

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK
CERRAHİ ANABİLİM DALI

**FARELERDE ULTRAVİYOLE-B IŞINI İLE
GELİŞTİRİLEN DERİ KARSİNOGENEZİ
MODELİNDE ORAL VE TOPİKAL
SKUALEN UYGULAMALARININ
PROFİLAKTİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DR. HÜSNÜ HACI

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2018

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK
CERRAHİ ANABİLİM DALI

**FARELERDE ULTRAVİYOLE-B IŞINI İLE
GELİŞTİRİLEN DERİ KARSİNOGENEZİ
MODELİNDE ORAL VE TOPİKAL
SKUALEN UYGULAMALARININ
PROFİLAKTİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DR. HÜSNÜ HACI

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Adnan MENDERES

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bilimsel yaklaşımı, tıp etiği, yapıcı ve çözüm odaklı duruşu ile yol gösteren, asistanı olmaktan kıvanç duyduğum değerli danışman hocam Sn. Prof. Dr. Adnan MENDERES'e; mesleki bilgi, deneyim ve rehberliğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı'mız Sn. Prof. Dr. Can KARACA'ya; birlikte çalışmak onuruna eriştiğim, eğitimim süresince önemli katkı ve desteklerini gördüğüm, emeği geçen değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Ali BARUTÇU, Sn. Prof. Dr. Mustafa YILMAZ, Sn. Prof. Dr. Haluk VAYVADA ve Sn. Doç. Dr. Cenk DEMİRDÖVER'e;

Asistanlık dönemim boyunca birlikte özveri ile çalıştığımız tüm asistan arkadaşlarıma, servis ve ameliyathanede görev yapan tüm hemşire ve personelimize;

Tezimin patolojik değerlendirme basamağında büyük yardımı olan Prof. Dr. Banu LEBE'ye, istatistiksel incelemeler aşamasında bilgi birikimini ve hoşgörüsünü esirgemeyen Prof. Dr. Pembe KESKİNOĞLU'na;

Tüm eğitim hayatım boyunca büyük bir inanç ve fedakarlık ile desteklerini hissettiren, bilginin, özverinin olduğu kadar insani ve ahlaki değerlerin de önemini anlamamı sağlayan değerli annem, babam ve kardeşim başta olmak üzere tüm aileme;

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi asistanlık sürecinde de hoşgörü ve desteğini hiç esirgemeyen, çalışma etiği, enerjisi ve motivasyonu ile örnek aldığım hayat arkadaşım Uzm. Dr. İdil AKAY HACI'ya;

Sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Hüsnü HACI

İzmir, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1 Deri Embriyolojisi.....	7
2.2 Deri Histolojisi ve Fizyolojisi	7
2.3 Deri Kanseri	11
2.3.1 Etiyolojik Faktörler.....	12
2.3.2 Korunma	16
2.3.3 Histopatoloji	18
2.3.4 Premalign Lezyonlar.....	20
2.3.5 Tanı Yöntemleri.....	22
2.3.6 Tedavi	23
2.4 Skuamöz Hücreli Karsinom Hayvan Modelleri	28
2.4.1 İki Aşamalı Kimyasal Model:.....	28
2.4.2 UV (Ultraviyole) Model:	28
2.5 Ultraviyole.....	32
2.6 Kemoprofilaksi.....	34
2.7 Skualen	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1 Araştırma Dizaynı	39
3.2 Deney Hayvanı	39
3.3 Deney Hayvanlarının Seçimi	39
3.4 Deney Hayvanlarının Bakımı.....	40
3.5 Anestezi.....	40
3.6 Hayvan Modeli	41

3.7 Deney Planı	41
3.8 Deney Grupları.....	41
3.9 Deney Düzenegi	42
3.10 Deneklerin Hazırlanması.....	43
3.12 Ultraviyole-B Uygulanması	44
3.13 Skualen Eldesi ve Uygulaması.....	46
3.14 Grupların İzlemi	48
3.15 Sakrifikasyon ve Örnek Alımı.....	49
3.16 Değerlendirme.....	51
3.16.1 Makroskopik Değerlendirme	51
3.16.2 Histopatolojik Değerlendirme	51
3.16.3 İmmünohistokimyasal Değerlendirme	54
3.16.4 İstatistiksel Değerlendirme	56
4. BULGULAR.....	57
4.1 Makroskopik Bulgular	57
4.1.1 Ağırlık.....	57
4.1.2 Aktinik Keratoz Sayısı ve Prevalansı	57
4.1.3 İç Organ İncelemesi.....	60
4.2 Mikroskopik Bulgular	62
4.2.1 Hematoksilen Eozin Boyama Bulguları	62
4.2.2 İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları	66
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	80
7.KAYNAKLAR	82

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Derinin fonksiyonları ve bu fonksiyonları gerçekleştiren yapılar.....	10
Tablo 2: Melanom Dışı Deri Kanseri Etiyolojik Faktörleri	13
Tablo 3: Skuamöz Hücreli Karsinomda Tedavi Seçenekleri	24
Tablo 4: Sebace bezlerden salgılanan sebum içeriğindeki maddeler	36
Tablo 5: Hematoksilen-Eozin boyama protokolü.....	53
Tablo 6: İmmünohistokimyasal boyama protokolü	55
Tablo 7: Gruplara ve Haftalara Göre Ağırlık(gram) Artışlarının Karşılaştırılması	57
Tablo 8: Gruplardaki tümör sayılarının dağılımlarının 18. hafta için karşılaştırılması .	59
Tablo 9: Gruplardaki epidermal kalınlıkların dağılımlarının karşılaştırılması.....	64
Tablo 10: Yangısal hücre dağılımının gruplara göre karşılaştırılması.....	65
Tablo 11: Mutant p53 protein dağılımının gruplara göre karşılaştırılması	66

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Derinin katmanları	9
Resim 2: Derinin üç boyutlu yapısı	11
Resim 3: SHK histopatolojik görüntüleri	20
Resim 4: Premalign lezyonlar	22
Resim 5: BALB/c fare	40
Resim 6: UVB uygulaması sırasında kabindeki bölmelerine yerleştirilmiş fareler	43
Resim 7: Deneklere kabinde UVB uygulaması	44
Resim 8: UVB uygulaması sırasında lambadan yayılan ışın dozunun hesaplanması.....	45
Resim 9: UVB ışın dozunu ölçen dozimetre	46
Resim 10: Skualenin saklandığı ışık ve hava geçirmeyen şişeler	47
Resim 11: Deneklerin sakrifikasyonu sonrası sırt derilerinin eksizyonu	50
Resim 12: Eksize edilen sırt derisi materyali	51
Resim 13: Sakrifiye edilen deneklerin iç organlarının incelenmesi.....	60
Resim 14: Deney sonu sırt derisi görüntüleri	61
Resim 15: 14. haftada alınan insizyonel biyopsi bulguları.(Boweonid aktinik keratoz)....	62
Resim 16: Hematoksilen eozin boyama bulguları	63
Resim 17: Mutant p53 protein ekspresyonunun gösterilmesi.....	66
Resim 18: Çeşitli immünohistokimyasal boyanma paternleri.....	67
Resim 19: p53 boyanma paterni	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Epidermisin tabakaları ve epidermiste yer alan hücreler	9
Şekil 2: p53 proteininin hücredeki görevleri	12
Şekil 3: Fitzpatrick deri tipleri.....	16
Şekil 4: UV etkisiyle DNA’da siklobütan dimerleri ve pirimidin dimerlerinin oluşumu.....	30
Şekil 5: UV ile deri kanseri modelinin aşamaları	31
Şekil 6: Elektromanyetik ışın tayfı	32
Şekil 7: Skualenin kimyasal formülü ($C_{30}H_{50}$)	35
Şekil 8: Kolesterol sentez basamakları	36
Şekil 9: Sebum salgısından sorumlu sebace bezlerin yerleşimi.....	37
Şekil 10: Ham zeytinyağının rafinasyon süreci	48
Şekil 11: Ham zeytinyağından skualenin elde edilme süreci.....	48
Şekil 12: Gruplardaki deneklerin tümör sayılarının haftalara göre dağılımı	58
Şekil 13: Gruplardaki tümör sayısı ortalamalarının haftalara göre dağılımı	58
Şekil 14: Gruplardaki tümör prevalansının haftalara göre dağılımı	59
Şekil 15: Gruplara göre epidermis kalınlık ortalamaları.....	64
Şekil 16: Yangısal hücre oranlarının Kruskal Wallis testiyle karşılaştırılması	65
Şekil 17: Mitoz bölünmenin aşamaları	69

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Ark.	: Arkadaşları
BHK	: Bazal hücreli karsinom
DMBA	: Dimetilbenzantrasen
DNA	: Deoksiribonükleik asit
HMG-CoA	: 3-Hidroksi 3-Metilglutaril Koenzim A
MDDK	: Melanom dışı deri kanseri
mJ	: MiliJoule
mW	: MiliWatt
nm	: Nanometre
SHK	: Skuamöz hücreli karsinom
Spp	: Türleri
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
TPA	: Tetradekanoilforbolasetat
UVA	: Ultraviyole-A
UVB	: Ultraviyole-B
UVC	: Ultraviyole-C
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
5-FU	: 5- florourasil



FARELERDE ULTRAVİYOLE-B IŞINI İLE GELİŞTİRİLEN DERİ KARSİNOGENEZİ MODELİNDE ORAL VE TOPİKAL SKUALEN UYGULAMALARININ PROFİLAKTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Hüsnü Hacı, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

hhaci87@gmail.com

ÖZET

Deri kanseri tüm dünyada, özellikle beyaz ırkta giderek artan, morbidite ve mortaliteye neden olabilen bir kanser türüdür. Deri kanserinin yaygın olarak görülmesi ve insidansının giderek artması nedeniyle deri kanseri profilaksi çalışmaları önem kazanmıştır. Kolesterol sentezinde ara metabolit olan skualenin derideki antioksidan, sitoprotektif ve yaşlanma geciktirici etkisi; kolon kanseri ve akciğer kanserine karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir. Çalışmamızda ise skualenin derinin skuamöz hücreli karsinomuna karşı koruyucu etkisi araştırılıp etki mekanizması saptanmaya çalışılmıştır.

Literatürdeki deri kanseri modellerinde kimyasal karsinogenez ya da ultraviyole karsinogenez yöntemleriyle farelerde aktinik keratoz benzeri premalign lezyonlar olan papillom ismi verilen tümörler oluşturulmuştur. Bu tümörlere karsinojen maruziyeti devam ettikçe invaziv karsinoma evrildiği belirtilmiştir. Kemoprofilaktik etkisi araştırılan maddelerin premalign papillom isimli tümörlere etkisi incelenmiş olup çalışmamızda da aynı şekilde skuamöz hücreli karsinomun öncül lezyonu olarak kabul edilen aktinik keratoz benzeri papillomlar literatürdeki gibi “tümör” olarak isimlendirilmiştir.

Çalışmada 28 adet 25-30 gr ağırlığında dişi BALB/c türü fare kullanılmıştır. Her bir grupta yedi adet fare olacak şekilde dört grup belirlenip her farenin sırt bölgesine Ultraviyole-B (UVB) ışını uygulanarak deri karsinogenez modeli oluşturulmuştur.

Grup-1’de (kontrol grubu) sırt derisine skualen çözücüsü (aseton), Grup-2’de sırt derisine topikal skualen (asetonla çözünmüş olarak) uygulandı. Grup-3’te sırt derisine skualen çözücüsü (aseton) uygulanıp aynı zamanda peroral skualen verilirken Grup-4’te sırt derisine topikal skualen (asetonla çözünmüş olarak) uygulandı ve peroral skualen verildi. Bu uygulamaların tümü deney boyunca düzenli olarak yapıldı.

Deneklerde aktinik keratoz oluşturmak için sırt derilerine ilk 10 gün boyunca her gün 540 milijoule/cm² UVB ışını uygulandı. Dört günlük aranının ardından 16 hafta boyunca haftada üç gün, günde 540 milijoule/cm² UVB uygulandı. Koruyucu amaçlı kullanılan skualen ise ilgili gruplarda 18 hafta boyunca UVB ışınlamasından 30 dakika önce topikal olarak kullanıldı. Oral skualen ise UVB ışınlama günlerinde oral gavaj kanülü yardımıyla peroral yolla verildi.

Gruplardaki fareler geliştirdikleri aktinik keratoz sayıları açısından düzenli olarak takip edilerek deney sonunda karşılaştırıldılar. Deney sonunda sakrifiye edilen farelerin sırt derileri eksize edilerek hematoksilen eozin boyama yapıldı ve ışık mikroskopu altında incelendi: Aktinik keratoz ile uyumlu, displazi ve mitozlar içeren premalign kitleler saptandı. Deri rneklerinin tamamı incelenerek epiteldeki hiperplazinin ve atipinin en yoğun olduğu bölgede epitelin kalınlığı, keratin tabakası hariç tutularak ölçüldü. İnflamasyonun en yoğun olduğu yerler saptanarak yangısal hücreler sayıldı ve gruplar karşılaştırıldı. Ayrıca skualenin karsinogenez patogenezinde p53 mutasyonuna etkisini saptamak amacıyla kitlelerden alınan örneklerde immünohistokimyasal yöntemlerle mutant p53 proteini incelenerek gruplar karşılaştırıldı. Topikal skualen kullanılan 2. ve 4. grupta diğer gruplara göre tümör sayısında ve epitel kalınlığında belirgin azalma, inflamatuvar hücre oranında anlamlı bir artış saptandı. Mutant p53 proteini içeren hücre oranlarında ise tüm gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi.

Tüm bu bilgiler ışığında topikal olarak uygulanan skualenin premalign aktinik keratoz benzeri papillom lezyonlarını anlamlı olarak azalttığı, ortaya çıkma süresini geciktirdiği, immün sistem hücrelerinin sayısını artırdığı ve dolayısıyla derinin skuamöz hücreli karsinomuna karşı koruyucu etkisi olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: aktinik keratoz, p53, skualen, skuamöz hücreli karsinom, ultraviyole

ABSTRACT

Hüsnü Hacı, MD. Investigation of the prophylactic effect of oral and topical squalene administration in a skin carcinogenesis model developed by ultraviolet-B radiation in mice. Dokuz Eylul University Faculty of Medicine; Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery Department, Thesis of Graduation, IZMİR 2018.

Skin cancer is the most common type of cancer that can cause morbidity and mortality all over the world, especially among white people. Skin cancer prophylaxis studies have become important because skin cancer is widespread all over the world and its incidence is increasing. The antioxidant, cytoprotective and anti-aging effect of squalene, the intermediate metabolite in cholesterol synthesis; protective effect against colon cancer and lung cancer has been shown. In our study, the protective effect of squalene on squamous cell carcinoma of skin was investigated and its mechanism of action was aimed to be detected.

In skin cancer models in the literature, tumors called papilloma, which are actinic keratosis-like premalignant lesions, were formed in mice by chemical carcinogenesis or ultraviolet carcinogenesis methods. Invasive carcinoma has been shown to develop as carcinogen exposure to these tumors persists. The effect of chemoprophylactic agents on the tumors called premalign papilloma was investigated. Similarly, actinic keratosis-like papillomas which are accepted as the precursor lesion of squamous cell carcinoma in our study have been named as “tumor” like in the literature.

In the study 28 female BALB/c mice of 25-30 gr weight were used. Four groups were determined as seven mice in each group and ultraviolet-B (UVB) rays were applied to the back region of each mouse to form a skin carcinogenesis model.

The squalene solvent (acetone) was applied to the dorsal skin of Group-1 (control group) and the topical squalene dissolved with acetone was applied to the dorsal skin of Group-2. While the squalene solvent (acetone) was applied to the dorsal skin of mice and the peroral squalene was given at the same time in Group-3, topical squalene (dissolved

with acetone) was applied to the back and peroral squalene was given in Group-4. All of these applications were performed regularly throughout the experiment.

To produce skin tumors in the experimental animals, the dorsal skin was irradiated with 540 millijoule/cm² UVB radiation for the first ten days. Following a four-day break, 540 milliJoules/cm² UVB was administered daily for three days a week during 16 weeks. Squalene was applied topically in the relevant groups 30 minutes before UVB irradiation for 18 weeks on the purpose of protection. In addition oral squalene was given perorally by the gavage cannula to Group 2 and 4 on UVB irradiation days.

The mice in the groups were followed regularly in terms of the number of tumors they developed and compared at the end of the experiment. The dorsal skin of sacrificed mice were excised and examined under light microscope after haematoxylin eosin stain protocol. Premalign masses consistent with actinic keratosis, including dysplasia and mitoses, were detected. All skin specimens were examined and the thickness of the epithelium in the region where epithelial hyperplasia and atypia were the most intensive was measured excluding the keratin layer. The inflammatory cells were counted by locating the areas where inflammation was most intense and groups compared. In addition, in order to determine the effect of squalene on p53 mutation in tumor pathogenesis, mutant p53 protein was examined by immunohistochemical methods in the samples taken from tumors and the groups were compared again. Significant decrease in tumor number and epithelial thickness and a significant increase in inflammatory cell ratio were observed in the 2nd and 4th groups using topical squalene compared to the other groups. Stained cell ratio of mutant p53 protein was not significantly different between all groups.

With all these information, it can be said that the topical application of squalene significantly reduces premalignant actinic keratosis like papilloma lesions, retards the time of emergence, increases the number of immune system cells and thus has a protective effect against squamous cell carcinoma of skin.

