral sfinkter gibi davranarak çiğnemeye, yutmaya ve konuşmaya yardımcı olurlar. Ayrıca görünümüne ve yüz ifadesine katkıda bulunduklarından estetik açıdan da önemlidir (2).

Üst dudağın transvers uzunluğu 8 cm, alt dudağınki yaklaşık 7.5 cm'dir. Orbikülaris oris kası, dudak boyunca uzanan bir sfinkterdir ve oral açıklığı çevreler. Dudak hareketleri ile ilişkilidir. Dudağın duysal ve motor innervasyonları ayrıdır. Trigeminal sinirin maksiller ayrımının (V2) infraorbital dalı, üst dudak derisi ve müköz membranlarına ana duysal innervasyonunu sağlar. Oral komissür alanı trigeminal sinirin (V3) mandibular ayrımının bukkal dalı ile sağlanır. Alt dudak derisi ve mukozasının duysal innervasyonu ise mandibular sinirin mental dalı ile sağlanır. 7. kranial sinir (fasial sinir), dudağın motor innervasyonunu sağlar. Üst dudak kasları fasial sinirin bukkal dalı ile alt dudak kasları marjinal mandibular dalı ile sonlanır (2, 25).

Dudaklara olan ana kan akımı, süperior ve inferior labial arterlerden sağlanır. Damarlar oral komissür lateralinde fasial arterden dallanırlar. Venöz dolaşım arterlere eşlik eden anterior fasial vene dökülen venler ile sağlanır (2).

Dudak lenfatikleri vermilyon sınırdan ince kapiller ağ olarak başlar ve toplayıcı dalları oluştururlar. Üst dudak ve komissürdeki kanallar ipsilateral preauriküler, infraparotid, submandibular ve submental lenf düğümlerine drene olur. Orta frontonazal prosesin embriyolojik birleşim planının lateral maksiller prosesler ve onlara eşlik eden nörovasküler ve lenfatik bağlantıları ayırması nedeniyle kontralateral drenaj olmaz. Alt dudak lenfatikleri submental ve submandibular lenf düğümlerine drene olur. Mandibular proseslerin orta hatta birleşmesi nedeniyle, orta hattı çaprazlayan ve kontralateral yayılıma yol açan çok sayıda anastomoz mevcuttur. Alt dudak lenfatikleri olguların %22'sinde mental foramene de girerler. Lenfatik yayılımında ikinci istasyon üst derin juguler lenf nodlarıdır (II. Seviye) veya bazen orta derin juguler nodlardır (III. Seviye) (2).

Dudaklar, anatomik olarak 3 bölgeye ayrılabilir; eksternal alanda deri, vermilyon zon ve müköz membran. Eksternal alanı kıllar, ekrin glandlar ve sebace glandları içeren duysal sinirlerden zengin deri ile kaplıdır. İç yüzeyleri oral mukoza ile kaplıdır ve oral kavite duvarının bir bölümünü oluştururlar. Eksternal bölge ve oral mukoza arasında orbikülaris oris kası, labial damarlar, sinirler ve çok sayıda minör tükrük bezi içeren yağ dokusu vardır.

Deri ve oral mukoza arasındaki birleşim yeri vermilyon zon olarak bilinir ve sadece insanlarda mevcuttur. Burası derinin keratinize skuamöz epitelinin oral kavitenin müköz membranına dönüştüğü yerdir. Oral komissürler üst ve alt vermilyon zonun birleştiği köşelerdir. Vermilyon sınırın skuamöz epiteli incedir ve stratum lucidum iyi gelişmişken stratum korneum yüz derisi ile karşılaştırıldığında çok incedir. Yüzeye yakın uzun, çok sayıda bağ doku papilları vardır. İnce epitel boyunca uzanan zengin kapiller ağ , dudaklara kırmızı rengini verir. Transizyon zonunda, kıllar veya ter duktusları yoktur ve sebace glandlar az sayıdadır. Erişkinlerde vermilyon sınırda, ağız köşelerinde veya bukkal mukozada ektojik sebace glandlar yaygın olarak izlenebilir. Bu görünüm Fordyce's granülleri olarak adlandırılır ve yaşla birlikte artar, bu yüzden yaşlı insanların %70-80'inde saptanır . Bu ektojik sebace glandlar normal kabul edilir. Dudağın müköz membranı non-keratinize çok katlı yassı epitel ile çevrilidir ve müköz membran çok sayıda değişik büyüklüklerde mikst glandlar içerir. Pigmente dudakta ve oral mukozada bazal tabaka boyunca dağılmış DOPA pozitif melanositler izlenirken nonpigmente dudakta çok sık izlenen bir bulgu değildir. Genellikle koyu tenli insanlarda gözlenir. Bu tip değişiklikler bazen de inflamatuvar reaksiyonlardan sonra, sigara içenlerde, Addison veya Peutz-Jeghers sendromunda veya ilaçlara sekonder olarak da izlenebilir (25,26).

Deri gibi , vermilyon sınır da fiziksel ve kimyasal ajanlarla sık karşılaşır. Bu yüzden aktinik keratoz ve solar elastoz gibi deride izlenen patolojiler vermilyon sınırda da görülebilir (26).

2.2.AKTİNİK KEİLİT

2.2.1 Genel Özellikler

Kronik aktinik keilit, alt dudak vermilyonunda sık olarak gözlenen premalign bir lezyondur. Güneş ışığına uzun süre veya aşırı maruziyet sonucu gelişir. Genelde güneş yanığına kolay eğilim gösteren açık tenli insanlarla sınırlı bir problemdir (27, 28).

Açık havada uğraşlar, meslekler bu problemle açık olarak ilişkilidir. Bu neden çiftçi dudağı, yelkenci dudağı gibi popüler terimlerin kullanımına yol açmıştır (25,27,29). Kronik güneş ışığı maruziyeti olan ve immunitesi baskılanmış özellikle transplant alıcısı bir kişide alt dudak vermilyonunda kanser gelişme riski artmıştır (27,30).

Güneş ışığı en önemli etyolojik faktör olmasına rağmen sigara kullanımı ve dudağın çeşitli irritasyon formlarının da premalign ve malign lezyonların gelişiminde önemli sekonder etkileri vardır (4,31).

Aktinik keilit derinin aktinik keratozuna patofizyolojik ve biyolojik davranış açısından benzerdir (27).

Ultraviyole ışın maruziyeti derinin premalign lezyonlarından biri olan aktinik keratozda olduğu gibi p53 tümör supresör gende mutasyona yol açabilir. Telomeraz geninde mutasyonlar lezyon gelişiminde diğer bir erken olayı gösterir ve bu durum apoptozda gecikme ve hücrelerde immortalite ile sonuçlanır (27). UVB ışınının karsinojenik etkisi DNA'da pirimidin dimerleri oluşturmaya bağlanmıştır (17).

2.2.2 Klinik özellikler:

Aktinik keilit 45 yaşın altında nadiren gözlenir. Bazı çalışmalarda erkek/kadın oranı 10/1 olarak bildirilmiş olup erkeklerde daha sık gözlenen bir hastalıktır (25,29).

Aralarındaki benzerlikten ötürü derinin aktinik keratozundan bahsedecek olursak solar keratozlar olarak da bilinirler. Solar kelimesi daha spesifiktir çünkü aktinik kelimesi çeşitli ışınlara işaret ederken; solar kelimesi neden olarak güneşi gösterir. Güneş ışınları arasında spektrum değerlendirmesi; UVB(290-320nm) ışınlarının en fazla hasar verici (karsinojen) ışınlar olmakla birlikte UVA(320-400nm) ışınlarının, UVB ışınlarının hasar verici etkisini arttırdığını göstermektedir (33).

Aktinik keratozlar genellikle açık tenli insanların yaşamlarının herhangi bir evresinde güneş gören deri alanlarında birden fazla lezyon şeklinde ortaya çıkar. Uzun yıllar boyunca fazla miktarda güneş ışığına maruziyet ve güneş ışığından yetersiz korunma önemli predispozan faktörlerdir. Aktinik keratoz sıklıkla yüz, el dorsumu ve erkeklerde kafa derisinin saçsız alanında gözlenir.

Genellikle lezyonlar 1 cm'den küçüktür. Eritematöz görünümde olup birlikteliğinde sıklıkla pullanma gösterirler. Bazı aktinik keratozlar pigmentedir ve periferik yayılım gösterirler, bu durum klinik olarak lentigo malignadan ayrımı güç kılar. Bazen lezyonlar belirgin hiperkeratoz gösterir ve o zaman klinik olarak kutanöz horn görünümüne yol açar. Alt dudak vermilyon sınırında oluşan aktinik keratozun analogu olan lezyon solar keilit (aktinik keilit) olarak adlandırılır. Solar keilitte erozyone alanlar ve hiperkeratoz alanları izlenebilir (33).

Lezyonlar genellikle alt dudak yerleşimlidir. Akut aktinik keilit ve kronik aktinik keilit olarak ikiye ayrılabilir. Akut formu her yaşta, akut güneş maruziyeti sonrası, genellikle yaz aylarında alt dudakta oluşur ve genellikle yüz derisini de etkiler. Akut yüzeysel inflamasyon, ödem, kızarıklık, ciddi olgularda vezikül, bül oluşumu, konjesyon gözlenebilir. Olguların çoğu birkaç gün veya hafta içinde kendiliğinden iyileşir (25,29).

Kronik aktinik keilitin akut ataklarla ilişkisi olup olmadığı açık değildir. Ama hafif akut atakların yaygınlığı dolayısıyla kronik formlu aktinik keilit olgularının bu deneyimi geçirmiş olmaları kuvvetle muhtemeldir. Kronik aktinik keilit her mevsim mevcuttur, inatçı kuruluk ve pullanma ile seyreder (25,29).

Lezyon yavaş gelişir ve sıklıkla asemptomatiktir. En erken ortaya çıkan klinik değişiklikler düzgün yüzeyli ve lekeli soluk alanlar ile karakterize alt dudak vermilyonunda atrofidir. Vermilyon zon ve dudağın kutanöz alanı arasındaki sınırda vermilyondaki epidermizasyon derecesi ile tipik olarak belirsizlik gözlenir. Lezyon ilerledikçe pürüzlü pul pul alanlar vermilyonun kuru bölgelerinde oluşur. Kalınlaşan ve özellikle dudağın ıslak çizgisine doğru uzanım gösteren lezyonlar dudağın lökoplakili lezyonları gibi görülebilirler. Hasta kabuklu materyalin kalktığından ve birkaç gün içinde yeniden oluştuğundan bahseder (27,28).

Lezyon daha da ilerledikçe bir veya daha çok alanda kronik fokal ülserasyon gelişebilir. Bu ülserasyonlar aylarca devam eder ve sıklıkla erken skuamöz hücreli karsinomaya progresyonu akla getirir (27).

2.2.3 Histopatolojik özellikler:

Dudak vermilyonu oral mukoza ve deri arasında geçiş bölgesi olmasına rağmen kronik UV maruziyete cevap olarak deridekine benzeyen epitelyal ve konnektif doku değişiklikleri gözlenir (34,35). Aktinik keilit derinin aktinik keratozuna klinik yanı sıra histopatolojik özellikler açısından da benzerlik gösterir (25,36).

Genellikle atrofik, stratifiye skuamöz epitel ile karakterizedir. Sıklıkla artmış keratin üretimi gösterir. Ortokeratinizasyon ve parakeratinizasyon alanları hafif bir birikimden yüzeyi yoğun bir şekilde kaplayan birikimlere kadar değişen derecelerde olabilir. Değişen derecelerde epitelyal displazi ile karşılaşılabilir. Displastik epitelin altında çoğunlukla kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenir. Epitel altındaki bağ doku değişmeyerek amorf, aselüler, bazofilik değişiklik gösterir. Bu durum, elastik lifler ve kollajende UV ışık ile tetiklenen değişim, “solar (aktinik) elastoz” olarak bilinir. Aktinik keilit için en belirgin özelliktir (27,31,37). Submukozada telenjektatik damarlar da görülebilir (28,37).

Aktinik keratoz ve solar keilit skuamöz hücreli karsinomaya ilerleyebilir. Bununla birlikte skuamöz hücreli karsinoma ile aktinik keratoz arasındaki sınır net olmadığından bu transformasyonun insidansını belirlemek zordur. Aktinik keratozlu olguların %20’sinde lezyonların bir veya birkaçından skuamöz hücreli karsinoma gelişebileceği bildirilmektedir. Aktinik keilitten skuamöz hücreli karsinoma gelişimi iyi bilindiği halde insidansını belirlemek

zordur. Bunun nedeni saptanan ve çalışılan lezyonların evresi ile ilgili olarak açıklanabilir. Medikal merkezlerde aktinik keilit vakalarının %6 ila %10'undan skuamöz hücreli karsinoma geliştiği bildirilmiştir. Dudaktaki solar indüklü değişikliklerin karsinoma ilerlemesi için 20-30 senelik bir periyod olduğu tahmin edilmektedir. Skuamöz hücreli karsinoma genellikle iyi diferansiyedir, 60 yaşından önce nadiren oluşur ve oluşan karsinom tipik olarak yavaş büyür ve sadece geç bir evrede metastaz yapar (27,31,33).

Aktinik keratoz zemininde veya güneşten hasarlanmış deride gelişen skuamöz hücreli karsinomalar genellikle metastaz yapmaz. Metastazın insidansı farklı serilerde %0.5 - %3 arasında bildirilmektedir (33). Ancak dudakta vermilyon sınırında gelişen skuamöz hücreli karsinomaların %11'inde metastaz saptanmıştır (33,38).

Multifokal premalign ve malign değişiklikler sıklıkla birlikte bulunur. Schmitt ve Folsom, solar keiliti olan 13 hastada yaptıkları histolojik çalışmada doku kesitlerini 1mm aralıklarla inceleyerek toplamda 42 ayrı displazi bölgesi ve 12 karsinoma alanı bulmuşlardır (39).

Aktinik keratozlar , biyolojik olarak benign olduğundan ve çok az bir kısmı skuamöz hücreli karsinoma ilerlediğinden kutanöz skuamöz hücreli karsinomanın prekürsörü olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte histopatolojik olarak sıklıkla kalabalıklaşma gösteren atipik keratinositlerden oluşurlar. Bu sitolojik özellikler invaziv skuamöz hücreli karsinomanın atipik keratinositlerinden ayırt edilemez. Ayrıca klinik ve histopatolojik olarak prekürsör lezyonlar ve invaziv skuamöz hücreli karsinoma arasında belirgin bir sınır mevcut değildir. Tedavi edilmediği takdirde bu lezyonların derin dokulara ilerleme ve metastaz yapma potansiyelleri vardır. Bu nedenle bu lezyonların malign ve erken skuamöz hücreli karsinoma veya skuamöz hücreli karsinoma in situ olarak kabul edilmesi gerektiğini düşünenler vardır (9,40,41). Dudakta izlenen aktinik keilit te benzer klinik ve biyolojik özellikler göstermesi nedeniyle prekürsör lezyon olarak kabul görmektedir (29).

Histopatolojik olarak altı tip aktinik keratoz mevcuttur; hipertrofik, atrofik, bowenoid, akantolitik, likenoid ve pigmente. Bu altı tip arasında geçişler ve kombinasyonlar sıklıkla izlenir (33,42). Aktinik keilitlerde ise altı tip sınıflandırması literatür bilgilerinde açık değildir. Bazı çalışmalar aktinik keratoza benzer şekilde hipertrofik, atrofik, akantolitik, ülsere, likenoid, basit tip gibi alt gruplara ayırırken, aynı lezyon içinde değişen derecelerde bütün değişikliklerin bulunabilmesinden dolayı belli bir sınıflandırması, spesifik bir tipi olmadığını savunan yayınlar da mevcuttur (43,31).

Aktinik keratozun tüm tiplerinde üst dermiste genellikle büyük kısmı lenfoid hücrelerden oluşan bazen plazma hücreleri de içerebilen kronik inflamatuvar infiltrat bulunur.

Solar keilit ise derinin aktinik keratozundan daha yoğun plazma hücrelerinin baskın olduğu inflamatuvar infiltrat içerir. Üst dermis genellikle solar veya bazofilik dejenerasyon gösterdiği halde inflamasyonun kollajende rejenerasyona yol açabilmesi nedeniyle belirgin inflamatuvar reaksiyon olan alanlarda izlenmeyebilir (33).

Solar keratozdan skuamöz hücreli karsinomaya transformasyona neden olan anahtar genetik değişiklik bilinmemektedir (9). P53 mutasyonundaki farklı spektrumlar bazı p53 mutasyonlarının invaziv fenotipe neden olduğunu desteklemektedir. Ek olarak CDKN2A genindeki 9p21 bölgesinin delesyonunun skuamöz hücreli karsinoma gelişiminde korele olduğu öne sürülmüştür (44). Solar keratozlar genelde spontan olarak regrese olduğundan solar keratozda olan multipl genetik değişimler progresyondansa regresyonu indüklüyor olabilir (9).

Berhane ve arkadaşları epigenetik veya genetik bir olayın malign transformasyonu oluşturmak için gerekli olduğunu öne sürmüş ve aktinik keratozun skuamöz hücreli karsinomaya ilerleyişinin inflamatuvar cevap ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (45).

2.2.4 Tedavi ve prognoz:

Aktinik keilit ile ilgili değişikliklerin büyük kısmı geri dönüşümsüzdür, ama hastalar daha fazla hasar oluşmasını önlemek için güneş koruyuculu dudak kremleri kullanmaya teşvik edilmelidir. Sertleşmiş, kalınlaşmış, ülserasyon veya lökoplaki alanları karsinomayı ekarte etmek için biyopsi ile örneklenmelidir (27,31,29). Bu tip değişiklikler bulunmayan keilitlerin malign olma ihtimali az olmakla birlikte ülser formasyonu olmadan da skuamöz hücreli karsinoma gelişebileceğinden yakından takip edilmelidir (31,29).

Klinik olarak aşikar malign transformasyon olmayan ciddi vakalarda bir dudak shave prosedürü (vermilyonektomi) uygulanabilir. Vermilyon mukoza ortadan kaldırılır ve intraoral labial mukozadan herhangi bir parça ileriye çekilir veya yara sekonder iyileşmeye bırakılır. Bu tekniğin avantajı dokuyu süperfisyel invaziv karsinom alanlarının varlığını belirlemek açısından histolojik inceleme için korumasıdır (27).

Alternatif tedaviler CO2 veya ErbiumYAG (Er:YAG) lazer ablasyonu, elektrolesikasyon, topikal 5-florourasil, topikal umiquimod, fotodinamik terapi ve trikloroasetik asit ile kemoeksfoliasyon (kimyasal soyma)dur (27). Payne, çeşitli aktinik bloke edici ajanlarla yaptığı bir çalışmada paraaminobenzoik asit veya esterlerini içeren ajanların deri ve dudak için üst düzeyde koruma sağladığını saptamıştır (46). Uzun dönem izlem önerilir. Elbette skuamöz hücreli karsinoma tanımlandıysa , tutulan dudak ona göre tedavi edilir (27).

2.3 DUDAK KANSERLERİ

2.3.1 Genel Özellikler

Primer malign dudak tümörleri tüm malignitelerin %2.06'sını oluşturur (47). Dudak kanseri oral kavitenin en sık görülen tümörüdür, oral kavite kanserlerinin %25-%30'unu oluşturur ve kutanöz malignensilerden sonra baş boyun bölgesinin ikinci en yaygın kanseridir (2,48). Amerika Birleşik Devletleri'nde insidansı 100.000 popülasyonda 1.8'dir ve Avustralya'da erkeklerde 13.5/100.000 kadar yüksek insidanslı olduğu gözlenirken, Asya bölgelerinde nadirdir (2). Dudak kanseri, US Kasım 2007 SEER verilerine göre, erkek/kadın insidans oranı (%7.16) en yüksek ikinci kanserdir (49).

Dudak kanseri dudağın vermilyon sınırından köken alan epitelyal malignensileri ifade eder (36). En yaygın histopatolojik tip olarak skuamöz hücreli karsinoma görülmekle birlikte nadiren bazal hücreli karsinom, adenokarsinom ve malign melanom da izlenebilir (47). Dudak karsinomalarının %90'ından fazlasının skuamöz hücreli olduğu, ve %90'ının alt dudakta olduğu izlenmiştir (2,36). Oral komissür, vakaların %0.7-%6.1'inde tümör orjini olarak saptanmıştır (2). Alt dudak kanserleri vermilyon sınırdan köken alırken üst dudak kanserleri genellikle deride gelişip mukozaya yayılım gösterirler (50). Dudak kanseri en sık beyaz , erkek ve sigara içen, hayatlarının 6.ve 7. dekadlarında olan açık tenli insanlarda gözlenir (2).

2.3.2 Etyolojik Faktörler

Oral kavitenin skuamöz hücreli karsinomu ve deri skuamöz hücreli karsinomu ile karşılaştırıldığında dudak kanserinin farklı bir analitik epidemiyolojisi vardır (36,51). Dudak kanseri oluşumuna yol açabilecek potansiyel etyolojik ajanlar veya kokarsinojenler birbirinden bağımsız veya multifaktöryel olabilir ve ortaya çıkmadan önce bir takım maruziyetler gerektirir. Hastalığın gelişiminde ilişkisi olan faktörler : güneş ışığına maruziyet ve kırsal yerleşim gibi çevresel faktörler, sigara içimi gibi davranışsal faktörler ; meslek ve sosyoekonomik statü; viral enfeksiyonlar ve endojenöz faktörler olarak tanımlanmıştır (36).

Güneş ışığına maruziyet:

Etyoloji genellikle multifaktöryeldir ama güneş ışığına uzun süre maruziyetin ana rolü oynadığı düşünülmektedir (2). Dudak kanseri gelişiminde uzamış güneş ışığı maruziyetinin önemli bir risk faktörü olduğu görüşü ; açık tenli, sarışın , açık havada çalışan ve kırsal alanda yaşayan veya çalışan insanlardaki artmış hastalık insidansını gösteren gözlemler ve tümörlerin çoğunun alt dudağın güneş gören vermilyon bölgesinde olması, hastalığın yaygın olarak ikinci primer deri malignensileri ile birlikte görülmesi, coğrafik olarak güneşli

bölgelerde daha yüksek insidansının olmasından kaynaklanmaktadır. Dudak kanserinde özellikle alt dudak tutulur ve alt dudak üst dudağa göre dikkate değer ölçüde daha fazla güneş ışığı alır. Bu gözlem aktinik radyasyon ile dudak kanseri ilişkisinde destekleyici olarak da kullanılmıştır (2,36).

Dudak kanserinin kadınlarda insidansının belirgin olarak daha az olması güneşten koruyan ajanların, bakım ürünleri ve gölgelik araçlar gibi, daha sık kullanılmalarına bağlanmıştır. Bu faktörler kadınların aktinik radyasyondan daha az etkilenmelerini sağlar. Kümülatif UV maruziyeti ve dudak kanseri arasındaki pozitif ilişki uzun zamandır kabul görmektedir (36).

Bu kanserler daha koyu deri pigmenti olan bireylerde daha az görülür ve pigmentin aktinik radyasyon hasarına karşı koruyucu olduğuna inanılmaktadır. Bununla birlikte bu alanda kanser oluşum mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Subepitelyal kollajenin zaman içinde degrade olduğu kabul edilmiştir ama asıl epitelyal neoplastik transformasyon iyi anlaşılamamıştır (52).

Dudak kanserinin etyopatogenezi güneş ışığı ile ilgili kutanöz malignensiler ile benzer gibi görünmektedir. Melanoma dışı deri kanserlerinin, güneş ışığına hayat boyu kümülatif maruziyet sonucu oluştuğu düşünülmektedir. UV ışın özellikle UVB (dalga boyu 290-320nm), UVA (320-400nm)'nın da rolü olabilmesine rağmen başlıca UVB çevresel karsinojen olarak kabul edilmiştir. UV radyasyon epidermal hücrelerin DNA'sında değişiklikleri ve p53 tümör supresör gende mutasyonları indüklerken selektif olarak immün sistemi baskılar ve anormal hücreleri seçen ve yok eden normal mekanizmaları zayıflatır. Vücudun etkilenen bölgelerinde hiperkeratoz ve kabuklanma gibi nonspesifik deri lezyonlarının birlikte olması kronik solar maruziyete bağlanabilir ve dudak kanseriyle güçlü olarak ilişkilendirilmiştir. Bu gözlemler güneş ışını maruziyetinin ortak bir risk faktörü olduğunu akla getirmektedir. Bazı çalışmalarda diğer çalışmaların aksine güneş ışığının bağımsız rolü sorgulanmıştır. Birkaç çalışmada dudak ve deri kanserleri insidansları arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Böylece solar maruziyetin dudak kanseri için tek başına nedensel bir ajan olarak davranmadığı sonucu çıkarılmıştır. Dudak kanserinin, deri kanserinden daha çok solunum yolu ve üst gastrointestinal sistem kanserleriyle daha yakın ilişkide olduğu da öne sürülmektedir (36).

Güneşin hasarlayıcı etkisi histolojik olarak tümör komşuluğunda da gözlenmektedir. Lökoplaki, hiperkeratoz ve aktinik keilit sıklıkla dudak karsinomasına eşlik eder (2).

Tütün:

Geleneksel olarak tütün kullanımı özellikle pipo içimi dudak kanseriyle ilişkilendirilmiştir. Tütün ilişkili kanserlerde nitrozaminler en önemli karsinojenler olarak tanımlanmışlardır. Pipo içenlerde oluşan ısının etkisi ve pipo ağzının durumu önemlidir. Bu, pipo içenlerde dudak kanserinin tahmini göreceli riskinin diğer formlarda tütün içenlerden neden daha yüksek oranda olduğunu açıklayabilir (53). Bazı araştırmacılar pipo içenlerin daha yüksek oranda dudak kanseri riski olduğunu vurgularken diğerleri bütün tütün içimi tiplerinin özellikle fazla içmenin önemli risk faktörü olduğunu bulmuştur. Diğer çalışmalar dudak kanseri ve genel tütün kullanımı arasında farklı bir korelasyon saptamamıştır (36,51)

Sigara içimi ve dış ortam uğraşlarının kombinasyonu dudak kanseri için artmış risk faktörlerini oluşturur. Bu faktörlerin her birinin bağımsız olarak önemli etkisi de vardır. Dış ortam uğraşlarının dudak vermilyonunun rezistansını azaltarak tütünün karsinojenik etkilerine duyarlılığını arttırdığı kabul edilmiştir (36).

Viral enfeksiyonlar:

Oral skuamöz hücreli kanserlerin bazılarında virüsler rol oynar. Oral kanser oluşumu ile EBV, CMV, HSV ve HPV gibi virüsler ilişkilendirilmiştir (36,51)

Dudak kanseri etyolojisinde virüslerin rolünü sorgulayan çok az sayıda araştırma vardır. En çok sözü edilenlerden biri herpes labialis enfeksiyonudur. Dudak kanseri ve herpes labialis enfeksiyonu arasında ilişki olduğu öne sürülmüştür (36,51,54). Sigara içiminin HSV ile mukozal enfeksiyona zemin hazırladığı ve viral replikasyon kontrolünde yer alan doğal öldürücü hücrelerin aktivitesini kısmen de olsa baskıladığı düşünülmektedir. Tekrarlayan HSV enfeksiyonları geçiren sigara içicilerinin dudağın skuamöz hücreli karsinomuna daha yatkın olduğu hipotezi ortaya atılmıştır (54). Ancak bu bağlantıyı kesin olarak doğrulayan çalışma mevcut değildir (51).

Meslek :

Çiftçilik, balıkçılık gibi çeşitli açık hava işleri dudak kanseri gelişiminde önemli risk faktörlerindendir. Bu ilişki sıklıkla solar radyasyona yüksek oranda maruz kalma ile direkt olarak bağıntılıdır (51).

Famlyal ve genetik faktörler:

Oral kanserler güçlü ailesel yatkınlık gösterme eğiliminde değildir. Ancak genetik yatkınlığın, örneğin duyarlı genlerin, kromozom fragilitatesinin ve onkogen aktivasyonunun oral karsinogenezde önemli rol oynadığına dair görüşler mevcuttur. Bazı moleküler çalışmalar bu teoriyi desteklemektedir. Ancak dudak kanseri ve genetik/famlyal faktörler arasında direkt

bağ kuran veriler bulunmamaktadır (51). Asya ırkında dudak kanserinin daha az görüldüğü bildirilmektedir, ama bu düşük insidansın temeli henüz açıklanamamıştır (53).

İmmunité:

Bağıışıklık sisteminin konağı kanserlere karşı korumada önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Çoğu neoplazinin gelişiminde immün sistemdeki hasarların etkili olabileceğı bildirilmiştir. Dudak kanseri ve bireyin immunitesi ile ilgili olarak yapılan az sayıda çalışma vardır. King ve meslektaşları renal transplant hastalarında displastik ve malign dudak lezyonlarının insidansının arttığını göstermişlerdir (2,51,52,30).

Sosyoekonomik statü:

Bazı çalışmalarda sosyoekonomik statünün dudak kanseri gelişiminde önemli bir bağımsız değişken olduğu vurgulanmıştır. Bu ilişkinin sebeplerini tanımlamak için başka çalışmalar yapılması önerilmektedir (51).

Diğer sorgulanan faktörler:

Diyet ve beslenme, sistemik hastalıklar, kötü ağız hijyeni, kronik alkolizm de dudak kanserinin patogeneziyle ilişkilendirilmeye çalışılmaktadır (2,51).