Key Words: actinic keratosis, p53, squalene, squamous cell carcinoma, ultraviolet

1. GİRİŞ VE AMAC

Deri kanseri, insanlarda en sık rastlanan kanser türüdür. Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda 1.2 milyon vaka görülmektedir. Epidemiyolojik, klinik ve laboratuvar çalışmaları solar ultraviyole ışınlarının ilk tümör hücrelerinin oluşması (initiation), oluşan hücrelerin büyümesi ve çoğalması (promotion) fazlarında etkili olduğunu göstermiştir. Deri kanserleri temel olarak iki alt bölüme ayrılır: melanom ve melanom dışı deri kanserleri (MDDK). MDDK ise bazal hücreli karsinom (BHK) ve skuamöz hücreli karsinom (SHK) olmak üzere temel olarak iki büyük grubu içermektedir ve bunlar sırasıyla tüm tanı konulan deri kanserlerinin % 80'i ile % 16'sını oluşturmaktadır (1). Ultraviyoleye fazla maruziyet melanom ve melanom dışı deri kanserleri (MDDK) dahil olmak üzere birçok farklı deri hastalıklarına sebep olabilmektedir (2). Melanom mortalitenin çoğundan sorumluydu da bazal hücreli karsinom (BHK) ve skuamöz hücreli karsinom (SHK) gibi melanom dışı deri kanserleri de ciddi morbiditeye ve bazen de ölüme yol açabilmektedir. Prevalans olarak da MDDK'nin melanoma oranla çok daha fazla olması klinik önemlerini artırmaktadır. MDDK'nin etiyolojisinde en önemli faktör ultraviyole ışınlarına maruziyettir (3). SHK açık tenli, yaşlı, kümülatif güneş maruziyeti yüksek olan bireylerde ve düşük enlemlerde yaşayanlarda daha sık görülmektedir (4). Son çalışmalarda MDDK'nin, ABD'de tüm tanı konulan kanserlerin yaklaşık %40'ını oluşturmakta olduğu, 1994'ten beri %300'den fazla artış gösterdiği ve tedavi giderlerinin yıllık 650 milyon dolara mal olduğu gösterilmiştir (5). Bu endişe verici istatistiklere bakıldığında ultraviyolele korunma ve deri kanserini önleme çalışmalarının önemi anlaşılmaktadır.

Melanom dışı deri kanserlerinde erken kanser tespiti tedavi için en iyi fırsattır. Erken evre deri kanseri yüksek bir iyileşme oranına sahipken, ileri evre kutanöz SHK genellikle kemoterapiye dirençlidir. Bu nedenle günümüzde araştırmalar kutanöz SHK oluşumunu geciktirmek veya önlemek için yeni kemoprofilaktik ajanlar geliştirmeye odaklanmıştır.

Deri kanseri oluşumunda oksidan stres artışı, immün sistem baskılanması ve hücre döngüsündeki çeşitli mutasyonlar önemli rol oynamaktadır (2,6–8). Kolesterol metabolizmasında ara ürün olan skualenin derideki antioksidan ve yaşlanma geciktirici etkisi, kolon kanserine ve akciğer kanserine karşı koruyucu etkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (9,10).

Çalışmamız tasarlanırken farelerde UVB ışınlarıyla deri kanseri modeli oluşturularak bu süreçte fareye topikal ve oral olarak uygulanan skualenin skuamöz hücreli karsinoma karşı koruyucu etkisini gözlemlemek amaçlanmıştır. Skualenin koruyucu etkisi gösterildiği takdirde tüm dünyada en yaygın kanser türü olan deri kanseri profilaksisi için yeni preparatlar geliştirilmesine ve deri kanseri insidansının, morbidite ve mortalitesinin azaltılmasına katkıda bulunmak amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Deri Embriyolojisi

Deri, dermis ve epidermis olarak iki tabakadan meydana gelmektedir. İntrauterin erken dönemde embriyonun yüzeyi tek katlı ektoderm ile kaplıdır ve bu tabakadan sinir sistemi ve epidermis meydana gelir. Ektodermden köken alan bu epidermis tabakası embriyolojik olarak üçüncü haftada tek katlı epitel olarak ortaya çıkar (11). Bu tek katlı tabakayı oluşturan hücreler farklılaşmamış, küboid yapıda, glikojen depolayan hücrelerdir (12). İntrauterin gelişimin dördüncü haftasının sonunda bu tabakanın yüzeyinde periderm isimli ikinci bir tabaka daha oluşur. Bu skuamöz tabaka tamamen intrauterin hayata özgü olup ilerleyen haftalarda kaybolur (12). Peridermin altındaki bazal tabaka çoğalarak yeni keratinositler üretir ve stratum germinativum olarak adlandırılır. Yeni hücreler oluştuğunda derinden yüzeye doğru yer değiştirerek ilerler. Onbirinci haftada bazal tabakadan çoğalan bu hücreler periderm altında “ara tabaka” denilen ikinci bir tabaka oluşturur ve epidermis giderek kalınlaşır. Beş ay civarında keratohyalin granülleri oluşmaya başlar. Altıncı ay sonunda derinin kornifikasyonu tamamlanmıştır ve beş ayrı histolojik tabakası ayırt edilebilir duruma gelmiştir (13). Altındaki tabaka olan dermis ise mezoderm kökenli bağ dokudan oluşmaktadır ve içerisinde kan damarları, lenfatik kanallar, sinir lifleri ve çeşitli reseptörler yer alır (14).

Melanositler, nöral krest hücrelerinden köken alır ve sekizinci haftada epidermise ulaşırlar. Beşinci ayda melanositler melanozom üretmeye ve melanini keratinositlere transfer etmeye başlarlar. Langerhans hücrelerinin hematopoetik kök hücrelerden köken aldığı düşünülmektedir ve epidermiste altıncı haftada görülür. Merkel hücrelerinin kökeni tartışmalı olmakla beraber nöral krest hücrelerinden ya da ektodermden köken aldığı düşünülmektedir ve gelişimin 16. haftasında görünür hale gelirler (15).

2.2 Deri Histolojisi ve Fizyolojisi

Deri vücudun tüm dış yüzeyini kaplayan organdır. Sindirim, solunum ve ürogenital sistem epitelyumu ile devamlılık gösterir. Önemli bir duyu organı ve D vitamini üretim merkezidir. En temel iki özelliği ise doğadaki mekanik, kimyasal ve mikrobiyolojik

etkenlere karşı bariyer görevi görmesi ve termoregülasyonda önemli bir rol oynamasıdır (12).

Deri temel olarak dermis ve epidermis olarak iki tabakadan oluşur. Dış katman olan epidermis temel olarak avaskülerdir ve esas görevi kornifikasyon ismi verilen ölü hücre bariyeri oluşturarak vücudu dış etmenlerden korumaktır (16). Daha iç taraftaki dermis ise vasküler olan yapı olup termoregülasyon ve derinin beslenmesinden sorumlu olan kısımdır. Epidermis dıştan içe doğru stratum korneum, stratum lusidum, stratum granülozum, stratum spinosum ve stratum bazale olarak adlandırılan beş tabakadan oluşur. Epidermisteki beş katmanın tümü sadece palmar ve plantar bölgelerde bulunur. Stratum lusidum isimli tabaka yük taşıyan ve derinin kalın olduğu bu bölgelere has bir tabaka olup başka vücut bölümlerinde bulunmaz. Vücudun tüm bölümlerinde ortak bulunan epidermis tabakaları ise stratum korneum ve stratum bazaledir (16). Epidermis kalınlığı vücutta bölgeden bölgeye değişmekte; göz kapağında 0.04 mm iken el palmar bölgelerinde 1.6 mm kalınlığa ulaşabilmektedir. Epidermis keratinosit, melanosit, Langerhans hücreleri, Merkel hücreleri olarak bilinen dört temel hücre içermektedir (Tablo 1).

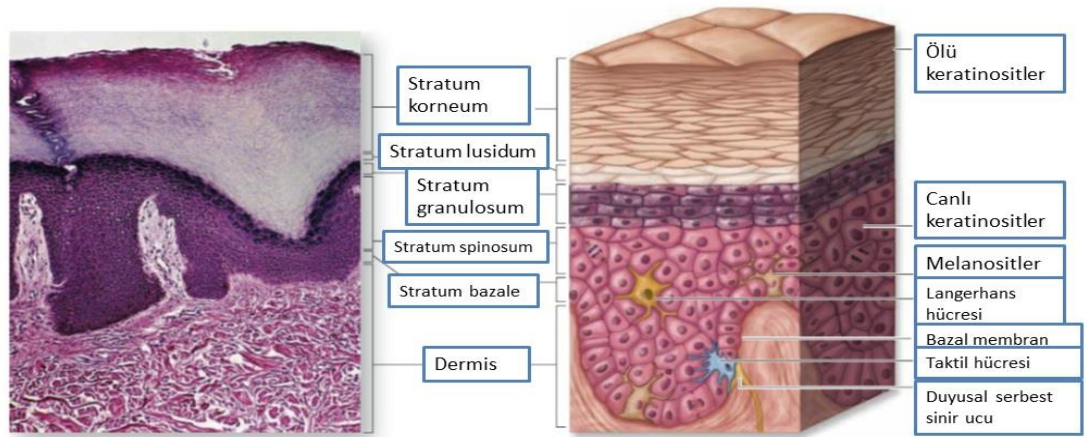
Keratinositler epidermisteki baskın hücre tipi olup bazal tabakadan korneal tabakaya doğru pasif olarak ilerleyerek tabakaların sürekli yenilenmesini ve bariyer fonksiyonunun devamını sağlarlar. Hücrelerin bazal tabakadan korneal tabakaya kadar ilerlemesi ve dökülmesi süreci epidermal döngü olarak adlandırılır ve bu döngü yaklaşık olarak 52-75 gün sürer. Gençlerde bu döngü süresi kısaltmakla birlikte yaşlılarda üst sınıra yaklaşmaktadır (17).

Epidermis bazal tabakasında yaklaşık her on keratinosite karşılık bir adet melanosit bulunur (18). Melanositlerin temel görevi melanozom isimli melanin dolu veziküller üretmektir. Bu veziküller melanositlerin dendritik uçlarına göç ederek komşu keratinositlere aktarılırlar (19). Melaninin asıl görevi cildi güneş ışığının zararlı etkilerinden korumaktır. Ultraviyole ışına maruziyet arttıkça melanin sentezi ve keratinositlere transferi artar ve deri rengi koyulaşır (20). Langerhans hücreleri çoğunlukla epidermis orta katmanlarında bulunan özelleşmiş immün hücrelerdir. Kemik iliğinden köken alan bu hücreler derideki major antijen sunan hücrelerdir ve nonspesifik immün sistem elemanlarıdır. Epidermisteki hücrelerin yaklaşık %3-6'sını oluştururlar (21). Merkel hücreleri epidermiste özelleşmiş nöroduyusal hücrelerdir. Vücutta çoğunlukla palmar

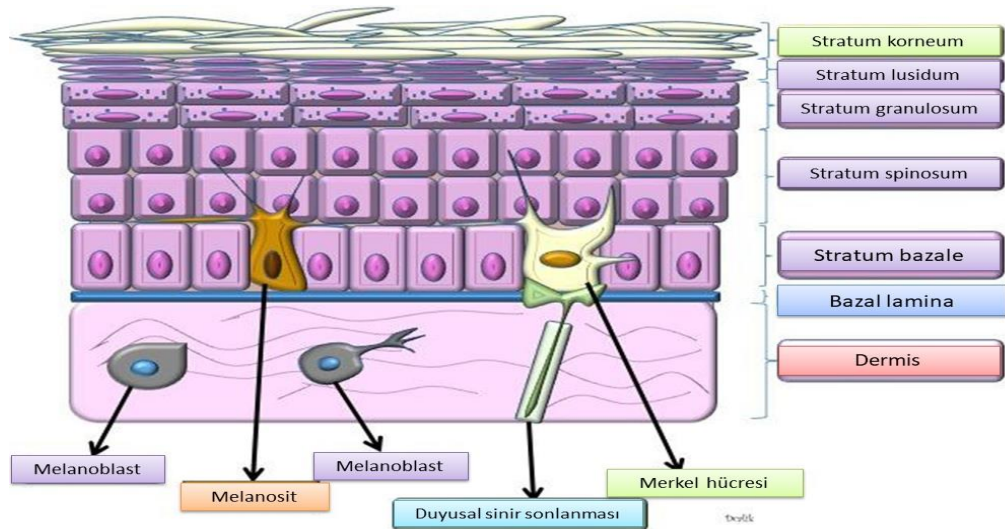
bölge, tırnak yatağı, oral ve genital epitelde bulunur. Mekanoreseptör fonksiyonları olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (20).

Deri ekleri olarak bilinen ter bezleri, pilosebace foliküller ve tırnaklar ektoderm kökenli olup özelleşmiş epitel yapılarıdır. Epidermisle bağlantılarını koruyarak dermise ve subkutise doğru uzanım gösterirler (18).

Epidermin derininde yer alan dermis tabakası ise epidermisten 15 ile 40 kat daha kalındır; ancak selülaritesi ise daha azdır. Bu tabaka derinin sinir, damar ve lenfatik yapılarının tümünü, glandüler yapıların ise çoğunu içermektedir. Deriye sağlamlık kazandıran ve kan dolaşımını sağlayan tabaka burasıdır. Dermis, kendi içinde yüzeyden derine doğru papiller ve retiküler dermis olmak üzere ikiye ayrılabilir (15).



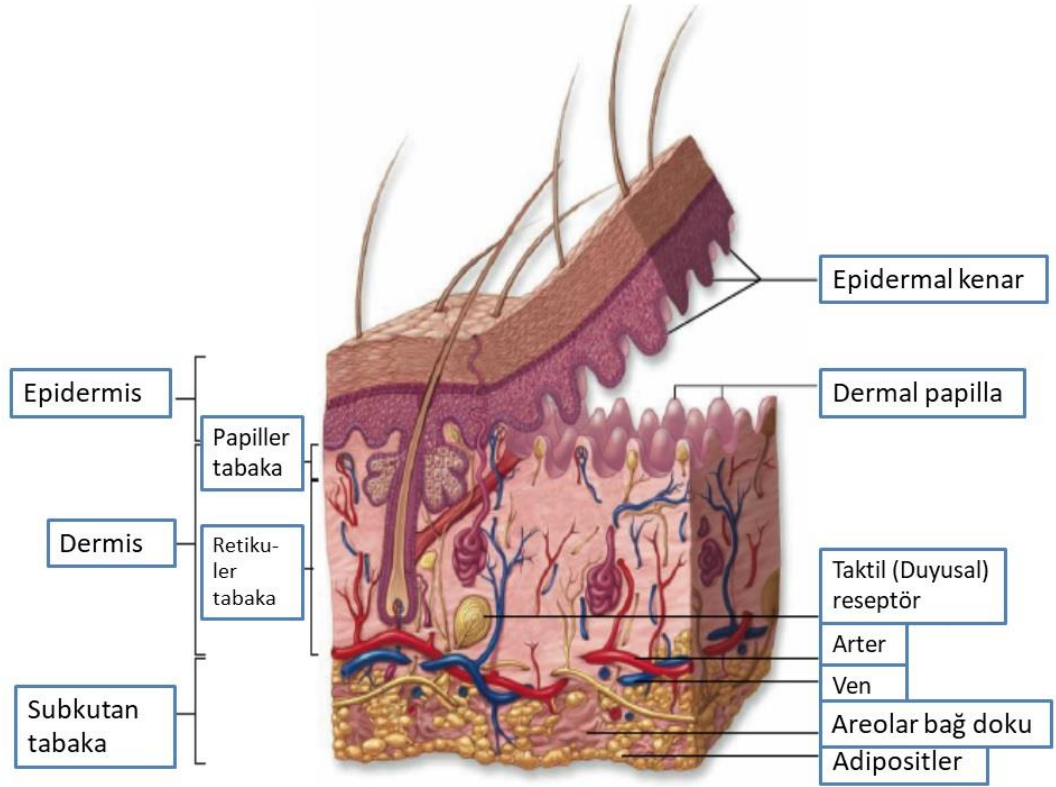
Resim 1: Derinin katmanları (22)



Şekil 1: Epiderminin tabakaları ve epidermiste yer alan hücreler (23)

Tablo 1: Derinin fonksiyonları ve bu fonksiyonları gerçekleştiren yapılar

Fonksiyon	Yapı/Hücre
Koruma Kimyasal, partikül Ultraviyole radyasyon Antijen, haptan Mikroorganizmalar	Epidermis Melanosit Langerhans Hücreleri Langerhans Hücreleri
Dengelenmiş iç yapının korunması	Epidermis
Sıvı, elektrolit ve makromolekül kaybının önlenmesi	Epidermis
Şok emme özelliği	Dermis-Subkutan doku
Isı regülasyonu	Kan damarları Ekrin ter bezleri
Yalıtım	Subkutan yağ
Duyu	Özel sinir sonlanmaları
Nemlendirme	Sebase glandlar
Koruma ve kazıma	Tırnak
Enerji depolama	Subkutan yağ
D-Vitamini sentezi	Keratinosit
Vücut kokusu-Feromon salgısı	Apokrin ter bezleri
Dış görünüş	Saç, tırnak, dudak gibi özelleşmiş yapılar



Resim 2: Derinin üç boyutlu yapısı (22)

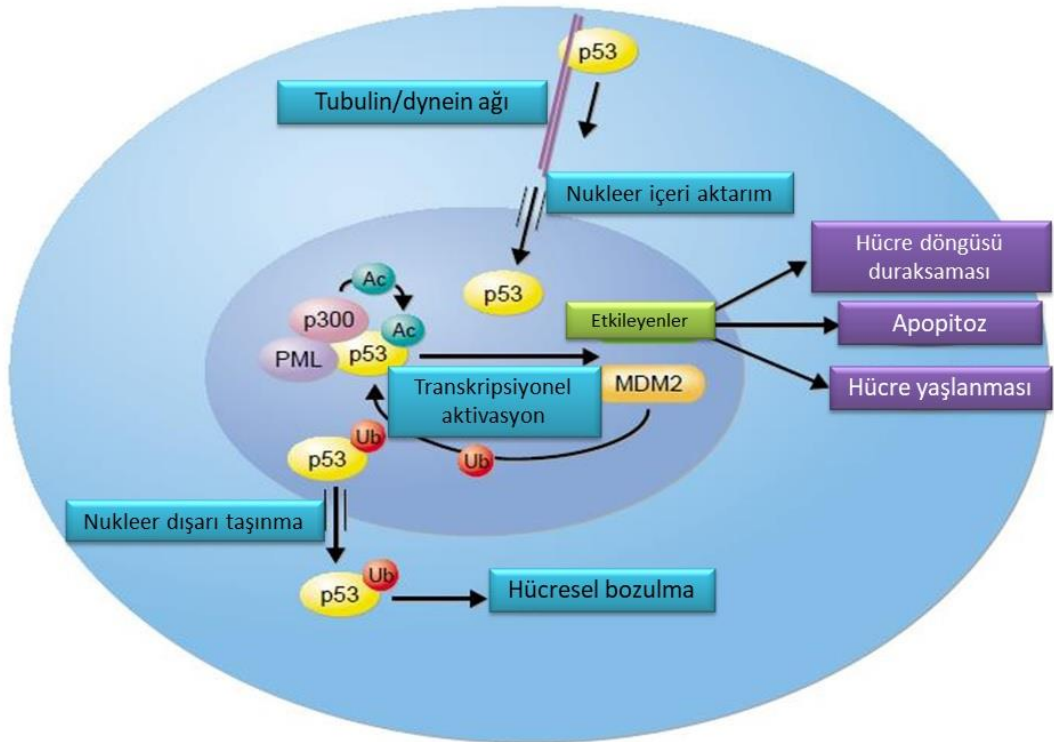
2.3 Deri Kanseri

ABD’de 1990’lardan bu yana ortalama kanser insidansı ve özellikle mortalitesi azalırken deri kanserlerinin insidansı istikrarlı bir şekilde artmaktadır. Deri kanserleri en sık kanser türü olmakla beraber, tüm kanser vakalarının yarısının deri kanseri olduğu tahmin edilmektedir (24).