2.3.3 Klinik değerlendirme:

Dudak karsinoması lokalizasyon nedeniyle kolayca farkedilen ve tanı alan lezyonlardandır. Erken evreleri sessiz olabilir. Fizik muayenede genellikle alt dudakta yerleşmiş lökoplaki alanında kabuklanma bölgesini çevreleyen indurasyon varlığı gözlenir. Daha ileri evrelerde deriyi, oral komissürü veya mandibulayı içine alan büyük kanamalı kitle olarak karşımıza çıkabilir.

Klinik tanı insizyonel biyopsi ile doğrulanır. Lezyonda histopatolojik olarak tanının teyidi yanısıra invazyon paterni ve perinöral invazyon varlığı gibi prognostik faktörlerin belirlenmesi sağlanır. Biyopsi lateral ya da derin tümör sınırını içermelidir.

Alt dudak malignitelerinin %90'ından fazlası skuamöz hücreli kanserler olmakla birlikte ayırıcı tanıda diğer iyileşmeyen ülseratif lezyonlar da akıldan çıkarılmamalıdır. Perioral bölgede ikinci sıklıkta, özellikle üst dudak lokalizasyonunda gözlenen malignite bazal hücreli karsinomadır (2).

2.3.4 Biyolojik davranış

Dudak kanseri en kolay kür elde edilebilen baş boyun kanserlerinden biridir. Erken evrede tanı alındığında 10 yıllık ortalama yaşam beklentisi %98, ve rekürrens olmaksızın yaşam beklentisi %92.5 gibi yüksek değerlerdedir. Lokalizasyon açısından klinik olarak

farkedilmesinin kolay olması bu lezyonların erken saptanmasına ve tedavi edilmesine imkan verir. Karakteristik olarak , kaldırıldığı zaman kanayan krut hikayesi ve birkaç aydan yıllara kadar geçen sürede iyileşmeyen yara farkedilmektedir. Tedavi edilmediği takdirde tümör çene derisine ve alveolar mukozaya ilerler. İlerlemiş vakalarda , mandibular kemik, ağız tabanı ve dil tutulumu olabilir. Servikal nodlara metastaz ilerlemiş lezyonlarda gelişir ve uzak metastaz gelişebilir. 1036 dudak kanserli hastadan oluşan retrospektif bir çalışmada, multideğişkenli analizler sonucu primer tümör büyüklüğü (>3cm), servikal bölgede metastaz varlığı, histolojik grade ve cerrahi sınır pozitifliği gibi pek çok prognostik faktörün azalmış yaşam beklentisi ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Primer tümör çapı arttıkça, özellikle oral komissür tutulumunda , lokal rekürrens varlığında ve tümör kalınlığı >5mm olan tümörlerde , histolojik diferansiasyon azsa ve perinöral invazyon mevcutsa servikal metastaz riskinin arttığı görülmüştür (2).

2.3.5 Yayılım ve Metastaz

Dudak kanserleri önce yüzeysel yayılıp daha sonra derin dokulara yayılım gösterirler (50). Dudak karsinomu komşu deriyi, orbikular kası ve ilerlemiş safhada bukkal mukozayı, komşu mandibula ve mental siniri invaze edebilir. Oral kanserler için boyunda nodal metastaz gösterme eğilimini belirleyen özellikler, lokalizasyon (dudak için risk düşüktür), tümör diferansiasyonu ve invazyon derinliğidir (55). Dudak kanserleri benzer histoloji ve boyuttaki intraoral kanserlerden daha az oranda servikal lenf nodu metastazı yapma eğilimindedir. Lenfatik yayılım genellikle ipsilateral lenf nodlarıdır ama orta hatta lokalize veya orta hata uzanım gösteren tümörlerde kontralateral veya bilateral lenf nodlarına metastaz olabilir (3). İlk yayılım submandibular ve submental lenf nodlarıdır ve lezyon erken tedavi edilmediyse derin servikal nodlara yayılım gösterebilir (2).

Üst dudak kanserleri, bölgesel lenf nodlarına daha erken metastaz yapar, infraparotid ve preaurikular lenf nodlarına yayılım gösterir. Komissüral lezyonların davranışı bukkal mukozadaki lezyonlara benzerdir, daha agresiftir ve parotid lenf nodlarına yayılırlar. Alt dudak tümörlerinde lezyon anaplastik değilse, metastaz geç evrede oluşur ve sıklıkla %12 ve daha az oranda bulunur. Alt dudak kanserlerinde metastaz oranı genellikle düşük olmakla birlikte metastaz potansiyelini belirleyen faktörler ; hastanın yaşı, lezyon boyutu, perinöral invazyon, histolojik grade, tümör kalınlığı ve histolojik yapısal patern olarak sayılabilir. Tümör neovaskülarizasyonu ve metastaz arasında belirgin bir ilişki yoktur (53).

Küçük bir hasta popülasyonunda mikroskopik nodal metastaz gelişir. Önemli risk faktörleri tümör ölçüleri, histolojik grade, lokal rekürrenstir. Nodal metastaz riski az diferansiye lezyonlarda %50-60 iken, iyi diferansiye karsinomlarda %5-6'dır (53).

2.3.6 Prognoz

Oral kanserler içinde en iyi prognoza sahip tümörler dudak kanserleridir (56). Aktinik keratozdan orijin alan deri tümörlerine benzer olarak aktinik keilitten köken alan dudak tümörleri de iyi prognoza sahiptir. Bu nedenle, aktinik keilit dudağın skuamöz hücreli karsinomasında hastalığın daha iyi seyrettiğini gösteren bir belirleyici olabilir. Rekürrens ise aktinik keilitten bağımsızdır ve yetersiz cerrahi tedavi ya da büyük tümörlerin başarısız tedavisi ile ilişkili olabilir. Komşuluğunda aktinik keilit olan tümörlerde metastaz oranı %10.5 iken aktinik keratozdan köken alan deri skuamöz hücreli karsinomlarında metastaz oranı %0.5 ila %3 arasında değişmektedir (57).

Dudak skuamöz hücreli karsinomaları için prognoz, primer olarak neoplazinin klinik evresine bağlıdır. Dudak kanserleri yavaş gelişen tümörlerdir ve lenf nodu metastazı varlığı %3-29 oranında bildirilmiştir. Başlangıçta level 1 lenf nodlarında lokalizedir (submental ve submandibular) ve sadece geç dönemde alt seviyelere yayılır (47,58). Tümör ölçümleri ve nodal durum önemli prognostik faktörlerdendir. Histolojik grade , 2 veya daha fazla pozitif bölgesel lenf nodu olması, lenf nodunda ekstrakapsüler yayılım ve cerrahi sınırların pozitif olması kötü prognoz göstergesidir (50).

Dudak kanserlerinde lokal rekürrens oranı %8-29 arasında değişmektedir, yüksek grade ve primer lezyonunun ölçüleri ile doğrudan orantılıdır (53).

Perinöral invazyon agresif gelişimi gösteren histolojik bir parametredir (58). Dudak kanserinde tüm metastazların %95'i tedavi sonrası ilk 5 yılda oluştuğundan hastaların en azından 5 yıl yakın izlem içerisinde olması gerekmektedir (59).

Küçük ve noninfiltratif lezyonlarda 5 yıllık sağkalım %90'lar civarındadır. Servikal lenf nodu tutulumu olan olgularda ise %25 ila %70 arasında değişmekte, ortalama olarak %50'lere kadar düşmektedir (59,47,53).

Konak immun yanıtın yetersizliği de oral kanserli hastaların yaşam süresini olumsuz yönde etkiler (60).

Oral kavite karsinomları için önemli prognostik faktörler:

1-Lokalizasyon: Alt dudak kanserleri için 5 yıllık sağ kalım oranı %90'dır.(55,58,53). Üst dudak kanserleri %58 ve komissür lezyonları %34 oranında survey gösterirler (53).

2-*Evre*: Rekürrens içermeyen 5 yıllık sağ kalım oranı bu alandaki mukozal kanserler için Evre 1 %91, Evre 2 %77.2, Evre 3 %61.2, Evre 4A %32.4, Evre 4B %25.3 ve Evre 4C %3.6 olarak saptanmıştır (55).

3-*Grade*: Bağımsız prognostik parametre olarak kabul edilmiştir. Tüm tümöre grade vermektense tümörün derin invaziv alanlarının gradelenmesinin daha iyi prognostik bilgi vereceği bildirilmektedir (55,58). Yüksek tümör grade'i ve düşük yaşam beklentisinin artmış servikal metastaz sıklığına bağlı olabileceği bildirilmiştir (53). Frierson, Grade 3 ve Grade 4 tümörlerin, metastazı olan hastalarda daha yaygın olduğunu bulmuştur (58).

4-*İnvazyon derinliği*: Ağız tabanı ve alt dudak karsinomları için önemli bir prognostik faktördür (55). Frierson ve Cooper prognoz göstergesi olarak 6mm'yi sınır kabul etmişlerdir (58).

5-*Tümör ölçüleri*: Farklı görüşler mevcuttur. Çok küçük tümörler hariç oral kanserler klinik gidiş ile korelasyon göstermez (55). Dudak kanserlerinde büyük lezyonlar daha kötü prognoza sahiptir (58,61). İki cm'den büyük lezyonlar lenf nodu metastazı oluşturma eğilimindedir (62).

6-*Desmoplastik reaksiyon*: Dudağın skuamöz hücreli karsinomasında yaygın desmoplastik reaksiyon varlığı agresif davranışın bir göstergesidir, metastaz oranı artış gösterebilir (55).

7-*Doku eozinofilisi*: Karsinomanın yoğun eozinofil infiltrasyonu içermesi olumlu bir prognostik faktördür (55).

8-*Lenf nodu tutulumu*: Doğal olarak lenf nodu metastazının olması önemli bir prognostik belirleyicidir ve evreleme sistemi için de anahtar özelliktir (55,58). Ekstrakapsüler yayılım sağ kalım oranlarında ileri derecede düşüşe neden olur (55). T1 ve T2 lezyonlarda lenf nodu metastaz oranları %5, T3 ve T4 lezyonlarda ise %67 olarak bildirilmiştir (64). Bölgesel lenf nodlarında metastaz varlığı 5 yıllık sağ kalım oranlarını %29-64 arasına ortalama %50'lere düşürür (53).

9-*DNA ploidi*: Oral karsinomların yarısı, parsiyel veya tamamen poliploid veya anöploiddir. Nondiploid tümörler diploid olanlara göre klinik olarak daha ilerlemiş evrededirler. DNA ploidi tümörün mikroskopik grade'i ve prognozu ile korelasyon gösterir. Ancak bağımsız prognostik belirleyici olup olmadığı tartışmalıdır(55). Daniele ve meslektaşları dudak karsinomlarında DNA ploidi ve lenf nodu metastazı, maksimum tümör kalınlığı arasında korelasyon saptamışlardır (63).

10-*H antijen*: Kan grubu antijeninin kaybının oral karsinomlarda artmış invazyon ve uzak metastaz yapma eğilimi ile ilişkili olduğu iddia edilmektedir.

11-*p21 geni*: Bu genin overekspresyonunun lingual skuamöz karsinomda kötü prognostik faktör olduğu bulunmuştur.

12-*3q36.3 lokus*: Bu genetik lokusun amplifikasyonunun tümör progresyonu ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu saptanmıştır (55).

13-*Rezeksiyon sınırları*: Oral kanserlerde tümör negatif cerrahi sınırlar yüksek yaşam oranları ile koreledir (60).

14-*Perinöral invazyon*: Dudak kanserlerinde perinöral invazyon varlığında 5 yıllık sağ kalım oranının %35’ler civarında olduğu bildirilmektedir (53).

15-*Yaş*: 40 yaşından genç ve 80 yaşından büyük hastalarda daha kötü prognozla seyreder (53). Genç hastalarda gelişen skuamöz hücreli karsinomun bu kimselerde immun yetersizlik veya Xeroderma Pigmentosum gibi diğer predispozan faktörlere de sahip olmaları nedeniyle daha agresif seyrettiği düşünülmektedir (59). Bir çalışmada ise radyoterapi ile tedavi edilen olgulardan 40 yaşından genç hastalarda sağ kalım %97, 40 yaşından yaşlı hastalarda ise %72 olarak saptanmıştır (64).

16-*PCNA*: Daniele ve meslektaşları PCNA ekspresyonu ve lenf nodu metastazı arasında güçlü korelasyon saptamışlardır (63).

2.3.7 Evreleme

Dudağın skuamöz hücreli karsinomunun evrelemesi “American Joint Committee on Cancer” tarafından tanımlanmıştır (Tablo 2.1 ve Tablo 2.2).

Tablo 2.1 Dudak ve Oral Kavite Kanserlerinin TNM Klasifikasyonu

<i>Primer Tümör</i>	
T _x	Primer tümör değerlendirilemedi
T ₀	Primer tümör kanıtı yok
T _{is}	Karsinoma in situ
T ₁	Tümörün en büyük çapı 2 cm'den küçüktür
T ₂	Tümörün en büyük çapı 2-4 cm arasındadır
T ₃	Tümörün en büyük çapı 4 cm'den büyüktür.
T ₄ (dudak)	Primer tümör kortikal kemik, inferior alveolar sinir, ağız tabanı, veya yüz derisini invaze eder
T _{4a} (oral kavite)	Tümör komşu yapıları (kortikal kemik, derin dil kasları, maksiller sinüs) veya yüz derisini invaze eder
T _{4b} (oral kavite)	Tümör çiğneme boşluğunu, pterygoid plates, veya kafa tabanını invaze eder ve/veya internal karotid arteri sarar.
<i>Bölgesel Lenf Nodları</i>	
N _x	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemedi
N ₀	Bölgesel lenf nodu metastazı kanıtı yok
N ₁	En büyük çapı ≤3 cm olan tek bir ipsilateral lenf nodunda metastaz
N _{2a}	En büyük çapı >3 cm ve <6 cm olan tek bir ipsilateral lenf nodunda metastaz
N _{2b}	Multipl ipsilateral lenf nodlarında metastaz, bütün nodlar <6 cm
N _{2c}	Bilateral veya kontralateral lenf nodlarında metastaz, bütün nodlar <6 cm
N ₃	En büyük çapı >6cm olan tek bir lenf nodunda metastaz
<i>Uzak Metastaz</i>	
M _x	Uzak metastazları değerlendirilemedi
M ₀	Uzak metastaz yok
M ₁	Uzak metastaz var

(American Joint Committee on Cancer: American Joint Committee on Cancer Staging Manual, 6th ed, New York, 2002, Springer) Bu tablonun hazırlanmasında Barnes L, Eveson J (eds) World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours adlı kaynaktan yararlanılmıştır.

Tablo 2.2: TNM Evrelemesi

<i>TNM Evrelemesi</i>			
Evre 0	T _{is}	N ₀	M ₀
Evre I	T ₁	N ₀	M ₀
Evre II	T ₂	N ₀	M ₀
Evre III	T ₃	N ₀	M ₀
	T ₁₋₃	N ₁	M ₀
Evre IVA	T _{4a}	N ₀	M ₀
	T _{4a}	N ₁	M ₀
	T _{1-4a}	N ₂	M ₀
Evre IVB	Herhangi T	N ₃	M ₀
	T _{4b}	Herhangi N	M ₀
Evre IVC	Herhangi T	Herhangi N	M ₁

(American Joint Committee on Cancer: American Joint Committee on Cancer Staging Manual, 6th ed, New York, 2002, Springer)

2.3.8 Tedavi

Preneoplastik lezyonları, risk faktörlerini ve dudak mukozasındaki oluşum mekanizmalarını anlamak erken tanı vermek ve doğru primer ve sekonder korunmayı uygulamak açısından önemlidir (47). Yaygın bir kanser olmakla birlikte diğer pek çok baş boyun tümöründen daha iyi kür elde edilir (65). Cerrahi tedavi seçeneklerinden biridir. Primer tümöre yaklaşımda cerrahi teknikler relatif olarak standardize edilmiştir (47).

Dudak kanserlerinde cerrahi ya da radyoterapi ile kür elde edilebilir. Yaşlı ve zayıf hastalarda elektron tedavisinin daha iyi tolere edildiği ve etkili olduğu da bildirilmektedir (48). Cerrahi ve radyoterapinin alt dudağın küçük tümörlerinin tedavilerinin düzenlenmesinde efektif etkileri vardır. Uygulanacak olan prosedürün seçimi tümör ölçüsü, multifokalite ve klinisyenin deneyimi gibi faktörler ile belirlenir. Radyoterapi genelde özellikle büyük tümörler için daha iyi kozmetik ve fonksiyonel sonuçlar getirir. Radyasyon terapisi uygulamada kontrendikasyonlar; mental sinir ve mandibula tutulumu olan büyük tümörler, genç hastalar, radyoterapi sonrası rekürrens, dudağın geri kalanında yaygın prekanseröz

değişikliklerin varlığı olarak sıralanabilir. Radyoterapi efektif bir tedavi olmasına rağmen cerrahi rezeksiyon en azından iki nedenden dolayı tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır. Histolojik tümör cerrahi sınırlarının değerlendirilmesine olanak sağlar ve kronik radyasyon sonrası gelişen fibrozis ihtimalini önler ve hastalar daha hızlı rehabilite olurlar (53).

Klinik olarak N0 olgularda elektif olarak tanımlanan modifiye radikal lenf nodu diseksiyonu yapılabileceği gibi “bekle ve gör” yaklaşımını tercih eden ve hastayı yılda iki kez gibi yakın takip altında izleyen tedavi modaliteleri de uygulanmaktadır (47).

Literatürde dudak kanserinin cerrahi tedavisi ile ilgili çok sayıda teknik bildirilmiştir ve bu durum alt dudağın rekonstrüksiyonunda ideal bir metod olmadığını göstermektedir. Genel olarak alt dudağın %60’ından fazlasının rezeksiyonunun kötü sonuçlar doğurduğu kanısına varılmıştır (47).

Bu yaygın malignitenin uygun tedavisinin hedefi, surveyi maksimize ederken tedavi ile bağıntılı fonksiyonel ve kozmetik morbiditeyi minimize etmektir (2).

2.3.9 Skuamöz Hücreli Karsinoma

Oral kavitenin skuamöz hücreli karsinomalarının yaklaşık %25-%30’u dudak yerleşimlidir. Dudak yerleşiminde de en sık tutulum yaklaşık %90 oranında alt dudaktadır. Skuamöz hücreli karsinoma üst dudakta %2-7 oranında gözlenir. Yaş ortalaması 60-70 arasındadır ve erkek hakimiyeti vardır. Klinik olarak lezyon vermilyon sınırında gelişmiş ülser veya verrüköz kabarıklık şeklindedir. Derinin skuamöz hücreli karsinomuna benzer olarak dudağın skuamöz hücreli karsinomunda ve premalign lezyonu aktinik keilitte kronik UVB maruziyeti etyolojide en önemli faktördür (34,55). Deri tutulumu gözleendiğinde lezyonun %50’sinden fazlası dudak vermilyonunda ise lezyon dudak orjinli kabul edilir (66). Neoplazilerin çoğu yüzeylelidir ve çoğu Tis, T1, T2 evredeki tümörlerdir. Üst dudak kanserleri hızlı gelişirken, alt dudak kanserleri yavaş gelişim gösterir (53).

2.3.9.1 Mikroskopik Özellikler

Skuamöz hücreli karsinom, keratinositlerin malign tümörüdür. Oral kavite mukozasından köken alan skuamöz hücreli karsinomalar deri skuamöz hücreli karsinomu epidermoid karsinom ile benzer histopatolojik özellikler gösterir. Tümörlerin çoğu fonksiyonel ve morfolojik olarak iyi diferansiyedir ve büyük miktarlarda keratin üretir (52,55).

Tümör sıklıkla displastik özellikler gösteren epitelden gelişir ve çeşitli oranlarda mitotik aktivite içeren infiltrate tabakalar ve adalar oluşturan değişik derecelerde farklılaşma gösteren skuamöz epitelden oluşur.

Tümörün, neoplazinin minör bir komponentini oluştursa bile, en az diferansiye elemana göre gradelenmesi gerektiği bildirilmektedir (3,67). Frierson ve Cooper ayırıcı özelliklerin spesimenin en derin alanlarında daha iyi izlendiğini belirtmişlerdir (58).

Alt dudak karsinomları, az sayıda istisna dışında orta veya iyi diferansiye tümörler olarak oluşur. Komşu dokular sıklıkla solar hasarın etkisi olarak elastik liflerde kayıp, glandüler elemanlarda atrofi ve epitelyal displazi ve hiperkeratoz gösterir. Frierson ve Cooper, ikisinin de metastaz potansiyeli için prognostik anlamı olan, 4 evreli sitolojik gradeleme sistemi ve 3 parçadan oluşan yapısal patern göstergesi geliştirmiştir (58).

Frierson'ın alt dudak kanserleri için geliştirdiği gradeleme sistemi şu şekildedir :

Grade1 :invaziv tümör adalarının periferinde birkaç tabaka halinde belirgin nükleer pleomorfizm göstermeyen bazaloid hücreler vardır, lezyonun kalan kısmı matür, iyi keratinize düzenli stratifikasyon gösteren skuamöz hücrelerden oluşmuştur.

Grade2 :tümör adalarının %50'sinden azında atipik bazaloid hücrelerden oluşan birçok periferik tabaka mevcuttur. Adalar küçük, düzleşmiş nükleuslu matür skuamöz hücreler ve keratin inci formasyonunu da içeren belirgin keratinizasyondan oluşmuştur.

Grade3 :tümör adalarının %50'sinden fazlasında multipl tabakalar halinde pleomorfik bazaloid ve skuamöz hücreler gözlenir. Pleomorfik nükleuslar çoğu adalar boyunca mevcuttur.

Grade4 :belirgin nükleer atipi ve keratinizasyon varsa çok azdır. Hücreler yuvarlak , polihedral veya iğsi olup eozinofilikten şeffaf sitoplazmalıya kadar uzanım gösterir (53).

Deri skuamöz hücreli karsinomlarında diferansiasyon keratinizasyon üzerine kurulmuştur ve bu tümörleri iyi diferansiye, orta derece diferansiye ve az diferansiye olarak sınıflandırmak uygun olur. Alternatif olarak Broders sistemi de sınıflandırma amacı ile kullanılmaktadır (67). Bu sistemde iyi diferansiasyon alanlarının oranına bakılarak sınıflandırma yapılmıştır.

Grade 1: Lezyonun % 75 veya daha fazlası iyi diferansiyedir

Grade 2: % 50 veya daha fazlası iyi diferansiyedir

Grade 3: %25- %50'si iyi diferansiyedir

Grade 4: % 25'ten azı iyi diferansiyedir.

Oral skuamöz hücreli kanserler için gradeleme sistemi; Broders gradeleme sistemi temel alınarak, keratinizasyon derecesinin, selüler ve nükleer pleomorfizm ve mitotik

aktivitenin subjektif değeriendirilmesi esasına dayanır. İyi diferansiye(grade 1) tümörler kolayca tanınan ve genellikle keratin incileri, keratin kistleri ve dağınık tek hücre keratinizasyonu gösteren, büyük miktarda keratinizasyon içeren skuamöz epitel ile karakterizedir. Epitel belirgin olarak skuamöz özelliktedir ve intersellüler köprüleri kolaylıkla görülür. Tümörlerde minimal pleomorfizm ve az sayıda mitotik figür izlenir.

Orta derecede diferansiye(grade 2) tümörlerde skuamöz epitel kökeni daha az olarak belirgindir ve yapısal disorganizasyon gösterirler. İyi diferansiye tümörlerle karşılaştırıldığında nükleer ve sitoplazmik pleomorfizm daha fazla göze çarpar, anormal formları da içeren mitotik figürler daha sık izlenir. Genellikle keratin formasyonu daha az görülür.

Az diferansiye(grade 3) tümörlerde ayırıcı tanıda zorluğa neden olabilecek şekilde az miktarda intersellüler köprüler veya küçük keratinizasyon odakları izlenir. Atipik mitozlar, selüler ve nükleer pleomorfizm belirgindir (3).

İnvazyon solid tabakalar, kordonlar veya adalar şeklinde ve bazen tek tek dağılmış tümör hücreleri formunda olabilir. Skuamöz hücreli karsinomanın adalar şeklindeki invazyonu sadece bazal membranın hemen altındaki bağ dokunun en yüzeysel alanlarını içeriyorsa ‘mikroinvaziv skuamöz hücreli karsinom’ terimi kullanılabilir (3).

Tümörlere sıklıkla T lenfositlerden baskın yoğun kronik inflamatuvar hücre infiltratı eşlik eder. Bazen stromal desmoplastik reaksiyon da görülebilir. Doğal öldürücü hücreler, mast hücreleri, B lenfositler, plazma hücreleri, makrofajlar sıklıkla mevcuttur. İltihabi hücre infiltrasyonu yoğun olduğunda bazen lenfoepitelyal lezyonu taklit edebilir. B veya T lenfositlerde klonalitesi ve EBV infeksiyon kanıtının bulunmaması ayırıcı tanıda yardımcı olur. Bu fenomen muhtemelen tümöre karşı lokal immün cevabı göstermektedir. Bazen eozinofiller çok sayıda olabilir (67,3,50).

Oral kavite tümörlerinin WHO klasifikasyonu Tablo 2.3’te gösterilmektedir (50).

Tablo 2.3. Oral Kavite ve Orofarinks Tümörlerinin Klasifikasyonu (WHO,2005)

MALİGN EPİTELYAL TÜMÖRLER

Skuamöz hücreli karsinoma

Verrüköz karsinoma

Bazaloid skuamöz hücreli karsinoma

Papiller skuamöz hücreli karsinoma

İgşi hücreli karsinoma

Akantolitik skuamöz hücreli karsinoma

Adenoskuamöz karsinoma

Karsinoma kunikulatum

Lenfoepitelyal karsinoma

EPİTELYAL PREKÜRSÖR LEZYONLAR**BENİGN EPİTELYAL TÜMÖRLER**

Papillomlar

Skuamöz hücreli papillom ve verruka vulgaris

Kondiloma akuminatum

Fokal epitelyal hiperplazi

Granuler hücreli tümör

Keratoakantom

TÜKRÜK BEZİ TÜMÖRLERİ

Tükrük bezi karsinomaları

Asinik hücreli karsinom

Mukoepidermoid karsinom

Adenoid kistik karsinom

Polimorf düşük gradeli karsinom

Bazal hücreli adenokarsinom

Epitelyal-myoepitelyal karsinom

Berrak hücreli karsinom

Kistadenokarsinom

Müsinöz adenokarsinom

Onkositik karsinom

Salivary dukt karsinom

Myoepitelyal karsinom

Karsinoma ex pleomorfik adenom

Tükrük bezi adenomları

Pleomorfik adenom

Myoepitelyoma

Bazal hücreli adenom

Kanaliküler adenom

Dukt papillom

Kistadenom

YUMUŞAK DOKU TÜMÖRLERİ

Kaposi sarkom

Lenfanjiom

Fokal oral müsinozis

Konjenital granüler hücreli epulis

HEMATOLENFOİD TÜMÖRLER

MUKOZAL MALİGN MELANOM

SEKONDER TÜMÖRLER

Bu tablonun hazırlanmasında Barnes L, Eveson J (eds) World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours adlı kaynaktan yararlanılmıştır.

2.3.9.2 Diğer Histopatolojik Varyantlar

Dudak karsinomlarının lokalizasyonları nedeniyle, berrak hücreli skuamöz karsinoma, desmoplastik skuamöz karsinoma, psödoasküler skuamöz karsinoma, mukoepidermoid karsinoma gibi derinin skuamöz hücreli karsinom varyantları yanısıra bazal hücreli karsinoma gibi kutanöz malignansileri, rabdomyosarkom, malign fibröz histiyositom, leiomyosarkom gibi nadir tümörleri de içerebildiği literatür bilgileri eşliğinde bildirilmiştir (67,68,69,70,32).

Verrüköz Karsinoma (Ackerman's tumor)

Verrüköz karsinoma (Ackerman's tümör) çok yaygın olmayan bir tümördür ve tüm olguların %75'i oral kavitede oluşur. Oral kavite klasik yerleşim yeri olmakla birlikte larinks, nazal kavite, özefagus, anogenital bölge, vulva ve deri gibi lokalizasyonlarda da bildirilmiştir. Ekzofitik, verrüköz görünümde, yavaş büyüyen ve itici sınırlara sahip bir skuamöz hücreli karsinoma varyantıdır (50,55). Oral kavitede en sık gözlendiği yer bukkal mukoza ve alt gingiva olmakla birlikte dudakta da gözlenmektedir (55,71). Oral tip verrüköz karsinomlar genellikle yavaş büyürler ve düşük metastaz insidansı vardır. Oral verrüköz karsinoma için risk faktörleri kronik inflamasyon veya irritasyon, betel lokması çiğneme, sigara içme ve HPV enfeksiyonudur (71,50). Genellikle yaşlı erkeklerde gözlenir. Tekrarlama eğiliminin yaygın olup metastazların nadir olması açısından önemlidir. Hibrid (verrüköz-skuamöz) tümörlerde nadiren metastaz gözlenebilir ve saf verrüköz karsinomlara göre daha fazla tekrarlama riskine sahiptir (55,71,67,50,72).

Verrüköz karsinom alttaki dokulara doğru büyüyerek derinlere penetre olan belirgin keratinizasyon gösteren iyi diferansiye skuamöz epitelden kaynaklanır. Skuamöz hücreli karsinomun infiltratif büyüme paterninin tersine verrüköz karsinomda endofitik büyüme paterni mevcuttur. Hücresel atipi minimaldir, mitotik aktivite de oldukça azdır. Uygun cerrahi

tedavi sonrası 5 yıllık hastalıksız sağ kalım %80-90 civarındadır. Mortalite metastatik yayılımdan ziyade lokal invazyon nedeniyledir (50,72).