Deri kanseri kendi içerisinde melanom ve melanom dışı deri kanseri olarak iki ana gruba ayrılabilir. Melanom dışı deri kanseri (MDDK) grubunda temel olarak bazal hücreli karsinom (BHK) ile skuamöz hücreli karsinom (SHK) yer almaktadır. BHK, SHK’ye göre 3-4 kat daha sık görülmektedir. Açık tenli popülasyonda deri kanserleri daha sık görülmekle birlikte, koyu tenli popülasyonda görülüyorsa genellikle değişik etkenler ile oluşmakta ve sıradışı anatomik bölgelerde ortaya çıkmaktadır. BHK ve SHK’de mortalite oranı yüksek olmamakla birlikte özellikle SHK vakalarında ileri yaş ve baskılanmış immün sistem eşlik ediyorsa mortalite artabilmektedir (25).

2.3.1 Etiyolojik Faktörler

Hücre nükleusunda DNA'daki bazı genlerde oluşan mutasyonlar onarılamazsa ve kontrol edilemeyen bir çoğalma yeteneği kazanırsa kanser gelişimi başlar. Böyle hasarlı genleri onaran ve kanser gelişimini önleyen bazı mekanizmalar bulunmaktadır. p53 hücre döngüsünü düzenleyen en önemli transkripsiyon faktörlerinden biridir. Kanser oluşumunu baskılamak için önemli bir proteindir. DNA'da hasar olduğunda hücre döngüsünü durdurarak DNA hasarının onarılmasını sağlar. Onarım sonrası hücre döngüsü devam eder. DNA hasarı onarılamayacak durumda ise p53 proteini döngüyü durdurarak apoptoz yolağını başlatır ve programlı hücre ölümü ile hatalı genlerin elimine olmasına yardımcı olur (Şekil 2). p53 geninde mutasyon olduğunda bu fonksiyonlar yerine getirilemez ve hücre malign dönüşüme açık hale gelir. SHK'lerin %90'dan fazlasında, BHK'lerin %50'den fazlasında p53 mutasyonu saptanmıştır (25).



Şekil 2: p53 proteininin hücredeki görevleri (26)

Ultraviyole ışınının karsinojenik etkisi çok iyi tanımlanmıştır. Ultraviyolenin kümülatif etkisi özellikle hücresel DNA üzerine olur. p53 yolağı gibi DNA onarım mekanizmalarını bloke ederek hücredeki mutasyonların onarılmasını önler (25).

Tablo 2: Melanom Dışı Deri Kanseri Etiyolojik Faktörleri

Melanom Dışı Deri Kanseri Etiyolojik Faktörleri
Maruziyet - Güneş - Düşük enlemde ve yüksek UV maruziyeti olan ortamda yaşamak - Dış ortamda çalışmak - Kümülatif maruziyet - Diğer UV kaynakları - Solaryum vb. yapay UV kaynakları - Psöralen+UVA fotokemoterapisi - Mesleki maruziyet - İyonizan radyasyon - Sigara tüketimi (Sadece SHK) - Kimyasal maddeler veya ilaçlar - Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (Fenol, krezol, ksilenoller, piridinler vb.) - Arsenik
Genetik veya Medikal Durumlar - Açık renk deri, saç ve göz rengi - Melanom dışı deri kanseri öyküsü - Yanık skarı - Diskoid lupus eritematozus - Drene sinüs traktı - Kronik ülser - Radyasyon dermatiti - İmmünsüpresyon

Güneş ışığı ve ultraviyole ışını tümör oluşturun ve ilerletici etkiye sahiptir (27). Güneşten yeryüzüne ulaşan ultraviyole A (UVA) ve UVB ışınlarından MDDK oluşumu ve ilerlemesini sağlayan primer etken UVB'dir (28). En karsinojenik etkiye sahip olan UVC (Ultraviyole-C) ise atmosferi geçememektedir. Bunlar arasında yeryüzüne en fazla miktarda ulaşan ise UVA'dır ve az da olsa karsinojenik etkisi vardır (29). UVB'nin büyük kısmı atmosferik stratosfer tarafından emilse de bir kısmı yeryüzüne ulaşmaktadır ve UV karsinojenik etkisinin büyük oranda sebebi budur. Ultraviyole ışınların yeryüzüne ulaşması

atmosferik koşullar, enlem, saat, mevsim ve ozon tabakasının durumu gibi birçok faktörden etkilenmektedir (30).

BHK ve SHK temel olarak açık tenli popülasyonun hastalığıdır. Derinin içerdiği melanin miktarı UV'ye duyarlılığı doğrudan etkiler. Açık tenli kişiler UV'ye daha duyarlı olup deri kanserine daha yatkınken, koyu tenli kişilerde UV duyarlılığı daha az olup deri kanseri insidansı bu popülasyonda çok daha düşüktür (28). Yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ki çocuk ve ergenlik çağlarında yoğun UV maruziyeti BHK, erken dekatlarda kronik UV maruziyetinin kümülatif etkisi SHK'ye neden olmaktadır. Bunların aksine melanom etyolojisinde ise yanığa neden olacak kadar akut UV maruziyetinin aralıklı olarak gerçekleşmesi bulunmaktadır (31).

UV ışınları deri kanseri gelişiminde temel olarak iki yoldan etki etmektedir: Birincisi DNA'daki komşu primidin molekülleri arasında çapraz bağ oluşturarak hücrelerin genetik kodlarında hasar oluşturmak, ikincisi ise immün sistemi baskılamaktır (32).

Kronik UV maruziyeti deride kronik bir inflamasyon yaratmaktadır. Antiinflamatuvar ajanlar kullanılırsa ya da prostagladin E₂ salınımı önlenirse UV kaynaklı immünsüpresyon engellenebilmektedir (33).

İmmün sistem de tümör oluşumunda önemli bir yere sahiptir. Yeterli immün yanıtın olmasının farelerde kanser gelişimini önlemede en önemli basamaklardan biri olduğu gösterilmiştir. Langerhans hücrelerinin antiijenleri tanıyıp T hücrelere sunma görevleri vardır. Kronik UV maruziyetinin bu hücrelerin sayısını ve fonksiyonunu azalttığı gösterilmiştir (34).

Organ nakli hastalarında ve otoimmün hastalıklarda olduğu gibi immün baskılayıcı ilaç kullanan hastalarda ise MDDK riski 50-100 kat artmıştır. Bu ilaçları kullanan kişilerde oluşan tümörler de daha agresif seyirli olmaktadır (35,36).

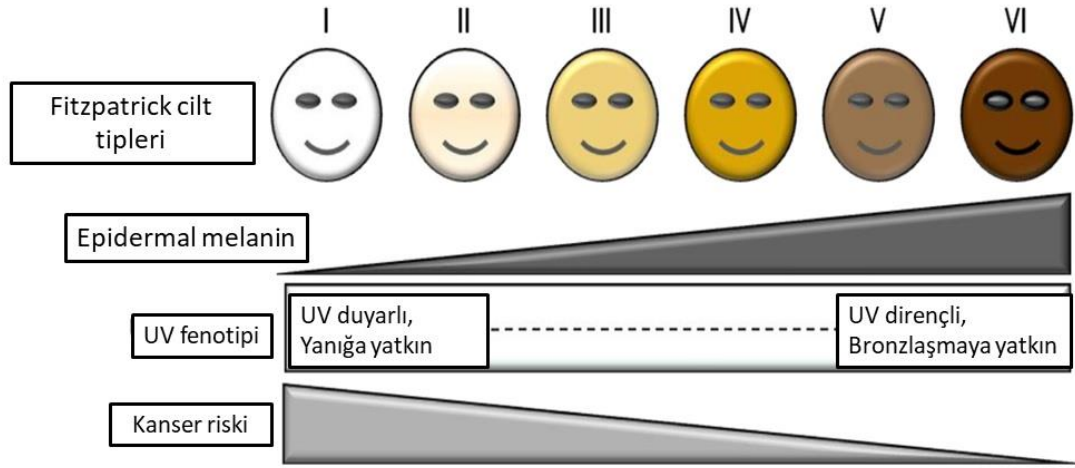
Tüm kronik yaralarda özellikle yanık zemininde oluşan kronik yara ve skarlarda uzun dönemde deri kanseri riski artmıştır. En sık görülen kanser tipi ise SHK'dir. Kronik yara zemininde gelişen SHK'ye marjolin ülser denir. Yara oluşumuyla kanserin ortaya çıkışı arasında 2-40 yıl arası latent periyot görülmektedir. Bu tümörler güneş maruziyetine bağlı gelişen tümörlerden daha sık metastaz yapma eğilimindedir (37).

MDDK'nin insidansının artmasına ek olarak ayrıca yüksek riskli hasta grupları bulunmaktadır. DNA onarım mekanizmalarında mutasyon sonucu oluşan ve otozomal resesif geçiş gösteren kseroderma pigmentozum hastalarında ultraviyole ışına hipersensitivite ve DNA onarımında genetik yetersizlik vardır ve deri kanseri riski 2000 kat artmıştır (32). Organ transplantasyonu yapılan hastalarda rejeksiyonu önlemek amacıyla kullanılan immünsüpresan ilaçlar nedeniyle SHK dahil olmak üzere genel kanser yatkınlığı artmıştır (38).

Geniş bir olgu-kontrol çalışmasında ise fotosensitizan ajanların, özellikle topikal antimikrobiyaller ve tiazid diüretiklerin SHK ve BHK gelişme riskini arttırdığı gösterilmiştir (39). Psöriazis gibi bazı dermatolojik hastalıklarda kullanılan psöralen-Ultraviyole A (PUVA) tedavisinde bulunan 8-metoksipsöralen ve UVA da hayvan modelleri ve insanlarda kanserojendir (40).

Fenol, krezol, ksilenoller ve piridinler gibi polisiklik aromatik hidrokarbonlara mesleki ya da başka sebeplerle kronik maruziyet deri kanseri etyolojisinde yer almaktadır (41). Radyasyon da iyi bilinen kanserojen etmenlerdendir. İş nedeniyle düzenli olarak radyasyona maruz kalan kişilerde ya da benign lezyonlar nedeniyle radyoterapi uygulanan kişilerde BHK ve SHK'ye yatkınlık olduğu gözlenmiştir (28). İnsan Papilloma Virus (HPV) enfeksiyonu durumlarında da artmış inflamasyon ve replikasyon kapasitesi nedeniyle MDDK insidansı artmıştır (42).

Pathak ve Fitzpatrick deri yapılarını UV ışığa duyarlılık ve melanin yoğunluğu açısından altı gruba ayırarak sınıflandırmıştır. Tip 1'de deri kanseri olma ihtimali en yüksekken tip 6'ya doğru gidildikçe bu risk azalır (43) (Şekil 3).



Şekil 3: Fitzpatrick deri tipleri

2.3.2 Korunma

Deri kanseri en sık kanser türüdür. Melanom ve MDDK insidansı ve tedavi maliyetleri her geçen yıl dünya genelinde artmaktadır. Morbidite, mortalite ve tedavi maliyetlerindeki bu artış deri kanserinden korunmaya daha çok önem verilmesine yol açmıştır. Erken tanı ve uygun tedavi %95'lere varan kür oranları sağlamaktadır. Korunma MDDK'deki en önemli stratejidir (44). Korunma stratejisinde primer, sekonder ve tersiyer korunma olmak üzere 3 temel basamak vardır. Primer korunma deri kanserini önleyici davranışlarda bulunmaktır ve temel olarak UV maruziyetinden kaçınmayı gerektirir (45).

Amerikan Dermatoloji Akademisi ve Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri Konferansında deri kanserinden korunma davranışı olarak aşağıdaki öneriler kabul edilmiştir (46):

- UV kaynağı olan güneşten özellikle 10:00-16:00 saatleri arasında korunmak
- Koruyucu giysi ve güneş gözlüğü kullanmak
- SPF (Güneş koruyucu faktör) 15 ve üzeri olan güneş koruyucu krem kullanmak
- Ultraviyole ışını yayan cihazlardan (solaryum gibi) uzak durmak
- Altı aylıktan küçük çocuklar için güneşten koruyucu krem yerine koruyucu giysi ve şapka kullanmak

Bunlara ek olarak MDDK insidansının çok yüksek olduğu Avustralya’da yapılan çok sayıda kohort çalışması göstermiştir ki primer korunmada halkın deri kanseri konusunda bilgilendirilerek korunma yöntemleri ile ilgili eğitim verilmesi de deri kanseri insidansını azaltmaktadır. Halkın rutin olarak güneş koruyucu krem kullanması teşvik edilmeli ve bronzlaşmış tenin popülarize edilmesine son verilmelidir. Ergenlik ve genç erişkinlik döneminde maruz kalınan ultraviyole ışınların ve güneş yanıklarının ileri yaşlarda MDDK ve melanom geliştirmedeki etkisi göz önünde bulundurulduğunda primer korunma çalışmalarının özellikle gençler üzerinde yoğunlaştırılması gerektiği görülmektedir(44). Güneş koruyucu kremlerin etkisi SPF (Sun protection factor) (Güneş koruyucu faktör) ile ölçülür. Bu değer de eritemdeki azalmayla doğru orantılıdır. Güneş koruyucu krem kullanan kişilerde eritemin rahatsız edici etkileri daha geç ortaya çıktığından kişiler güneş altında daha fazla vakit geçirme eğiliminde olmaktadır. Bu da güneş koruyucu krem kullananlarda paradoksal olarak daha fazla UV kaynaklı hasar oluşturabilmektedir. Halkın eğitiminde güneş koruyucu krem kullanılsa bile güneşten kaçınmak gerektiği vurgulanmalıdır (44).

Melanom dışı deri kanserinden primer korunma methoduyla davranış değişiklikleri ve güneş koruyucu krem kullanımına rağmen deri kanseri insidansında beklenen düzeyde bir azalma sağlanamamıştır. Bu nedenle başka stratejilerin de kullanılması gerekmektedir. Sekonder korunma dermatolog veya pratisyen hekim tarafından düzenli bir şekilde tüm vücut inspeksiyonu yapılarak riskli ya da premalign lezyonların belirlenmesi, gerekirse bu lezyonlara müdahale edilmesi olarak tanımlanabilir. Bu şekilde premalign lezyonlar malign dönüşüme uğramadan, malign lezyonlar ise daha erken evrelerde tanınmış ve daha düşük morbidite ve maliyetle tedavi edilmiş olacaktırlar (45). Bunun dışında riskli lezyonlara yönelik kemoprofilaktik ajanların uygulanması da sekonder korunma kapsamına girmektedir. Sporn ve arkadaşları kemoprofilaksiyi “karsinogenez sürecini durdurmak veya tersine çevirmek için uygulanan farmakolojik yaklaşım” olarak tanımlamışlardır. İdeal kemoprofilaktik madde toksik olmayan, ucuz, kolay ulaşılabilir, oral ve topikal formları olan bir madde olmalıdır. Hayvan deneylerinde etkisi gösterilen kemoprofilaktik maddelerin geniş klinik çalışmalarla da etkisi gösterilmelidir. SHK’yi önlemede kullanılan ajanların aktinik keratoz üzerine etkisi incelenmektedir. Önleyici etkisi gösterilen ajanların SHK’ye karşı koruyucu olduğu söylenebilir (44).

Tersiyer korunma deri kanseri tanısı ve tedavisi almış kişilerin düzenli takiplerinin yapılması, olası rekürrens durumlarının erken saptanmasıdır. En sık rekürrens ilk tümör

saptanmasından sonra ilk üç yıl içinde görülse de bu hastalar ömür boyu takip altına alınmalı ve olası rekürrensler ve yeni tümör oluşumları açısından dikkatle incelenmelidir (45).

2.3.3 Histopatoloji

Aktinik keratoz, in situ SHK ve invaziv SHK birbirinden farklı lezyonlar olmakla birlikte epidermal keratinositlerden köken alan karsinogenezin birbirini takip eden aşamalarıdır. Kronik karsinojen maruziyeti ile öncelikle aktinik keratoz (solar keratoz) oluşur. Karsinojen maruziyetinin devam etmesi halinde ise in situ SHK (Bowen hastalığı) ve en sonunda da invaziv SHK ortaya çıkar. Bu aşamadan itibaren de lenf nodu ve uzak organ metastaz ihtimali söz konusudur (44).

Aktinik keratoz, premalign lezyon olarak sınıflandırılrsa da erken SHK olarak da adlandırılabilir. Histolojik olarak parakeratotik ve ortokeratotik hiperkeratoz ile akantotik epidermis görülür. Epidermisin bazal tabakasındaki neoplastik keratinositler nedeniyle artmış selülarite, mitoz ve nükleer pleomorfizm vardır. Süperfisyonel perivasküler lenfositik infiltrat ve papiller dermiste elastozis vardır (47). Bu aşamadaki lezyonların kemoprofilaktik ajanlar uygulanarak geri çevrilmesi ya da karsinogenez sürecinin yavaşlatılması SHK'ye dönüşümü azaltabilmektedir (44).

Bowen hastalığı intraepitelyal karsinom olarak adlandırılır ve epidermisin tüm tabakalarında atipik keratinositler bulunur (skuamöz hücreli karsinoma in situ). Tüm epidermiste atipik keratinositlerin dezorganize matürasyonu, pleomorfik nükleuslar, atipik mitozlar, multinükleer tümör hücreleri ve intakt bazal tabaka vardır. Karsinojen maruziyetinin devamı durumunda invaziv SHK'ye dönüşerek metastaz yeteneği kazanabilmektedir (47).