Bazaloid Skuamöz Hücreli Karsinoma

Oral kavitede çok sık gözlenmeyen, yüksek gradeli, bazaloid ve skuamöz komponentlerden oluşan agresif bir skuamöz hücreli karsinoma varyantıdır. Belirgin skuamöz diferansiyasyon gösteren alanlar kalın bazal membran ve periferik palizadlanma gösteren solid tümör adaları ile karışmış görünümündedir. Bazaloid skuamöz hücreli karsinomu konvansiyonel skuamöz hücreli karsinomadan ayıran özellikler, PAS ve Alcian Blue pozitif materyal içeren küçük kistik boşluklar ve stromal hyalinizasyondur. Komedo tip nekroz sıklıkla saptanır. Ayırıcı tanıda nöroendokrin karsinom, adenoid kistik karsinom ve adenoskuamöz karsinom ekarte edilmelidir. Hızlı büyüyen, agresif, tanı esnasında ileri evrede kötü prognozlu tümörlerdir (50,55).

Papiller Skuamöz Hücreli Karsinoma

Papiller skuamöz hücreli karsinoma ekzofitik, papiller gelişim ve iyi prognoz gösteren farklı bir skuamöz hücreli karsinoma varyantıdır (50). Tümörde papiller büyüme paterni baskındır. Papillalar neoplastik, immatür bazaloid hücreler veya pleomorfik hücreler ile döşeli ince fibrovasküler korlara sahiptir. Nekroz ve hemoraji odağı sıklıkla izlenir. Oral kavite ve orofarinkste oldukça nadir gözlenir.

Ayırıcı tanıda skuamöz papillom, verrüköz karsinom ve ekzofitik skuamöz hücreli karsinoma akla gelmelidir (50).

İğsi Hücreli Karsinoma

İğsi hücreli karsinoma; in situ ve/veya invaziv bileşeni olan skuamöz hücreli karsinom ve mezenkimal görünümlü ama epitelyal orjinli malign iğsi hücreli komponentten oluşan bifazik bir tümördür (50). Bu lezyonlar çoğunlukla alt dudak, dil ve alveolar sırtta oluşmakla birlikte oral kavitenin diğer alanlarında da gözlenirler ve ülser, polipoid, ekzofitik veya endofitik gelişim gösterebilirler (55,73).

İğsi hücreli komponent genellikle tümörün büyük bir kısmını oluşturur. Sarkoma benzeri komponent malign fibröz histiyositoma veya fibrosarkoma benzerlik gösterebilir. Tanı için iğsi hücreler ve skuamöz karsinoma in situ veya invaziv skuamöz hücreli karsinoma alanını tanımlamak gerekir. skuamöz hücreli karsinoma komponenti belirgin değilse iğsi hücrelerde epitelyal diferansiyasyon varlığı aranmalıdır (50,55). Bazen sarkoma benzeri oluşum açıkça belli olan skuamöz hücreli karsinoma alanları ile birbirine karışır, oral kavitede başka bir yerdeki skuamöz hücreli karsinoma ile ilişkili olabilir veya orijinali skuamöz hücreli karsinoma olan lezyonun rekürrensi olabilir. Bu bulgular;

immunohistokimyasal, elektron mikroskopik ve moleküler veriler eşliğinde sarkoma benzeri komponentin , başlangıçta epitelyal olan neoplazinin metaplastik değişimini tanımladığını gösterir (55).

İmmunohistokimyasal çalışmalarda sıklıkla keratin ve EMA ekspresyonu en azından fokal alanda saptanır. Bazen Vimentin, Desmin, SMA ,Kas Spesifik Aktinin fokal pozitifliği izlenir. Nodal veya distal metastazları tamamen karsinomatöz, primer neoplazideki gibi mikst görünümde olabilir veya nadiren tamamiyle sarkoma benzeri elemanlardan oluşabilir. Prognoz invazyon derinliği ile yakın ilişki içindedir ve aynı evre ve kalınlıktaki sıradan skuamöz hücreli karsinomadan önemli ölçüde farklı değildir (50,55,67).

Akantolitik Skuamöz hücreli karsinoma

Skuamöz hücreli karsinomun çok da sık gözlenmeyen bir histopatolojik varyantıdır. Oral bölgede en sık gözleendiği yer dudaklardır. Derideki eşdeğerlerine benzer olarak akantolitik solar keratoz ile ilişkilidir ve muhtemelen aktinik radyasyon ile indüklenir. Histolojik olarak tümör adalarında akantolitik odaklar olan skuamöz hücreli karsinoma alanlarından oluşur. Akantoliz nedeniyle psödoglandüler veya alveolar görünüm sergilerler. Akantolitik skuamöz hücreli karsinoma Pansitokeratin ve EMA ile pozitif boyanırken CEA ile negatif boyanır. Vimentinin de koeksprese olduğu bazı örnekler de gözlenmiştir (50,52,55,67).

Adenoskuamöz Karsinom

Bu nadir, agresif neoplazi yüzey epitelinden kaynaklanır ve hem skuamöz hücreli karsinoma hem de gerçek glandüler farklılaşma gösteren alanlardan oluşur. Histolojik olarak adenoskuamöz karsinoma yüzey epitelinden multifokal olarak gelişmiş konvansiyonel invaziv skuamöz hücreli karsinoma alanları ile karakterizedir. Adenokarsinomatöz komponent tümörün derin alanlarında gözlenir (50,55,67). Müsikarmen veya Alcian blue gibi müsin boyaları ve CEA ile yapılan immunohistokimya ile glandüler diferansiyasyon alanları ortaya çıkar. İmmunohistokimyasal olarak glandüler alanlar CK7 pozitif, CK20 negatif olarak boyanırlar (50).

Tümör ; akantolitik skuamöz hücreli karsinoma, serömüköz tükrük bezlerini infiltre eden skuamöz hücreli karsinoma ve mukoepidermoid karsinoma yayılım veya metastazından ayırdedilmelir (50).

Karsinoma kunikulatum(epitelyoma kunikulatum)

Oral kanserin oldukça nadir bir varyantıdır. Ayakta gözlenen ve kemiği infiltre eden tümöre benzer özellikler sergiler. Oral tümörlerde kemiğe doğru ilerleyen içi keratin dolu kriptler ve proliferatif stratifiye skuamöz epitel gözlenir. Ama malignensiye ait belirgin

sitolojik özellikler yoktur. Biyopsi ile tanı vermek güçtür ve radyolojik ve klinik işbirliği gereklidir (50).

Desmoplastik Skuamöz Hücreli Karsinoma

Nadir ama klinik açıdan önemli bir varyanttır. İnvaziv tümörlerin yaklaşık % 7'sini oluşturur, artmış lokal tekrarlama ve metastaz oranları ile karakterizedir. İleri yaştaki kişiler özellikle erkeklerde görülür. Güneş gören deride, baş-boyun bölgesinde daha sık gözlenir. Dudakta gözlenme insidansı skuamöz hücreli karsinomanın diğer subtipleri ile kıyaslıgında daha az sıklıktadır. Tümörler daha ileri evrede ve daha kalın olma eğilimindedir (67,74).

Histolojik olarak bu varyant yoğun desmoplastik stromal reaksiyon ile çevrelenmiş yuvalar ve kordonlar şeklinde gelişim gösteren tümör agregatlarından oluşur. Selüler pleomorfizm ve perinöral invazyon sık saptanan bulgulardır (67).

2.3.10 Moleküler ve Genetik Özellikler

Oral skuamöz hücreli karsinomada tanımlanan en yaygın moleküler ve genetik değişiklikler p16(%80), p53(%50), siklin D1(%30), p63 (%30), PTEN (%10), Rb ve EGFR de gözlenmektedir (55).

2.4 KARSİNOGENEZ

Kanser ; hücre büyüme siklusu veya hücre hasarını onaran mekanizmalar veya disfonksiyonel hücreleri elimine etmede bozukluk sonucu oluşan düzensiz hücre proliferasyonudur. Kromozomal(genetik) hasar bu düzenleyici süreçleri transkribe proteinler yoluyla etkiler. Onkogenlerin artmış fonksiyonları veya tümör supresör genlerin veya ürünlerinin azalmış fonksiyonları ya da artmış telomeraz aktivite karsinogenezis ile bağlantılıdır (75).

Hanahan ve Weinberg, bir hücrenin veya hücre grubunun büyüme, invazyon ve metastaz yapabilmesi için yani kanser haline gelebilmesi için 6 önemli özellik tanımlamışlardır (76).

- Büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik
- Büyüme inhibe edici sinyallere duyarsızlık
- Apoptozdan kaçınma
- Sınırsız çoğalma potansiyeli
- Angiogenezis

- Doku invazyonu ve metastaz

Kanserin temelini genetik hasar oluşturur. Bunların bir kısmı germline mutasyonlar olabilir ama çoğu sadece neoplastik hücrelerde gelişen somatik mutasyonlardır. Proto-onkogenleri, tümör supresör genleri veya DNA tamir enzimlerini etkileyen mutasyonlar neoplastik transformasyona yol açabilir (75). Tümörögenizde genetik değişikliklerden başka epigenetik mekanizmalar da önemli rol oynar (77,78). Metilasyon ile oluşan epigenetik değişiklikler, DNA sekansında değişiklik yapmayan gen modifikasyonları olarak tanımlanmıştır (77). Tümör supresör genler veya hücre siklus regülatörlerinin (p14,p16,Rb,p73 gibi) metilasyonu değişik tümör antitelerinde tümörögeniz ile ilişkilendirilmiştir. Baş boyun skuamöz hücreli kanserleri için p16INK4A promoter metilasyonu ve somatik değişiklikler, karsinogenezde major faktörler olarak tanımlanmıştır (77,79).

Multisellüler organizmalar, uygun olmayan büyüme sinyalleri ile karşılaştıklarında, hücreler bireysel homeostatik savunma mekanizmalarıyla tümörögenizden korunurlar. Bu savunma, hücreye, dengesiz proliferasyona karşı koruyan alternatif yıkım olanakları sağlar: bunlar, apoptozis ve senesens olarak adlandırılan 2 temel hücrel mekanizmadır (80,81). Apoptoz doku kaybı ile sonlanır ve başka hücre proliferasyon dizisini harekete geçirebilirken, senesens; hücrelerin başka bölünme yeteneği olmamasına rağmen intakt ve metabolik olarak yaşayabilir kalmasını sağlar. Tümörler; hücreler bu intrinsek savunma mekanizmalarını kaybettiklerinde ya da duyarsızlaştıklarında ortaya çıkarlar (80). Rb ve p53 yollarındaki hücre siklus düzenleyicileri hücrel yaşlanma programını sürdüren “gate keepers” kapı bekçileridir (80,81). Rb ve p53 yollarında görev alan regülatör proteinler siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitör (CDKI) leridir. Hücrel yaşlanma sürecinde özellikle p16, p14 ve p15’in önemli oldukları saptanmıştır (82).

2.4.1 Oral ve Baş Boyun Kanserinde Kromozomal Aberasyonlar

Oral skuamöz hücreli karsinoma gelişimi; 3p, 9p, 11q, 13q ve 17p kromozomlarındaki heterozigosite kaybı ve allelik imbalansı içeren çok basamaklı bir süreçtir (5). Genel olarak baş boyun skuamöz hücreli karsinomalarının ortak bir premalign projenitörden ve onu izleyen kümülatif genetik aberasyonlarla ilişkili klonal popülasyonun aşırı çoğalması ve invaziv maligniteye fenotipik ilerlemesinden kaynaklandığı kabul edilmektedir (6). Bu genetik değişiklikler p16, p53, cyclin D1, p14, FHIT, RASSF1A, EGFR ve Rb içeren çok sayıda tümör supresör genin inaktivasyonu ve proto-onkogenin aktivasyonu sonucu oluşmaktadır (7). Baş boyun kanserlerinin %70-80’inde 9p21 kaybı bulunmaktadır ve

bu baş boyun skuamöz hücreli karsinomalarında ve skuamöz displazide en sık görülen genetik değişikliktir (6). Bunu sırasıyla , tümör supresör genlerin henüz tam olarak tanımlanmadığı 3p, özellikle 3p24, 3p21.3 ve 3p14, p53 geninin kodlandığı 17p kromozomlarında heterozigosite kaybı, p53 mutasyonu, 11q ve 13q kromozomlarındaki heterozigosite kaybı izlemektedir (7,75). Diğer pekçok tümör supresör genler olabileceği gibi hücre sinyaliyle ilişkili genler, onkogenlerin overekspresyonu, özellikle kromozom 11(P-RAD,Int-2,hst-1 ve bcl-1) ve 17(ras) baş boyun skuamöz hücreli karsinomunun karsinogeneze dahil edilmiştir. Telomeraz aktivitesinde artış olduğu da saptanmıştır(75).

Yukarıdaki değişikliklerinin çoğunun potansiyel olarak malign olan displastik lezyonlarda da saptanması, displazinin maligniteye ilerleyebileceği görüşüne destek vermektedir (75).

2.5 CDKN2A (INK4a/ARF) lokusu

9p21 kromozomu üzerindeki CDKN2A lokusu, insan kanserlerinde p53'ten sonra ikinci en sık değişikliğe uğrayan gen lokusudur (15). Kromozom 9p21'de lokalize INK4/ARF lokusu , fonksiyon kaybının çok sayıda insan kanserinin patogenezi ile ilişkili olduğu bilinen p15INK4b, p16INK4a ve p14ARF tümör supresör proteinlerini kodlar (16). İnsan kanser genetiği ve insan kanser hücre dizilerinde yapılan çalışmalar pek çok malignenside INK4a inaktivasyonunun merkezi bir rolü olduğunu işaret etmektedir. İnsan kanserlerinde ARF inaktivasyonunun daha az sıklıkta olması , tümör supresyonunda bu faktörün daha az güçlü katkısı olduğunu akla getirmektedir (16).

INK4a (siklin bağımlı kinaz 4 inhibitörü) ve ARF (alternative reading frame) tümör supresör genleri kromozom 9p21'in aynı 30 kb'lık bölgesinde lokalizedir (83). Bu değişik lokus ayrı promoterlerden oluşur ve transkriptler birinci eksonları farklı (alfa ve beta), ikinci ve üçüncü eksonları ortak olan "reading frame"leri de ayrı olan bu promoterlerden üretilir (16). Sonuç olarak bu transkriptlerden kodlanan proteinler, p16^{INK4a} ve p14^{ARF} (p19^{Arf} farede) farklıdır ve aminoasid homolojileri yoktur. Bu lokusun karmaşıklığına ek olarak INK4b olarak adlandırılan yakın bir INK4a homologu, INK4a/ARF'ye fiziksel olarak çok yakında (<8kb)oturur (16).

p16^{INK4a} ve p14^{ARF} proteinlerinin her ikisi de antiproliferatif biyolojik aktiviteye sahiptirler ve dolaylı olarak Retinoblastom (Rb) proteini ve p53 transkripsiyon faktörün aktivitelerine etki ederler (84). Bu nedenle p16^{INK4a} ve p14^{ARF}'nin fonksiyonel kaybı ile neticelenen genetik ve epigenetik değişiklikler sonuç olarak inhibe edilemeyen hücre büyümesi ve proliferasyonuna yol açar (85).

2.5.1 p16^{INK4a}

p16^{INK4a}, hücre siklus regülatörlerinden siklin bağımlı kinaz (CDK4/6) inhibitör ailesinin (p15INK4b, p18INK4c, p19INK4d ile birlikte) bir üyesidir, ve CDK4 ve CDK6'nın D-tip siklinlerle bir kompleks oluşturmasını bloke etmede görev alır. p16^{INK4a}, siklin D-CDK4/6 kompleksinin Rb'ü fosforile etme yeteneğini inhibe ederek hücre siklusunun geç G1 fazında durmasına yol açar. Hipofosforile Rb ailesi proteinleri (Rb, p107, p130) E2F transkripsiyon faktörüne bağlı kalmayı sürdürür ve hücre siklusunun G1'den S fazına geçmesi için gerekli olan genlerin transkripsiyonunu önler (16,17).

p16^{INK4a} in vivo şartlarda değişken bir ekspresyon paterni gösterir, embriyonik gelişim sırasında tüm dokularda ekspresyonu az veya saptanamazken, sonrasında yaş bağımlı bir biçimde belirgin olarak artar ve yaşam süreci boyunca pek çok dokuda gösterilebilir. p16^{INK4a} ekspresyonunu uyaran sinyaller, tam olarak açığa çıkarılamamıştır; bununla birlikte uyarım in vivo da onkogenik ve inflamatuvar sinyallerle ilişkilendirilmiş ve in vitro uyaran gelişiminde yüksek oksijen gerilimi gibi hücresel stresler ile bağımlı gibi görünmektedir. Moleküler seviyede, in vitro olarak aktive Ras'ın p16^{INK4a} ekspresyonunu belirgin olarak uyardığı gösterilmiştir. INK4b, INK4a'ya yakın sekans homolojisi gösterir ve CDK4/6 aktivitesini düzenlemede özdeş bir fonksiyon paylaşır ama in vivo ve in vitro şartlarda farklı bir ekspresyon paternine sahiptir. Özellikle INK4b yaşlanma sürecinde indüklenmez ve in vitro şartlarda TGF- β sinyali ile aktive olup Myc ile baskılanır (16).

p16^{INK4a} ekspresyon kaybı, oral premalign lezyonlar ve oral kavite tümörlerinde gözlenmiştir (86,87). p16 mRNA ve protein birikimi, hücresel yaşlanma, Ras onkogenik hiperaktivitesi ve Rb inaktivasyonu sonucu oluşur (88).

İnsan p16^{INK4a} geni 1994'te MTS1 (multiple tümör supresör 1) olarak tanımlanmıştır ve bugüne kadar p16^{INK4a} geninde mutasyonlar çeşitli insan malignansilerinde gösterilmiştir (83). Çok sayıda çalışmada melanoma, mezotelyoma, osteosarkoma, renal hücreli karsinoma, özefagus, akciğer, pankreas, baş boyun, meme, beyin ve over kanseri gibi çeşitli kanserlerde p16^{INK4a} delesyonu yüksek sıklıkta saptanmıştır (89). Bu tümörlerde p16^{INK4a}'nın sık inaktivasyonu p16 kaybının seçici hücresel büyüme avantajını sağladığını akla getirmektedir. p16^{INK4a}'nın tümör supresör aktivitesi CDK4 ve CDK6'yı bağlayan biyokimyasal özelliğine ve hücre siklusunun ilerlemesi için Rb proteini fosforilasyonu için gerekli siklinD/CDK enzim kompleksinin katalitik aktivitesini inhibe etmesine bağlanmıştır (90). Kanserlerde p16^{INK4a}'nın sık inaktivasyonu p16^{INK4a}'nın sıkı regülasyonunun hücre büyümesini sürdürmek için gerekli olduğunu düşündürmektedir. Homozigot delesyon, ve inaktive edici mutasyonlara

ek olarak p16^{INK4a} promoterin uygunsuz metilasyonu genin susturulmasında ana mekanizmalardan biridir (90). 5'CpG adalarının metilasyonu genel olarak transkripsiyonel represyonun önemli bir mekanizmasıdır ve bu kanıt p16^{INK4a} promoter metilasyonunun tümörögenizde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. p16^{INK4a}'nın 5'CpG adalarının metilasyonu baş boyun, meme, prostat, akciğer, kolon, özefagus ve mesane kanserlerinde tanımlanmış bu kanserlerde komplet transkripsiyonel blok ile ilişkilendirilmiştir (77, 90).

p16^{INK4a} seviyesinde artma yaşlanmış hücrelerde gözlenmiştir ve bu olay p16^{INK4a}'nın bu kalıcı büyüme durmasından sorumlu olduğunu akla getirmektedir. p16^{INK4a} overekspresyonu hücrelerde replikatif senesensin bir karakteristiği olan senesens ilişkili beta galaktozidazı (SA-b-gal) indükler. Ayrıca hücreler immortalizasyon kazandığında p16^{INK4a} ekspresyonu kaybolur (90). Son çalışmalar p16^{INK4a}'nın hücre adhezyon kaybı, hücre yayılımı ve angiogenezde rolü olduğunu göstermiştir. VEGF angiogenezde pivotal bir medyatördür ve p16^{INK4a} overekspresyonunun VEGF ekspresyonunu önemli derecede azaltarak tümör angiogenezini inhibe ettiği glioma hücrelerinde gösterilmiştir (91).

INK4A lokusunda meydana gelen delesyonların ARF'yi de hedef aldığını ve sadece bazı nokta mutasyonların ARF fonksiyonunu etkilemeden p16^{INK4a}'yı etkilediğini belirtmekte fayda vardır (92).

2.5.2 p14^{ARF}

ARF, INK4A/ARF tümör supresör lokusta alternatif bir transkript olarak tanımlanmıştır (insanlarda p14^{ARF}, farelerde p19^{Arf} olarak da bilinir). İlk eksonları farklı olduğundan ARF ve p16^{INK4a} farklı proteinler üretirler. Bu lokusu etkileyen değişiklikler insan kanserlerinde yaygın olarak gözlenirler ve sıklıkla p16^{INK4a} ve p14^{ARF}'nin her ikisi birden etkilenebilir. Melanomaya yatkın ailelerde bu değişikliklerin %20-40 oranında kalıtsal olarak saptandığı bildirilmektedir (93).

İnsan ve fare ARF proteinleri argininden zengin, hidrofobik proteinlerdir. İnsan proteini 132 aa'den oluşur ve 13,902 Da moleküler ağırlığa sahiptir (94). ARF normal dokuların çoğunda anlamlı düzeyde eksprese olmamakla birlikte , onkogenlerin mutasyonel aktivasyonları veya overekspresyonları sonucu oluşan anormal, sürekli ve artmış seviyelerde mitojenik sinyaller ARF'nin transkripsiyonunu uyarırlar (95).

p14^{ARF} onkojenik stres durumunda p53 yolağının önemli bir düzenleyicisidir (16). ARF proteini p53'ün negatif regülatörü MDM2'ye direkt olarak bağlanır. MDM2, p53 cevabını sonlandırmada anahtar rolü oynar (96). ARF, MDM2'yi inaktive ederek , p53 bağımlı transkripsiyonel bir program başlatır ve böylece G1 fazında duraklama ya da

apoptoza yol açar. ARF proteini hücrelerin nükleolusunda birikir ve MDM2 ile bağlanarak nükleoplazmik p53'ün MDM2 aracılı yıkımını önler. ARF'nin nükleoplazmaya dağılımı da MDM2 ile etkileşimini ve p53 bağımlı büyüme supresyonu aktivitesini de artırır. MDM2'ye bağlanan ARF aynı zamanda MDM2'nin E3 ubiquitin protein ligaz aktivitesini antagonize ederek , p53'ü stabilize eder, “turn-over”ını önler ve transkripsiyonel aktivitesini artırır (84,93,94,95).

Bu üç proteinin ayrı fonksiyonları olması yolağın bozulmasının ARF veya p53 inaktivasyonu ile ya da MDM2'nin overekspresyonu ile oluşabileceğini göstermektedir (84).

ARF'nin p53'ten bağımsız etkilerini araştırırken çok sayıda ARF ile etkileşim gösteren başka proteinler tanımlanmıştır ancak bu ARF etkileşimlerinin ARF'nin tümör supresör fonksiyonu üzerindeki biyolojik önemi henüz açıklanamamıştır (94).

ARF kısmen Rb-E2F kompleksleri ile de düzenlenir, ve bu durum p16^{INK4a} ve p14^{ARF} fonksiyonları arasında bir bağlantı sağlar (95,97,98). İntakt bir ARF-MDM2-p53 yolağı içeren hücreler onkogenik Ras uyarısına cevap olarak zamanından önce yaşlanırlar veya dramatik olarak zorunlu myc ekspresyonuna karşı apoptotik bir cevap sergilerler. ARF veya p53'ten yoksun hücrelerde bu cevaplar azalır. ARF veya p53 fonksiyonu kaybı veya MDM2 overekspresyonu bu tip hücre otonom tümör denetimini iptal edebilir ve kansere büyük ölçüde artmış yatkinlıkla sonuçlanır (95).

2.6 p53

p53 geni (*TP53*), kromozom 17p13.1 üzerinde lokalize bir tümör supresör gendir ve 393 aa lik nükleer protein kodlar (99,100,101). *TP53* ilki kodlama yapmayan 11 eksondan oluşur (100).

p53 proteini çok sayıda fonksiyonel bölgeden oluşur. Transaktivasyon bölgesi (TA) amino terminal bölgede lokalizedir ve hem transkripsiyonel aktiviteye hem de MDM2 bağlanmasına aracılık eder. Prolinden zengin bölge (PRD) TA bölgesine komşudur ve SH-3 içeren proteinlerle etkileşim için önemlidir. p53 proteininin santral alanında DNA bağlayıcı bölge (DBD) sekans spesifik bir yolla nükleer DNA'ya bağlanır ve bu bölge tümör hücrelerinde en sık mutasyona uğrayan yerdir. PRD ve DBD ile birlikte olan 21 aa'lık bir sekans , MDM2 ve HPV E6 ile p53 degradasyonunda önemlidir. P53'ün karboksi terminal ucunda oligomerizasyon bölgesi bulunur ve burası nükleer eksport ve p53 degradasyonu için ubiquitinasyon gibi nükleer lokalizasyon sinyallerini taşır. p53'ün invivo aktivitesi için tetramerizasyon önemlidir. P53'ün son 30 aa'lık karboksi terminal grubu p53'ün

transkripsiyonel aktivitesi ve DNA spesifik bağlanma aktivitesini inhibe eden negatif bir düzenleyicidir (99,100).

p53 mRNA temel olarak eksprese olur ve p53 regülasyonu başlıca protein seviyesindedir (99). Fizyolojik şartlarda, p53 proteininin yarılanma ömrü çok kısadır (10-20dk) ve normal dokuda tespit etmek zor olabilir. Ancak mutasyona uğradığında, degradasyon yolağında bir hasar olduğunda veya diğer proteinlerle bağlandığında dokuda uzun süre kalabilir (100).

p53 ; DNA hasarı veya UV radyasyon gibi stres oluşturan durumlarda, hücredeki fonksiyonlarını yerine getirebilmek için, aktifleştirilmesine ek olarak nükleusa transforme olmalı ve ideal olarak diğer p53 molekülleri ile tetramerler oluşturmalıdır. Bu olayları takiben p53 molekülü büyüme durması veya apoptozisi indükler (100).

Etkili bir molekül olduğundan, hücrelerdeki normal p53 proteini seviyesi pozitif ve negatif düzenleyicilerin etkisiyle sıkı bir şekilde kontrol altında tutulur (85,100). Bu regülasyonda çok sayıda gen ve gen ürünleri yer alır. Proteinin hızlı degradasyonu düşük seviyelerde kalmasına yardımcı olur (100,102). Negatif düzenleyicilerinden biri proto-onkogen MDM2 ürünü olan MDM2 proteinidir. P53'ün N terminal ucuna bağlanır ve p53'ün transkripsiyonel aktivitesini bloke eder. MDM2'nin bağlanması ayrıca p53'ün nükleustan sitoplazmaya çıkışına ve ubiquitin yolağı ile proteozomal degradasyonuna yol açar (100). p53/MDM2 kompleksinin nükleus dışına eksportuna eksportin adlı spesifik nükleer proteinler yardımcı olur. Bu negatif regülasyon nötralize edilebilir. ARF proteini MDM2'ye bağlanarak MDM2/p53 kompleksinin nükleusta kalmasını ve MDM2 degradasyonunu sağlayarak p53'ün nükleusta serbest kalmasını sağlar (85,100,103). Nükleer lokalizasyon sinyalleri olduğu gibi nükleustan taşıma için nükleer eksport sinyalleri (NES)de vardır. Bu NES p53'ün C terminalinde tetramerizasyon bölgesindedir ve p53 tetramer oluşturduğunda eksportinlerin p53'e bağlanmasını önler. Ama p53 dimer veya monomerik durumdayken eksportinler NES'e bağlanır ve MDM2'den bağımsız olarak p53'ün sitoplazmada degradasyonuna yol açarlar (100,104)

Çeşitli tipteki streslere cevap olarak , p53 proteini , nükleusta stabilize olur ve hücre siklus progresyonunun inhibisyonu, apoptozis, senesens ve DNA tamir mekanizmalarını içeren genleri regüle eden bir transkripsiyon faktörü gibi davranır (85,105). P53 aktivasyonuna yol açan bu stres tipleri arasında DNA hasarı, kromozom kusurları, onkogen aktivasyonu, hipoksi, telomer kısalması ve daha pek çok etken sayılabilir. Koruyucu bir p53 cevabını başlatan kanser ilişkili sinyallerin çeşitliliği , p53'ün neden santral tümör supresör olduğunu ve nerdeyse tüm kanser tiplerinde sıklıkla inaktive olduğunu açıklayabilir (105).

TP53 insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan gendir , tüm insan kanserlerinin yaklaşık %50'si p53 kaybı gösterir veya inaktif, mutant p53 eksprese ederler (85,101,106). P53 geninin mutasyonu sıklıkla p53 geninin over ekspresyonu ile sonuçlanır (105). Bundan başka p53 protein stabilizasyonuna neden olan alternatif mekanizmaların sonucu olarak da p53 protein birikimi gözlemlenebilir. P53 stabilizasyonuna yol açan ana faktörlerden biri p14^{ARF} ekspresyonudur. Alternatif olarak p53'ün MDM2 aracılı degradasyonunun inhibisyonu da p53 protein birikimine yol açabilir (107).

p53, normal şartlarda fonksiyonel olarak inaktif olan başlıca transkripsiyon faktörüdür. Hızlı degradasyonu ubiquitin ligaz MDM2 ile sağlanır. Ancak herhangi bir hücresel stres anında MDM2 aracılı degradasyonu duraksamaya gider ve p53 birikerek transkripsiyonel aktif hale gelir. P53'ün aktivasyonu hücre siklus inhibitörleri ve proapoptotik proteinlerin aktivasyonuna yol açar ve hücre siklusu apoptoz veya (geri dönüşümsüz proliferatif durma) senesens ile sonlanır. Malign transformasyon süresince çeşitli hücresel stresler vardır, DNA hasarı ve onkogenik sinyallerin p53 ile ilişkisi özellikle iyi çalışılmıştır (106).

DNA hasarı , p53'ü aktive ettiği bulunan ilk stres tipidir ve bu yüzden p53 'genomun gardiyanı' olarak kabul edilmiştir (106,108). DNA hasarı ve p53 arasında bağlantı kuran sinyal rotalarının kapsamlı karakterizasyonu ser/thr kinaz kaskad oluşumunu tanımlamıştır. p53'ü fosforile eden bu kinazlar arasında ATM, ATR, Chk1, Chk2 sayılabilir. Bu sinyal kaskadı insan kanserlerinde aktive olur ve kanseröz durumun aslında DNA hasarı ile ilişkili olduğunu akla getirmektedir (106).

DNA hasarı gibi onkogenik sinyal oluşumu da kanser gelişiminde önemli bir stres tipidir (106). Onkogenik sinyaller p53'ü ARF üzerinden aktive ederler. P53'ü aktive eden farklı yollardan biri tümör supresör genlerin inaktivasyonu (Rb proteini veya APC tümör supresör gibi) veya myc ya da ras gibi onkogenlerin aktivasyonudur. Bu transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ARF genini transkribe eder ve ARF proteini MDM2'ye bağlanarak , ubiquitin ligaz aktivitesini inhibe eder. Böylece hücredeki p53 seviyesi yükselir ve organizmayı kanser gelişiminden koruyan p53 cevabının gelişmesine yardımcı olur. Bu mekanizma , çeşitli sinyal transdüksiyon yollarının hücrede nasıl iletişim kurduğunu ve hücresel homeostaza katkıda bulunan feedback halkasını nasıl oluşturduğunu gösteren güzel bir örnektir (102). ARF, p53'ün önemli düzenleyicilerinden biridir ve eksikliğinin kanser gelişiminde önemli bir etkisi vardır (106).

Ultraviyole radyasyon ile olan DNA hasarı gibi hücresel stres altında, p53'ün indüksiyonu ve aktivasyonu hücresel büyümeyi durdurma ve hasarlı DNA'yı onarımda

önemli rol oynar. P53'ün hücre siklusu inhibitör fonksiyonunda önemli bir medyatör p21'dir. p21, p53 ile aktive olur ve siklinE/CDK2 kompleksini inhibe eder. SiklinD1/CDK4-6 kompleksinin p16 ile olan inhibisyonuna benzer olarak SiklinE1/CDK2 kompleksinin p21 ile inhibisyonu da azalmış Rb fosforilasyonuna yol açar ve sonrasında siklus G1/S geçiş noktasında durur (85).

P53 aktive olduğunda çok sayıda geni transkribe eder. Bunlardan biri p53'ün ana negatif düzenleyicisi MDM2'dir. p53 seviyesi yükselince MDM2 seviyesi de artar, negatif feedback ile p53 inaktif duruma geçer. Aktif p53, ARF geninin transkripsiyonu inhibe eder. p53'ün in vivo regülasyonunda MDMX(MDM4) te MDM2 kadar önemli bir gendir. MDMX p53'ü direkt olarak negatif yönde düzenleyebilir ve MDM2'yi pozitif yönde düzenler. Stres sinyalinin sonra MDM2'nin poli-ubiquitinasyonu MDMX ve MDM2'nin degradasyonu ve p53 seviyesinde ve aktivitesinde artım ile sonuçlanır (102).

DNA hasarı olduğunda p53 hücre siklusunu durdurur ve DNA tamiri için gen ekspresyonunu indükler. Eğer hasar onarılamayacak kadar ciddiye o zaman p53 homeostazi sağlamak için apoptozisi indükler. P53 mutasyona uğradığında veya hücre siklus durması veya apoptozisi indükleyen p53 yolakları etkisizse hücre kontrol dışı büyüyerek çeşitli tümörlerin gelişimine yol açar (99).

p53'ün hedef aldığı transkripsiyonel genler büyük ölçüde araştırılmıştır. En önemli olanlardan biri siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21'dir. Hücre siklusunu G1 veya G2 fazında durdurur. Hücre siklusunu durduran diğer genler 14-3-3σ ve GADD45 tir. P53 indüklü apoptozisin ekstrensek ve intrinsek yolaklarında rol alan KILLER/DR5, Bax, Kaspaz-6, PUMA, vb p53'ün diğer hedefleri arasında sayılabilir. P53 XP-C ve DDB2 gibi genler serisini aktive ederek genetik stabiliteyi de sağlar. p53'ün hedef aldığı genler arasında anti-angiogenezden sorumlu olanlar da vardır ve aktivasyonları p53 aracılı tümör supresyonuna da katkıda bulunur. Diğer bir kategori, MDM2, COP-1 ve PIRH-2 den oluşur ve p53 stabilizasyonunu regüle eder (99).

Geçmiş çalışmalardan elde edilen önemli bir veri, DNA hasarı ve onkogenik sinyal yolaklarının çoğu zaman birbirinden bağımsız olduğudur : DNA hasarı ile ATM/ATR/Chk1/Chk2/JNK/p38 ve c-abl yolakları üzerinden ilişkilendirilirken , onkogenik sinyal yolağı , p53 ile ARF üzerinden ilişki kurar. Üstelik bu iki tip sinyal yolağı zaman içinde ayrı ayrı da oluşabilir. Örneğin deneysel tümörlerde güçlü bir DNA hasarı onkogenleri ve tümör supresör genleri mutasyona uğratan tetikleyici olay olabilir ve bunu ek onkogenik mutasyonları seçen proliferasyon periyodu izleyebilir. DNA hasarı ve onkogenik sinyallerin p53'ü ayrı rotalardan etkilemesi aralarında tam bir etkileşim yokluğu olduğu anlamına

gelmez, özellikle onkogenik sinyaller reaktif oksijen türevlerinin yükselmesi sonucu DNA hasarı oluşturabilirler (106).

DNA hasarı ve onkogenik sinyallerin p53'ün tümör supresif aktivitesi için göreceli önemi hala tartışılan bir konudur (108). Farelerde uygulanan bazı çalışmalarda ; p53'ün onkogenik sinyallere duyarlılığının ARF yokluğu ile baskılandığı ve DNA hasarına karşı gelişen etkin cevaba rağmen, p53'ün kanserden koruma yetisini tamamen kaybettiği gösterilmiştir. Ancak insan hücrelerinde ARF'nin onkogenik sinyal iletimindeki rolü halen çok açık değildir. İnsan fibroblastları ile olan çalışmalar sonuç verici olmamıştır çünkü bazı fibroblast hücre dizilerinde ARF eksprese olurken ve onkogenik strese cevap verirken diğer hücre dizilerinde ARF ekspresyonu hemen hiç saptanmamış ve onkogenik strese cevap oluşmadığı gözlenmiştir. İnsan hücrelerinde onkogenik sinyallerle p53 aktivasyonunda ARF'nin önemli bir rolü olup olmadığını göstermek için ek çalışmalar gerektiği önerilmektedir (106).

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Olgu Seçimi:

2001-2008 yılları arasında Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Bölümünde tanı almış 19 adet dudak skuamöz hücreli karsinoma ve 14 adet aktinik keilit olgusu çalışma kapsamına alındı. 13 adet normal vermilyon ve oral mukoza biyopsisi kontrol olarak kullanıldı. Skuamöz hücreli karsinoma vakalarının 2 tanesi biyopsi materyali, 17 tanesi kama rezeksiyon materyali idi. Çalışma için olgular, tekrar gözden geçirilerek, Skuamöz hücreli karsinoma (SHK), Aktinik Keilit (AK), normal mukoza (K) olarak 3 ana gruba ayrıldı. Bunun dışında SHK grubunda tümör komşuluğunda yer alan displastik alanlar (tümör komşuluğunda aktinik keilit benzeri değişiklikler gösteren alanlar) değerlendirme için ayrı bir grup olarak ele alındı (SHK-AK).

3.2. Histopatolojik inceleme:

Tanımlanan yukarıdaki gruplardan, SHK olgularında; tümör kalınlığı, invazyon derinliği, tümör çapı, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon, tümör komşuluğundaki inflamasyon derecesi, tümörün farklılaşma derecesi (grade), lenf nodu metastazının varlığı ile ilişkili histopatolojik prognostik veriler kaydedildi.

SHK olgularında aşağıda belirtilen özelliklere göre histopatolojik prognostik kriterler detaylı bir şekilde değerlendirildi :

1-Tümör kalınlığı :Tümörün yüzey epitelinden en derin invazyon gösterdiği alan arasındaki mesafe ≤ 2 mm, 2-6 mm arası ve >6 mm olarak kategorize edildi.

2-İnvazyon derinliği :Orta dermis, tüm dermis, yağ doku, kas dokusu ve kırık/kemik dokusuna ulaşmış/ulaşmadığı şeklinde değerlendirildi.

3-Tümör çapı : Tümörün en büyük çapı alınarak ≤ 2 cm, >2 cm şeklinde 2 gruba ayrıldı .

4-Perinöral invazyon: Tümör hücrelerinin nöral invazyon gösterip göstermediği değerlendirildi.

5-Lenfovasküler invazyon: Damar lümeninde tümör hücresi olup olmadığı kaydedildi.

6-Tümör komşuluğundaki inflamasyon: Tümör çevresindeki iltihabi hücre infiltrasyonu subjektif olarak hafif-orta ve şiddetli şeklinde kategorize edildi.

7-Lenf nodu metastazı varlığı: Lenf nodu diseksiyonu yapılan olgulardaki metastatik lenf nodu varlığı değerlendirildi.

8-Tümörün farklılaşma derecesi (grade'i) :Frierson 'ın alt dudak kanserleri için geliştirdiği gradeleme sistemi kullanıldı (58).

AK ve SHK-AK histopatolojik tanıları hiperkeratoz, parakeratoz, akantoz, atrofi, keratinositlerde tomurcuk benzeri proliferasyon, displazi derecesi, displazi lokalizasyonuna göre değerlendirildi. AK ve SHK-AK gruplarında ayrıca bağ doku inflamasyonu ve perivasküler inflamasyon, solar elastoz ile ilişkili veriler kaydedildi. (4, 43,109)

Çalışmaya dahil edilen tüm olgular için yaş, cinsiyet ve tümör çapına ait bilgiler daha önce patoloji raporlarında belirtilen bilgilerden elde edildi.

AK ve SHK-AK olgularında aşağıdaki parametreler değerlendirildi:

Hiperkeratoz, parakeratoz, epitelyal akantoz ve atrofi, epitelyal displazi, hafif, orta ve şiddetli olarak değerlendirildi. Ayrıca displazi lokalizasyonu , epitelin alt 1/3, 1/3-2/3 arası ve tam kat olarak kategorize edildi. Lezyon komşuluğunda, bağ doku inflamasyonun ve solar elastozun derecesi, hafif, orta ve şiddetli olarak kaydedildi.

3.3. İmmunohistokimyasal inceleme:

Tüm olgulara ait hematoksilen-eozin boyalı arşiv preparatları tekrar gözden geçirilerek immunohistokimyasal inceleme için uygun olan ve lezyonları temsil eden parafin bloklar seçildi. p16^{INK4a} , p14^{ARF} ,p53 immunohistokimyasal belirleyicilerini çalışmak üzere seçilen parafin bloklardan 3-5 µm kalınlığında , üçer adet kesit adeziv lamlara alındı.

3.3.1. p16^{INK4a} saptanması:

İmmunohistokimya için primer antikor olarak p16^{INK4a} monoklonal antikor (p16^{INK4a} Ab-4(16PO4), Neomarkers Ltd), optimal dilüsyon olarak 1/100 oranında hazırlandı. Adeziv lama alınan preparatlar 1 gece boyunca 37 °C'de etüvde, ertesi gün 60°C'de 20 dakika etüvde bekletildikten sonra , iki defa 5'er dakikalık sürelerde ksilenden geçirilip değişen derecelerde alkollerde bekletilerek deparafinize edildi. Daha sonra distile su ile yıkandı. Antijen açığa çıkarma aşaması için preparatlar EDTAlı tampon (pH 8) solusyonu içerisinde 23 dakika süreyle 98 °C'de PT modüle (Labvision) alındı. Modülden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Distile su ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla %3 hidrojen peroksit 5 dakika süreyle uygulandı. Daha sonra distile su ile yıkanan preparatlar Sequenza Manuel boyama istasyonuna (Shandon Scientific Limited, Astmoor, UK) dizildi. Yıkama solusyonu olarak fosfat tampon solüsyonu(PBS) kullanıldı. 2 kez yıkandıktan sonra 5 dakika protein blok solüsyonu (Blocking Reagent-ultra v blok, Labvision) ile protein blokajı yapıldı. Sonra PBS ile 2 kere yıkandıktan sonra primer antikor

damlatılarak oda ısısında 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün 2 kez PBS ile yıkanan preparatlar Biotin içeren sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-polyvalent, Labvision) ile 45 dakika inkübe edildi. 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra Strep-AB kompleksi (Streptavidin Peroxidase, Labvision) damlatılıp 45 dakika beklendi .Tekrar 2 kez PBS ile yıkanmanın ardından preparatlara Diaminobenzidin (DAB, Labvision) kromojen olarak kullanıldı ve damlattıktan sonra 20 dakika beklenildi. 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra Mayer's Hematoksilen (Merck Mayer's hemalum solution for microscopy) damlatılıp 5 dakika beklenerek karşıt boyama yapıldı. 2 kez PBS ile ve sonrasında 5 dakika süre ile akan musluk suyu altında yıkandı.Yıkanan preparatlar 2 defa alkole batırılıp çıkarıldı. Kuruduktan sonra ksilen ile kapatıldı.

Pozitif kontrol olarak kolon adenokarsinomu tanısı almış örneklerden uygun kesitler kullanıldı.

3. 3.2. p14^{ARF} saptanması

İmmunohistokimya için primer antikor olarak p14^{ARF} monoklonal antikor (p14^{ARF}, GeneTex, GTX23642), optimal dilusyon olarak 1/50 oranında hazırlandı. Adeziv lama alınan preparatlar 1 gece boyunca 37 °C'de etüvde bekletildi, ertesi gün 60 °C'de 20 dakika etüvde bekletildikten sonra , iki defa 5'er dakikalık sürelerde ksilenden ve alkollerden geçirilerek deparafinize edildi. Kesitler daha sonra distile su ile yıkandı. Antijen açığa çıkarma aşaması için preparatlar EDTAlı tampon (pH 8) solusyonu içerisinde 23 dakika süreyle 98 °C'de PT modüle(Labvision) alındı. Modülden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Distile su ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla %3 hidrojen peroksit 5 dakika süreyle uygulandı. Daha sonra distile su ile yıkanan preparatlar Sequenza Manuel boyama istasyonuna (Shandon Scientific Limited, Astmoor, UK) dizildi. Yıkama solüsyonu olarak fosfat tampon solüsyonu kullanıldı. 2 kez yıkandıktan sonra 5 dakika protein blok solüsyonu (Blocking Reagent-ultra v blok, Labvision) ile protein blokajı yapıldı. Sonra PBS ile 2 kere yıkanıp primer antikor damlatılarak oda ısısında 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün 2 kez PBS ile yıkanan preparatlar Biotin içeren sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-polyvalent, Labvision) ile 45 dakika inkübe edildi. 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra Strep-AB kompleksi (Streptavidin Peroxidase, Labvision) damlatılıp 45 dakika beklendi .Tekrar 2 kez PBS ile yıkanmanın ardından preparatlara Diaminobenzidin (DAB, Labvision) kromojen olarak kullanıldı ve damlattıktan sonra 20 dakika beklendi. 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra Mayer's Hematoksilen (Merck Mayer's hemalum solution for microscopy) damlatılıp 3

dakika beklenerek karşıt boyama yapıldı. 2 kez PBS ile ve sonrasında 5 dakika süre ile akan musluk suyu altında yıkanan preparatlar 2 defa alkole batırılıp çıkarıldı. Kuruduktan sonra ksilen ile kapatıldı.

Pozitif kontrol olarak fibroadenoma tanısı almış örnekten uygun kesitler kullanıldı.

3.3.3. p53 saptanması

İmmunohistokimya için primer antikor olarak p53 monoklonal antikor (p53 (SP5), Neomarkers Ltd), optimal dilusyon olarak 1/100 oranında hazırlandı. Adeziv lama alınan preparatlar 1 gece boyunca 37 °C’de etüvde bekletildi, ertesi gün 60 °C’de 20 dakika etüvde bekletildikten sonra , iki defa 5’er dakikalık sürelerde ksilenden ve alkollerden geçirilerek deparafinize edildi. Kesitler daha sonra distile su ile yıkandı. Antijen açığa çıkarma aşaması için preparatlar EDTAlı tampon (pH 8) solusyonu içerisinde 23 dakika süreyle 98 °C’de PT modüle (Labvision) alındı. Modülden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Distile su ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla %3 hidrojen peroksit 5 dakika süreyle uygulandı. Daha sonra distile su ile yıkanan preparatlar Sequenza Manuel boyama istasyonuna (Shandon Scientific Limited, Astmoor, UK) dizildi. Yıkama solüsyonu olarak fosfat tampon solüsyonu kullanıldı. 2 kez yıkandıktan sonra 5 dakika protein blok solüsyonu (Blocking Reagent-ultra v blok, Labvision) ile protein blokajı yapıldı. Sonra PBS ile 2 kere yıkanıp primer antikor damlatılarak oda ısısında 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün 2 kez PBS ile yıkanan preparatlar Biotin içeren sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-polyvalent, Labvision) ile 45 dakika inkübe edildi. 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra Strep-AB kompleksi (Streptavidin Peroxidase, Labvision) damlatılıp 45 dakika beklendi. Tekrar 2 kez PBS ile yıkamanın ardından preparatlara Diaminobenzidin (DAB, Labvision) kromojen olarak kullanıldı ve damlattıktan sonra 15 dakika beklendi. 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra Mayer’s Hematoksilen (Merck Mayer’s hemalum solution for microscopy) damlatılıp 5 dakika beklenerek karşıt boyama yapıldı. 2 kez PBS ile ve sonrasında 5 dakika süre ile akan musluk suyu altında yıkanan preparatlar 2 defa alkole batırılıp çıkarıldı. Kuruduktan sonra ksilen ile kapatıldı.

Pozitif kontrol olarak kolon adenokarsinomu tanısı almış örnekten uygun kesitler kullanıldı.

3.3.4. p16^{INK4a}, p14^{ARF} ve p53 immunohistokimyasal belirleyicilerinin değerlendirilmesi:

Her üç immun belirleyici ile boyanmanın mikroskoptaki değerlendirmesinde modifiye immunohistokimyasal skor (H-SKOR) kullanıldı. Bu skor matematiksel olarak şu formül ile açıklanmaktadır :

$HS = \sum (P_i \times i / 100)$; P_i : boyanan hücrelerin yüzdesi, i : 1-3 (hafif-orta-şiddetli) arasında oranlarda boyanma yoğunluğu

p14^{ARF} çalışılan her bir vaka için nükleolar ve nükleer boyanma pozitif olarak kabul edilirken, p16^{INK4a} ve p53 için yalnızca nükleer boyanma pozitif olarak değerlendirildi ve H-SKOR değerleri aşağıda belirtilen şekilde hesaplandı (110,111).

Negatif boyanan hücrelerin %'si (Skor 0) X 0

Zayıf pozitif boyanan hücrelerin %'si (Skor 1) X 1

Orta derecede pozitif boyanan hücrelerin %'si (Skor 2) X 2

Güçlü pozitif boyanan hücrelerin %'si (Skor 3) X 3

Daha sonra bütün değerler toplanarak 0-300 arasında değişebilen değerler elde edildi.

3.4.İstatistiksel İnceleme :

SPSS 15.0 Windows yazılımı (Chicago, IL , USA) kullanılarak, çalışmadan elde edilen sonuçlar ile istatistiksel inceleme yapıldı. Grupların denek sayısının 30'dan az olması ve verilerin dağılım özellikleri nedeniyle non-parametrik testler kullanıldı.

Histopatolojik olarak belirlenen gruplar ve immünohistokimyasal belirleyiciler arasındaki farklılığı araştırmak için Kruskal-Wallis analizi uygulandı. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunan gruplar arasında, farka neden olan grubu saptamak için Mann-Whitney U testi ile değerlendirme yapıldı.

Korelasyonda Spearman's korelasyon analizi kullanıldı.

3.5. Etik Kurul Kararı:

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurul başkanlığının 23.2.2009 tarihli, 2009/012 numaralı kararıyla etik kurul onayı alındı.

BULGULAR

Çalışma grubu , 19 adet dudak skuamöz hücreli karsinoma (SHK), 14 adet aktinik keilit (AK) tanısı almış vakalardan oluşmuştur. 13 adet normal vermilyon ve oral mukoza biyopsisi kontrol grubu (K) olarak kullanılmıştır.

Çalışmamızda olguların 33'ü (%71.7) erkek, 13'ü (%28.3) kadındı.

SHK grubunda olguların 3'ü kadın (%15.79), 16'sı (%84.2) erkek idi. Yaş aralığı 50 ile 82 arasında değişmekteydi. Bu grup için yaş ortalaması $\pm$ SD (standart sapma) 64.37 ± 9.61 olarak saptandı. AK grubunda olguların 4'ü kadın (%28.5), 10'u (%71.4) erkek olup yaş aralığı 40 ile 84 (56.57 ± 15.63) arasında değişmekteydi. Kontrol grubumuzdaki olguların 6'sı kadın 7'si erkekti. Ortalama yaş 50.54 ± 17.61 olarak saptandı (Tablo 4.1). Erkek/kadın oranı, SHK grubunda 5,33/1, AK grubunda 2.5/1 olarak saptandı. Hem SHK hem de AK lezyonlarının erkeklerde daha yüksek oranda gözlendiği dikkati çekmiştir.

Tablo 4.1: Olguların gruplara göre yaş ve cinsiyet dağılım özellikleri

	n / %	Kadın/ Erkek	Yaş ortalaması $\pm$ SD
K	13 / 28.3	6 / 7	50.54 $\pm$ 17.61
AK	14 / 30.4	4 / 10	56.57 $\pm$ 15.63
SHK	19 / 41.3	3 / 16	64.37 $\pm$ 9.61

İmmunohistokimyasal inceleme dışında aktinik keilit olgularında saptadığımız histopatolojik değişiklikler şu şekildedir:

Hiperkeratoz 14 olgunun %71'inde şiddetli ve orta şiddette; parakeratoz olguların %79'unda şiddetli ve orta şiddetteydi. Olguların 11'inde akantoz, 3'ünde atrofi izlendi. Skuamöz hücreli karsinoma komşuluğundaki displastik (SHK-AK) alanlarda ise 4 olguda atrofi, 13 olguda akantoz izlenirken 2 olguda ise epitelyal tabakada akantoz ya da atrofi izlenmedi. Hiperkeratoz ise 12 olguda hafif, 4 olguda orta şiddette ve 3 olguda şiddetli olup, parakeratoz 11 olguda hafif, 2 olguda orta, 1 olguda şiddetli derecelerdeydi.

14 tane aktinik keilit olgusu histolojik açıdan değerlendirildiğinde epidermisteki atipik hücrelerin dağılımına bakıldığında olguların büyük kısmında (%71) alt 1/3 tabakada atipi mevcuttu. Displazi 7 olguda hafif, 6 olguda orta, 1 olguda şiddetli olarak izlendi. 19 adet SHK-AK olgusunun %79'unda ise hafif şiddette ve alt 1/3 tabakada lokalize atipi gözlemlendi.

Her iki gruba ait tüm olgularda solar elastoz ve bağ dokuda ve damarlar çevresinde kronik inflamasyon dikkati çekmiştir.

Skumöz hücreli karsinoma grubunda saptadığımız histopatolojik prognostik veriler şu şekildeydi:

19 SHK olgusunun hiçbirinde lenfovasküler invazyon gözlenmedi ve sadece 2 olguda perinöral invazyon varlığı izlendi. 3 olguda lenf nodu diseksiyonu spesimeni mevcuttu ve bunların hiç birinde metastatik lenf nodu saptanmadı. 6 olgunun tümör çapı 2 cm'den büyüktü, 13 olgumuz(%68) literatürle uyumlu olarak T1 evresindeydi. Tümör kalınlığı 6 olguda 6 mm'nin üzerinde 9 olguda 2-6mm arasında ve 4 olguda 2mm'den az olarak saptandı. İnvazyon derinliği %58'inde (11 olguda) kas dokusuna kadar, 2 olguda yağ dokusuna kadar ve 4 olguda tüm dermiste ve 2 olguda orta dermiste; tümör komşuluğundaki inflamasyon 13 olguda şiddetli, 4 olguda orta , 2 olguda hafif şiddette olarak izlendi.

SHK grubundaki olguların %74'ü Grade 1 ve Grade 2 tümörlerden, %26'sı Grade 3 tümörlerden oluşmaktaydı.

Gruplara göre immunohistokimyasal boyanma özellikleri incelenmiştir. Buna göre p16^{INK4a} ile 13 olgudan oluşan kontrol grubunda 9 olguda boyanma izlenmedi. Pozitif boyanan 4 olgunun tamamında boyanma lokalizasyonu alt 1/3'te , dağınık ve fokal, boyanma yoğunluğu zayıf olarak izlendi. 14 olgudan oluşan AK grubunda p16 ile 9 AK olgusunda pozitif boyanma izlendi. p16 ile pozitif boyanan olguların 8'inde boyanma alt 1/3'te sınırlıydı. Boyanma yoğunluğu 8 olguda hafif, 1 olguda orta şiddette olarak görüldü. 19 olgudan oluşan SHK grubunda p16 ile 7 olguda boyanma izlenmezken 4 olgunun fokal 1-2 alanda pozitif boyandığı, 4 olgunun genellikle yüzeysel alanlarda, 4 olgunun daha çok invaziv adalar çevresinde ve 1 olgunun tümör içinde homojen boyanma özelliği gösterdiği saptandı. Pozitif olguların 9'unda orta şiddette, 3'ünde hafif şiddette boyanma yoğunluğu gözlemlendi. SHK-AK grubunda p16 ile 13 olgunun alt 1/3'te sınırlı , büyük çoğunluğunun hafif şiddette boyanma gösterdiği izlendi.

p14^{ARF} ile tüm gruplardaki olguların tamamında pozitif boyanma gözlemlendi. Kontrol grubumuzdaki olguların tümünde p14 ile pozitif boyanma gözlenirken boyanma yoğunluğu 11 olguda hafif, 2 olguda orta şiddette olarak izlendi. Boyanma lokalizasyonu 6 olguda alt 1/3, 7 olguda 1/3-2/3 arası olarak saptandı. AK grubunda p14 ile 7 olguda boyanmanın bazal

2/3 -3/3 arasında olduğu, SHK-AK olgularında 11 olguda bazal 1/3-2/3 arasında olduğu gözlemlendi. SHK grubundaki olgularda ise boyanma lokalizasyonunun 16 olguda daha çok invaziv adalar bazalinde olduğu, 2 olguda adalar ve yüzeysel alanlarda dağınık olarak olduğu izlendi.

p53 ile K grubundaki olguların 10'unda bazalde dağınık olarak, hafif şiddette boyanma paterni gözlenirken 3 olguda boyanma gözlenmedi. AK grubuna ait olguların 10'unda alt 1/3'te, 4'ünde 1/3-2/3 arasında boyanma varlığı gözlemlendi. Bu grupta boyanma yoğunluğu 10 olguda hafif, 3 olguda orta ve 1 olguda şiddetli olarak değerlendirildi. SHK-AK grubunda ise 19 olgunun 17'sinde alt 1/3'te , 2 olguda 1/3-2/3 arasında lokalize boyanma izlenirken boyanma yoğunluğu olguların 15'inde hafif, 4'ünde orta şiddette olarak gözlemlendi. SHK grubunda 3 olguda p53 ile boyanma izlenmedi. 16 olgunun ise özellikle adalar periferinde bazalde 1-2 sıra halinde veya dağınık boyanma paterni sergilediği izlendi. Pozitif boyanan olguların 7'sinin orta, 7'sinin şiddetli ve 2'sinin hafif şiddette boyandığı saptandı.

Olguların gruplara göre p16, p14, p53 immunohistokimyasal boyanma yüzdeleri ve boyanma lokalizasyonları Tablo 4.2 ve 4.3 de gösterilmektedir.

Skuamöz hücreli karsinoma grubundaki p16 negatif 7 olgunun tamamı p14 ve p53 ile pozitif boyanmıştı. p53 negatif 3 olgunun ise p16 ve p14 ile pozitif boyandığı izlendi. AK olgularından p16 ile negatif boyanan 5 olgunun p14 ve p53 pozitivitesi gösterdiği izlendi. SHK-AK olgularından tüm olgular p14 ve p53 ile pozitif boyanırken sadece 1 olgunun p16 ile boyanma göstermediği izlendi.