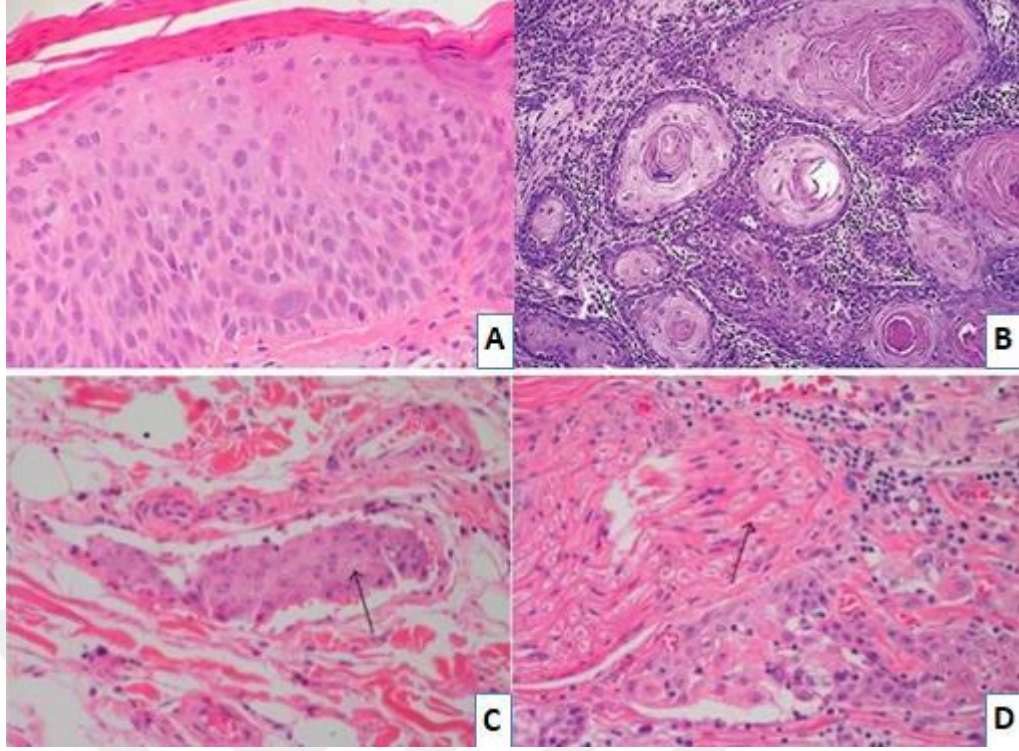
SHK derinin epidermis tabakasından ya da skuamöz epitele sahip müköz membranlardaki keratinositlerden köken alır. SHK'ler adenoid ya da müsin üreten kanserler olarak da ortaya çıkabilir. Tümördeki keratinositlerin normal keratinositlere benzemesi ve yüksek oranda keratinizasyon olması durumunda “iyi diferansiye” olarak tanımlanır. Bu benzerlik ve keratinizasyon miktarı azaldığı takdirde “orta ve kötü diferansiye SHK” olarak adlandırılır (48). Bunlar dışında hücre atipi derecesi, tümörün yapısı, atipik mitozların miktarı da tümör derecelendirmesinde önemli değişkenlerdir (48).

SHK, histolojik açıdan klasik, dezmoplastik, iğsi hücreli, pigmente, verrüköz, akantolitik, adenoskuamöz, papiller SHK olarak alt gruplara ayrılabilir. Klasik SHK, atipik mitotik aktivite içeren genişlemiş ve pleomorfik nükleuslu atipik hücrelerle karakterizedir. İnflamasyon genellikle ülser lezyonlarda bulunur ve lenfosit, plazma hücreleri ve nötrofilleri içerir. Atipik hücrelerle çevrili keratin incileri bulunur (44).

Dezmoplastik SHK, tümörün en az %30'unu ilgilendiren dezmoplastik stromayla çevrili orta veya kötü diferansiye keratinositlerle karakterizedir. Metastatik yayılım oranı daha yüksektir. İğsi hücreli SHK, daha önceki travma ya da radyoterapi ile ilişkili olup, Marjolin ülserde en çok görülen alttıptir. Dermisi infiltre eden iğsi hücreler ve bunların çevresinde girdap şeklinde kollajen iplikleriyle karakterizedir. Miksoid stroma, pleomorfik dev hücreler ve atipik mitozlar içerebilir. Pigmente SHK çok nadir olup genellikle koyu tenli popülasyonda oral ve konjonktival mukozayı etkiler (44).

Akantolitik SHK, adenoakantoma olarak da bilinir ve yaşlı insanlarda, baş-boyun bölgesinde, radyoterapi alanlarında görülür. Çok sayıda diskeratotik hücre içeren adenoid patern ile karakterizedir. Papiller SHK, yaşlı, immünsüprese kadınlarda görülür ve kırmızı-bronz arasında rengi olan lezyonlardır. Adenoskuamöz karsinom glandüler ve skuamöz diferansiyasyonun birlikte görüldüğü, çok nadir ve agresif karakterli bir lezyondur. İntrasitoplazmik müsin içeren adenomatöz komponenti de olan SHK türüdür. Verrüköz karsinom iyi diferansiye SHK türü olup histolojik olarak düşük atipi, koilositik değişiklikler, santral nötrofil koleksiyonu içeren egzofitik skuamöz proliferasyonla karakterize lezyondur (44).

SHK'de tümör kalınlığı arttıkça lokal rekürrens ve lenf nodu metastazı olasılığı da artmaktadır (25). Tümör çapı 2 cm'den büyükse rekürrens riski 2 kat, metastaz riski 3 kat artmaktadır (47).



Resim 3: SHK histopatolojik görüntüleri

A)Bowenoid aktinik keratoz **B)**İyi diferansiye SHK **C,D)**SHK’de perivasküler, perinöral infiltrasyon

SHK’de nöral invazyonun histolojik olarak görülmesi artmış invazyon ve metastaz oranlarıyla ilişkilidir (49). Erken perinöral invazyon genellikle asemptomatiktir ve genellikle patolojik incelemede ortaya çıkar. Asemptomatik hastalarda cerrahi ve radyoterapi uygulaması ile kür oranı %80’e ulaşırken, semptomatik hastalarda aynı tedaviye rağmen kür oranları %45 seviyesindedir (50).

2.3.4 Premalign Lezyonlar

1-Aktinik Keratoz

Aktinik keratoz kronik güneş maruziyeti sonucu oluşan, açık tenlilerde, özellikle ileri yaşta sık görülen premalign deri tümörüdür. Aktinik keratozların yaklaşık %16’sı invaziv SHK’ye dönüşür; ancak hangi lezyonun malign dönüşüme uğrayacağını öngörmek mümkün değildir (51).

Aktinik keratoz deriden hafif kabarık, hafif kırmızı renkte, pullu kitlelerdir. Aşırı keratin birikimi olduğu takdirde makroskopik olarak SHK ile karışabilen “kutanöz boynuz” olarak isimlendirilen yapılar oluşur. Bu kitlelerin komşu normal deriyle aralarında genellikle aşamalı bir geçiş olur, kesin hatları çoğu zaman seçilemez. Aktinik keratoz lezyonlarının hipertrofik, atrofik, bovenoid ve likenoid gibi birçok histolojik alt tipi bulunmaktadır. Tedavide topikal 5-florourasil (5-FU) ya da cerrahi eksizyon uygulanır.

2-Lökoplaki

Yunanca’da “beyaz yama” anlamına gelen lökoplaki lezyonları oral ya da vulvar mukozada görülebilmektedir. Kronik tütün kullanımı ya da protez dişlerin kronik irritasyonu ile olabileceği gibi papilloma virüs enfeksiyonu kaynaklı da oluşabilmektedir (52). Lökoplaki lezyonlarına yapılan biyopsiler sonucu %17’sinin in situ, %3’ünün invaziv SHK olduğu gösterilmiştir (53). Lökoplaki zemininde gelişen SHK’ler aktinik keratoz zemininde gelişenlere göre daha fazla metastatik özellik göstermektedir. Tedavide cerrahi eksizyon ya da kriyocerrahi kullanılmaktadır.

3-Kseroderma Pigmentozum

Kseroderma pigmentozum etkilenen kişilerin ultraviyolenin DNA’da oluşturduğu hasarları tamir edemediği genetik bir hastalıktır. ABD’de her 250000 canlı doğumda bir görülmektedir. Deride ve gözlerde güneşe olan aşırı hassasiyetten dolayı BHK, SHK ve melanom riski yaklaşık 1000 kat artmıştır (54).

Kseroderma pigmentozum aslında kromozom kırılma sendromları ve DNA onarım bozuklukları grubunun bir üyesidir. Bu grupta bulunan diğer hastalıklar ise Fankoni anemisi, ataksi telenjektazi, Bloom sendromu ve Cockayne sendromudur.

4-Keratoakantoma

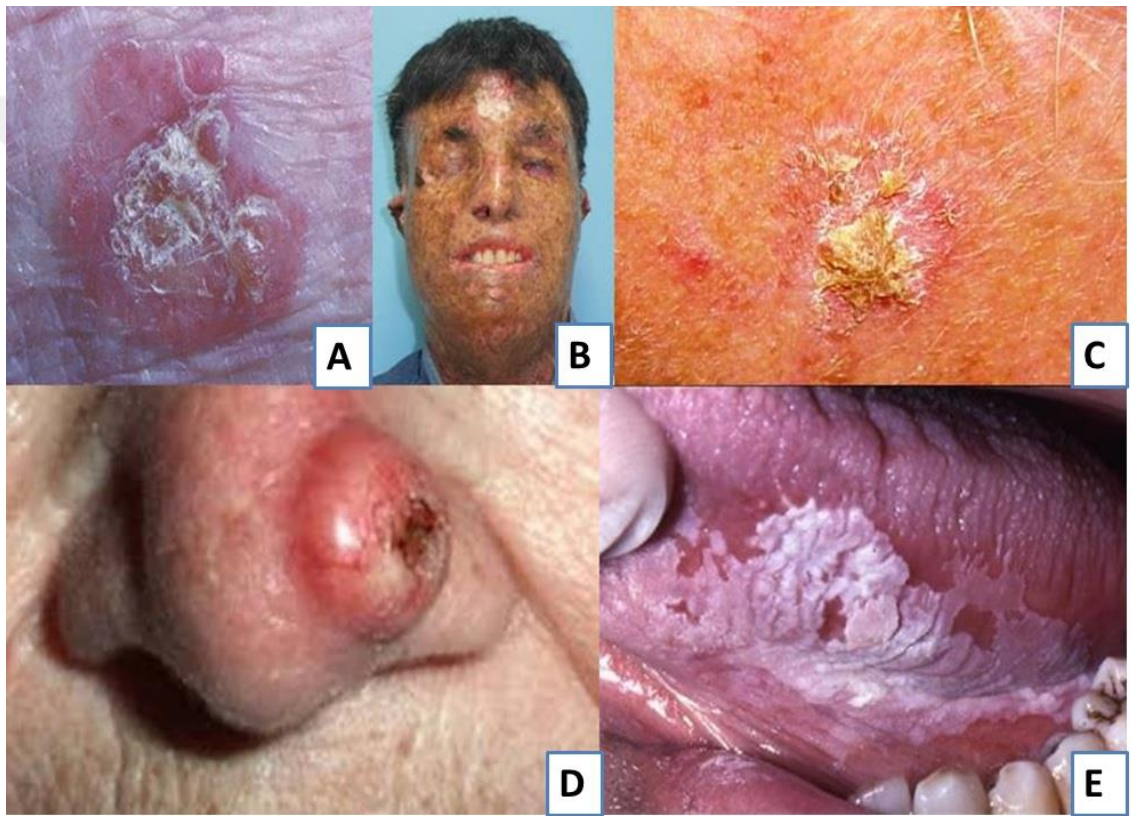
Açık tenli kişilerde, genellikle güneşe maruz kalan bölgelerde oluşan, hızlı büyüme gösteren tümörlerdir. 4-8 hafta gibi kısa bir sürede büyüme gösterse de genellikle 4-6 ay içerisinde spontan regresyona uğramaktadır. Ancak düşük de olsa malign dönüşüm riski olduğundan dolayı cerrahi eksizyon önerilmektedir.

Genellikle yuvarlak, keskin sınırlı, ortasında keratin tıkaçı içeren, deriden kabarık, soliter lezyondur. Etyolojisinde UV ışını, kronik travma, viral enfeksiyon, kimyasal

maruziyeti ve immün yetmezlik yer almaktadır (55). Tedavisinde cerrahi eksizyon, lazer ablasyon ve desikasyon-küretaj yer almaktadır.

5-Bowen hastalığı

İn situ SHK olarak da adlandırılan bu lezyon düzensiz sınırlı, eritematöz, kabuklanmış, pullu görünümündedir. Mikroskopik olarak dermoepidermal bileşke bütünlüğü bozulmamıştır. Glans penis, vulva ve oral mukozadaki bowen hastalığının özel ismi “Queyrat eritroplazisi” olarak adlandırılmaktadır. Tedavisi cerrahi eksizyon ya da topikal 5-FU uygulamasıdır.



Resim 4: Premalign lezyonlar

A)Bowen hastalığı **B)**Kseroderma pigmentozum **C)**Aktinik keratoz
D)Keratoakantoma **E)**Lökoplaki

2.3.5 Tanı Yöntemleri

SHK tanısında kritik olmayan bölgelerdeki küçük lezyonlara eksizyonel biyopsi uygulanabilir. Tanı koyma oranının yüksek olması yanında muhtemel tedavi de sağlaması önemli bir avantajdır (56).

Daha büyük lezyonlarda ya da kozmetik veya fonksiyonel açıdan önemli (yüz, kulak, el vb) alanlarda ise tanıyı kesinleştirmek amacıyla eksizyonel biyopsiden önce insizyonel biyopsi ya da punch biyopsi düşünülmelidir. Çünkü bu bölgelerde yapılacak eksizyon komplike rekonstrüktif işlemler gerektirebilir. Her üç biyopsi yönteminde de dikkat edilecek temel prensipler bulunmaktadır. Bunlar (56):

- Biyopsi materyali deriyi tam kat içermelidir. Böylece tümör derinliği hatasız saptanabilir. Malignite şüphesi olan lezyonlarda shave biyopsi önerilmez.
- Biyopsi normal ve tümöral deriyi birlikte içermelidir. Böylece spesimeni inceleyen patoloğun normal dokuyu referans alarak doğru tanı koyması kolaylaştırılır.
- Optimal kozmetik sonuçlar için mümkünse insizyonlar deri gerim çizgilerine (Langer çizgileri) paralel yapılmalıdır.
- Punch biyopsi yapılırken Langer çizgilerine dik olarak deri gerilmeli ve böylece biyopsi sonrası oluşan elipsin uzun aksının Langer çizgilerine paralel olması sağlanmalıdır.

2.3.6 Tedavi

MDDK tedavisinde küretaj-elektrodesikasyon, kriyoterapi, elektrocerrahi, topikal 5-florourasil, fotodinamik terapi, imikimod ve radyoterapi sayılabilir. Bununla birlikte cerrahi müdahale birincil tedavi yöntemidir. Erken tedavi edildiğinde beş yıllık hastalıksız dönem oranı % 90'dan fazladır. MDDK rekürrensi % 8-16, ikinci lezyon nüks oranları ilk iki yılda % 75, beş yıl içinde % 95 gibi yüksek düzeylerdir (57). Tedavi öncesi lenf nodlarının kapsamlı değerlendirilmesi, metastaz taraması yapılması; tedavi sonrasında ise yakın hasta takibinin sağlanması hastalığın kontrolü ve artmış sağkalım açısından önem taşımaktadır (25).

Tablo 3: Skuamöz Hücreli Karsinomda Tedavi Seçenekleri (25)

Tedavi	Endikasyon	Avantaj	Dezavantaj	Kür oranı
Cerrahi Eksizyon	Çoğu tümör	Defektler primer kapatılır, daha iyi kozmetik sonuç, tek aşamalı	Mohs Cerrahisine kıyasla bazı tiplerde daha yüksek rekürrens, sınırlı histolojik kontrol	%95-98
Mohs cerrahisi	Geniş, invaziv, belirsiz sınırlar, yüksek riskli alanlar	Tümörün daha iyi histolojik kontrolü	Uzun süre alan işlemler, özel teknikler ve eğitim gerektirir	%99
Küretaj-elektrodesikasyon	Küçük(2-4 mm), primer, lokalize, yüzeysel tümörler	Kolay uygulanabilirlik, geniş kullanım alanı	Zayıf histolojik kontrol, hipertrofik skar, hipopigmentasyon, gecikmiş yara iyileşmesi	%50(>3 mm)- %100 (<2 mm)
5-Fluorourasil	Yüzeysel, multisentrik (sınırlı kullanım alanı)	Noninvaziv	Uzun süreli tedavi, pighmentasyon değişiklikleri, invaziv ve rekürren tümörlere uygulanamaz	%60-70
Radyoterapi	Cerrahi yapılamayacak yaşlı ve komorbiditeleri olan veya inoperabl hastalara	Tümöral doku odaklanarak uygulanabilir	Özel uzmanlık gerektirir, ülserasyon riski, kötü estetik sonuç, sekonder malignite riski	%75-90
Kriyocerrahi	Lokalize ve primer tmörlerde ve cerrahi riski yüksek hastalarda	Normal dokuyu etkilemez	Körleme tedavidir, kötü histolojik kontrol, invaziv ve rekürren tümörlerde kullanılamaz	Primer tümörlerde %95'e kadar (<2 cm)
Kemoterapi	Kontrol edilemeyen lokal ya da metastatik hastalıkta	Palyasyon sağlar, sağkalımı uzatabilir	Toksisite, Normal dokuların hasarlanması	Çok düşük
Fotodinamik tedavi	Yüzeysel lezyonlarda	Non invaziv	Işığın sınırlı penetrasyonu, histolojik kontrol olmaz, fotosensitize hastalarda kullanılamaz	%10-40

1. Küretaj – Elektrodesikasyon

Küretaj ve elektrodesikasyon çoğunlukla dermatologlar tarafından tercih edilmektedir. Tümörün deriden kabarık kısmı küret ile ortadan kaldırılır ve koter ile tabanı yakılır. Koterize edilen kısım zamanla dökülerek defekt sekonder olarak iyileşir. Alınan spesimen patolojiye gönderilir. İki cm'den küçük çaplı tümörlere uygulanabilir. % 97-98 gibi yüksek kür oranları bildirilmiştir (58). Yöntemin avantajı hızlı ve basit olmasıdır bu yöntem kitlenin derinliğinin önemli olduğu SHK ve malign melanomda hastalık evresini ve derecesini doğru değerlendirme olanağı tanımaz. Cerrahi sınırlarda tümör olma ihtimali ve dolayısıyla nüks olasılığı yüksektir. Hipertrofik skar ve hipopigmentasyon riski yüksektir. Ayrıca bazı anatomik hassas bölgelerde (göz kapağı, dudak, nazal kanat, kulak) sekonder iyileşme neticesinde kabul edilemez skarlar ve deformiteler bırakabilmektedir. Bu nedenlerle primer tedavi olarak genellikle tercih edilmez (25).