Tablo 4.2. Olguların pozitif immunohistokimyasal boyanma yüzdeleri

	Pozitif olgu sayısı ve yüzdesi							
	K (n=13)		AK (n=14)		SHK (n=19)		SHK-AK (n=19)	
p16	4	%30,77	9	%64,28	12	%63,15	18	%94,73
p14	13	%100	14	%100	19	%100	19	%100
p53	10	%76,92	14	%100	16	%84,21	19	%100

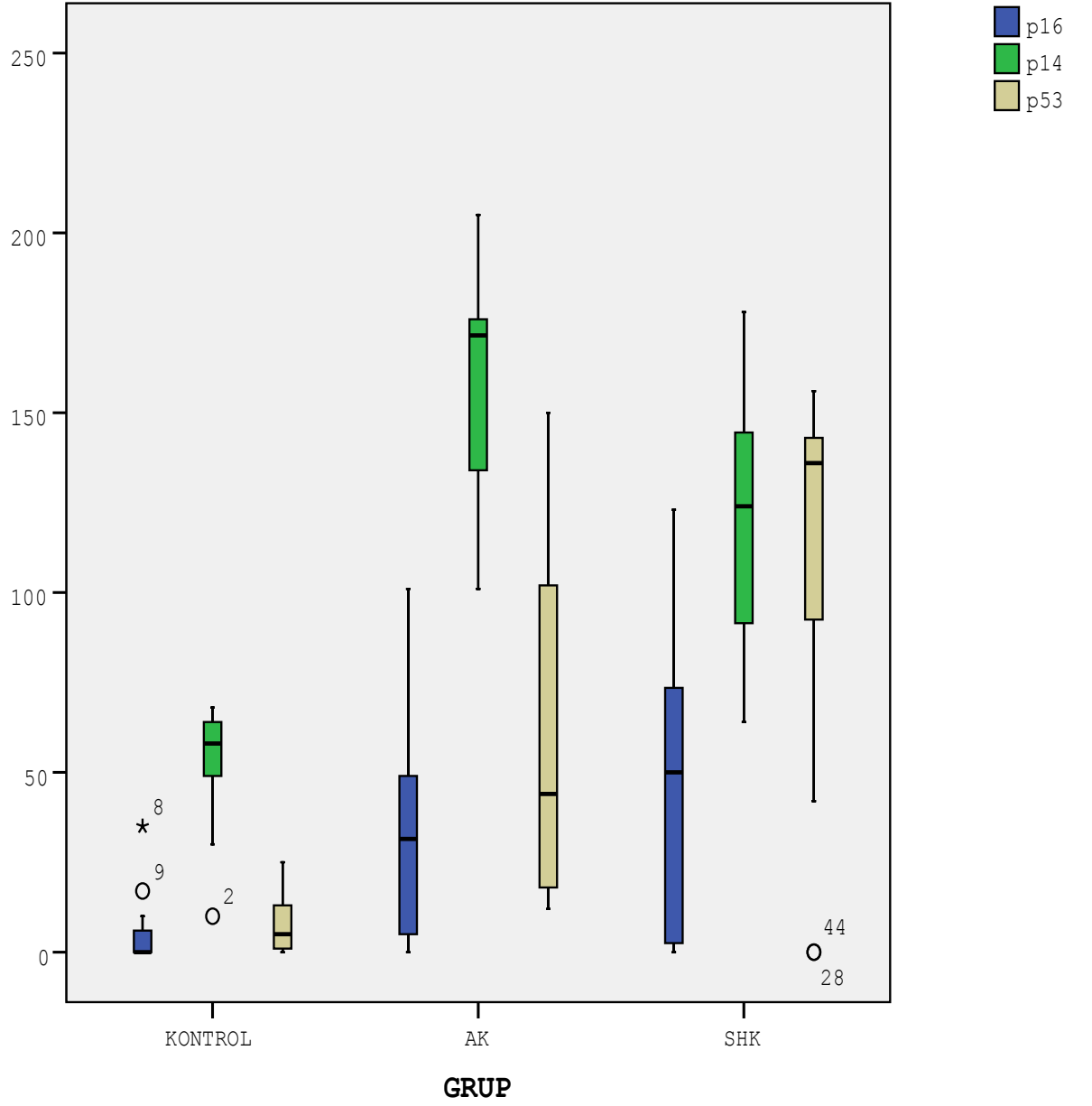
Tablo 4.3: K, AK ve SHK-AK gruplarındaki olguların immunohistokimyasal boyanma lokalizasyonları

	<i>K</i>			<i>AK</i>			<i>SHK-AK</i>		
	p16	p14	p53	p16	p14	p53	p16	p14	p53
Alt 1/3	4	6	10	8	3	10	13	4	17
1/3-2/3 arası	-	7	-	1	4	4	5	11	2
2/3 ve üstü	-	-	-	-	7	-	-	4	-

Tüm gruplar arasındaki antikor ekspresyonları H-SKOR değeri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen değerlerin dağılım özellikleri nedeniyle non-parametrik testler kullanılmıştır ve gruplar arasında antikor ekspresyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığını saptamak için Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. Tüm gruplardaki p16, p14 ve p53 ekspresyonlarının H-SKOR değerleri için tanımlayıcı istatistiksel değerler Tablo 4.4’ de verilmiştir. Antikorların ekspresyonlarının H-SKOR değerlerinin dağılım özellikleri 1 nolu saplı kutu grafiğinde gösterilmiştir (Şekil-4.1).

Tablo 4.4: Kontrol, aktinik keilit ve skuamöz hücreli karsinoma gruplarında p16,p14 ve p53 ekspresyonunun H-SKOR değerlerinin tanımlayıcı istatistiksel bulguları

	n	Ortalama ± SD	Ortanca	Minimum-maksimum	Değer aralığı	Çeyreklerarası aralık değeri (IQR)
<i>p16</i>						
K	13	5.62±10.27	0	0-35	35	8
AK	14	32.79±27.79	31.50	0-101	101	45
SHK	19	45.32±38.54	50	0-123	123	78
<i>p14</i>						
K	13	52.92±17.28	58	10-68	58	21
AK	14	160.93±33.09	171.50	101-205	104	51
SHK	19	119.95±32.87	124	64-178	114	62
<i>p53</i>						
K	13	7.54±7.82	5	0-25	25	13
AK	14	59.00±45.56	44	12-150	138	85
SHK	19	109.89±49.52	136	0-156	156	66



Şekil 4.1:Kontrol, AK ve SHK gruplarında p16,p14 ve p53 ekspresyonlarının H-SKOR değerlerinin saplı kutu grafiği

Kruskal Wallis Varyans Analizine göre p16, p14 ve p53 için p değerleri sırayla $p=0.003$, $p=0.001$ ve $p=0.001$ olarak bulunmuştur. Tüm değerler $p<0.05$ olduğu için istatistiksel olarak gruplar arasında en az birinin ekspresyonlar açısından farklı olduğu kabul edilmiştir.

Kruskal Wallis Varyans Analizinde yukarıda da belirtildiği üzere en az bir grupta p16 ekspresyonu farklılık göstermektedir ($\chi^2=11.396$, $p=0.003$). İkili karşılaştırmalarda Bonferroni düzeltmesi yapılarak Mann Whitney U testi uygulanmıştır. Anlamlılık değeri, $\alpha/k=0,05/3=0,0167$ olarak belirlenmiştir. Elde edilen değerler Tablo 4.5'te gösterilmektedir. p16 ekspresyonunun ortalama sıralama değerlerinin normal dokulardan oluşan kontrol grubuna göre aktinik keilitlerde arttığı gözlemlenmiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($Z=3.141$, $p=0.001$). Kontrol grubuna göre p16 ekspresyonunun H-SKOR ortalama sıralama değerleri, SHK grubunda artmıştır. Bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($Z=2.860$, $p=0.005$). Skuamöz hücreli karsinoma grubunda aktinik keilit grubuna göre p16 ekspresyonunun bir miktar daha arttığı izlenmiştir. Ancak bu artışın istatistiksel olarak fark oluşturmadığı gözlenmiştir.(Tablo 4.5)

Tablo 4.5: p16 ekspresyonunun ikili grup karşılaştırmalarında elde edilen H-SKOR ortalama sıralama değerleri ve p değeri

p16	n	Ortalama sıralama değeri	p değeri
K	13	9.12	0.001*
AK	14	18.54	
K	13	10.96	0.005*
SHK	19	20.29	
AK	14	15.54	0.461
SHK	19	18.08	

Kruskal Wallis Varyans Analizi ile en az bir grupta p14 ekspresyonu farklılık göstermektedir ($\chi^2=30.777$, $p<0,001$). Gruplarımız Mann-Whitney U testi ile Bonferroni düzeltmesi yapılarak karşılaştırıldığında K grubu ile AK grubu arasında p14 ekspresyonlarının H-SKOR ortalama sıralama değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($Z=4.420$, $p=0.001$). p14 ekspresyonunun ortalama sıralama değerlerinin K grubuna göre AK 'lerde arttığı gözlemlenmiştir. K grubuna göre p14 ekspresyonunun H-

SKOR ortalama sıralama değerleri SHK grubunda artmıştır. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($Z=4.571$, $p=0.001$). p14 ekspresyonunun ortalama sıralama değerlerinin AK grubuna göre SHK grubunda azaldığı saptanmıştır. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($Z=2.878$, $p=0.003$). Gruplar arasındaki p14 ekspresyonları açısından ikili grup karşılaştırmaları Tablo 4.6'da gösterilmektedir.

Tablo 4.6: p14 ekspresyonunun ikili grup karşılaştırmalarında elde edilen H-SKOR ortalama sıralama değerleri ve p değeri

p14	n	Ortalama sıralama değeri	p değeri
K	13	7.00	0.001*
AK	14	20.50	
K	13	7.35	0.001*
SHK	19	22.76	
AK	14	22.64	0.003*
SHK	19	12.84	

p53 ekspresyonlarının H-SKOR değerlerinin dağılım özelliği nedeniyle Kruskal Wallis Varyans Analiz uygulandığında en az bir grubun p53 ekspresyonunun farklılık gösterdiği bulunmuştur ($\chi^2=23.151$, $p<0.001$). İkili karşılaştırmalarda Bonferroni düzeltmesi yapılarak Mann Whitney U testi uygulandı. Bu teste ait ikili karşılaştırma değerleri Tablo 4.7'de gösterilmektedir. Kontrol grubuna göre p53 ekspresyonunun H-SKOR ortalama sıralama değerlerinin AK grubunda arttığı gözlemlendi. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır. ($Z=4.032$, $p=0.001$) Kontrol grubu ile SHK grubu arasında p53 ekspresyonunun H-SKOR ortalama sıralama değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu gözlenmiştir ($Z=3.864$, $p=0.001$). p53 ekspresyonu SHK grubunda artış göstermektedir. Aktinik keilit grubuna göre p53 ekspresyonunun SHK grubunda arttığı saptanmıştır. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($Z=2.623$, $p=0.008$).

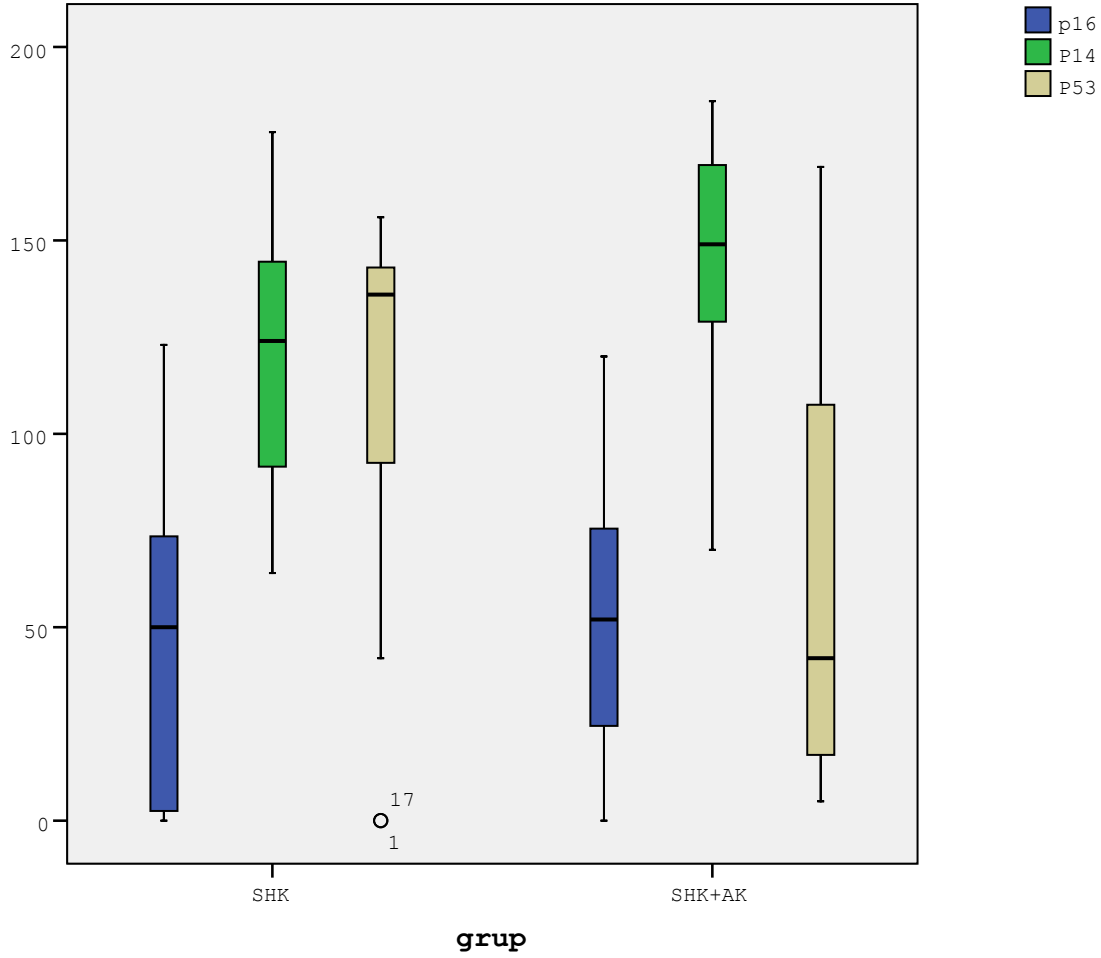
Tablo 4.7: p53 ekspresyonunun ikili grup karşılaştırmalarında elde edilen H-SKOR ortalama sıralama değerleri ve p değeri

p53	n	Ortalama sıralama değeri	p değeri
K	13	7.62	0.001*
AK	14	19.93	
K	13	8.77	0.001*
SHK	19	21.79	
AK	14	11.86	0.008*
SHK	19	20.79	

Ayrıca SHK grubundaki tümör komşuluğundaki aktinik keilit benzeri değişiklik gösteren alanlar (SHK-AK); SHK ile birlikteliği olmayan AK olguları ve SHK grubundaki tümöral alanlardaki antikor ekspresyonları açısından da karşılaştırılmıştır. Skuamöz hücreli karsinoma komşuluğundaki displastik (SHK-AK) alanlardaki antikor ekspresyonlarının H-SKOR değerlerinin tanımlayıcı istatistiksel değerleri Tablo 4.8’de , saplı kutu grafiği ise Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.8: Tümör komşuluğundaki displastik (SHK-AK)alanların p16, p14 ve p53 ekspresyonları için tanımlayıcı istatistiksel bulgular

	n	Ortalama $\pm$ SD	Ortanca	Minimum-maksimum	Değer aralığı	Çeyreklerarası aralık değeri(IQR)
p16	19	53.89 $\pm$ 35.95	52	0-120	120	59
p14	19	143.89 $\pm$ 32.56	149	70-186	116	54
p53	19	59.84 $\pm$ 56.10	41	0-169	169	107



Şekil 4.2: SHK grubu ve SHK-AK grubundaki p16,p14 ve p53 ekspresyonlarının H-SKOR değerlerinin saplı kutu grafiği

Skuamöz hücreli karsinom olgularında tümör komşuluğundaki displastik alanlar (SHK-AK) ve tümöral alanlardaki (SHK) antikor ekspresyonları incelendiğinde dağılım özellikleri nedeniyle Wilcoxon testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.9'da gösterilmektedir. Buna göre, ekspresyonlar (ortalama sıralama değerleri) açısından değerlendirildiğinde p16 ekspresyonunun 8 olguda tümör alanlarında, 11 olguda ise displastik alanlarda ortalama sıralama değerleri daha yüksek bulunmuştur ($Z=0.845$; $p=0.398$). Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. p14 ekspresyonu açısından bakıldığında 13 olguda displazi alanlarında, 6 olguda ise tümör alanlarında ekspresyon ortalama sıralama değerleri yüksek bulunmuştur. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($Z=2.677$; $p=0.007$). p53 ekspresyonları ortalama sıralama değerleri açısından 15 tümör yüksek değer, 3 displastik alan yüksek değer, 1 olgu eşit değer almıştır. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($Z=2.788$, $p=0.005$).

Tablo 4.9: SHK ve SHK-AK grupları arasında p16, p14 ve p53 ekspresyonlarının H-SKOR değerlerinin dağılımı

		n	Ortalama sıralama değerleri	p değeri
p16 SHK / SHK-AK	Negatif sıralama	11(a)	10,55	0.398
	Pozitif sıralama	8(b)	9,25	
	Eşit değer	0(c)		
	Toplam	19		
p14 SHK / SHK-AK	Negatif sıralama	13(d)	12,42	0.007*
	Pozitif sıralama	6(e)	4,75	
	Eşit değer	0(f)		
	Toplam	19		
p53 SHK / SHK-AK	Negatif sıralama	3(g)	7,17	0.005*
	Pozitif sıralama	15(h)	9,97	
	Eşit değer	1(i)		
	Toplam	19		

- a) p16 SHK ekspresyonu < p16 SHK-AK ekspresyonu
b) p16 SHK ekspresyonu > p16 SHK-AK ekspresyonu
c) p16 SHK ekspresyonu = p16 SHK-AK ekspresyonu
d) p14 SHK ekspresyonu < p14 SHK-AK ekspresyonu
e) p14 SHK ekspresyonu > p14 SHK-AK ekspresyonu
f) p14 SHK ekspresyonu = p14 SHK-AK ekspresyonu
g) p53 SHK ekspresyonu < p53 SHK-AK ekspresyonu
h) p53 SHK ekspresyonu > p53 SHK-AK ekspresyonu
i) p53 SHK ekspresyonu = p53 SHK-AK ekspresyonu

Tümör komşuluğundaki displastik alanlar (SHK-AK grubu) ve tümör birlikteliği olmayan aktinik keilit olguları (AK grubu) arasında yapılan karşılaştırmalarda her üç antikoru ekspresyonlarının H-SKOR değerleri açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

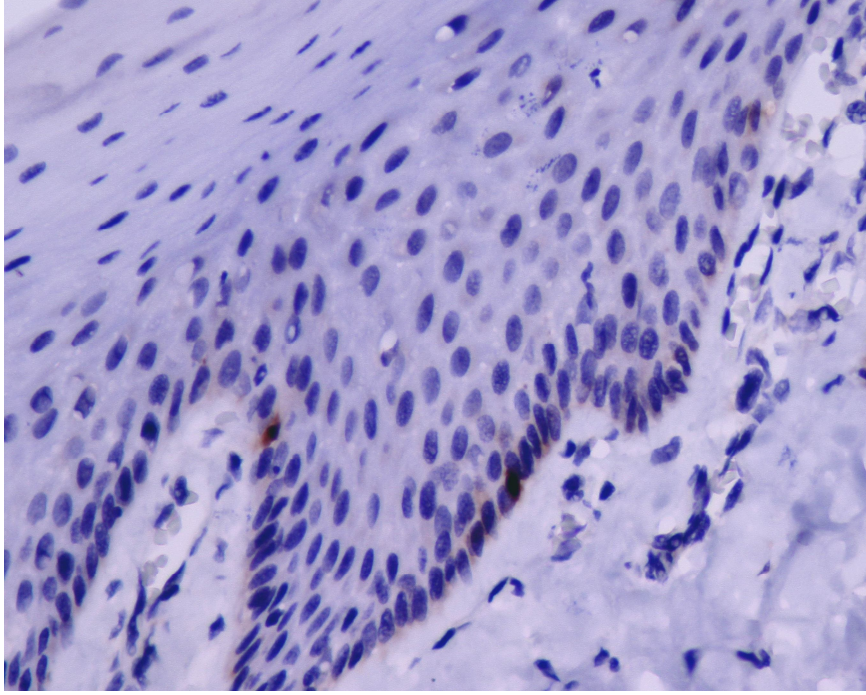
Spearman's korelasyon analizinde SHK grubunda başta tümörün farklılaşma derecesi(grade) olmak üzere histopatolojik prognostik faktörler ile p16, p14, p53 ekspresyonları arasında anlamlı ilişki görülmemiştir.

SHK, AK ve K grupları arasında p16, p14 ve p53 ekspresyonları açısından da korelasyon bulunamamıştır. Ancak skuamöz hücreli karsinom olgularında tümör komşuluğundaki displastik alanlarda (SHK-AK) p14 ve p53 ekspresyonlarında pozitif yönde korelasyon dikkati çekmiştir.(Tablo 4.10).

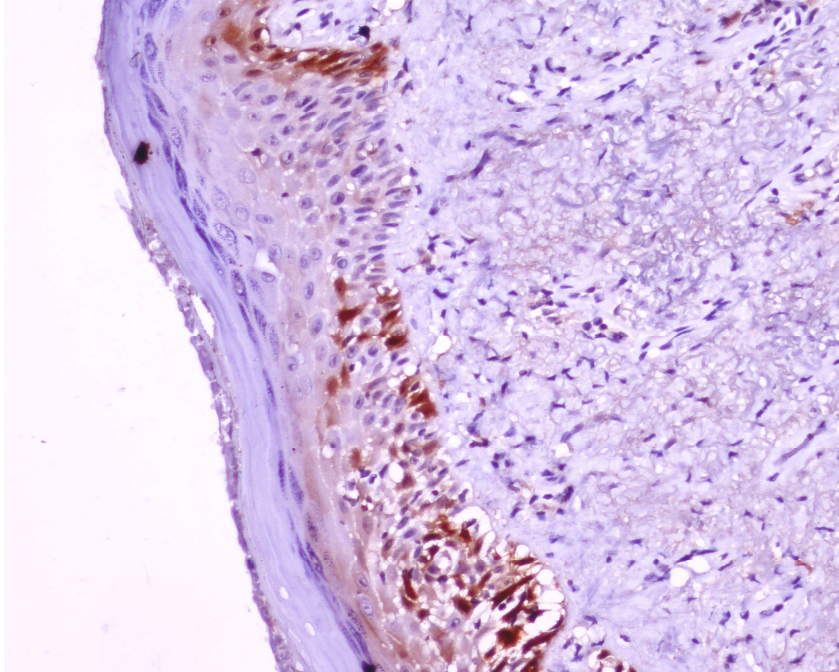
Tablo 4.10: Gruplar arasında p16, p14, p53 antikorları korelasyon analizi

	Antikorlar	Korelasyon katsayısı	p değeri
K	p16-p14	0.399	0.177
	p16-p53	0.107	0.727
	p14-p53	0.172	0.575
AK	p16-p14	0.077	0.793
	p16-p53	0.149	0.612
	p14-p53	0.231	0.426
SHK	p16-p14	0.296	0.219
	p16-p53	0.176	0.470
	p14-p53	0.048	0.844
SHK-AK	p16-p14	0.095	0.699
	p16-p53	0.043	0.861
	p14-p53	0.567	0.011*

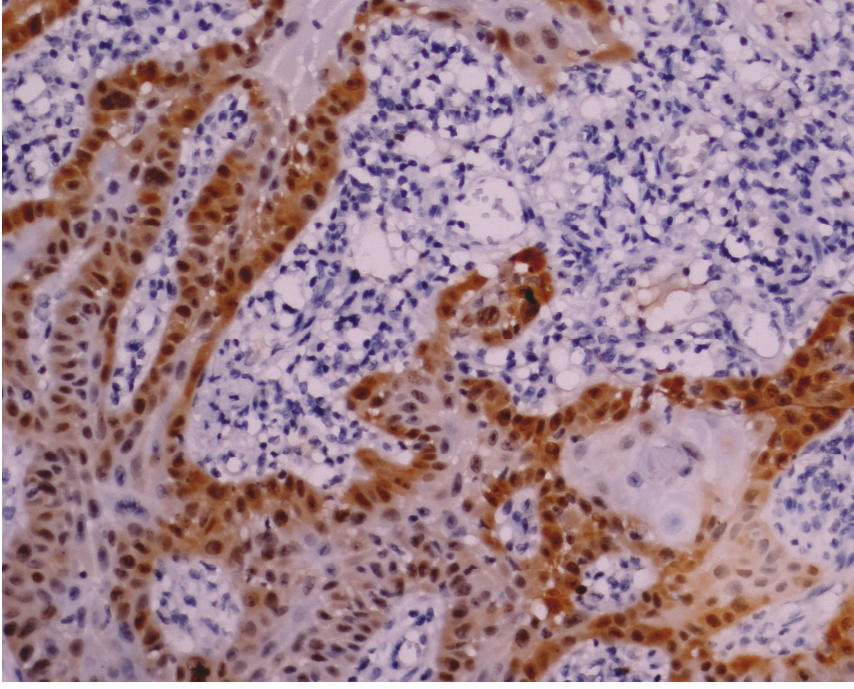
* $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı kabul edilmiştir.