2. Cerrahi Eksizyon

Tüm dünyada en çok tercih edilen tedavi yöntemidir. Deri tam kat eksize edildiği için doğru tanı koyma ve tümör olmayan cerrahi sınırlarla eksizyon sağlama oranı yüksek olmaktadır. Primer kapama yapıldığı için daha kabul edilebilir izler kalmaktadır. Defektin yeri ve büyüklüğüne göre flep ya da deri grefti ile rekonstrüksiyon da tercih edilebilmektedir. Çoğu durumda SHK'de 4-6 mm cerrahi sınırla eksizyon yapıp defekt kapatılır (59). Kür oranını artırmak amacıyla tümörün orijinal boyutuna göre bu cerrahi sınır 10 mm'ye kadar çıkarılabilir (60). İki cm çapından büyük, 6 mm'den fazla derinliği olan, subkutan ve/veya perinöral invazyon yapan yüksek riskli SHK'ler ile dudak, kulak, göz kapağı, saçlı deri gibi riskli lokasyonlardaki SHK'ler 10 mm cerrahi sınırla eksize edilmelidir (61). Bir diğer yöntem ise tümörü eksize edip frozen incelemesine göndermektir. Bu yöntemin avantajı ameliyat sırasında, defekt kapatılmadan patoloji sonucunun gelmesidir. Materyal sınırında tümör saptanırsa gecikmeden reeksizyon yapılabilir ve rekonstrüksiyon güvenli bir şekilde sonlandırılır. Ancak bu yöntemin dezavantajı ise patoloji incelemesinin yanlış negatif sonuç verme ihtimalinin yüksekliğidir. Patolog, örneği kalıcı kesitlerde olduğu kadar detaylı inceleyemediğinden yalancı negatiflik oranı nispeten yüksek olmaktadır.

Cerrahi sınır negatifliği olasılığını ortadan kaldırmak amacıyla uygulanan yöntemlerden biri eksizyon sonrası rekonstrüksiyon yapılmadan defektin yara bakımı ile

takip edilmesi ve patoloji sonucuna göre rekonstrüksiyon işleminin bir diğer seansta yapılmasıdır (25).

3. Mikrografik Cerrahi

Mikrografik cerrahi Mohs tarafından tanımlanan, dokunun eksizyonu sonrası hemen histolojik inceleme yapılan bir yöntemdir. Yapılan haritalandırmaya dayanarak tümör pozitif olarak gelen bölgeden reeksizyon yapılır ve bu şekilde tüm cerrahi sınırlar negatif gelene kadar devam edilir. Çok uzun süren bir yöntem olmasından dolayı rutin kullanıma girememiştir. BHK'nin agresif tiplerinde, tümörlerin sınırları makroskopik olarak net tanımlanamıyorsa, özellikli bölgelerin (medial kantal bölge, burun kanadı, dudak gibi) yapısının mümkün oldukça korunması amacıyla kullanılabilir. Kür oranları en yüksek olan yöntem olarak kabul edilmektedir (25).

4. 5-Florourasil (5-FU)

5-FU etki derinliği fazla olmadığından yüzeysel lezyonlarda topikal olarak kullanılan kemoterapötik bir ajandır. Etki derinliğini artırmak amacıyla lezyonun deriden kabarık olan kısmına küretaj uygulama sonrası tabana 5-FU uygulanabilmektedir. Bir diğer seçenek de topikal olarak 3-6 hafta 5-FU uygulaması sonrası küçülen lezyonun eksizyonudur. Noninvaziv olması nedeniyle kolay uygulanabilir. Pigmentasyon bozuklukları yapabilmektedir. İnvaziv ya da rekürren tümörlerde kullanılmamalıdır (25).

5. Kriyocerrahi

Sıvı azotun spreysel şeklinde topikal uygulanarak lezyonların dondurulması işlemidir. Özellikle dermatoloji kliniklerinde tercih edilen bu tedavi yöntemi verrü, seboreik keratoz, molluskum kontagiyozum, spider anjiom gibi benign lezyonlarda daha sık kullanılsa da 7 mm derinliğe kadar ulaşabilen etkisiyle aktinik keratoz ve bowen hastalığı gibi premalign lezyonlarda da oldukça yüksek kür oranları sunmaktadır (62). BHK ve SHK'de de etkili olmakla birlikte malign tümörlerde tanı olanağı sağlamaması ve tümörün derinliğinden emin olunamayacağı için genellikle tercih edilmemektedir (25).

6. Radyoterapi

İyonlaştırıcı radyasyon, elektronu bir atom veya molekülden serbestlemek için gereken enerji olarak tanımlanır. Çoğu radyasyon ajanı iyonlaşmaya neden olmak için fotonları veya elektronları kullanır. Bu enerjinin tümörler üzerinde tedavi edici olarak

kullanılması radyoterapi olarak adlandırılır. İyonize edici radyasyonun tümör hücrelerini öldürmesini sağlayan mekanizma tam olarak anlaşılamasa da iyonlaştırıcı radyasyon, serbest oksijen radikalleri üreterek hücrel hasara neden olur. Melanomun radyoterapiye yanıtı genellikle kötü olsa da BHK ve SHK'nin tedavisinde radyoterapinin yeri bulunmaktadır (63). Hastanın yaşı ya da komorbiditeleri nedeniyle operasyona alternatif olarak kullanılabilse de genellikle inoperabl hastalarda tümör yükünü azaltmak, tümör hacmini küçültmek ve palyasyon amacıyla kullanılmaktadır. Direk tümör dokusu ya da metastaz bulunan dokular ile lenf nodları hedeflenerek uygulanır. Kozmetik sonuçları kötüdür (25).

7. Kemoterapi

Çeşitli sitotoksik ajanlar ya da mitozu engelleyici ajanlar kullanılarak tümörün aşırı çoğalması kontrol altına alınmaya çalışılır (25). Kemoterapinin amacı da radyoterapi gibi normal hücrelerden çok tümör hücrelerinin öldürülmesidir. Normal hücrelerin hasarlı DNA'yı onarma kapasitesi kanser hücrelerinden fazladır. Ayrıca birçok kemoterapötik ajan mitoz bölünme aşamasında etki gösterdiği için bölünme hızı yüksek olan tümör hücreleri üzerine daha toksiktir. Bunun yanında deri, kemik iliği, barsak mukozası gibi mitoz oranının yüksek olduğu dokulara da toksik etki göstererek yan etkiler oluşturabilmektedir (63). Kemoterapi, adjuvan ya da primer tedavi olarak, topikal ya da sistemik yolla uygulanabilir. Kontrol edilemeyen lokal hastalıkta ya da metastaz durumlarında kullanılabilir (25).

8. Fotodinamik Tedavi

Fotodinamik tedavi iki aşamalı bir yöntemdir: Öncelikle ışığa duyarlı bir madde (porfirin gibi) intravenöz olarak verilir. Bu madde vücuttaki dokulara yayıldıktan sonra tümör dokusu üzerine bu maddeye uygun dalga boyunda ışık uygulanır. Böylece tümör dokusu içinde biriken fotosensitizan ajan oksijenle tepkimeye girerek reaktif oksijen metabolitleri oluşturur ve bunların sitotoksik etkisiyle tümörlü hücrelerin yok edilmesi sağlanır. Kemoterapiye göre çok daha az yan etki görülmektedir. Bu ışık endoskopi ile ulaşılabilen yerlere de uygulanabilmesine rağmen çoğu metastatik lezyona ışık ulaştırılamadığından o lezyonlara etkili değildir. Sadece lokalize hastalığa etkili olabilmesi en önemli dezavantajıdır (64).

2.4 Skuamöz Hücreli Karsinom Hayvan Modelleri

Derinin skuamöz hücreli karsinomu oluşturmak amacıyla hayvan deneylerinde temel olarak iki aşamalı kimyasal model veya ultraviyole modeli kullanılmaktadır. Bu modellerde farklı etkenler kullanılarak deri kanserleri ve diğer deri değişiklikleri oluşturulabilmektedir. Bu modeller deri kanserinde kemoprofilaktik ve kemoterapötik ajanlar geliştirmeye olduğu kadar tümör gelişiminin farklı aşamalarında genetik mutasyonları ve diyet manipülasyonlarını çalışmaya da olanak sağlamaktadır (65). Literatürde skuamöz hücreli karsinom modellerinde SENCAR, SKH-1, CD-1, BALB/c türü fareler kullanılmıştır (66–68).

2.4.1 İki Aşamalı Kimyasal Model:

İki aşamalı kimyasal karsinogenez modeli dünyada en sık kullanılan fare deri skuamöz hücreli karsinom modelidir (69). Bu modelde topikal olarak uygulanan 7,12 dimetilbenzantrasen (DMBA) hücrelerde geri dönüşsüz bir karsinojenik etki başlatmaktadır. Ardından kendisi kanserojen olmayan; ancak oluşan tümörün gelişimini indükleyici etkisi olan 12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat (TPA) isimli maddenin tekrarlayan dozlarda uygulanması ile ilerleyen haftalarda öncelikle premalign aktinik keratozun farelerdeki karşılığı olan papillomlar gelişmekte, karsinojen maruziyeti devam ettikçe ise invaziv SHK gelişmektedir (70).

2.4.2 UV (Ultraviyole) Model:

Deri kanserlerinin büyük çoğunluğa UV'ye kronik aşırı maruz kalma nedeniyle olur. Halk sağlığıyla alakalı olması ve UV'nin deri üzerindeki biyolojik etkisini anlamak için bu ışın enerjisinin deri kanserine neden olduğu mekanizmalara uzun zamandır ilgi duyulmaktadır. Yapılan gözlemler UV ile indüklenen deri kanserini genel olarak daha iyi anlamamıza yardımcı olmuştur (71).

UV spektrumu temel olarak üç gruba ayrılır: UVC (200-280 nm), UVB (280-315 nm) ve UVA (315-400 nm). Güneş maruziyetinin zararlı etkilerinin çoğundan sorumlu olan ise UVB'dir (72).

Kronik güneşe maruziyetin deri kanserine neden olabileceği fikri ilk kez Unna (1894) tarafından ortaya atılmıştır. Findlay (1928), fareleri kullanarak yapay bir ışık

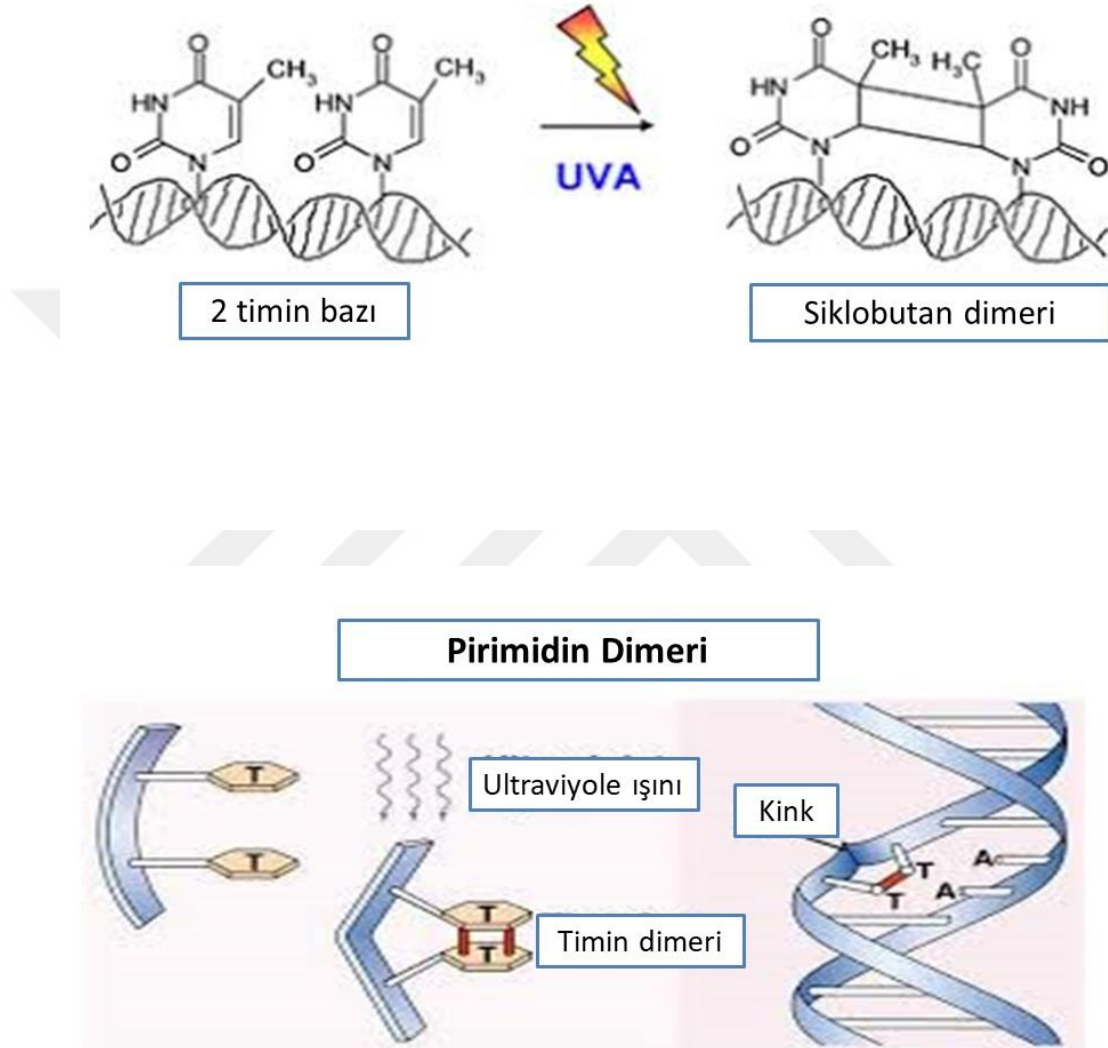
kaynağından UV'ye kronik maruz kalmanın skuamöz hücreli karsinomlara (SHK) neden olduğunu ilk kez ortaya koymuştur. On yıllar sonra, Blum (1959) ışık kaynağı ile ışınlanan hayvanlar arasına UVB dalga boylarını seçici olarak bloke eden plaka camın yerleştirilmesinin deri kanseri insidansını büyük ölçüde azalttığını göstermiştir (71). Kseroderma pigmentosum gibi hastalıklarda UV kaynaklı DNA hasarının onarımında bozukluk olduğu ilk kez 1968'de Cleaver tarafından gösterilmiştir (73). UVB'nin UVA'ya oranla bu maligniteleri ortaya çıkarmada daha fazla etkili olduğu belirtilmiştir (71).

Farede UV karsinogenez modeli, iyi tanımlanmış iki aşamalı kimyasal karsinogenez modeline göre daha değişkendir. Farklı dozlarda UV (genellikle UVB) farklı sürelerde, farklı fare suşlarında uygulanmıştır. Standart bir prosedür tanımlanmamıştır(38,74–76).

UV ile indüklenen fare deri kanseri modeli daha fizyolojiktir. Deri karsinogenezinin altında yatan mekanizmaları incelemek için en uygun olan yöntemdir; çünkü kullanılan karsinojenler insandaki deri kanseri etkenlerine benzerdir. Hem p53 hem de PTCH tümör süpresör genlerindeki mutasyonlar insan ve fare üzerindeki UV kaynaklı karsinogenezde rol oynarken p53'teki mutasyonlar DMBA/TPA ile tümör oluşturulan farelerin sadece bir kısmında (~% 30) görülür. UV karsinogenez çalışmaları tüysüz farelerde daha etkili olmakla birlikte genetik olarak manipüle edilmiş bu fare modellerini değerlendirme kabiliyetini zorlaştırır. Tümör başlatma ve ilerletmenin genel prensipleri, hem kimyasal karsinogenez modellerine hem de UV karsinogenez modellerine uygulanabilir (38).

Farelerde yapılan çalışmalar, UVA ve UVB'nin hem tümör başlatıcı hem de tümör geliştirici ajanlar olarak tam karsinojen olduğunu göstermektedir (38,66,77). Bununla birlikte UVA, başlatıcı etkiden daha çok bir tümör ilerleticisi olarak işlev gören zayıf bir tam karsinojendir. UV makromoleküller tarafından absorbe edilir. Siklobütan dimerlerin oluşumu, sitozin fotohidratları, 6-4 foto ürünleri, DNA çapraz bağları ve DNA çift iplikli kırılmaları başlatılarak doğrudan DNA hasarı uyarılır (1). Bu hasarlar p53 proteininde hızlı bir artışa sebep olur ve DNA replikasyonu ile hücre döngüsü durdurularak hasar onarılır ya da hasar onarılamayacak düzeyde ise apoptoz yolu aktive edilerek hasarlı DNA içeren hücre ortadan kaldırılır. Bu savunma mekanizması UVB hasarlı hücreleri ortadan kaldırırsa da bazı hücreler onarım ve apoptoz yolundan kaçarak yaşamaya devam ederler (78). Bu hücrelere uzun süre UVB maruziyetinin tekrarlanması ile p53 geninde UV'ye özgü CC (sitozin-sitozin)'den TT (timin-timin)'ye ve C (sitozin)'den T (timin)'ye mutasyonlar gerçekleşebilir. Mutant p53 geninin ürettiği işlevsiz p53 proteini nedeniyle hücre

durdurulamaz bir döngüye girerek deri kanseri oluşumunu başlatır (38,78). UV'nin neden olduğu bu tipik mutasyonlar hem insan hem de fare UV kaynaklı deri kanserleri için p53 geninde yüksek bir frekansta tespit edilmiştir (38,79–81). İnsan p53 dipirimidin mutasyonları, aktinik keratozların % 80'inde ve SHK'lerin % 90'ından fazlasında bulunur (82).