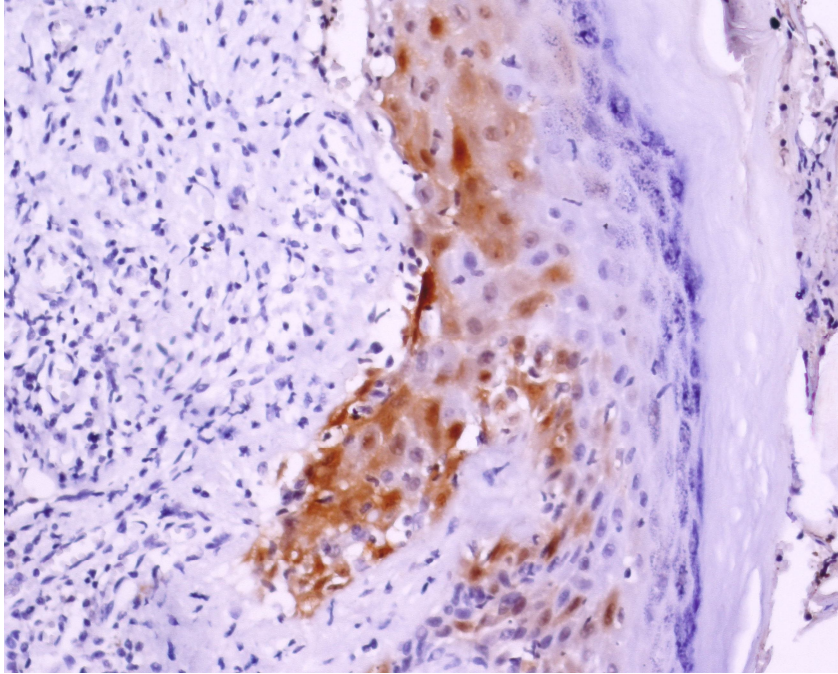
Resim 4.1: Normal oral mukozada nükleer p16 pozitifliği (x400)



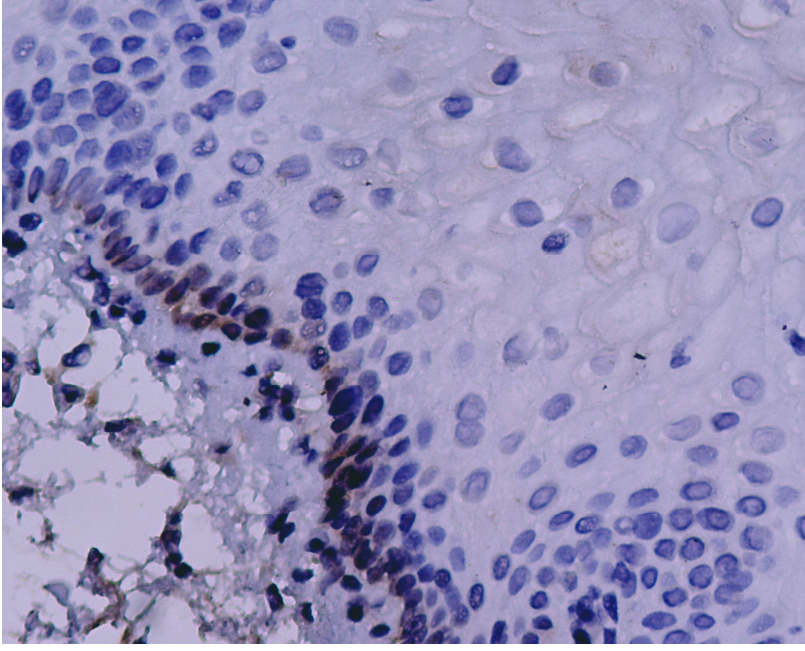
Resim 4.2: Aktinik keilitte nükleer ve sitoplazmik p16 pozitifliği (x400)



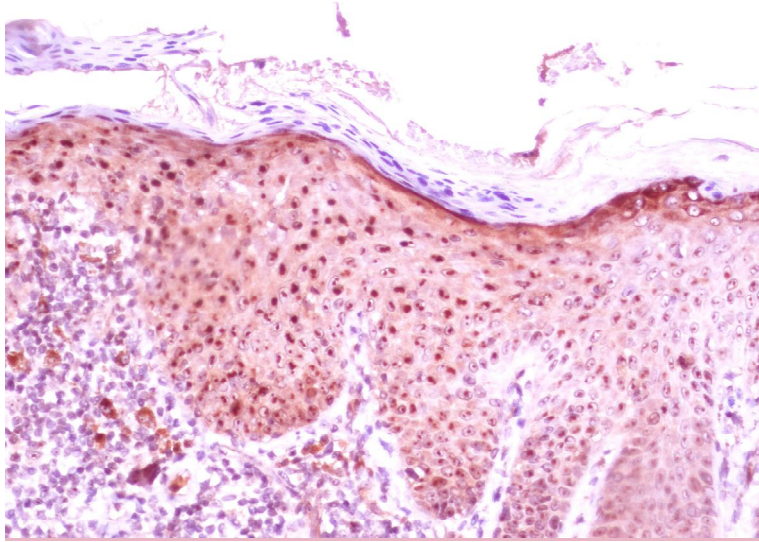
Resim 4.3: Dudak skuamöz hücreli karsinomada p16 pozitifliği (x200)



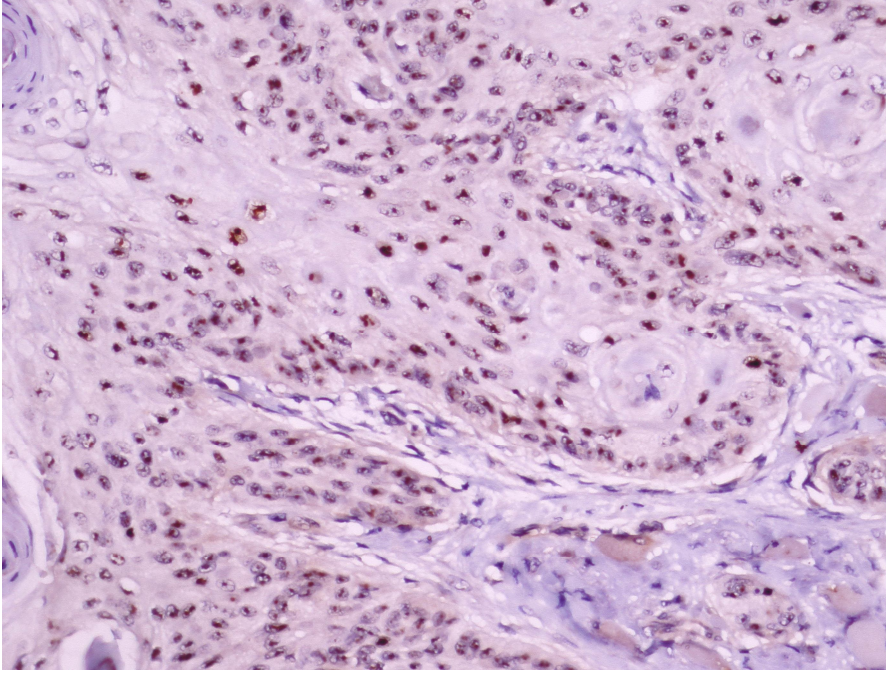
Resim 4.4: Skuamöz hücreli karsinoma komşuluğundaki displastik alanlarda p16 pozitifliği (x200)



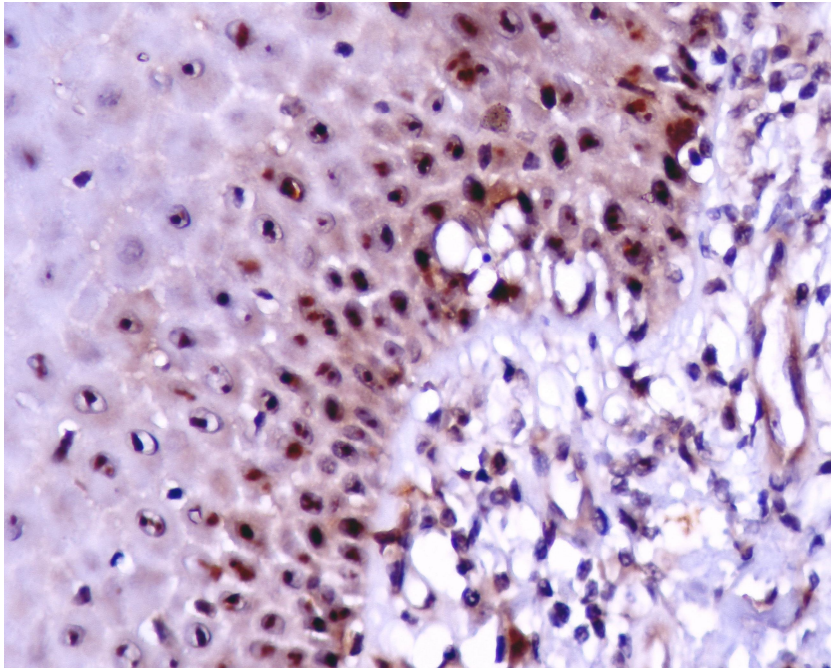
Resim 4.5: Normal oral mukozada nükleer p14 pozitifliği (x400)



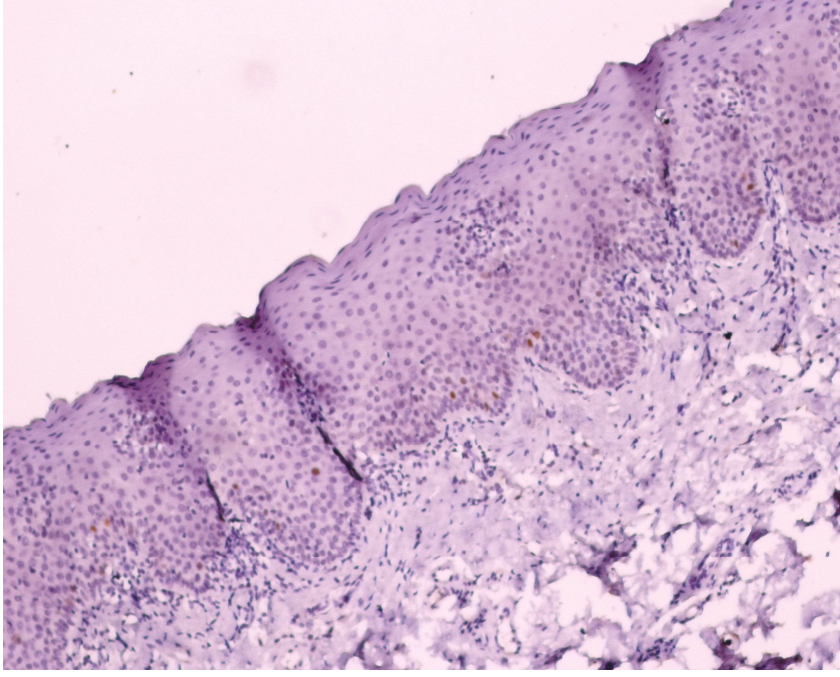
Resim 4.6 Aktinik keilitte nükleer ve nükleolar p14 pozitifliği(x200)



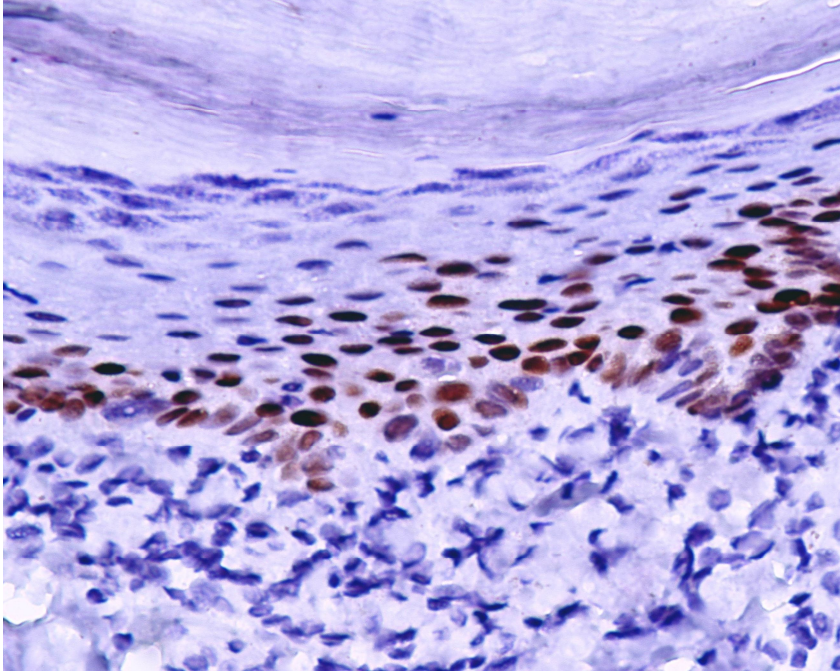
Resim 4.7: Dudak skuamöz hücreli karsinomada nükleer ve nükleolar p14 pozitifliği (x400)



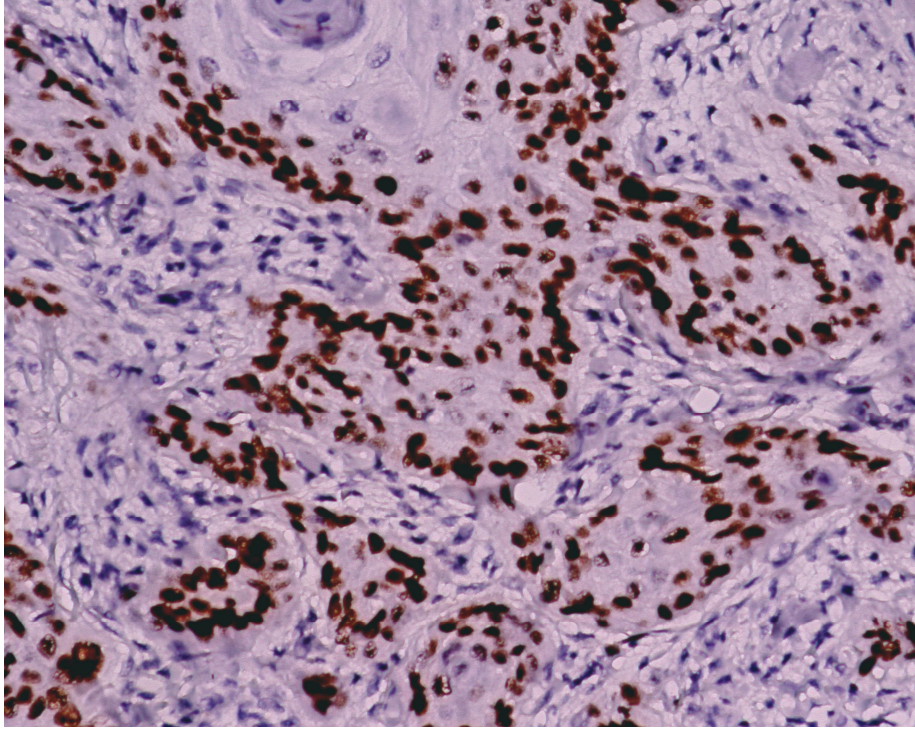
Resim 4.8: Skuamöz hücreli karsinoma komşuluğundaki displastik alanlarda p14 pozitifliği (x400)



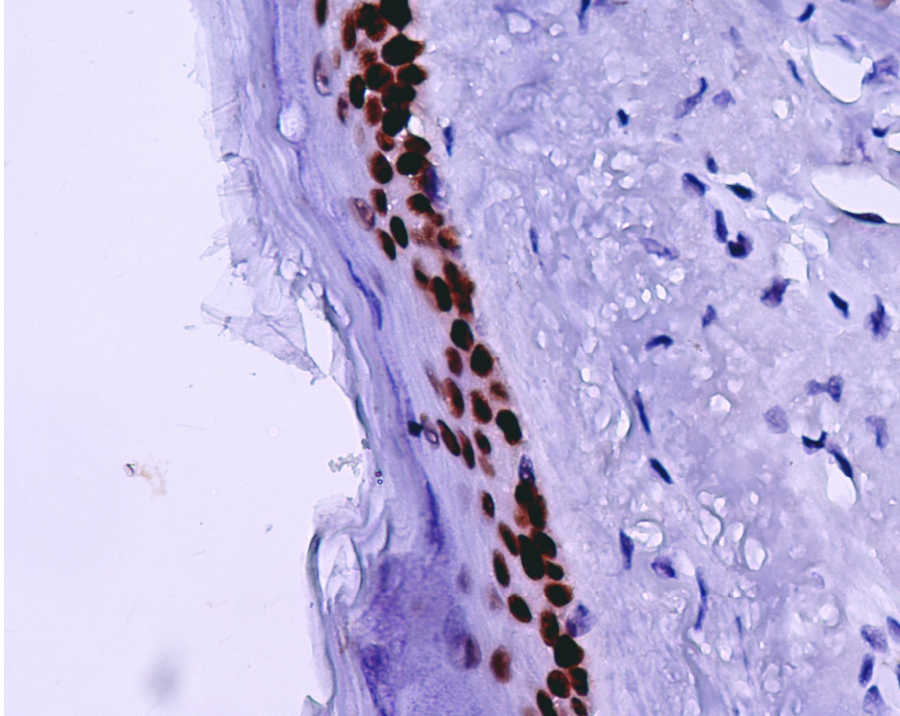
Resim 4.9: Normal oral mukozada bazal tabakada dağınık nükleer p53 pozitifliği (x100)



Resim 4.10: Aktinik keilitte nükleer p53 pozitifliği (x400)



Resim 4.11: Dudak skuamöz hücreli karsinomada nükleer p53 pozitifliği(x200)



Resim 4.12: Skuamöz hücreli karsinoma komşuluğundaki displastik alanlarda p53 pozitifliği (x400)

TARTIŞMA

Alt dudak, oral kavitenin skuamöz hücreli karsinomunun en sık gözleendiği yerdir (112). Alt dudak skuamöz hücreli karsinomu farklı epidemiyoloji ve etyopatogeneze sahip olan bir oral kanser formudur (36,51). Alt dudak skuamöz hücreli karsinomu gelişiminden sorumlu risk faktörleri iyi tanımlandığı halde, bu kanserin gelişiminin ve davranışının moleküler temelini araştıran çok az sayıda çalışma vardır (36,112).

Deri kanseri gelişiminin, güneş hasarlı epidermisten, aktinik keratoza, skuamöz hücreli karsinoma in situ ve skuamöz hücreli karsinomaya kadar uzanan çok basamaklı bir süreç olduğu kabul edilmiştir (113). Lezyonların bir dizi halinde olması, UV uyarılı karsinogenez gelişiminde yer alan moleküler ve fenotipik değişikliklerin progresyonunu çalışmaya olanak sağlamaktadır.

Dudağın premalign lezyonu olarak kabul gören ve “dudağın aktinik keratozu” olarak adlandırılan aktinik keilitler de benzer şekilde basamaklı progresyon göstererek skuamöz hücreli karsinomaya ilerleme potansiyeline sahiptirler. Deri kanseri gelişiminde UV radyasyonun ana etyolojik olay olduğu bilinmektedir. Bazı premalign UV indüklü lezyonlar malign tümörlere ilerlerken, bu lezyonların büyük bir kısmından malignite gelişimi izlenmemektedir. Premalign lezyonların, maligniteye dönüşümündeki hücresel ve moleküler değişiklikler henüz tam olarak açıklanamamıştır (29,45,114).

CDKN2A lokusu insan kanserlerinde p53'ten sonra en sık mutasyona uğrayan gen lokusudur (15). CDKN2A lokusu p16^{INK4a} ve p14^{ARF} olarak adlandırılan iki tümör supresör gen adayını kodlar. p53 ile birlikte bu genlerin, protein ürünleri hücre siklus kontrol noktalarının düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir ve bu sekanslardaki mutasyonların diğer organ kanserlerinde olduğu gibi oral skuamöz hücreli karsinom gelişimine de katkıda bulunduğu bildirilmektedir (115).

p16^{INK4a} ve p14^{ARF} ile yapılan, baş boyun kanserleri ve oral skuamöz hücreli karsinomlardaki çalışmaların büyük kısmı, değişik lokalizasyonlardaki tümörleri incelemektedir. Bu çalışmalar, protein ekspresyonlarından ziyade genetik aberasyonlar üzerine odaklanmıştır. Dudaktan köken alan skuamöz hücreli karsinomalar, bu çalışmalarda genellikle alt grup olarak ele alınmıştır (116,117). Çalışmamızda, p53, p16^{INK4a} ve p14^{ARF} genlerinin ürünü olan proteinleri, prekürsör lezyon olan aktinik keilit olguları ile karşılaştırarak, dudak skuamöz hücreli karsinomalarındaki değişimini inceledik. Bu lokalizasyondan gelişen skuamöz hücreli karsinomalarda her üç proteini birden inceleyen ve histolojik prognostik faktörleri ile birlikte değerlendiren çalışmaya rastlamadık.

p16^{INK4a}, 9p21 kromozomu üzerinde CDKN2A geninde kodlanan, Rb yolağında yer alan, hücre siklusunu negatif yönde düzenleyen bir tümör supresör proteindir. Hücre siklusunu, G1 fazında durdurup S fazına geçişini önler. p16^{INK4a}'nın inaktivasyonu, hücre siklusunun durmasını önler ve tümör gelişimine yol açar (118). p16^{INK4a}'nın yer aldığı CDKN2A lokusundaki mutasyonlar akciğer, meme, beyin, kemik, deri, mesane, böbrek lenfoma ve melanomayı içeren değişik tümör hücre dizilerinde gösterilmiştir (83,92). p16 gen inaktivasyonu, baş boyun ve oral skuamöz hücreli karsinomalarda sıklıkla bulunur ve bu inaktivasyonun homozigot delesyon, DNA metilasyonu ve nokta mutasyon gibi pek çok farklı mekanizma sonucu oluştuğu düşünülmektedir (86,87,116,117).

p16^{INK4a} gen inaktivasyonunun immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi ile ilgili farklı düşünceler mevcuttur. Reed ve meslektaşları ile Sanchez-Cespedes ve meslektaşları, p16^{INK4a}'nın immunohistokimyasal olarak kaybının p16^{INK4a} gen inaktivasyonu ile ilişkili olduğunu savunmaktadır (119,120). Kutanöz skuamöz hücreli karsinoma üzerinde yapılan bir çalışmada p16^{INK4a} ve p14^{ARF}'de hipermetilasyon olan olguların neredeyse tamamında protein ekspresyon kaybı izlenmiştir (78). p16^{INK4a} ekspresyon kaybı, oral premalign lezyonlar ve oral kavite tümörlerinde de gözlenmiştir (86,87).

p16 mRNA ve protein birikimi, hücresel yaşlanma, Ras onkogenik hiperaktivitesi ve Rb inaktivasyonu sonucu oluşur (88). p16^{INK4a} proteini, Rb geninin mutasyone olduğu, delesyon ve inaktivasyona uğradığı durumlarda yüksek oranda saptanırken, intakt Rb geni içeren hücrelerde azalmıştır veya yoktur (121).

p16^{INK4a} genindeki mutasyon ve protein ekspresyonunun immunohistokimyasal boyanması arasındaki ilişki belirsizliğini korumaktadır. p16^{INK4a} gen inaktivasyonu en belirgin saptanan moleküler değişiklik olmakla birlikte immünohistokimyasal olarak p16^{INK4a} protein ekspresyonunun artışı veya ekspresyon kaybını bildiren çeşitli yayınlar bulunmaktadır. Conscience ve meslektaşları, kutanöz karsinomalarda immunohistokimyasal olarak p16^{INK4a} boyanmasının güneş gören alanlarda görmeyen alanlara göre daha yoğun olduğunu göstermişlerdir (122). Değişik çalışmalarda saptanan benzer değişiklikler, derinin skuamöz hücreli karsinomalarındaki p16^{INK4a} mutasyonunun, UV ile ilişkili olduğu görüşünü desteklemektedir (122,123,124).

Hodges ve meslektaşları, normal deriden, skuamöz hücreli karsinomaya geçişi araştırdıkları çalışmalarında, tüm aktinik keratoz olgularında epidermisin alt yarısında p16^{INK4a} ekspresyonunun olduğunu göstermişlerdir (125). Çalışmamızda, normal dudak ve oral mukozadan oluşan kontrol grubumuzdaki 13 olgudan 9'unda (%69,23) p16^{INK4a} ile immunohistokimyasal olarak boyanma izlenmezken pozitifite saptanan 4 olguda zayıf,

dağınık ve fokal olarak boyanma gözledik. Aktinik keilit grubundaki 14 olgudan 9'unda (% 64,28) mukozanın alt 1/3 kısmında sınırlı pozitif boyanma saptadık. Bulgularımız, Hodges ve meslektaşlarının çalışmasına benzer şekilde, aktinik keilitte normal mukozaya oranla artmış p16^{INK4a} ekspresyonunun olduğunu göstermiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Hodges ve meslektaşlarının çalışması ile birlikte bizim çalışmamız karşılaştırıldığında lokalizasyon farkı bulunmakla birlikte, dudakta izlenen aktinik keilit ve deride izlenen aktinik keratozun benzer p16^{INK4a} ekspresyonu gösterebileceği saptanmıştır.

Mortier ve meslektaşları p16^{INK4a} inaktivasyonunun aktinik keratozdan skuamöz hücreli karsinoma gelişiminde bir basamak olduğunu öne sürmüşlerdir (44). Salama ve meslektaşları 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada p16^{INK4a}'nın aktinik keratozu Bowen hastalığından ayırtetmede sensitif ve spesifik bir immunohistokimyasal marker olduğunu öne sürmüşlerdir. P16'nın immunohistokimyasal boyanmasının Bowen hastalığında %84.1 oranında pozitif olduğunu, aktinik keratoz olgularının ise sadece %6.8'inin pozitif boyandığını saptamışlardır (124). Bagazgoitia ve meslektaşları ise aktinik keratoz, Bowenoid aktinik keratoz (BAK) ve Bowen hastalığının(BD) ayırıcı tanısında p16^{INK4a} ekspresyonunun önemini araştıran çalışmalarında bowen hastalığı ve BAK'da p16^{INK4a}'nın aktinik keratoza oranla daha yüksek oranda ekprese olduğunu göstermişlerdir. BAK ve BD nin benzer immunohistokimyasal özelliklerinin bulunması nedeniyle Salama ve meslektaşlarının tersine; p16^{INK4a} nın BD ile genel olarak tüm aktinik keratoz tiplerini ayırtetmede yararlı bir araç olamayacağını düşünmüşlerdir (118). Çalışmamızda skuamöz hücreli karsinoma in situ olgusu bulunmamaktadır. Bu nedenle aktinik keilit ile skuamöz hücreli karsinoma in situ arasında p16^{INK4a} ekspresyonu açısından karşılaştırma olanağı bulunamamıştır.

Hodges ve meslektaşları, çalışmalarında, p16^{INK4a} ekspresyonunun skuamöz hücreli karsinoma in situ olgularında aktinik keratozlara oranla daha yüksek olduğunu, tam kat boyanma paterni gösterdiğini ve ekspresyonun normalden skuamöz hücreli karsinomaya ilerleyiş ile korele olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada skuamöz hücreli karsinomanın invaziv komponentinde p16^{INK4a} boyanmasının olduğunu, aktinik keratozlarda ise epidermin alt yarısında boyanma olduğunu göstermişlerdir (125). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde 19 skuamöz hücreli karsinoma olgusundan 5 tanesinde, daha çok invaziv komponentte p16^{INK4a} ekspresyonunun olduğunu , 4 tanesinde ise fokal birkaç alanda ekspresyon olduğunu saptadık. Ancak 7 olguda ekspresyonun bulunmadığı dikkati çekti. Bu bulgular da, skuamöz hücreli karsinomada literatürde bildirilen p16 protein ekspresyonunun değişkenliğini desteklemiştir.

Tokman ve meslektaşları oral skuamöz hücreli karsinomalarda p16^{INK4a} ve p53 ekspresyonlarını incelemişlerdir (115). Çalışmalarında bir alt grup olarak değerlendirdikleri, dudak skuamöz hücreli karsinomaların %58'inde p16^{INK4a} ile pozitif boyanma saptanmıştır. Bizim çalışmamızda benzer olarak dudak skuamöz hücreli karsinoma olgularının %63'ünde pozitif boyanma izlenmiştir.

Reed ve meslektaşları ile Sanchez-Cespedes ve meslektaşları, p16^{INK4a}'nın immunohistokimyasal olarak kaybının p16^{INK4a} gen inaktivasyonu ile ilişkili olduğunu savunmaktadır (119,120). Soufir ve meslektaşları da kutanöz skuamöz hücreli karsinomaların %24'ünde CDKN2A inaktivasyonu olduğunu göstermişlerdir (123). Yine de sporadik derinin skuamöz hücreli karsinomalarında CDKN2A lokusunun rolü kesin olarak açıklanamamıştır (126). CDKN2A lokusuna ait genetik değişiklikler, çalışmamızda incelenmediği için dudak skuamöz hücreli karsinomalarda p16^{INK4a} ekspresyonundaki değişimler ile p16^{INK4a} gen inaktivasyonu arasındaki ilişki değerlendirilememiştir. Daha geniş olgu içeren ve genetik değişimleri bir arada inceleyen çalışmaların p16^{INK4a} ekspresyonunun, dudak skuamöz hücreli karsinoma gelişimindeki yerini daha iyi ortaya koyabileceği düşünülmüştür.

Kannan ve meslektaşları oral skuamöz hücreli karsinomalarda p16^{INK4a} mutasyonlarının beklendiği kadar sık olmadığını öne sürmüşler ve skuamöz hücreli karsinoma gelişiminde p16^{INK4a}'nın mutasyonel inaktivasyonunun major role sahip olmayabileceği sonucuna varmışlardır (127). Diğer taraftan basamaklı oral onkogenezi araştıran deneysel çalışmalarda p16^{INK4a} protein ekspresyonunun normal mukozadan hiperplastik mukozaya geçişte artarken, displastik mukozaya ve karsinoma geçişte azalma gösterdiği de saptanmış ve prekanseröz oral lezyonlarda p16^{INK4a} fonksiyon kaybının malign transformasyon için prognostik belirleyici olabileceği kabul edilmiştir (87)

Angiero ve meslektaşları normal oral mukozadan displastik mukozaya geçişte artan p16^{INK4a} protein ekspresyonu, displastik mukozadan oral skuamöz hücreli karsinoma geçişte ise azalmış p16^{INK4a} ekspresyonu olduğunu gözlemlemişler ve artmış p16^{INK4a}, p53 ekspresyonunun Ki-67 birlikteliğinde oral mukozada prekanseröz lezyonları derecelendirmede ve kanser gelişimini saptamada önemli olabileceğini öne sürmüşlerdir (128). Bizim çalışmamızda p16^{INK4a}'nın immunohistokimyasal ekspresyonunda bir spektrum olarak ele almaya çalıştığımızda normal mukozadan aktinik keilite geçişte istatistiksel olarak belirgin olarak artışın bulunduğunu gözlemledik. Aktinik keilitten skuamöz hücreli karsinoma geçişinde ise boyanma yüzdesi ve yoğunluğunu içeren H-SKOR değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasada ekspresyonun artış gösterdiğini saptadık. Deri ve oral bölgenin skuamöz hücreli karsinomalarında yapılan çalışmalardan p16^{INK4a} immunohistokimyasal

boyanmasında elde edilen farklı sonuçlar farklı p16^{INK4a} antikorlarının kullanımı, olgu sayısının yetersizliği ve farklı skorlama metodları nedeniyle açıklanabileceği gibi örneklerden bir kısmı inaktif mutant bir p16^{INK4a} protein ekspresyonu da sergiliyor olabilir (129,90).

HPV ile ilişkili servikal intraepitelyal neoplaziler ve serviks skuamöz hücreli karsinomalarında immunohistokimyasal olarak p16^{INK4a} overekspresyonu olduğu gösterilmiştir (130,81). Bu gözlemler viral onkoprotein E7'nin Rb proteinini bloke ederek p16^{INK4a} transkripsiyonunun inhibisyonunu önlediği hipotezine uygundur (115,81). Willmann ve meslektaşları ise serviks karsinomlarında tanımlanan tersine BD'daki p16^{INK4a} overekspresyonu ile HPV arasında ilişki olmadığını göstermişlerdir (131). Serviks malignitelerinin aksine, oral skuamöz hücreli karsinomalarda HPV geninin saptanmasının karsinojenik süreçte benzer katkısı olmadığı bildirilmektedir. Oral skuamöz hücreli karsinomlarda HPV, p16^{INK4a}, ve p53 arasındaki ilişki tutarsızlık göstermektedir (132). Nemes ve meslektaşları dudak ve tonsillar karsinomları dahil etmedikleri oral kanserleri içeren çalışmalarında HPV pozitif ve negatif tümörlerde p16^{INK4a} ve p53 ekspresyonları açısından anlamlı farklılık saptamamışlar. Oral skuamöz hücreli karsinomlarda HPV saptanmasının; E6/E7 aktivasyonunu, karsinojenik süreç içerisinde enfeksiyon varlığını göstermediğini, diğer HPV ilişkili anogenital maligniteler ile karşılaştırıldığında spesifik, bağımsız bir karsinojenik etkisi olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda HPV enfeksiyonu ve p16^{INK4a} arasındaki ilişki değerlendirilmemekle birlikte dudak skuamöz hücreli karsinoma gelişiminde; normalden aktinik keilite ve skuamöz hücreli karsinomaya geçişteki p16^{INK4a} ekspresyonundaki bu artışın, Rb inaktivasyonuna yol açan mekanizmalar yanı sıra, HPV veya başka bir viral onkoprotein etkisiyle de ortaya çıkabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle, dudak skuamöz hücreli karsinomalarda viral etkininde sorgulandığı daha geniş olgulu çalışmaların bu konuyu açıklayabileceği kanaatindeyiz.