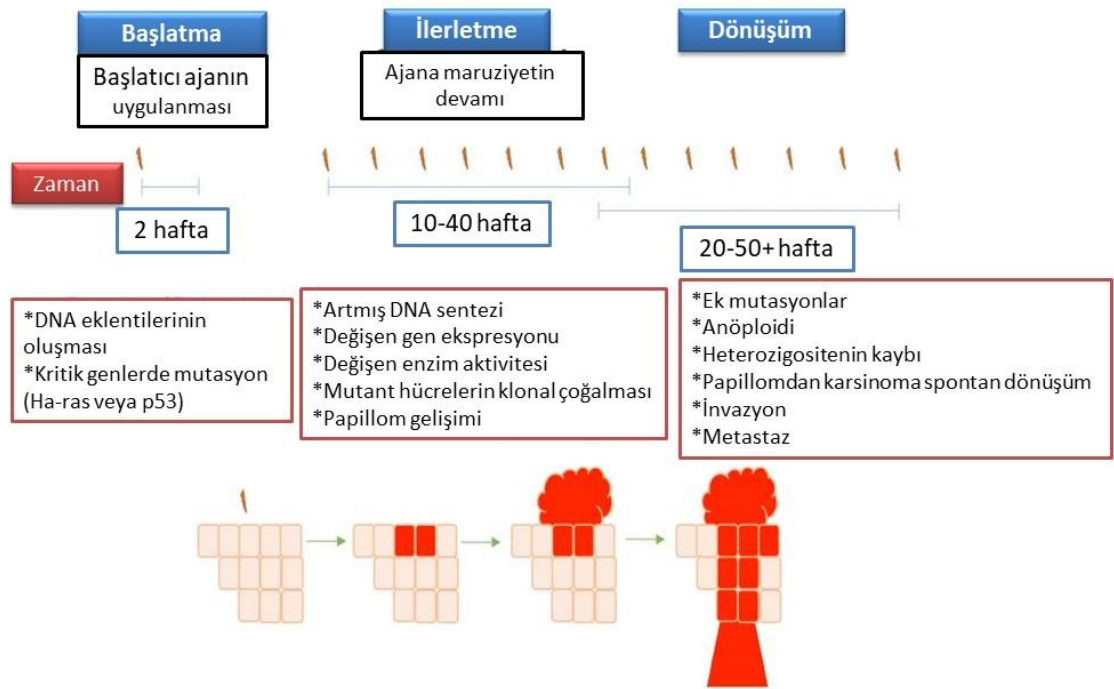


Şekil 4: UV etkisiyle DNA'da siklobütan dimerleri ve pirimidin dimerlerinin oluşumu

Kronik inflamasyonun MDDK'nin gelişimine katkısı iyi bilinmemekle birlikte, tümör geliştirici faktörlerin keratinositler tarafından proinflamatuvar moleküllerin sekresyonunu indüklediği ortaya konulmuştur. Bu olay bağışıklığı baskılayan ve tümör büyümesini

destekleyen sitokinleri ve kemokinleri üreten dermise inflamatuvar hücrelerin alınmasıyla sonuçlanır (83).

Aşamalı kimyasal karsinogenez modelinde deri kanseri gelişimi, hedef hücrelerde poliaromatik hidrokarbonların etkisi sonucu moleküler ve biyokimyasal değişikliklerin birikmesiyle başlar. Başlangıç aşamasında oluşan DNA hasarı onkogenlerin aktivasyonuna ve bazı tümör supresör genlerin inaktivasyonuna neden olur. Bu mutant keratinositler klinik olarak belirgin değildir; ancak görünür premalign aktinik keratozlara neden olan ilerleme aşamasında ek biyokimyasal değişiklikler geçirirler. Tüm aktinik keratoz benzeri papillomların küçük bir kısmı invaziv karsinomlar olmasına izin verecek başka değişiklikler geçirir. Epstein, fotokarsinogenezde de bu sürecin aynı olduğunu farelerde yaptığı çalışmada göstermiş; UV ışınının hem tümör başlatıcı mutasyonlara hem de tümörün ilerlemesini sağlayan biyokimyasal değişikliklere neden olduğunu ortaya koymuştur (84).



Şekil 5: UV ile deri kanseri modelinin aşamaları (38)

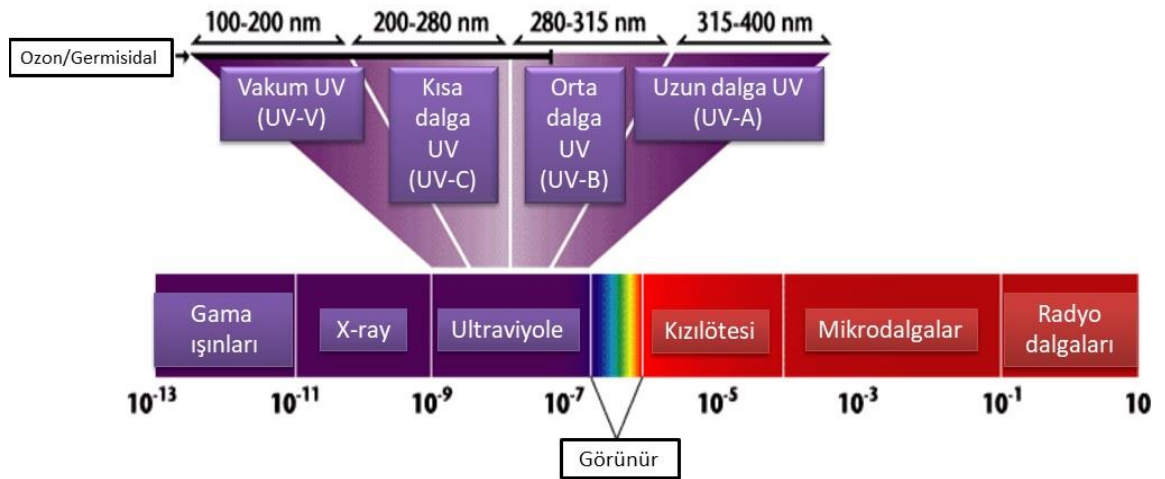
Kronik UV maruziyetini takiben gelişen deri kanserleri farelerde ve insanlarda oldukça antijeniktir. Organ nakli olan hastaları tedavi etmek için kullanılan immünsüpresif ilaçlar UV ile indüklenen deri kanseri olasılığını büyük oranda artırmakta ve ek olarak bu kanserler genel popülasyona göre daha agresif seyretmektedir (36).

UV ile indüklenen deri kanserlerinin yüksek immünojenitesine rağmen bu etkilenen hücreler neoplastik hücreleri ortadan kaldırmak için özelleşmiş olan bağışıklık sisteminden kaçarlar ve böylece invaziv maligniteler haline gelebilirler (8,81,85,86). Süperfisiyal dermise ulaşan UV'nin deride antijen sunan hücrelerin işlevini bozduğu, düzenleyici T hücrelerinin üretimini uyararak ve aynı zamanda immünosupresif bir sitokin olan interlökin-10 (IL-10) üretimini artırıp interlökin-12 (IL-12) üretimini azaltarak bu etkilere neden olduğu gösterilmiştir (87–89).

UV kaynaklı deri kanserlerinde immün sistemin önemi insanlar üzerindeki gözlemlerle de desteklenmiştir. UV'ye bağlı baskılanmış immün yanıtı olan bireylerin UV'ye karşı dirençli olanlara göre MDDK geliştirme oranları daha yüksek bulunmuştur (90,91).

2.5 Ultraviyole

Ultraviyole ışık, 100-400 nanometre (nm) dalga boyları arasında yer alan elektromanyetik radyasyondur. Bir tarafında görünür ışığın mavi-mor formu varken spektrumun diğer tarafında x ışınları bulunmaktadır. İki majör UV kaynağı bulunmaktadır: biri güneş, diğeri ise insan yapımı lambalardır (92).



Şekil 6: Elektromanyetik ışın tayfı

UV ışınları 1801 yılında Alman fizikçi Johann Wilhelm Ritter tarafından keşfedilmiştir. 1878'de UV kısa dalga boylarının bakteriler üzerindeki bakterisidal etkisi

fark edildikten sonra sterilizasyon amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. İnsanlarda tedavi ajanı olarak 1903'ten itibaren lupusa karşı kullanılmıştır (92).

UV spektrumu temel olarak üç gruba ayrılır: UVC (200-280 nm), UVB (280-315 nm) ve UVA (315-400 nm) (72). UVA ve UVB ışınları deriye zarar verir ve deri kanserine neden olabilir, UVC ışınları atmosfer tarafından filtrelendir ve dünya yüzeyine ulaşmaz (93). Yeryüzüne ulaşan UV ışınlarından UVB (280-315 nm) en karsinojenik olmasına rağmen UVA'nın (315-400 nm) da karsinojenik etkisinin olduğu hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (94). Ancak UVB ile karşılaştırıldığında farelerde UVA ile deri kanseri yapmak için daha uzun süre maruziyet gerekmekte ve tümör ortaya çıkmadan önceki latent periyot çok daha uzun olmaktadır (66,76,95). UV ışınlarının miktarı ışınların mukavemetine, derinin ışına maruz kaldığı sürenin uzunluğuna ve derinin giysilerle ya da güneş kremi ile korunup korunmadığına bağlıdır. UV ışınları deri hücrelerinde DNA hasarına, hücre proliferasyonuna yol açan sinyal iletim yollarının, inflamatuvar yanıtların ve immünsüpresyonun indüklenmesine neden olur. UV ışınlarından kaynaklanan tüm bu etkiler tümör gelişiminde gereklidir. UV ışınları, deride kanser başlama ve ilerlemesine neden olan tam bir karsinojen olarak işlev görür (93,96). Bu nedenle fotoprotektif takviyelerin uygulanması UV ışınlanmasına bağlı deri hasarı ve histopatolojik değişiklikleri önlemek amacıyla kullanılabilir.

Akut UVB maruziyetinin eritem, ödem ve çoğunun yaklaşık iki hafta içinde kaybolacağı hücresel hasar oluşturduğu gösterilmiştir (97).

Kronik UV maruziyeti hiperpigmentasyon, hiperkeratinizasyon, skuamöz hiperplazi, DNA hasarı (98), güneş yanığı hücrelerinin (apoptotik keratinosit) oluşumu (99), immünsüpresyon, proinflamatuvar sitokinlerin aşırı salınması (100) ve yaşlanma da dahil olmak üzere bir dizi patolojik değişikliklerle deri hasarını indükleyebilir (101–103).

UVB ışınlanmasının ayrıca aşırı serbest oksijen radikali üretilmesine, oksidatif stres ve oksidatif DNA hasarına neden olabileceği iyi bilinmektedir. Aynı zamanda aşırı serbest oksijen radikali keratinosit zarındaki fosfolipidlerin, proteinin ve doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu hızla başlatarak hücre ölümüne yol açar (104). Bununla birlikte, derideki UV radyasyona bağlı oksidatif hasarı azaltmak için topikal antioksidanların fotoprotektif etkisinin önemi gösterilmiştir (101).

Tek bir seferde maruz kalınan yüksek doz ultraviyole ışınının insan fibroblastlarında telomer kısalmasına neden olabildiği gösterilmiş, ultraviyole maruziyetine bağlı hızlı gelişen telomer kısalmasının erken deri yaşlanmasına yol açabileceği belirtilmiştir (105).

2.6 Kemoprofilaksi

Kemoprofilaksi doğal veya sentetik ürünler kullanılarak tümör oluşumu, gelişimi ve ilerlemesini durdurma veya geri çevirme stratejisi olarak tanımlanabilir (106).

Literatürde skuamöz hücreli deri kanseri kemoprofilaksi çalışmalarında parthenolide (3), santalol (76), nar tohumu yağı (107), silimarin (108), sarkophine diol (70), sarkotriol (109), perilil alkol (110), zeytinyağı (111), honokiol (93), folik asit (112), kafein (113), barthogenic acid (114), magnolol (115), yeşil çay ekstresi (116), indosyanin yeşili (117), silibinin (118,119) gibi birçok madde kullanılmış ve tüm bu çalışmalar iki aşamalı kimyasal karsinogenez veya UVB karsinogenez modelleri kullanılarak ortaya konulmuştur.

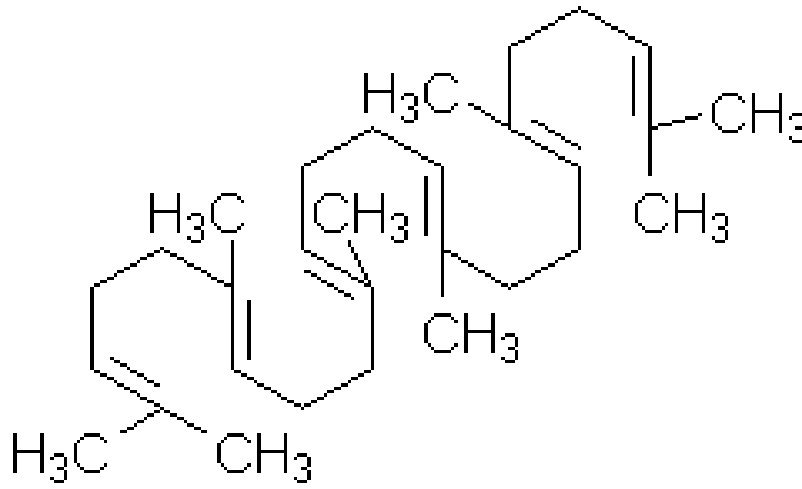
Deri dokusu doğada tekrarlayan şekilde UV ışınlarına maruz kalır ve derideki lipidler, proteinler ve DNA UV kaynaklı hasarlara karşı son derece duyarlıdır (6). UV ışınının zararlı etkilerinin çoğu serbest radikallerin oluşumuyla gerçekleşir (7). Lipit peroksidasyonunun kanser gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Peroksidasyona uğrayan çoklu doymamış yağ asitleri hücrel membranlarda ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerde bol miktarda bulunur. Bir dizi antioksidanın farelerde UV ışınının indüklediği deri kanserinin gelişimini azaltabildiği bulgusu, bu işlemde oksidatif reaksiyonların önemli olduğu ve deri kanseri önleme hedefi olarak kullanılabileceği konularına ışık tutmaktadır (8).

Tüm bu gözlem ve bilgiler ışığında UVB kaynaklı deri değişikliklerini önlemede yeni yaklaşımlar ve stratejiler geliştirilmesi insandaki melanom dışı deri kanseri insidansını (MDDK) azaltabilecektir. Bu da deri kanseri profilaksi çalışmalarının önemini göstermektedir.

2.7 Skualen

Vücudun tüm dış yüzeyini kaplayan insan derisi en büyük organdır ve ultraviyole (UV) ışınına da içeren güneş ışığı stresine sürekli maruz kalır. Deri dokusu güneş ışığından oksidatif strese karşı savunmasız olduğu düşünülen lipid bakımından zengindir. Skualen altı izopren birimi içeren 30 karbonlu bir triterpen ($C_{30}H_{50}$) olup poliansatüre alifatik hidrokarbondur. Skualen koyuya yakın sarı renkli bir sıvıdır. Zeytinyağında % 0.2-0.7

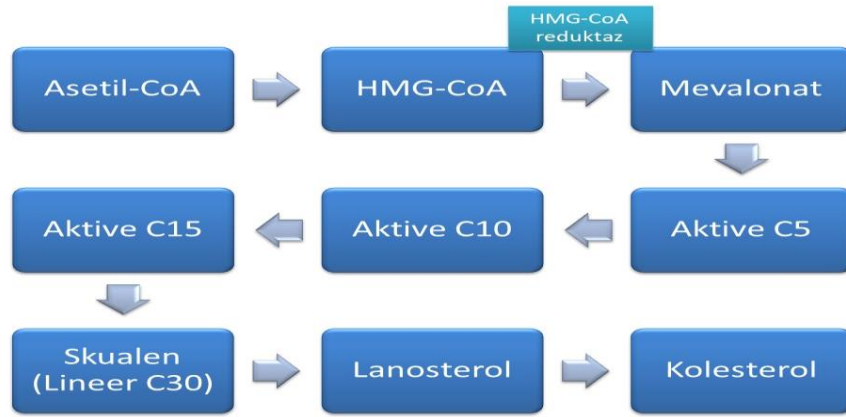
arasındaki konsantrasyonlarda bulunur, diyetteki diğer yağların ise sadece % 0.002-0.03'ünü oluşturmaktadır. Bitkiler ve hayvanlardaki steroidlerin sentezinde anahtar bir ara üründür. İnsanlarda deri yüzeyindeki lipidlerin ana bileşenlerinden biridir (yaklaşık % 13) (120). İlk olarak büyük miktarlar içeren ve en zengin kaynağı olduğu düşünülen köpekbalığı (*Squalus spp.*) karaciğer yağından izole edildiği için bu şekilde adlandırılmıştır. Genellikle çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL) ile birlikte serumda taşınır ve deride en büyük konsantrasyona sahip olmakla birlikte tüm dokulara dağılır (121).



Şekil 7: Skualenin kimyasal formülü ($C_{30}H_{50}$)

Yapısal olarak skualene benzer birçok poliprenil bileşiği doğada bulunur ve kritik biyolojik işlevleri yerine getirir. Bunlar; β -karoten, koenzim Q10, A vitamini ve K1 vitaminini içerir. Bu maddeler sentezleri için prenil grupları gerektirir ve bu nedenle yapısal olarak skualene benzerdir.

Serum skualeni kısmen endojen kolesterol sentezinden ve kısmen diyetteki kaynaklardan sağlanmaktadır. Özellikle büyük miktarda zeytinyağı veya köpekbalığı karaciğeri tüketen popülasyonlarda serum skualen düzeyi yüksektir (121).

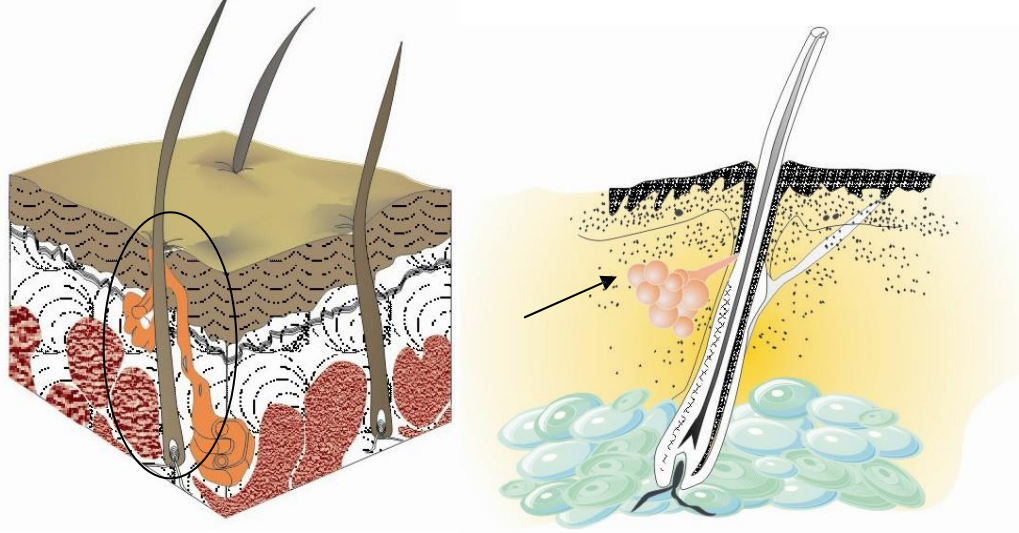


Şekil 8: Kolesterol sentez basamakları

Sebase bezler kıl foliküllerine yağlı bir madde (sebum) salgılayan küçük bezlerdir. İnsanlarda palmar ve plantar bölgeler hariç tüm deri bölgelerine dağıldığı halde, yüz ve kafa derisi üzerinde en bol miktarda bulunurlar. Skualen sebumun baskın bileşenlerinden biridir (yaklaşık % 13) (122). Skualen deride oksidatif hasar ve serbest radikal oluşumunu azaltmak için kritik bir rol oynamaktadır (121).