Normal mukozadan aktinik keilite geçişte istatistiksel olarak anlamlı saptadığımız artış ile p16^{INK4a} nın erken dönemde karsinogenezden koruma aşamasında etkili bir değişim olduğunu düşündük. Ama skuamöz hücreli karsinoma olgularının bir kısmında ekspresyonun devam etmesi geç dönemde de etkisinin devam ettiğini akla getirmiştir. Aktinik keilitlerde ve skuamöz hücreli karsinomalarda izlenen p16^{INK4a} ekspresyonu, inaktif p16^{INK4a} proteini birikimi olması ve hücrelerin hücre siklusundan kaçışının mümkün olamaması veya Rb yolağındaki diğer komponentlerden birinin başarısızlığı, yetersizliği sonucu fonksiyonel bir p16^{INK4a} proteini overekspresyonu olması ile açıklayabiliriz. p16^{INK4a} overekspresyonu, Salama ve meslektaşlarının çalışmalarına benzer olarak UV radyasyonun defektif p16^{INK4a} tümör supresör gen aktivitesine yol açtığı hipotezini destekleyebilir (124). Bizim çalışmamız,

vaka sayısı bakımından küçük çaplı olmakla birlikte en azından aktinik keilit ve dudak skuamöz hücreli karsinoma gelişiminde p16^{INK4a}'nın rolünü araştırmak için başka çalışmaların da yapılabileceğini gösteren bir ön çalışma niteliğindedir.

İnsan kromozomundaki CDKN2A lokusu, p16^{INK4a} dışında aynı alternatif mRNA düzenlenmesinden gelişen p14^{ARF} isimli ikinci bir protein kodlar (83). p14^{ARF}'nin hücre siklus kontrolünde, p16INK4a/Rb yolağı ile p53 yolağını bağlayarak rol oynadığı kabul edilmiştir (97). Rb fosforilasyonu, E2F'yi aktive eder ve p14^{ARF}'nin indüksiyonunu sağlar, böylece p14^{ARF}, MDM2 ile bağlanarak, p53'ün degradasyonunu ve nükleusdan dışarı çıkmasını engeller (18). Diğer taraftan p16, CDK 4-6'yı bağlayarak siklin D'yi inhibe eder. Rb fosforilasyonunu inhibe ederek, Rb-E2F transkripsiyonel kompleksin oluşumunu sağlar ve hücre siklus progresyonunu G1-S kontrol noktasında bloke eder (16,17).

Baş boyun kanserlerinde INK4A-ARF genlerinde homozigot delesyon, promoter metilasyon, mutasyon gibi moleküler değişikliklere rastlanmıştır (116,117). İmmunohistokimyasal olarak p14^{ARF} protein ekspresyonunu çalışan çok az sayıda çalışma vardır (22,77). Literatürde aktinik keilit ile ilgili yapılmış sınırlı sayıda çalışma vardır (24,43). Ve bunların büyük kısmı p53 ekspresyonu üzerinde odaklanmıştır. Biz literatürde aktinik keilitlerde p16^{INK4a} ve p14^{ARF} ekspresyonunu çalışan herhangi bir araştırma saptamadık.

Pacifico ve arkadaşları bazal hücreli karsinoma (BHK), skuamöz hücreli karsinoma ve aktinik keratozdan oluşan 40 vakalık bir melanoma dışı deri kanseri grubunda CDKN2A inaktivasyonunun delesyon ile olguların %82,5'inde olduğunu göstermişlerdir (126). Sadece 2 BHK olgusunda p16^{INK4a} protein ekspresyonu, 1 tane BHK olgusunda ise p14^{ARF} ekspresyonu saptamışlar ve immunohistokimyasal olarak p16 ve p14 ekspresyon kaybı göstermeyen olgularda CDKN2A geninde genetik abnormalite saptamamışlardır. p14^{ARF} ve p16^{INK4a} genetik ve epigenetik değişikliklerini saptamak için Weber ve meslektaşlarının yaptığı çalışmada, baş boyun bölgesinin malign ve benign tümörlerinde p16^{INK4a} ve p14^{ARF} genlerinde metilasyon saptadıkları olgularda immunohistokimyasal ekspresyonun negatif olduğu, metilasyon olmayan olguların neredeyse tümünde orta-kuvvetli derecelerde gen ürün ekspresyonunun bulunduğu gösterilmiştir (77).

Brown ve meslektaşları derinin skuamöz hücreli karsinomalarında CDKN2A lokusundaki değişikliklerin yaygın olduğunu ve bu lokustaki iki tümör supresör genin inaktivasyonunu genetik ve epigenetik mekanizmalarla göstermiş ve bu gen ürünlerinin ekspresyonları ile immunohistokimyasal olarak karşılaştırmışlardır. p16^{INK4a} ve p14^{ARF}'nin mutasyonlarının UV ile tetiklenen skuamöz hücreli karsinoma patogenezinde rolü olduğunu desteklemişler ve bu genlerin, derinin skuamöz hücreli karsinomu gelişiminde metilasyon

yolu ile inaktivasyonun en yaygın mekanizma olduğunu ve p16^{INK4a} ve p14^{ARF} gen promoter metilasyonunun birbirinden bağımsız olaylar olduğunu göstermişlerdir. İmmunohistokimyasal olarak ise p16^{INK4a} metilasyonu olan olguların %64'ünde, p14^{ARF} metilasyonu olanların ise %62'sinde uyumluluk saptanmıştır. Biallelik inaktivasyon olan tümörlerde fonksiyonel protein kaybını immunohistokimyasal olarak doğrulamışlardır (8).

p14^{ARF} protein ekspresyonunu farklı insan tümörlerinde araştıran Geradts ve meslektaşları, küçük hücreli dışı akciğer karsinomalarında diğer çalışmalar ile tutarlı olarak azalmış p14^{ARF} ekspresyonu olduğunu, pankreas karsinomalarında ise 28 olgunun 9'unda p14^{ARF} ile pozitifite olduğunu görmüşlerdir. Tümörlerdeki p16^{INK4a} ekspresyonunu da değerlendirdikleri bu çalışmada p14^{ARF} ekspresyon kaybının en azından bazı tümörlerde ve kanser hücre dizilerinde olabileceğini ancak p16 inaktivasyonundan daha nadir gözlemlendiği sonucunu çıkarmışlardır (133). Servikal skuamöz hücreli karsinoma karsinogenezini ele alan bir çalışmada ise p53, p15, p16^{INK4a} ve p14^{ARF} ekspresyonlarının servikal displazi ve karsinomların her ikisinde de artış gösterdiği ve bu artışın HPV onkoproteinlerine karşı aktive olmuş kompensatuar bir mekanizma olduğu desteklenmiştir. Servikal karsinomaların senesens ve apoptozun aktive edildiği farklı mekanizmalar sonucu geliştiği düşünülmüştür (81). Wang ve meslektaşları, HPV ilişkili servikal neoplazilerde p16^{INK4a} ve p14^{ARF} protein ekspresyonunu araştırmışlardır. Premalign lezyonlardan servikal kanser gelişiminde p16^{INK4a} ve p14^{ARF} aşırı ekspresyonunun potansiyel biyomarkerlar olabileceği sonucunu çıkarmışlardır (134). Kanao ve meslektaşları HPV pozitif servikal kanserlerde HPV E6,E7 ekspresyonunun sonucu olarak p14^{ARF} ve p16^{INK4a}'nın overeksprese olduğunu göstermiş, HPV negatif serviks karsinomlarında p14^{ARF} ekspresyon kaybını p53 degradasyonu ve p16^{INK4a} ekspresyon kaybını Rb inaktivasyonu ile ilişkilendirmişlerdir (135). Olgularımızda, normal mukozadan, aktinik keilite ve skuamöz hücreli karsinomaya geçişte değişen derecelerde p14^{ARF} ekspresyonu saptandı. Normal mukozadan aktinik keilit grubuna geçerken p14^{ARF} ekspresyonunun istatistiksel olarak belirgin olarak arttığı, aktinik keilit olgularına göre skuamöz hücreli karsinoma olgularının daha az ekspresyon gösterdiği izlendi. Kontrol grubuna göre skuamöz hücreli karsinoma olguları daha belirgin ekspresyon göstermekle birlikte bu ekspresyonunun aktinik keilit olgularına göre daha az olduğu dikkati çekti. Erken dönemdeki p14^{ARF} ekspresyonundaki bu artışı, p14^{ARF}'nin onkogenik aktivasyonu sonucu koruyucu mekanizma olarak devreye girdiği şeklinde düşünebiliriz. p14^{ARF} overekspresyonu, MDM2 sekestrasyonuna yol açarak p53 ile bağlanmasını önleyici ve p53 stabilize edici bir etkiye sahiptir. Geç dönemde, skuamöz hücreli karsinoma grubundaki azalmada ise p53 ilişkili negatif feedback mekanizmalarının etkili olabileceği düşünülmüştür. Servikal

kanserlerde HPV infeksiyonu ile p16^{INK4a} ve p14^{ARF} aşırı ekspresyonu arasındaki ilişki HPV onkoproteinlerinin pRb ve p53 proteinlerinin inaktivasyonu sonucu negatif feedback sonuç olarak değerlendirilmektedir (130). Çalışma grubumuzda skuamöz hücreli karsinomalarda, normal mukozadan daha fazla miktarda saptadığımız p14^{ARF} ekspresyonun varlığından, p14^{ARF}'nin etkisini sürdürdüğü ancak karsinoma gelişimini engellemede yetersiz kaldığı sonucu çıkarılabilir. Çalıştığımız olguların verilerinde etyolojik faktörler net olarak ortaya konulmasa da, lokalizasyon açısından bakıldığında, dudak skuamöz hücreli karsinomunda UV etkisi ve tütün kullanımı etyolojik bakımdan HPV'nin karsinojenik etkisinden daha çok sorgulanmaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, HPV ilişkili serviks kanserlerinde elde edilen sonuçlara benzer özelliktedir. Bu benzerlik, p14^{ARF} ekspresyonunun, HPV ilişkisinden de bağımsız ortaya çıkabileceğini düşündürmüştür. Ancak bu görüşün, dudak skuamöz hücreli karsinomalarında HPV etkisi çalışılarak, desteklenmesi gerekmektedir.

Baş boyun bölgesinde p14^{ARF} protein ekspresyonunu çalışan çok az sayıda çalışmada değişken sonuçlar bildirilmektedir. Kwong ve meslektaşlarının çalışmasında p16^{INK4a}, p53, pRb, p21, E2F-1 belirleyicileri ile birlikte p14^{ARF}'nin ön dilin skuamöz hücreli karsinomasındaki prognostik önemi belirlenmeye çalışılmış ve diğer klinikopatolojik özelliklerden bağımsız olarak p14^{ARF} ekspresyon kaybının surveyi olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir. (22). Cheng ve meslektaşları özefagus skuamöz hücreli karsinomalarında p14^{ARF}, p53 ve MDM2 protein ekspresyonu ile prognoz arasında anlamlı ilişki olmadığını göstermişlerdir (136). Bizse çalışmamızda, Cheng ve meslektaşlarının araştırmalarına benzer şekilde p53, p16^{INK4a} ve p14^{ARF} ekspresyonu ile dudak skuamöz hücreli karsinoma olgularında histopatolojik prognostik faktörler açısından karşılaştırdığımızda anlamlı bir ilişki saptayamadık. Ohta ve meslektaşları oral skuamöz hücreli karsinomalarda p16^{INK4a} ve p14^{ARF} genlerinin sıklıkla metilasyon, mutasyon ve allelik delesyonlarla inaktive olduğunu olguların %97.7'sinde 9p21 lokusunda, p16^{INK4a} ve p14^{ARF}'de değişikliklerin bulunduğunu göstermişlerdir. p16^{INK4a} ve p14^{ARF} gen inaktivasyonu ve 9p21 lokusundaki değişikliklerin oral skuamöz hücreli karsinoma patogeneğinde önemli rol oynayabileceğini belirtmişlerdir (137). Dudak skuamöz karsinogeneğinde p14^{ARF}'nin etkin bir rolü olup olmadığının veya prognostik önemi olup olmadığının anlaşılabilmesi için immunohistokimyasal çalışmanın moleküler ve genetik çalışmalar ile desteklenmesi gerektiğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda araştırdığımız bir diğer protein olan p53'ün, genotoksik stres altındaki hücrelerde arttığı bildirilmekte ve koruyucu rolünden ötürü “genomun gardiyanı” olarak adlandırılmaktadır (108). İyonize radyasyon, oksidatif reaksiyonlar, hipoksemi ve onkogenik proteinler, DNA hasarına sebep olduğunda p53 fosforile olur ve p53-wild tip formunda aktive

olur (24). Temel fonksiyonu, hücreye dışarıdan bir saldırı olduğunda apoptozisi indükleyerek veya hücre siklusunu durdurarak onkogenezi önlemektir (118). Mutasyone formu, bu fonksiyonlardan yoksundur ve insan kanserlerinde en sık mutasyonu saptanan genidir. Malign tümörlerin %50'sinde bu mutasyon bildirilmektedir (118,100). Literatürde pek çok çalışma p53 genindeki değişikliklerin skuamöz hücre karsinogenezi ile ilişkili olduğunu öne sürmektedir (138,139,140). Oral skuamöz hücreli karsinomalar, aktinik keratozlar ve deri skuamöz hücreli karsinomalarını içeren çoğu çalışmada p53 protein ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (141,45,109,23).

Güneş gören deride ve premalign lezyonlardaki p53 mutasyonları , p53 mutasyonunun erken dönemde oluştuğunu ama tümör gelişimi için yeterli olmayabileceğini düşündürmektedir (113). Bu nedenle melanoma dışı deri kanserlerinin gelişiminde ek onkogen ve tümör supresör gen değişikliklerinin önemli olabileceği bildirilmektedir (126).

TP53'deki mutasyonlar, baş boyun skuamöz hücreli karsinomalarında en sık saptanan genetik bozukluklardır ve çalışmalar *TP53* mutasyonel spektrumun dudak ve oral kavite kanserlerinde farklı olduğunu göstermiştir (100,142). İntraoral tümörlerde gözlenen DNA hasarı bütün ilişkili değişikliklerden oluşurken, dudak kanserlerinde UV ışığının yol açtığı mutasyonlar mevcuttur (142). Alt dudak kanserlerinde p53 aşırı ekspresyonunun yüksek oranda olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (143,112). p53'teki bu aşırı ekspresyon, genellikle *TP53* mutasyonu ile ilişkilendirildiğinden, alt dudak kanseri gelişiminde p53 yolağındaki değişimlerin önemli olduğu kabul edilmektedir (112).

Aktinik keilit, aktinik keratoz ve skuamöz hücreli karsinomalarda, p53 protein ekspresyonu üzerinde yapılan çalışmalarda daha çok hem mutant hem de "wild type" (wt) p53'ü gösteren immunohistokimyasal belirteçler kullanılmıştır. Bu yüzden bu çalışmalarda saptanan p53 aşırı ekspresyonunun tamamını mutasyon göstergesi olarak değerlendirmemek gereklidir. *TP53*'deki mutasyonlar, kanserlerde tanımlanan en yaygın mutasyonlar olmakla birlikte tüm p53 ekspresyonu saptanan deri tümörlerinde p53 mutasyonu bulunmamıştır (144). Wt-p53, UV radyasyona maruziyet sonrası artış gösterir, mutasyone p53 daha yavaş degrade olduğundan birikime sebep olur . Bu nedenle çalışmalarda saptanan p53 ekspresyonundaki artış, tümör progresyonu sırasındaki mutasyone p53 proteinindeki artışa bağlı olabileceği gibi, diğer genlerdeki kararsızlığa veya DNA hasarlayıcı ajanlara karşı gelişmiş wt-p53 ekspresyon cevabı da olabilir. Deri kanserlerinde yapılan pek çok çalışmada p53 mutasyonunun immunohistokimyasal olarak p53 protein overekspresyonu ile iyi korele olmadığı saptanmıştır (145,146,147). Nelson ve meslektaşlarının aktinik keratozlar üzerinde yaptığı çalışmada, olguların %53'ünde p53 mutasyonu izlenirken, %80 oranında p53

immunohistokimyasal pozitifliği gösterdiğini belirtmişlerdir (145). Pacifico ve meslektaşlarının çalışması, p53 mutasyonu açısından değerlendirildiğinde 40 tümörden 22 sinde ekson 4-9 arasında mutasyon saptanırken immunohistokimyasal olarak bütün tümörlerin p53 pozitivitesi gösterdiğini izlemişlerdir (126). Bu durum aslında immunohistokimyasal olarak saptanan p53 overekspresyonunun p53 mutasyonu ile birebir örtüşmediğini göstermektedir. p53 mutasyonu ve immunohistokimyasal ekspresyonu arasındaki korelasyon olmaması birçok faktöre bağlı olabilir. Bazı mutasyonlar proteini daha az stabil ve degradasyona daha eğilimli hale getirirken alternatif olarak bazı antikörler wt-p53 ile çapraz reaksiyona girebilir (148).

Çalışmamızda, diğer çalışmalar ile tutarlı olarak normal epidermal hücrelerde az miktarda p53 proteini saptadık (138). Normal mukoza ve aktinik keilit ile aktinik keilit ve skuamöz hücreli karsinoma grupları arasında wt-p53 ekspresyonlarını karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu tespit ettik. Gruplar arasındaki farklılıklarda, normalden aktinik keilite ve skuamöz hücreli karsinomaya doğru geçişte artma eğilimi gösteren bir ekspresyon değişimi saptadık. “Wild” tip p53 ekspresyonunda saptadığımız bu artış, skuamöz hücreli karsinoma progresyonunda aslında diğer çalışmalarda belirtildiği gibi mutant p53 ekspresyonunun zannedildiği kadar çok da fazla bir önemi olamayabileceği, belki de wt-p53’teki artışında bu ekspresyon yanıtına katkıda bulunabileceğini akla getirmektedir. Ancak yine de bu olgularda mutant tip p53 klonu gören bir antikör ile ve/veya moleküler çalışmalar eşliğinde bu savın desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Bu çalışmada skuamöz hücreli karsinoma olgularımızın %84.21’inde wt-p53 ekspresyonu olduğunu saptadık ve UV indüklü dudak karsinogenezinde wt-p53’ün artmış ekspresyonu olduğunu tespit ettik. Wt-p53 artışının gösterilmesi, “chemoprevention” çalışmalarda hedef bir molekül belirleyebilmek için, normal ve mutant p53 proteinlerin ayrımının ileride yararlı olabileceği görüşünü desteklemektedir (109).

Oral kanserler ve alt dudak kanserlerinde yapılan çalışmalarda invaziv adalardaki p53 ve p21 ekspresyonunun tümörün tamamında görülenden daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır (112). İnfiltratif adalardaki hücrelerde invazyon ve metastaz için genetik değişikliklerin biriktiği bu yüzden bu alanların tümör davranışından sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (112). Çalışmamızda wt-p53’ün derinde yerleşimli invaziv adalarda, tümörün diğer alanlarına göre daha fazla eksprese olduğunu saptadık. Bu bulgu, diğer çalışmalarda, invaziv adalarda saptanan p53 birikiminin sadece mutasyona p53 birikimi ile açıklanamayacağını, sanıldığı aksine wt-p53 proteininin de etkili olabileceğini düşündürmüştür. Baş boyun skuamöz karsinomdaki p53 aşırı ekspresyonu, kötü prognoz ile

ilişkilendirilmekte, bunun da mutant p53 proteininden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bizim çalışmamızdan elde edilen veriler ile de wt-p53 proteini ile de böyle bir artışın olabileceği ve bu ekspresyon ile histolojik prognostik faktörler arasında ilişki bulunmadığı sonucuna varılabilir. Tokman ve meslektaşlarının, oral skuamöz hücreli karsinomda, p53 ve p16 ekspresyonu üzerinde yaptıkları çalışmada invazyon gradeleme sistemi ve p53 ekspresyonu arasında korelasyon saptanmamıştır (115). Bukhari ve meslektaşları p53 proteinin immunohistokimyasal skorlarının skuamöz hücreli karsinomların histolojik gradeleri ve TNM evreleri ile güçlü ilişkisi olduğunu göstermiştir (138).

p53 aşırı ekspresyonunun, skuamöz hücreli karsinomalarda erken olaylardan biri olduğu öne sürülmektedir (138). Aktinik keilit ve skuamöz hücreli karsinoma arasındaki ilişki oldukça kompleksdir. UV ışığın deri üzerindeki etkisini araştıran çok sayıda çalışma olmasına rağmen aktinik keilit ve skuamöz hücreli karsinom gelişimi ile ilgili yapılmış çok az sayıda çalışma vardır (23,24). Bu nedenle aktinik keilitin gelişim mekanizması ve malign potansiyeli açık değildir. Martinez ve meslektaşları p53 ekspresyonunun normal dudak ve oral mukozaya oranla, aktinik keilit olgularında artmış olduğunu, antiapoptotik protein bcl-2 ekspresyonunun normal mukozaya oranla azalmış olduğunu göstermişlerdir. p53 ve bcl-2' nin aktinik keilitteki malign transformasyonu düzenlemede önemli rol oynayabileceğini belirtmişlerdir (23). p53 ekspresyonundaki bu artışı UV maruziyet sonucu oluşmuş yoğun DNA hasarı ile ilişkilendirmiş ve DNA hasarının bir hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğine karar vermede predominant faktörlerden biri olduğunu öne sürmüşlerdir (23,149). UV ile indüklenen apoptozis değişik yolları içeren kompleks bir olaydır. p53'ün rolü premalign hücrelerin apoptozis ile ölümünü indüklemek olabilir.

Crosthwaite ve meslektaşları, skuamöz hücreli karsinoma, aktinik keilit, benign lezyonlar ve normal mukozada p53 ekspresyonunu çalışmış ve aberan p53 ekspresyonunun dudak kanseri patogenezinde erken bir olay olduğu sonucuna varmışlardır (143). Pimentel ve meslektaşları da çalışmalarında benzer şekilde aktinik keilitten skuamöz hücreli karsinomaya doğru artan p53 ekspresyon değerleri bulmuşlardır (43). Ayrıca tümörle ilişkili olan ya da olmayan aktinik keilit olguları arasında p53 ekspresyonu açısından farklılık saptamamışlardır (43). Çalışmamızda skuamöz hücreli karsinoma komşuluğunda yer alan aktinik keilitler ile tümör ilişkisi bulunmayan aktinik keilitleri p53 ekspresyonu açısından karşılaştırdığımızda anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu bulgu, Pimentel ve meslektaşlarının yaptığı çalışmaya benzer şekilde p53 immunohistokimyasal boyanmasının, aktinik keilitlerin skuamöz hücreli karsinomaya dönüşümünü belirlemede tek başına yararlı bir belirleyici olamayacağını göstermektedir (43). Martinez ve meslektaşları; suprabazal lokalizasyonda p53 ekspresyonu

saptanan aktinik keilit lezyonlarında malignite gelişim riskinin yüksek olduğunu öne sürmüşlerdir (23). Çalışmamızda aktinik keilit ve tümör komşuluğunda izlenen aktinik keilit olguları arasında p53'ün boyanma paternleri açısından da anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Apoptozis, epidermal homeostazi sağlamada son derece önemli bir rol oynar ve apoptotik hücreler normal ve hasta deride gözlenebilir. Bununla birlikte derideki apoptotik inhibitör mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmektedir. Survivin keratinosit apoptozunun potansiyel bir modulatörüdür ve proliferen hücrelerde bol miktarda eksprese olur. Bu bağlamda çoğu insan kanserinde overeksprese olurken normal dokularda gözlenmez(150). İmmunohistokimyasal olarak p53 ile pozitif boyanan deri bazal hücreli karsinom ve skuamöz hücreli karsinomlarını çalışan bir araştırmada, olguların %90'ında survivin pozitifliği saptanmış ve skuamöz hücreli karsinomada survivinin p53 aktivitesinin etkisini azaltarak apoptotik süreci inhibe edip tümör gelişimine yol açabileceği düşünülmüştür. Survivin'in deregölasyonu hem epidermal homeostazi sağlayıp hem de deri kanseri gelişimine yol açabilir (150). Bizim çalışmamızda da wt-p53 proteininin normal mukozadan skuamöz hücreli karsinoma ile ilerlerken kademeli olarak artması bu tip inhibitör apoptotik proteinlerin etkisiyle apoptozun baskılanıp tümöral hücre proliferasyonuna yol açan mekanizmaların dudak karsinogenezinde etkisi olabileceğini ve daha başka çalışmalarla bu mekanizmanın da araştırılabileceğini akla getirmiştir.

Dudak skuamöz karsinogenezde, aktinik keilitin öncül bir lezyon olduğunu varsaydığımız çalışmamızda skuamöz hücreli karsinoma gelişmiş olgularda tümör komşuluğundaki displastik alanlar ile tümör arasında p16^{INK4a}, p14^{ARF} ve p53 ekspresyonlarını incelediğimizde p16^{INK4a} açısından anlamlı fark bulunmamıştır p14^{ARF} ekspresyonunun tümöral alanlarda azalırken displastik alanlarda yüksek olduğu, p53 ün ise tümöral alanlarda daha fazla eksprese olduğunu saptadık. Bu sonuçlar tümör gelişmemiş aktinik keilit olgularımızda elde ettiğimiz sonuçlara paralellik göstermektedir.

p14^{ARF} ve p53 protein ekspresyonları arasında skuamöz hücreli karsinoma komşuluğundaki displastik alanlarda pozitif yönde korelasyon saptanırken skuamöz hücreli karsinoma gelişmemiş aktinik keilit olgularında herhangi bir korelasyon gözlemlenemedi. Bu korelasyonun varlığından aktinik keilitden skuamöz hücreli karsinoma gelişiminde p14^{ARF} aracılı p53 overekspresyonunun erken karsinogenez aşamasında önleyici bir faktör olarak devreye girdiğini ancak yetersiz kaldığı sonucu çıkarılabilir. Ayrıca p14^{ARF} ve p53'ün birlikte overeksprese olması ortak bir mekanizma ile düzenlendiklerini akla getirebilir. Aynı zamanda ilk basamak olarak UV indüklü karsinogenez kadar p14^{ARF} nin onkogenik aktivasyonunun da payı olabileceğini belki de bu iki mekanizmanın birlikteliğinin etkin bir rolü olduğu

düşünülebilir. Efeyan ve arkadaşları fareler üzerinde yaptıkları deneyde ARF yokluğunda p53'ün kanser koruyucu aktivitesinin bozulduğunu göstermişler ve onkogenik sinyalin p53 ile korumayı başlatmada önemli yeri olduğunu ve DNA hasarı ile olan p53 aktivasyonunun tümör gelişiminde daha az etkisi olduğu sonucuna varmışlardır (151). Biz de skuamöz hücreli karsinoma oluşumundan sonra azalmış olsa da p14^{ARF} ekspresyonunun devam ettiğini saptadık ve bu durumun p53 aktivasyonunu koruduğunu , bu nedenle alt dudak skuamöz hücreli karsinomalarının diğer oral kanserlere oranla daha iyi prognoza sahip olmasının bu koruyucu mekanizmalar ile açıklanabileceğini düşünmekteyiz.

Rb ve p53 yolları neredeyse tüm insan tümörlerinde sıklıkla hedef olan 2 ana hücre siklus kontrol yolağıdır. Ayrı ayrı etkilenecekleri gibi eş zamanlı olarak da düzensizliğe girebilirler. Çalışmamızda p16^{INK4a} negatif olan olguların tamamı p14^{ARF} ve p53 ile pozitif boyanmıştı. Bu çalışmada p16^{INK4a} negatifliği gösteren olguların durumu; p16^{INK4a} nın dolayısıyla Rb yolağının inaktivasyonunu, E2F'nin artması sonucu p14^{ARF} ve p53'ün aktive olduğunu ve böylelikle bu olgulardaki artmış p14^{ARF} ve wt-p53 ekspresyonunun nedenini açıklayabilir. p14^{ARF} ve wt-p53 ekspresyonunun devam etmesi de dudak skuamöz karsinogenezinde p16^{INK4a} ve p14^{ARF} ekspresyonları açısından p16-Rb yolağının etkilenmesinin önemli bir mekanizma olduğunu düşündürmektedir. Ancak CDKN2A lokusunun moleküler analizin eklendiği bir çalışmada p16^{INK4a} overekspresyonu gösteren olguların genetik durumu araştırılabilir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

1-) $p16^{INK4a}$ 'nın immunohistokimyasal ekspresyonunda, normal mukozadan aktinik keilite geçişde istatistiksel olarak belirgin olarak artışın bulunduğunu gözlemledik. Aktinik keilitten skuamöz hücreli karsinoma geçişinde H-SKOR değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasada ekspresyonun artış gösterdiğini saptadık. Aktinik keilitlerde ve skuamöz hücreli karsinomalarda izlenen $p16^{INK4a}$ ekspresyonunu, inaktif $p16^{INK4a}$ proteini birikimi olması ve hücrelerin hücre siklusundan kaçışının mümkün olamaması veya fonksiyonel bir $p16^{INK4a}$ proteini overekspresyonu olması ile açıklayabiliriz. CDKN2A lokusuna ait genetik değişiklikler, çalışmamızda incelenmediği için dudak skuamöz hücreli karsinoma gelişiminde $p16^{INK4a}$ gen inaktivasyonu ile protein ekspresyonları arasındaki ilişkinin, daha geniş olgu içeren ve genetik değişimleri bir arada inceleyen çalışmalar ile daha iyi anlaşılabilceği düşünülmüştür.