Tablo 4: Sebase bezlerden salgılanan sebum içeriğindeki maddeler

Ürün	Dağılım (%)
Trigliserit, Serbest yağ asidi, Digliserit	57
Mum esteri	25
Skualen	13
Kolesterol	2
Diğer	3



Şekil 9: Sebum salgısından sorumlu sebase bezlerin yerleşimi

Doğanın mükemmel yumuşatıcılarından biri olan skualen, hızlı ve etkili bir şekilde deriden emilerek yağlı bir kalıntı bırakmadan deriye sağlıklı bir esneklik kazandırır (123). Derinin oklüzif maddelerle kaplanması derinin hidrasyonunu artırır. Bunu doğada en iyi yapan maddelerden biri yenidoğanların derisinde görülen verniks kazeoza isimli tabakadır. Stratum korneumun hidrasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Rissmann ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada verniks kazeozayı taklit etmek amacıyla skualen; trigliseridler, kolesterol, seramidler ve yağ asitleriyle karıştırılmış ve deri hidrasyonunda çok etkili olduğu gösterilmiştir (124).

Skualenin önemli antioksidan özellikleri olduğu gösterilmiştir. İn vitro deneysel çalışmalarda skualenin oldukça etkili bir serbest oksijen tutucu olduğu; klinik çalışmalarda ise güneş ışığı gibi oksidatif stres etkenlerine karşı bu serbest oksijen tutucu etkisi sayesinde insan derisini lipid peroksidasyonundan koruduğu gösterilmiştir (125).

Kohn ve arkadaşları skualenin serbest oksijen tutucu etkisinin insan deri yüzeyindeki diğer tüm lipidlerden fazla olduğunu belirtmişlerdir (126). Skualen, peroksidasyona karşı çok hassastır ve deride reaktif oksijen tutucu olarak işlev görür. UV ışınına ve diğer oksidatif hasar kaynaklarına bağlı olarak insan deri yüzeyini lipid peroksidasyonundan korur (127).

Çalışmalar skualenin antioksidan, antiinflamatuvar ve sitoprotektif etkileri olduğunu göstermiştir. Skualenin ayrıca kolon (9) ve akciğer kanserine (10) karşı da koruyucu etkileri olduğu ve antitümöral aktivitesinin olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (128). Karsinogen uygulaması öncesinde ve/veya sırasında skualen verildiğinde koruyucu etki

gözlenir. Skualenin önleyici etkinliğinde yer alan mekanizmalar, Ras farnesilasyonunun inhibisyonunu, kanserojen aktivasyonunun modülasyonunu ve antioksidatif aktiviteleri içerebilir (128).

Van Duuren ve Goldschmidt fare derisine uygulanan skualenin, benzopiren ile uyarılan deri karsinogenezini inhibe ettiğini ortaya koymuştur (129). Murakoshi ve arkadaşları, topikal olarak uygulanan skualenin, DMBA ile başlatıldıktan sonra fare deri tümörleri üzerindeki TPA'nın tümör ilerletici etkisini önemli ölçüde baskıladığını göstermiştir (130). Ayrıca bazı çalışmalar, skualenin çeşitli antikanser ajanların etkilerini güçlendirdiğini ortaya koymuştur (131).

Skualen kolesterol, safra asitleri ve sterollerin biyosentezinde rol oynayan anahtar bir ara maddedir (9). Strandberg ve arkadaşları 5 gün süreyle % 1 oranında diyet skualeni verilen farelerin karaciğer mikrozomlarında HMG-CoA redüktaz aktivitesinin kuvvetle baskılandığını (~% 80) bildirmişlerdir (132). Ayrıca 10 haftalık bir sürede % 1 skualenin diyetle uygulanmasının serum kolesterol düzeylerini artırmadığı da gösterilmiştir (9). Kritchevsky ve arkadaşları, yüksek kolesterolü bir diyetle % 3 skualenin 14 hafta boyunca tavşanlara diyetle verilmesinin, benzer kolesterol oranıyla beslenen kontrollerden daha fazla aterom üretmediğini açıklamıştır (133). Strandberg ve arkadaşları insanlara 7-10 gün boyunca günde 900 mg skualen vermiş, serum skualeninde 17 kat artış meydana getirmiş; ancak serum kolesterol düzeylerinde belirgin bir artış görülmemiştir (134).

Bu gözlemler oldukça önem taşımaktadır; çünkü teorik olarak skualenin diyetle desteklenmesi, kolesterol ve safra asidi üretimini artırabilir ve aterosklerotik hastalık riskinin artmasına neden olabilir. Bu çalışmalar eşliğinde oral skualen tüketiminin serum kolesterol seviyesinde belirgin artış yapmadığı söylenebilir.

Kısa süreli çalışmalar, normal diyetle skualen alımının uzun süreli etkilerini sorgulamak için kolesterol ve diğer metabolitlerin metabolizması ile ilgili sorulara tam olarak cevap verme noktasında yetersizdir. Bu nedenle bu tür etkileri incelemek için uzun vadeli çalışmalara gerek duyulmaktadır (9).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na sunulan tez projesinin onayının ardından çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda yürütüldü.

3.1 Araştırma Dizaynı

Skumöz hücreli deri karsinomuna karşı skualenin koruyucu etkisinin araştırıldığı bu tez çalışması 4 grupta (7 adet kontrol grubu / 7 adet topikal skualen grubu / 7 adet oral skualen grubu / 7 adet topikal+oral skualen grubu) toplam 28 denek üzerinde deneysel çalışma olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2 Deney Hayvanı

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından önerilen laboratuvar hayvanı kullanım kılavuzunda belirtilen şartlarda (sıcaklık 23 $\pm$ 2 santigrat derece, 12 saat gündüz/gece siklusu) bakımı yapılan ve Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen 28 adet, 20-25 gr ağırlığında, dişi BALB/c suşu fare kullanıldı.

3.3 Deney Hayvanlarının Seçimi

Literatürde skumöz hücreli deri kanseri modellerinde SENCAR, SKH-1, CD-1, BALB/c türü fareler kullanılmıştır (66–68). SENCAR ve SKH-1 türü fareler ülkemizde bulunmamaktadır. CD-1 türü fareler ise çoğunlukla çok aşamalı kimyasal karsinogenez modelinde kullanılmış olup fotokarsinogenez modellerinde kullanım örneği saptanmamıştır (68). Fotokarsinogenez modeliyle deri kanseri oluşturulabildiği ve profilaktik ajanların denendiği literatürde gösterilen BALB/c türü fareler deneyimize uygun hayvan olarak seçilmiştir (110,135).

Erkek farelerin dişilere göre daha saldırgan olması ve diğer farelerin sırtlarında oluşan tümör dokularına zarar verme eğiliminde olması nedeniyle deney ve kontrol grupları için sadece dişi farelerin kullanılması kararlaştırılmıştır.



Resim 5: BALB/c fare

3.4 Deney Hayvanlarının Bakımı

Çalışmada kullanılan deney hayvanlarının bakımı Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. Denekler uluslararası hayvan deney ve bakım kılavuzlarına göre standart laboratuvar koşullarında (sıcaklık 23 ± 2 °C, 12 saat gündüz/gece siklusu), standart pellet yemlere ve suya serbest ulaşımının olduğu kafeslerde, yedişerli gruplar halinde izlendi. Her gruptaki denekler diğer gruplardaki hayvanlarla karışmayacak şekilde yedişerli olarak dört ayrı kafeste bakıldı. Denekler sadece UVB, topikal aseton/skualen, oral skualen uygulanması amacıyla kafeslerinden çıkarıldı. UVB uygulanması sırasında Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda hazırlanan düzenekteki yerlerine yerleştirilen denekler uygulama sonrası yine kendi kafeslerine alındılar.

3.5 Anestezi

Deney prosedürü başlamadan önce deneklerin sırt kıllarının depilasyonu öncesi dietil eter (Tekkim Kimya San. Tic. Ltd. Şti. Bursa Türkiye) inhalasyon anestezisi uygulanmıştır. Deney sonuna kadar yapılan haftalık depilasyon sırasında, topikal aseton (Tekkim Kimya San. Tic. Ltd. Şti. Bursa/Türkiye) ve skualen (4K Kimya Sanayi ve Tic. A.Ş. İzmir, Türkiye) uygulaması ile ultraviyole-B uygulaması sırasında anestezi madde verilmemiştir. Haftalık tıraşlamalar sırasında sırt kıllarının artık daha seyrek ve boylarının daha kısa olması nedeniyle haftalık tıraşlama işlemleri de anestezi madde uygulanmadan kolaylıkla gerçekleştirilmiştir. Böylece deney sonuna kadar deneklerin maruz kalacakları

anestezik madde miktarı oldukça kısıtlanmış ve denek mortalitesinin minimuma indirilmesi hedeflenmiştir.

3.6 Hayvan Modeli

Dişi 6-8 haftalık BALB/c farelerin sırt kılları Nair tüy dökücü krem (Church& Dwight Co. Birleşik Krallık) ile tıraş edildikten sonra 10 gün boyunca her gün, kabin üzerinden, kabindeki deneklere 35 cm mesafeden 540 miliJoule/cm²/gün dozunda ultraviyole-B (UVB) ışını (Koninklijke Philips Electronics, Amsterdam, Hollanda) uygulandı.

Bu tümör başlatıcı aşama ardından uygulamaya 4 günlük ara verilip tümör ilerletici aşama için 16 hafta boyunca, haftada 3 gün (salı, perşembe, cumartesi) olmak üzere aynı mesafeden 540 mJ/cm² dozda UVB uygulandı.

3.7 Deney Planı

Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (HADYEK) alınan izin gereğince Deney Hayvanları Laboratuvarından rastgele gruplama ile alınan 28 adet 6-8 haftalık dişi BALB/c fare aşağıdaki dört gruba ayrılarak deney gerçekleştirildi:

1. Kontrol grubu (UVB)
2. Topikal skualen grubu (UVB + Topikal skualen)
3. Oral skualen grubu (UVB + Oral skualen)
4. Topikal + oral skualen grubu (UVB + Topikal skualen + Oral skualen)

3.8 Deney Grupları

1. *Grup-1*= Kontrol grubu (UVB): Tümör modeli uygulandı. Uygulama başlamadan 30 dk önce sırt derisine skualen çözücü olarak kullanılan 200 µL (mikrolitre) aseton topikal olarak uygulandı.

2. *Grup-2*= Topikal skualen grubu (UVB + Topikal skualen): Tümör modeli uygulandı. Uygulama başlamadan 30 dk önce sırt derisine 200 µL aseton ile çözünmüş 500 µL skualen topikal olarak uygulandı. Ardından modelde belirtilen şekilde 2 saat boyunca UVB uygulanması ardından seans sonlandırıldı.

3. *Grup-3=* Oral skualen grubu (UVB + Oral skualen): Tümör modeli uygulandı. Uygulama başlamadan 30 dk önce sırt derisine skualeni çözmede kullanılan aseton (200 µL) topikal olarak uygulandı. Ardından 2 saat boyunca modelde belirtilen şekilde UVB uygulanması ardından seans sonlandırıldı. Haftada üç gün (salı, perşembe, cumartesi) oral gavaj kanülü yardımıyla 200 µL skualen oral yolla uygulandı.

4. *Grup-4=* Topikal + oral skualen grubu (UVB + Topikal skualen + Oral skualen): Tümör modeli uygulandı. Uygulama başlamadan 30 dk önce sırt derisine 200 µL aseton ile çözünmüş 500 µL skualen topikal olarak uygulandı. Ardından 2 saat boyunca modelde belirtilen şekilde UVB uygulanması ardından seans sonlandırıldı. Haftada üç gün (salı, perşembe, cumartesi) oral gavaj kanülü yardımıyla 200 µL skualen oral yolla uygulandı.

Literatürde daha önce yapılan çalışmalar, 200 µL asetonun (topikal) deri kanseri gelişimine etkisi olmadığını göstermiştir (70,136). Bu nedenle topikal skualen uygulanan gruplara skualen çözücüsü olarak aseton uygulanmıştır. Gruplar arasında uygulama farkı olmaması amacıyla asetonla çözülmüş topikal skualen uygulanmayan gruplara ise sadece topikal aseton uygulanmıştır.

3.9 Deney Düzenegi

Deney için 32 bölmeli, dikdörtgen ahşap bir kabin hazırlandı. Kabinin temizliği ve kullanımını kolaylaştırmak amacıyla bölmeler takılıp çıkarılabilir şekilde yapıldı. Her bir denek ayrı bölmelere yerleştirildi. Böylece deneklerin UVB uygulaması sırasında izole olmaları ve UVB'nin efektif şekilde sırt bölgelerine teması sağlanmış oldu. Kabin hazırlanırken her bir hayvan için gerekli minimum taban alanı olan 60 cm² göz önünde bulunduruldu ve her bir bölmenin taban ölçüleri 6x10 cm ebatlarında olacak şekilde hazırlandı (137). Kabin üzerinden UVB uygulama amacıyla iki adet UVB lambanın monte edildiği dört ayaklı platform hazırlandı. Tüm bu düzenek de ön yüzünde kapağı olan kapalı cam kabin içerisine yerleştirildi. Ortamdaki diğer hayvanların ve laboratuvar çalışanlarının ultraviyole ışınına maruz kalmaması için de cam kabinin etrafı ışık geçirmeyecek şekilde kaplandı.



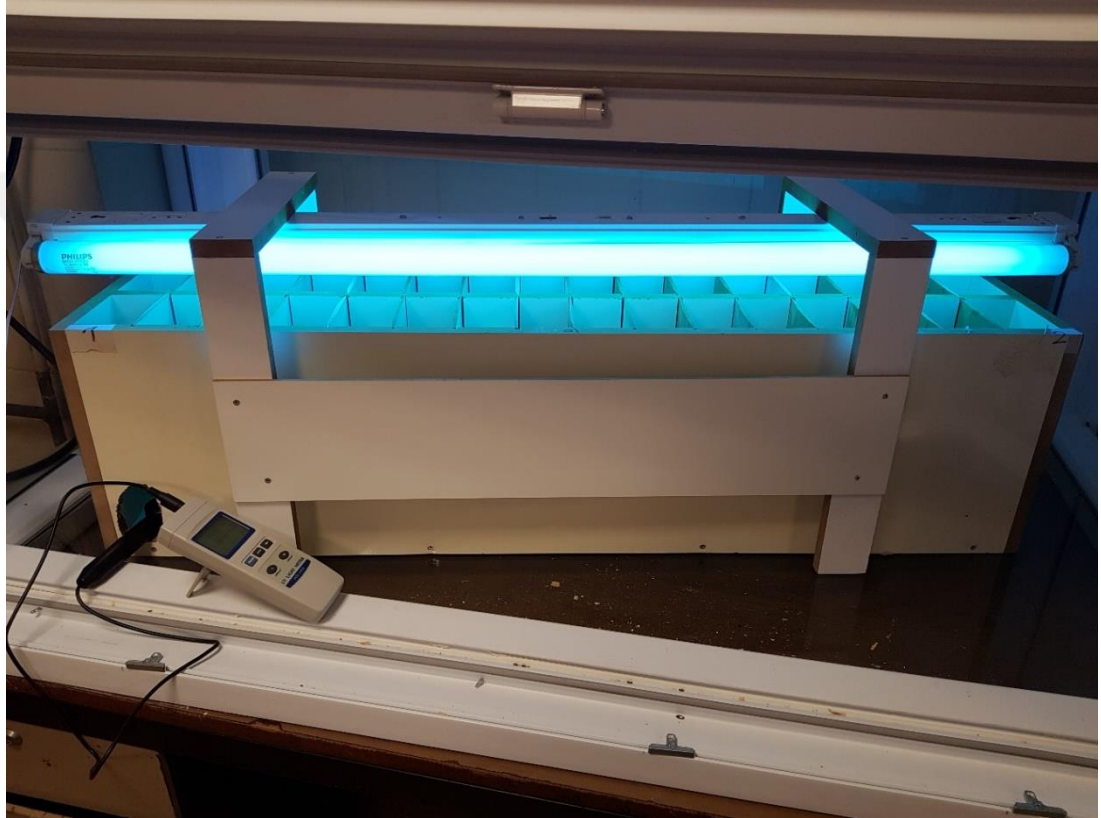
Resim 6: UVB uygulaması sırasında kabindeki bölmelerine yerleştirilmiş fareler

3.10 Deneklerin Hazırlanması

Farelerin UVB uygulanacak olan sırt bölgelerinin tıraşlanması amacıyla tüy dökücü krem kullanıldı. Kılların tamamını alamaması, ince bir kıl tabakası bırakması, bu nedenle UV'nin etkin olarak cilde ulaşmaması, her uygulamada sedasyon amacıyla anestezi madde uygulanması gerekliliği ve bu nedenle mortalitenin artması ihtimali, deneklerin vertebralarından dolayı düzgün bir yüzey olmaması, deride yaralanma ve kanama gibi mekanik hasar olasılığından dolayı tıraş makinesi kullanımı tercih edilmemiştir. Deneyin ilk gününde eter anestezisi altında sırt bölgesine tüy dökücü krem uygulandı. Üç dakikalık bekleme ardından ıslak gazlı bezle sırt bölgesi silinerek dökülen kıllar ve tüy dökücü krem kalıntıları tamamen temizlendi. Deney sürecinde kıllar asimetric şekilde ve her denekte farklı bölgelerde, farklı yoğunluklarda çıkmaya devam etti. UVB ışınının deriye ulaşabilmesi ve denekler arasında maruz kalınan kümülatif ışın dozu açısından fark olmaması amacıyla her hafta düzenli olarak depilasyon işlemi tekrarlandı.