2-) Skuamöz hücreli karsinoma olgularında $p16^{INK4a}$ H-SKOR ve $p14^{ARF}$ H-SKOR arasında ilişki gözlemedik. Aynı gen lokusunda oturan fakat farklı ekzonlara sahip bu genlerin eş zamanlı inaktive olması ihtimalinin düşük olduğunu, dudak karsinogenezinde bu lokustaki $p16^{INK4a}$ spesifik genetik değişikliklerin sorumlu olduğunu akla getirmektedir.

3-) Çalışmamızda tümör birlikteliği olmayan aktinik keilit olgularında ve tümör komşuluğunda izlenen displastik alanlarda antikor ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu durum $p16^{INK4a}$, $p14^{ARF}$ ve p53 antikor ekspresyonlarının, aktinik keilitlerin skuamöz hücreli karsinomaya dönüşümünü belirlemede tek başına yararlı bir belirleyici olamayacağını göstermektedir.

4-) Skuamöz hücreli karsinoma olgularında $p14^{ARF}$ ekspresyonunun azalmış olsa da devamı, diğer oral ve deri skuamöz hücreli karsinomalarında gösterildiğinin aksine dudak skuamöz karsinogenezinde p14 inaktivasyonunun etkin rolü olmadığını akla getirmektedir.

5-) Çalışmamızda, $p16^{INK4a}$, $p14^{ARF}$ ve p53 ekspresyonu ile skuamöz hücreli karsinoma olgularında histopatolojik prognostik faktörler açısından karşılaştırdığımızda anlamlı bir ilişki saptayamadık. Dudak skuamöz karsinogenezinde bu belirleyicilerin etkin bir rolü veya prognostik önemi olup olmadığının anlaşılabilmesi için immunohistokimyasal çalışmanın moleküler ve genetik çalışmalar ile desteklenmesi gerektiğini düşünüyoruz.

6-) Skuamöz hücreli karsinoma komşuluğundaki aktinik keilit benzeri değişiklikler gösteren olgularda $p14^{ARF}$ H-SKOR ve p53 H-SKOR arasında pozitif yönde korelasyon izledik. Ancak tümör gelişmemiş aktinik keilit olgularında böyle bir korelasyon mevcut değildi. $p14^{ARF}$ ve p53'ün erken karsinogenezi önlemede birlikte çalıştığını ancak bu çabanın

yetersiz olduğunu ve eş zamanlı olarak ARF/p53 yolağını da aktive eden karsinogenezden sorumlu başka mekanizmaların olduğunu düşünüyoruz.

7-) Skuamöz hücreli karsinoma grubundaki olgular, tümör komşuluğundaki aktinik keilit benzeri değişiklik gösteren alanlarda izlenen ekspresyonlar açısından değerlendirildiğinde p16^{INK4a} açısından anlamlı fark bulunmamıştır. p14^{ARF} ekspresyonunun tümöral alanlarda azalırken displazi alanlarında yüksek olduğu, p53'ün ise tümöral alanlarda daha fazla eksprese olduğunu saptadık. Bu sonuçlar tümör gelişmemiş aktinik keilit olgularımızda elde ettiğimiz sonuçlara paralellik göstermektedir. Bu nedenle aktinik keilitten skuamöz hücreli karsinoma gelişimi olup olmayacağını belirleyebilmek için farklı antikorların araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

8-) Bizim çalışmamız, vaka sayısı bakımından küçük çaplı olmakla birlikte, aktinik keilit ve dudak skuamöz hücreli karsinomaların gelişiminde aynı lokusta yer alan p16^{INK4a} ve p14^{ARF}'nin farklı mekanizmalarla düzenlendiğini düşündürmüştür. Bu açıdan dudak skuamöz karsinogenezinde CDKN2A lokusunun çeşitli moleküller ile ilişkisini araştırmak için başka çalışmaların da yapılabileceğini gösteren bir ön çalışma niteliğindedir.

KAYNAKLAR

- 1- Gomes APN, Johann JE, Lovato GG, Ferreira AM. Comparative Analysis of the Mast Cell Density in Normal Oral Mucosa, Actinic Cheilitis and Lip Squamous Cell Carcinoma. *Braz Dent J* 2008; 19(3): 186-189.
- 2- Esclamado RM, Fritz MA. Lip Cancer in Bailey BJ, Johnson JT, Newlands SD(eds) *Head and Neck Surgery-Otolaryngology* Lippincott Williams and Wilkins , Philadelphia ,4th edt, 2006, p 1535-1549.
- 3- Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal. *Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa. WHO International Classification of Tumours.* Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 1997.
- 4- Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Dis* 2004;10:212-216.
- 5- Woo S-B, Diseases of the oral mucosa In: Mckee PH, Calonje JE, Granter SR(eds) *Pathology of the Skin with Clinical Correlations*, Elsevier Mosby, 3rd edt. 2005:p 459-461.
- 6- Califano J, van der Riet P, Westra W, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56:2488–2492.
- 7- Perez-Ordoñez B, Beauchemin M and Jordan RCK. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 2006;59;445-453
- 8- Brown VL, Harwood CA, Crook T, Cronin JG, Kelsel DV, and Proby CM. p16INK4a and p14ARF Tumor Suppressor Genes Are Commonly Inactivated in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma .*J Invest Dermatol* 2004;122:1284 –1292.
- 9- Takata M, Saida T. Early cancers of the skin: clinical , histopathological , and molecular characteristics. *Int J Clin Oncol* 2005; 10: 391-397.
- 10- Burnworth B, Arendt S, Muffler S, Steinkraus V, Bröcker EB, Birek C, Hartschuh W, Jauch A, Boukamp P. The multi-step process of human skin carcinogenesis:A role for p53, cyclin D1, hTERT , p16, and TSP-1. *Eur J Cell Bio* 2007;86:763-780.
- 11- Papadimitrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM. Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. *Oncogene* 1997;14:1799–1803.
- 12- Pande P, Mathur M, Shukla NK, et al. pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. *Oral Oncol* 1998;34:396–403.
- 13- Bradley KT, Budnick ST and Logani S. Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity. *Mod Pathol* 2006; 19: 1310–1316.

- 14- McGregor JM, Yu CC-W, Dublin EA, et al. Aberrant expression of p53 tumour-suppressor protein in non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 1992; 127: 463.
- 15- Liggett WH Jr, Sidransky D: Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16:1197–1206.
- 16- Berger JH, Bardeesy N. Modeling INK4/ARF tumor suppression in the mouse. *Current Molecular Medicine* 2007; 7(1):63-75.
- 17- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Neoplasia. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. (eds). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Elsevier Saunders, Philadelphia, 7th ed. 2005: p269-342.
- 18- Stott FJ, Bates S, James MC, et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 1998;17:5001–5014.
- 19- Bradley G, Irish J, Macmillan C, Mancer K, Witterick I et al. Abnormalities of the ARF-p53 pathway in oral squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2001;20:654-658.
- 20- Gologan O, Barnes EL, Hunt JL. Potential diagnostic use of p16INK4a, a new marker that correlates with dysplasia in oral squamoproliferative lesions. *Am J Surg Pathol* 2005;29:792–796.
- 21- Ai L, Stephenson KK, Ling W, et al. The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *Mod Pathol* 2003;16:944–950.
- 22- Kwong RA , Kalish LH , Nguyen TV, Kench JG , Bova RJ, Cole IE, Musgrove EA, and Sutherland RL . p14ARF Protein Expression Is a Predictor of Both Relapse and Survival in Squamous Cell Carcinoma of the Anterior Tongue. *Clin Cancer Res* 2005; 11 :4107-4116.
- 23- Martinez A, Brethauer U, Rojas IG, Spencer M, Mucientes F, Borlando J, Rudolph MI. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. *J Oral Pathol Med* (2005) 34: 257–262.
- 24- De Freitas MCA, Ramalho LMP, Xavier FCA, Moreira ALG, Reis SRA. p53 and MDM2 protein expression in actinic cheilitis. *J Appl Oral Sci* 2008;16(6):414-419.
- 25- Picascia D, Robinson JK. Actinic cheilitis: A review of the etiology, differential diagnosis, and treatment *J Am Acad Dermatol* 1987;17:255-264.
- 26- Balogh K, Pantowitz L. Mouth, nose and paranasal sinuses In: *Histology for Pathologists*, Mills SE Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia 3rd ed, 2007, p403-431.

27- Neville B, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Epithelial Pathology in Oral and Maxillofacial Pathology, Saunders Elsevier ,3rd edt, 2009, p362-452.

28-Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK Ulcerative conditions, White lesions In: Oral Pathology:Clinical Pathologic Correlations, Elsevier Science, 4th edt,2003, p23-109.

29-Main JHP, Pavone M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. J Can Dent Assoc 1994; 60(2): 113–116.

30- King GN, Healy CM, Glover MT, Kwan JT, Williams DM, Leigh IM, et al. Increased prevalence of dysplastic and malignant lip lesions in renal-transplant recipients. N Engl J Med. 1995;332:1052–1057.

31-Cataldo E, Doku H C, Solar Cheilitis. J Dermatol Surg Oncol 1981;7(12): 989-995.

32- Bailey BM. A rare malignant connective tissue tumour arising in the upper lip. Br J Oral Surg 1983 ;21(2):129-135.

33-Kirkham N, Tumors and Cysts of Epidermis In:Lever's Histopathology of the skin, Lippincott-Raven Philadelphia 1997, 8th edt, p 685-746.

34-Martinez A, Brethauer U, Borlando J, Spencer ML, Rojas IG. Epithelial expression of p53, mdm-2 and p21 in normal lip and actinic cheilitis. Oral Oncology 2008; 44(9):878-883.

35- Rojas IG, Martinez A, Pineda A, Spencer ML, Jiménez M, Rudolph MI. Increased mast cell density and protease content in actinic cheilitis. J Oral Pathol Med 2004;33:567-573.

36- Visscher JGAM, van der Waal I. Etiology of cancer of the lip. A review. Int J Oral Maxillofac Surg 1998; 27:199-203.

37- Cavalcante AS, Anbinder AL, Carvalho YR, Actinic cheilitis: clinical and histological features. J Oral Maxillofac Surg 2008; 66(3):498-503.

38- Moller R, Reymann F,Hou-Jensen K, Metastases in dermatological patients with squamous cell carcinoma. Arch Dermatol 1979, 115:703-705.

39- Schmitt CK, Folsom TC. Histological evaluation of degenerative changes of the lower lip. J Oral Surg 1968, 26:51-56.

40- Heaphy MR Jr, Ackerman AB. The nature of solar keratosis : a critical review in historical perspective. J Am Acad Dermatol 2000; 43:138-150.

41- Ackerman AB. Solar keratosis is squamous cell carcinoma. Archives of Dermatology 2003; 139: 1216-1217.

42- Weedon D, Marks R, Kao GF, Harwood CA. Keratinocytic tumours In:Leboit PE, Burg G, Weedon D, Sarasain A (eds), World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Skin Tumours , IARC Press Lyon 2005, p.9-47.

- 43- Pimentel DRN, Michalany N, Alchorne M, Abreu M, Borra RC, Weckx L. Actinic cheilitis: histopathology and p53. *J Cutan Pathol* 2006; 33:539-544.
- 44- Mortier L, Marchetti P, Delaporte E et al. Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16(INK4a) tumor suppressor. *Cancer Lett* 2002; 176:205-214.
- 45- Berhane T, Halliday GM, Cooke B, Barnetson RSC. Inflammation is associated with progression of actinic keratosis to squamous cell carcinomas in humans. *British Journal of Dermatology* 2002; 146: 810-815.
- 46- Payne TE. An evaluation of actinic blocking agents for the protection of lip mucosa. *J Am Acad Dent Assoc* 1976; 92: 409-411.
- 47- Salgarelli AC, Sartorelli F, Cangiano A, Collini M. Treatment of lower lip cancer: an experience of 48 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 34: 27-32.
- 48- Sykes AJ, Allan E, Irwin C. Squamous cell carcinoma of the lip: the role of electron treatment. *Clinical Oncology*, 1996; 8: 384-386.
- 49- Cook MB, Dawsey SM, Freedman ND, Inskip PD et al. Sex disparities in cancer incidence by period and age. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(4):1174-1182.
- 50- Slootweg PJ, Eveson JW, Oral Cavity and Oropharynx In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (eds) *World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*, IARC Press Lyon 2005, p163-209.
- 51- Moore S, Johnson N, Pierce A, Wilson D. The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and etiology. *Oral Dis.* 1999 ;5(3):185-195.
- 52- Greer RO, Savid JS. The Oral Cavity. In: Silverberg SG, DeLellis RA, Frable WJ, Livolsi VA, Wick MR. (eds) *Silverberg's Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology*, Churchill Livingstone Elsevier, 4 th ed. 2006: p1137-1202
- 53- Barnes L, Verbin RS, Guggenheimer J. Cancer of the oral cavity and oropharynx In *Surgical Pathology of the Head and Neck*, Marcel Dekker 2 nd ed, 2001, p 369-415
- 54- Blomqvist G, Hirsch JM, Alberius P. Association between development of lower lip cancer and tobacco habits. *J Oral Maxillofac Surg* 1991;49(10):1044-7; discussion 1048-9.
- 55- Rosai J. Oral cavity and oropharynx In: Rosai and Ackerman's *Surgical Pathology*, Mosby, 9 th ed. 2004: p247-277.
- 56- Tralongo V, Rodolico V, Luciani A, Marra G, Daniele E. Prognostic factors in oral squamous cell carcinoma. A review of the literature. *Anticancer Res* 1999; 19(4C):3503-3510.

57- Morgado de Abreu MAM, da Silva OMP, Pimentel DRN, Hirata CHW, Weckx LLM, Alchorne MMA, Michalany NS. Actinic cheilitis adjacent to squamous cell carcinoma of the lips is an indicator of prognosis. *Rev Bras Otorhinolaringol* 2006;72(6):767-771

58- Frierson HF Jr, Cooper PH. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the lower lip. *Hum Pathol*. 1986;17(4):346-354.

59- Bilkay U, Kerem H, Ozek C, Gundogan H, Guner U, Gurler T, Akin Y. Management of lower lip cancer: a retrospective analysis of 118 patients and review of the literature. *Annals of Plastic Surgery* 2003;50(1):43-50.

60- Massona J, Regaterio FS, Januario G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma :review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102:67-76.

61- Uğurluer G, Özyurt S, Aksaray F, Aslan N, Habiboğlu R, Tümöz M Oral kavite kanserlerinde prognostik faktörler ve sağkalım oranları. *Kulak Burun Boğaz İht Der.* 2006; 16(2):64-71.

62- Rodolico V, Barresi E, Lorenzo R, Leonardi V, Napoli P, Rappa F, Bernardo C. Lymph node metastasis in lower lip squamous cell carcinoma in relation to tumour size, histological variables and p27kip1 protein expression. *Oral Oncology* 2004; 40:92-98.

63- Daniele E, Rodolico V, Leonardi V, Tralongo V. Prognosis in lower lip squamous cell carcinoma: assessment of tumor factors. *Path Res Pract* 1998; 194:319-324.

64- Petrovich Z, Parker RG, Luxton G, Kuisk H, Jepson J. Carcinoma of the lip and selected sites of head and neck skin. A clinical study of 896 patients. *Radiother Oncol* 1987 ;8(1):11-17.

65- Wilson R, Jackson J, Rassekh C. A study on squamous cell carcinoma of the lip at West Virginia University Hospitals from 1980-2000. *The West Virginiamedical Journal* 2005;101(5):217-219.

66- Allen DC. Head and Neck cancer In *Histopathology Reporting* Springer-Verlag London Limited 2nd edt, 2006.p 101-155.

67- Brenn T, Mckee PH. Tumors of the surface epithelium In: Mckee PH, Calonje JE, Granter SR(eds) *Pathology of the Skin with Clinical Correlations*, Elsevier Mosby, 3rd edt. 2005:p 1153-1240.

68- Hwang K, Lee S. Mucoepidermoid carcinoma on the upper lip vermillion : a clinical report. *J Craniofacial Surg* 2007;18(2):445-448.

69- Piatelli A. Pleomorphic rhabdomyosarcoma of the upper lip in adult patient. *Acta Stomatol Belg* 1991;88:57-64.

- 70- Banuls J, Botella R, Sevilla A, et al. Leiomyosarcoma of the upper lip. *Int J Dermatol* 1994;33:48-49.
- 71- Hsu CK, Lee JY, Yu CH, Hsu MM, Wong TW. Lip verrucous carcinoma in a pregnant woman successfully treated with carbon dioxide laser surgery. *Br J Dermatol* 2007 ;157(4):813-815.
- 72- Zeina B, Sakka N, Mansoor S, <http://emedicine.medscape.com/article/1101695-overview>
- 73- Ellis GL, Corio RL. Spindle cell carcinoma of the oral cavity. A clinicopathologic assessment of fifty-nine cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1980 ;50(6):523-533.
- 74- Breuninger H, Schaumburg-Lever G, Holzschuh J, Horny HP. Desmoplastic Squamous Cell Carcinoma of Skin and Vermilion Surface A Highly Malignant Subtype of Skin Cancer *Cancer* 1997;79(5): 915-919.
- 75- Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic alterations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncology* 2000; 36(4):311-327.
- 76- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 ;100(1):57-70.
- 77-Weber A, Wittekind C, Tannapfe A. Genetic and epigenetic alterations of 9p21 gene products in benign and malignant tumors of the head and neck. *Pathol Res Pract* 2003;199(6):391-397.
- 78-Murao K, Kubo Y, Ohtani N, Hara E, Arase S. Epigenetic abnormalities in cutaneous squamous cell carcinoma: frequent inactivation of the RB1/p16 and p53 pathways. *British J Dermatol* 2006; 155:999-1005.
- 79- El-Naggar AK, Lai S, Clayman G, Lee JK, Luna MA, Goepfert H, Batsakis JG. Methylation, a major mechanism of p16/CDKN2 gene inactivation in head and neck squamous carcinoma. *Am J Pathol* 1997 ;151(6):1767-74.
- 80- Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nature* 2006; 7:667-677.
- 81- Feng W, Xiao J, Zhang Z, Rosen DG, Brown RE, Liu J, Duan X. Senescence and apoptosis in carcinogenesis of cervical squamous carcinoma. *Mod Pathol.* 2007 ;20(9):961-966.
- 82- Collado M, Gil J, Efeyan A, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 2005; 436(7051):642.
- 83- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitgian SV, Stockert E et al A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264(5157):436-440.

- 84- Sherr CJ. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. Nat Rev Cancer 2006 ;6(9):663-673.
- 85- Sekulic A, Haluska JR, Miller AJ, de Lamo JG, Jadi SE; Pulido JS ,et al. Malignant Melanoma in the 21st Century:The Emerging Molecular Landscape. Mayo Clin Proc. 2008;83(7):825-846.
- 86-Kresty LA, Mallery SR, Knobloch TJ, Song H, Lloyd M, Casto BC, Weghorst CM. Alterations of p16INK4a and p14ARF in Patients with Severe Oral Epithelial Dysplasia. Can Res 2002; 62,:5295–5300.
- 87-Vairaktaris E, Yapijakis C, Psyrri A, Spyridonidou S, et al .Loss of tumour suppressor p16 expression in initial stages of oral oncogenesis. Anticancer Res 2007;27(2):979-984.
- 88-Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. Exp Cell Res 1997;237:7-13.
- 89- Kamb A. Cell cycle regulators and cancer. Trends Genet 1995; 11:136-140.
- 90- Lee MH, Yang HY. Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. Cell Mol Life Sci 2001; 58:1907-1922.
- 91- Harada H, Nakagawa K, Iwata S, Saito M, Kumon Y, Sakaki S, Sato K, Hamada H. Restoration of Wild-Type *p16* Down-Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Inhibits Angiogenesis in Human Gliomas Cancer Res.1999; 59(15):3783-3789
- 92- Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. Biochim Biophys Acta. 1998 ;1378(2):115-177.
- 93-Sharpless NE. INK4a/ARF : a multifunctional tumour suppressor locus. Mut Res 2005; 576:22-38.
- 94-Gallagher SJ, Kefford RF, Rizos H. The ARF tumour suppressor. IJBCB 2006;38: 1637-1641.
- 95- Lowe SW, Sherr CJ. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. Curr Opin Genet Dev. 2003 ;13(1):77-83.
- 96- Sherr CJ.The INK4a/ARF network in tumour suppression. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001;2(10):731-737.
- 97- Bates S, Philips AC, Clarke PA, et al. P14ARF links the tumour suppressor RB and p53. Nature 1998;395:124-125.
- 98- Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. Nature 2004; 432:307-315.

- 99- Wang W, Rastinejad F, El-Deiry WS. Restoring p53-dependent tumor suppression. *Cancer Biol Ther* 2003 ;2 :4 :suppl.1,55-63.
- 100- Nylander K , Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 413-425.
- 101- Bozdoğan Ö. Neoplastik Hastalıklar ve Onkogenezi In: Bozdoğan Patoloji, Nobel, 1. Baskı 2007: sayfa 165-207.
- 102- Levine AJ, Hu W, Feng Z. The p53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death and Differentiation* 2006;13:1027-1036.
- 103- Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF Promotes MDM2 Degradation and Stabilizes p53: ARF-INK4a Locus Deletion Impairs Both the Rb and p53 Tumor Suppression Pathways. *Cell* 1998; 92, 725–734.
- 104- Liang SH, Clarke MF. Regulation of p53 localization *Eur. J. Biochem.* 2001 ;268:2779-2783 ,
- 105- Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer Review, *Cell Death and Differentiation* 2003; 10:431–442
- 106- Efeyan A, Serrano M. p53:guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 2007;6(9):1006-1010.
- 107- Midgley CA, Lane DP.p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding. *Oncogene.* 1997 ;15(10):1179-1189.
- 108- Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358:15-16.
- 109- Einspahr J, Alberts DS, Aickin M, Welch K, Bozzo P, Grogan T, Nelson M. Expression of p53 protein in actinic keratosis, adjacent, normal- appearing, and non-sun-exposed human skin. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1997; 6:583-587.
- 110- Atasoy P, Yilmaz E, Bozdogan O, Ayva S, Batislam E. Expression profile and prognostic importance in prostate lesions of the reverse transcriptase component of human telomerase (hTERT) and of cyclin-dependent kinase inhibitor p57 (p57kip2a). *Int Urol Nephrol* 2009;41(1):55-60.
- 111- McCarty KS, Szabo E, Flowers JL, et al. Use of a monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors. *Cancer Res* 1986 (Suppl); 46: 4244-4248.

112- Horta MCR, de Assis LAP, de Souza AF, de Araujo FC, Gomez RS, Aguiar MCF. p53 and p21 WAF1/CIP1 overexpression at the invasive front of lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2007;36:88-92.

113- Zeigler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Shanna HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature (Lond.)* 1994; 372: 773-776.

114- English DR, Armstrong BK, Kricker A, Fleming C. Sunlight and cancer. *Cancer Causes Control* 1997; 8: 271–283.

115- Tokman B, Gultekin SE, Sezer C, Alpar R. The expression of p53, p16 proteins and prevalence of apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *Saudi Med J* 2004;25(12):1922-1930.

116- Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. Inactivation of the p14(ARF), p15(INK4B) and p16(INK4A) genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2001;37: 498-504.

117- Weber A, Bellmann U, Bootz F, Wittekind C, Tannapfel A. INK4a-ARF alterations and p53 mutations in primary and consecutive squamous cell carcinoma of the head and neck. *Virchows Arch* 2002;441:133- 142.

118- Bagazgoitia L, Cuevas J, Juaranz A. Expression of p53 and p16 in actinic keratosis, bowenoid actinic keratosis and Bowen's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009.

119- Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56(16):3630-3.

120- Sanchez-Cespedes M, Reed AL, Buta M, Wu L, Westra WH, Herman JG, Yang SC, Jen J, Sidransky D. Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 1999;18(43):5843-5849.

121- Geradts J, Kratzke RA, Niehans GA, Lincoln CE. Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2 / multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2 / MTS1) product p16INK4a in archival human solid tumors: correlation with retinoblastoma protein expression. *Cancer Res* 1995; 55: 6006–6011.

122- Conscience I, Jovenin N, Coissard C et al. P16 is overexpressed in cutaneous carcinomas located on sun-exposed areas. *Eur J Dermatol* 2006; 16: 518–522.

123- Soufir N, Moles JP, Vilmer C et al. P16 UV mutations in human skin epithelial tumors. *Oncogene* 1999; 18: 5477–5481.

124- Salama MH, Mahmood MN, Qureshi HS, Ma C, Zarbo RJ, Ormsby AH. p16INK4a expression in actinic keratosis and Bowen's disease. *Br J Dermatol* 2003; 149: 1006–1012.

125- Hodges A, Smoller BR. Immunohistochemical comparison of p16 expression in actinic keratoses and squamous cell carcinomas of the skin. *Mod Pathol* 2002; 15: 1121–1125.

126- Pacifico A, Goldberg LH, Peris K, Chimenti S, Leone G, Ananthaswamy HN. Loss of CDKN2A and p14ARF expression occurs frequently in human nonmelanoma skin cancers. *British Journal of Dermatology* 2008 158, p 291–297

127- Kannan K, Munirajan AK, Krishnamurty J. The p16/p19 gene mutations are infrequent and are mutually exclusive to p53 mutations in Indian oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2000;16:585-590.

128- Angiero F, Berenzi A, Benetti A, Rossi E, Del Sordo R, Sidoni A et al. Expression of p16, p53 and Ki-67 proteins in the progression of epithelial dysplasia of the oral cavity. *Anticancer Res* 2008;28:2535-2540.

129- Blokx WAM, de Jong E, de Wilde PCM, Bulten J, Link MMGM, Ruiter DJ, de Kerkhof PCM. P16 and p53 expression in (pre)malignant epidermal tumours of renal transplant recipients and immunocompetent individuals. *Mod Pathol* 2003;16(9):869-878.

130- Sano T, Masuda N, Oyama T, Nakajima T. Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia. *Pathol Inter* 2002;52:375-383.

131- Willman JH, Heinz D, Golitz LE, Shroyer KR. Correlation of p16 and pRb expression with HPV detection in Bowen's disease. *J Cutan Pathol* 2006; 33: 629–633.

132- Nemes JA, Deli L, Nemes Z, Marton IJ. Expression of p16, p53 and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. *Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:344-352.

133- Geradts J, Wilentz RE, Roberts H. Immunohistochemical detection of the alternate INK4a-encoded tumor suppressor protein p14(ARF) in archival human cancers and cell lines using commercial antibodies: correlation with p16(INK4a) expression. *Mod Pathol*. 2001;14(11):1162-1168.

134- Wang JL, Zheng BY, Li XD, Nokelainen K, Angström T, Lindström MS, Wallin KL. p16INK4A and p14ARF expression pattern by immunohistochemistry in human papillomavirus-related cervical neoplasia. *Mod Pathol*. 2005 ;18(5):629-637.

135- Kanao H, Enomoto T, Ueda Y, Fujita M, Nakashima R, Ueno Y et al. Correlation between p14ARF/P16INK4A expression and HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Lett* 2004;213:31-37.

136- Cheng TH, Hsu PK, Li AFY, Hung IC, Huang MH, Hsu HS. Correlation of p53, MDM2 and p14ARF protein expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:1577-1582.

137- Ohta S, Uemura H, Matsui Y, Ishiguro H, Fujinami K, Kondo K, Miyamoto H, et al. Alterations of p16 and p14ARF genes and their 9p21 locus in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol Endod.* 2009;107(1):81-91.

138- Bukhari MH, Shahida N, Chaudhry NA. Relationship of immunohistochemistry scores of altered p53 protein expression in relation to patient's habits and histological grades and stages of squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol* 2009; 36: 342–349.

139- Shin DM, Kim J, Ro JY, et al. Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 321.

140- Wood NB, Kotelnikov V, Caldarelli DD, et al. Mutation of p53 in squamous cell cancer of the head and neck: relationship to tumour cell proliferation. *Laryngoscope* 1997; 107: 827.

141- Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, Mizuno A. p53, mdm2, and p21 expression in oral squamous cell carcinomas: relationship with clinicopathologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94: 593–600.

142- Ostwald AC, Gogacz P, Hillmann T, et al. P53 mutational spectra are different between squamous cell carcinomas of the lip and oral cavity. *Int J Cancer* 2000;88:82-86.

143- Crosthwaite N, Teale D, Franklin C, Foster GA, Stringer BM. p53 protein expression in malignant, premalignant and non-malignant lesions of the lip. *J Clin Pathol* 1996; 49:648-653.

144- Campbell C, Quinn AG, Angus B, Rees JL. The relation between p53 mutation and p53 immunostaining in non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 1993; 129: 235–241.

145- Nelson MA, Einspahr JG, Alberts DS, Balfour CA, Wymer JA, Welch KL, Salasche SJ, Bangert JL, Grogan TM, and Bozzo PO. Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers. *Cancer Lett* 1994; 85(1): 23-29.

146- Taguchi M, Watanabe S, Yakhima R, Murakami Y, Sekiya T, and Ikeda S. Aberrations of the tumor suppressor p53 gene and p53 protein in solar keratosis in human skin. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 300-303.

147- Campbell C, Quinn AG, Ro Y-S, Angus B and Rees JL. p53 mutations are common and early events that precede tumor invasion in squamous cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol* 1993; 100: 746-748.

148- Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. *Front Biosci* 2002 ;7:765-783.

149- Kulms D, Schwarz T. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2000; 16: 195–201.

150- Park HR, Min SK, Cho HD, Kim KH, Shin HS, Park YE. Expression profiles of p63, p53, survivin and hTERT in skin tumors. *J Cutan Pathol* 2004;31: 544–549.

151- Efeyan A, Garcia-Cao I, Herranz D, Miguel SV, Serrano M. Policing of oncogene activity by p53. *Nature* 2006;443:159.