3.12 Ultraviyole-B Uygulanması

Deneklere gruplarına uygun topikal ajanlar (skualen/aseton) uygulandıktan 30 dakika sonra denekler UV kabinindeki yerlerine yerleştirilerek UVB ışınına maruz bırakıldılar. UVB kaynağı olarak iki adet paralel yerleştirilmiş Philips marka TL 40W/12 RS model floresan geniş bant UVB lambası kullanıldı. Kullanılan lambalar 290-315 nm spektrumunda ışın yaymaktadır. Işınlama deney düzeneğinde anlatıldığı ve Resim-7’de gösterildiği şekilde yapılmıştır.



Resim 7: Deneklere kabinde UVB uygulaması

Bölmelerden birine daha önceden açılmış olan delikten UVB ölçücü cihazın probu yerleştirilerek UV dozu hesaplandı (Resim 8). UVB dozu ölçümünde PCE-UV34 (PCE Instruments, Almanya) isimli cihaz kullanıldı. Işık kaynağına mesafesi deneklerle yaklaşık aynı seviyede olan sensörle yapılan ölçümde $0.075 \text{ mW(miliWatt)/cm}^2$ güç saptandı.

Güç, birim zamanda yapılan iş miktarıdır. $\text{Watt}=\text{Joule/saniye}$ formülüne göre cihazın bu mesafeden cm^2 başına saniyede 0.075 miliJoule(mJ) enerji verdiği hesaplanabilir. Bir saatte 3600 saniye olduğundan $0.075 \times 3600 = 270$ mJ enerji bir saatte iletilmektedir. İki

saatlik sürede hedeflediğimiz 540 mJ/cm^2 değere ulaşılmaktadır. İki saatlik uygulama sonrasında denekler kabin ortamından alınarak takip edildikleri kafeslerine yerleştirildiler.



Resim 8: UVB uygulaması sırasında lambadan yayılan ışın dozunun hesaplanması



Resim 9: UVB ışın dozunu ölçen dozimetre

3.13 Skualen Eldesi ve Uygulaması

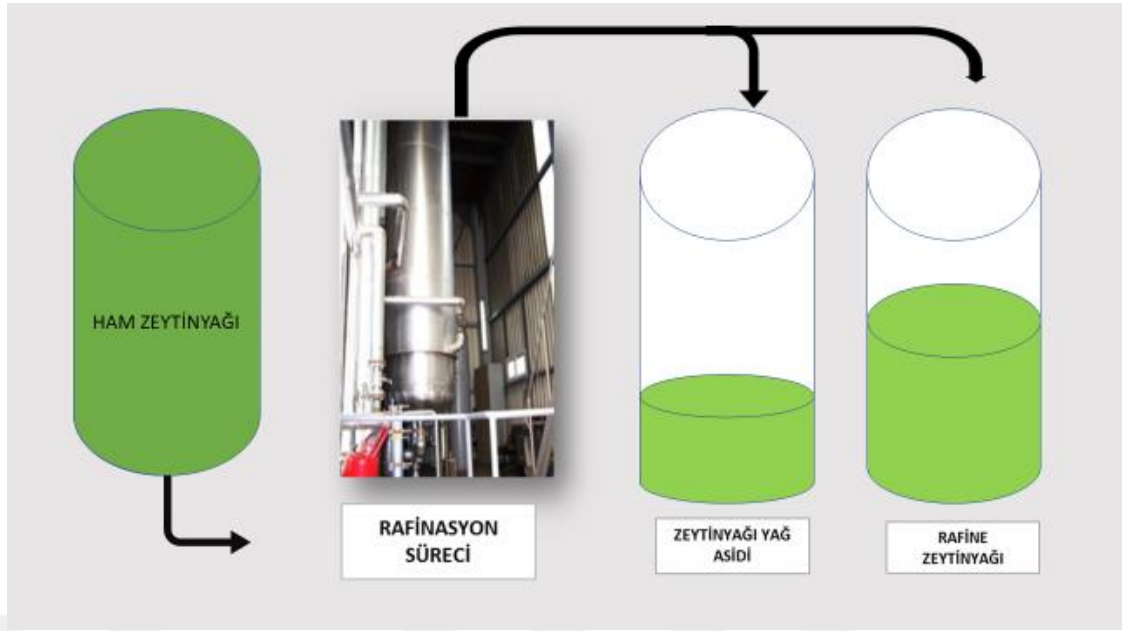
Ham zeytinyağı rafinasyonu sonucunda rafine zeytinyağı ve zeytinyağı yağ asidi olmak üzere iki ürün çıkışı olur (Şekil 10). Zeytinyağı yağ asidinin altı aşamada işlenmesi sonucunda skualen elde edilir (Şekil 11). Bu aşamalar; esterifikasyon, distilasyon, nötralizasyon, ağartma, vinterizasyon ve deodorizasyondur. Prosesin temeli ise düşük vakum altında buharlaştırmaya dayalı bir sistem olan distilasyondur.

Skualen elde edildikten sonra ışığa ve havaya maruz kalarak oksitlenmemesi ve etkisinin azalmaması amacıyla her biri 60 ml hacimli, koyu renkli, cam şişelere doldurularak hava ve ışıkla temas etmesi engellenmiştir.



Resim 10: Skualenin saklandığı ışık ve hava geçirilmeyen şişeler

Deneklerde % 98 saflıkta elde edilen skualen (4K Kimya Sanayi ve Tic. A.Ş., İzmir, Türkiye) kullanıldı. Topikal olarak kullanılan deneklerde (2. ve 4. grup) 0,2 ml aseton ile 0,5 ml skualen karıştırılarak sırt derisine uygulandı. Oral olarak kullanılan gruplarda (3. ve 4. grup) ise saf haliyle 0,2 ml skualen haftada 3 kez peroral yolla deneklere uygulandı. Skualenin oral uygulanması için 22 Gauge çapta 25 mm uzunlukta paslanmaz çelik gavaj kanülleri kullanılmıştır (FTSS-22S-25) (Prime BioScience PTE LTD, Singapur). Topikal uygulamalar ise (aseton/skualen) 1 ml'lik enjektörün iğne ucunun çıkarılması ardından farelerin sırtına deney grubuna uyan miktarda sıvı damlatılarak yapılmıştır.



Şekil 10: Ham zeytinyağının rafinasyon süreci



Şekil 11: Ham zeytinyağından skualenin elde edilme süreci

3.14 Grupların İzlemi

Deney başlangıcında deneklerin sırt derisinin tıraşlanması ardından topikal ve oral skualen ile UVB uygulamasına hemen başlandı. Toplam 18 hafta süren deney boyunca topikal ve oral ajanlar aynı şekilde uygulanmaya devam edildi. Deneklere topikal ve oral ajanlar ile UVB uygulanan dönemler dışında kendi kafeslerinde hazır pellet fare yemlerine ve suya serbest erişimleri sağlandı.

Deneyin ilk gününde ve sonrasında her iki haftada bir tümör sayısı ve vücut ağırlığı açısından denekler düzenli olarak değerlendirildi. Tüm deney süresince ağırlık kaybı ve mortalite gibi toksisite işaretleri açısından denekler izlendi.

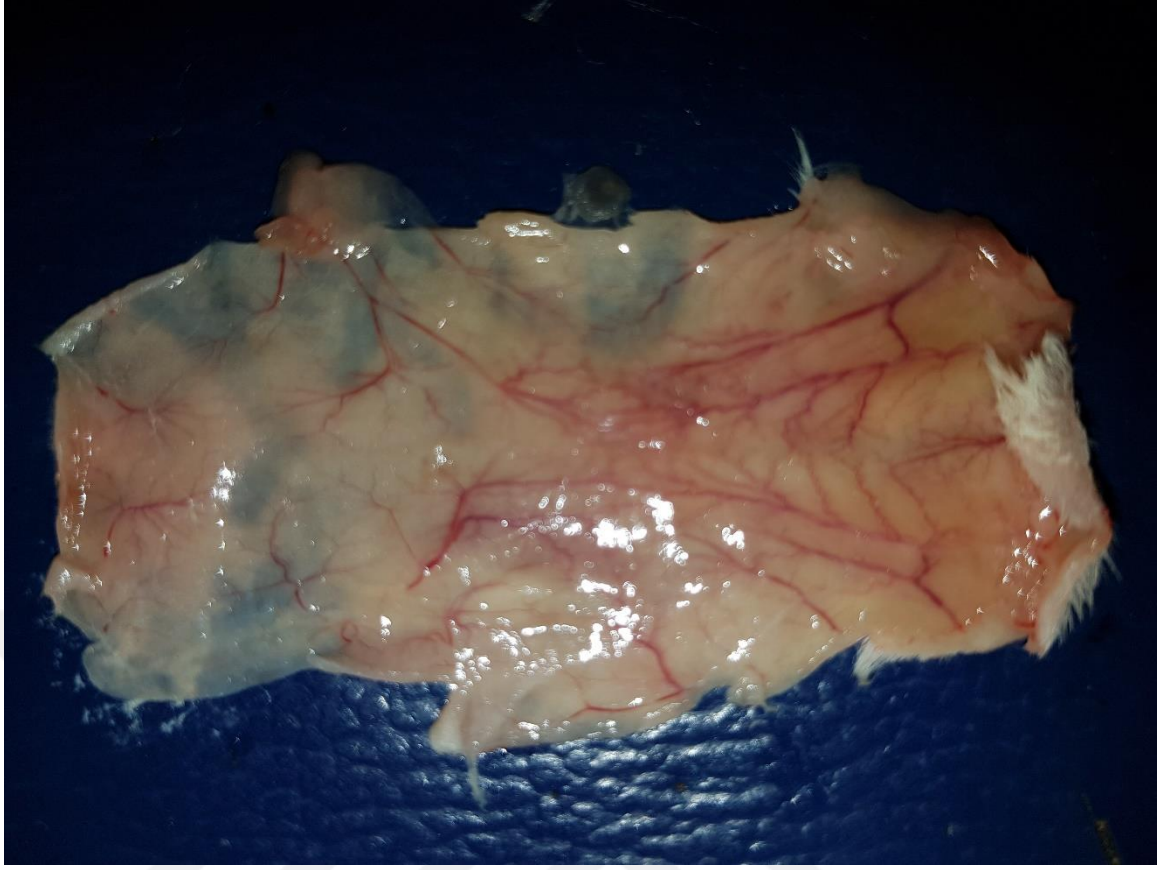
3.15 Sakrifikasyon ve Örnek Alımı

18 haftalık deney süreci sonunda denekler yüksek doz eter anestezisi ile sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası her bir deneğin kılız sırt derisi tam kat olarak cerrahi makas yardımıyla eliptik olarak eksize edildi. Alınan deri örnekleri ayrı kaplarda formaldehit içerisinde saklandı.





Resim 11: Deneklerin sakrifikasyonu sonrası sırt derilerinin eksizyonu



Resim 12: Eksize edilen sırt derisi materyali

3.16 Değerlendirme

3.16.1 Makroskopik Değerlendirme

Denekler iki haftada bir değerlendirilerek ağırlık ölçümleri yapıldı. Sırt bölgesindeki makroskopik olarak aktinik keratoz ile uyumlu lezyonlar sayılarak kaydedildi.

Sakrifikasyon sonrası tüm deneklerin iç organları makroskopik olarak şüpheli metastatik lezyonlar açısından incelendi. Tüm bu verilerle oluşturulan tabloları esas alan grafikler hazırlandı ve gruplar karşılaştırıldı.

3.16.2 Histopatolojik Değerlendirme

Ondördüncü haftada 1. ve 2. grupta birer farenin sırt derilerinden insizyonel biyopsi alındı. Onsekizinci haftanın sonunda yapılan sakrifikasyon ardından ise fare sırt derileri cerrahi makas yardımıyla tam kat olarak eksize edildi ve tüm bu örnekler % 10'luk

formalin (4% NB Formaldehyde Novagen Diagnostik Laboratuvar ve Sağlık Hizmetleri San. Ve Tic. Ltd. Şti.) solüsyonu içerisinde 24-48 saat süre ile tespit edildi.

Deneklerden elde edilen deri örneklerinin tümünün incelenmesi hedeflendi. Bu amaçla deri örnekleri her denek için deri dokusunun boyutuna bağlı olarak dört, beş veya altı parçaya ayrılarak kasetlere konuldu ve parafin bloklar elde edildi. Her bir bloktan ise 5 µm (mikrometre) kalınlığında ikişer kesit alınarak hematoksil-eozin boyaması yapıldı. Tüm preparatlar ışık mikroskobunda incelenerek epiderminin en kalın olduğu ve mitoz sayısı, aktinik değişiklikler, tek hücre nekrozları gibi bulguların en fazla olduğu preparatlar o deneğin asıl preparatı olarak seçilerek değerlendirmeye alındı. Tüm bu preparat seçme ve değerlendirme işlemleri preparatların hangi gruplara ait olduğunu bilmeyen patolog tarafından tek kör olarak gerçekleştirildi

1- Hematoksil-eozin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için bir gece 60°C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Dehidratasyon işlemi için beş değişik azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika hematoksil (01562E, Surgipath, Bretton, Peterborough, Cambridgeshire, Birleşik Krallık) ile boyandı. Boyamanın ardından boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, iki dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peterborough, Cambridgeshire, Birleşik Krallık) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve iki seri absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı (Tablo 5).

Tablo 5: Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	10 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eozin	2 dakika

2- Histopatolojik İnceleme ve Ölçümler

Histopatolojik değerlendirme kısmında anlatıldığı şekilde her denek için asıl preparat elde edildikten sonra bu preparatların mikroskop altında en kalın yeri saptanarak ölçüldü. Mikroskop olarak Olympus BX51 (Olympus Corporation, ABD) kullanıldı. Bu mikroskopa monte edilmiş olan Olympus DP70 (Olympus Corporation, ABD) kamera ile görüntüler bilgisayar ortamına aktarılarak Olympus cellSense Entry (Olympus Corporation, ABD) programıyla ekran görüntüleri alındı ve ölçümler yapıldı. Epitel kalınlığı hesaplanırken literatürdeki gibi stratum korneum tabakası hariç tutularak epidermisin kalınlığı ölçüldü (138).

İnflamasyon durumu değerlendirilirken büyük büyütme alanında (40x büyütme) epidermisteki inflamatuvar hücrelerin tüm hücrelere oranı göz önünde bulunduruldu ve yüzde değerleri alınarak kaydedildi. Bu değerler üzerinden gruplar karşılaştırıldı.

3.16.3 İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Daha önce seçilen bloklardan yine 5 µm kalınlığında kesitler alınıp anti-p53 antikoru ile immünohistokimyasal boyama uygulanarak grupların karşılaştırmalı değerlendirilmesi yapıldı.

1- İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü

Deneydeki her deneğin daha önce anlatılan şekilde saptanan asıl preparatları DAKO Autostainer (Agilent Technologies, ABD) cihazında anti-p53 (Invitrogen Life Technologies, Auckland, Yeni Zelanda) antikoru ile inkübe edildi.



Tablo 6: İmmünohistokimyasal boyama protokolü

İşlem	Ortam	Süre
Deparafinizasyon	Ksilen	5
Deparafinizasyon	Ksilen	5
Rehidratasyon	%100'lük alkol	3 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	3 dakika
Rehidratasyon	%95'lik alkol	3 dakika
Rehidratasyon	%70'lik alkol	3 dakika
Rehidratasyon	%50'lik alkol	3 dakika
Peroksidaz Blokajı	%3 Hidrojenperoksit + Metanol	10 dakika
Yıkama	PBS	5 dakika
Yıkama	PBS	5 dakika
Boyama	Sitrat-95°	10 dakika
Soğutma	Oda sıcaklığı	20 dakika
Yıkama	PBS	5 dakika
Yıkama	PBS	5 dakika
Protein Blokajı	Fetal bovin serum	1 saat
Boyama	Primer Antikor	1 gece
Yıkama	PBS	5 dakika
Yıkama	PBS	5 dakika
Boyama	Sekonder Antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	5 dakika
Yıkama	PBS	5 dakika
Yıkama	Peroksidaz Substrat Solüsyonu	5 dakika
Yıkama	PBS	2 dakika
Yıkama	PBS	2 dakika
Yıkama	PBS	2 dakika
Yıkama	Akan su	10 dakika
Dehidratasyon	%95'lük alkol	5 dakika
Dehidratasyon	%95'lük alkol	5 dakika
Dehidratasyon	%100'lük alkol	5 dakika
Dehidratasyon	%100'lük alkol	5 dakika
Kapama		

2- *İmmünohistokimyasal Ölçüm ve Skoring*

p53 antikoru (PAb 240) ile boyanan preparatlar ışık mikroskopunda patoloğ tarafından tek kör olarak incelendi. İmmünohistokimyasal boyanmanın en yoğun olduğı alan saptandı. Büyük büyütme (40x) alanında nükleer ve sitoplazmik boyanma olan hücrelerin tüm çekirdekli hücrelere oranı saptandı ve yüzde oranı olarak kaydedildi.

3.16.4 İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada dört grupta veriler ölçümle elde edilmiş ise normal dağılıma uygunluğı Shapiro-Vilk testiyle kontrol edildi. Normal dağılım sağlanıyorsa tanımlayıcı analizlerde ortalama sapma ile sunuldu, analitik olarak ANOVA F test ile karşılaştırıldı. ANOVA F testin uygulanabildiğı veri tekrarlı ölçümlerin (haftalara göre ağırlık) gruplar arası (deney grupları) etkisi kontrol edildi ve ANOVA F testi ile karşılaştırması yapıldı. Diğer ölçülen ve toplanabilirlik özelliğı olan sayım değişkenleri için non-parametrik özellikte olduğundan dört grup arasındaki farklılığı Kruskal Wallis (KW) testiyle karar verildi. KW analizinde farklılık saptandığında farkın hangi eşli karşılaştırmalardan olduğunu bulmak için post-hoc Dunn's test uygulandı. Tüm analitik karşılaştırmalarda $p < 0.05$ anlamlılık sınır değeri olarak kabul edildi. SPSS 22.0 paket programıyla analizler gerçekleştirildi. Grafiksel değerlendirmelerde de Excel ve SPSS programları kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1 Makroskopik Bulgular

4.1.1 Ağırlık

Deney boyunca iki haftada bir yapılan ölçümler karşılaştırıldığında haftalara göre 10 zaman diliminde ağırlık artışları her grup için anlamlıdır ($p<0.001$); ancak gruplar arasında ağırlık artış hızında fark yoktur ($p=0.185$). (Tablo 7)

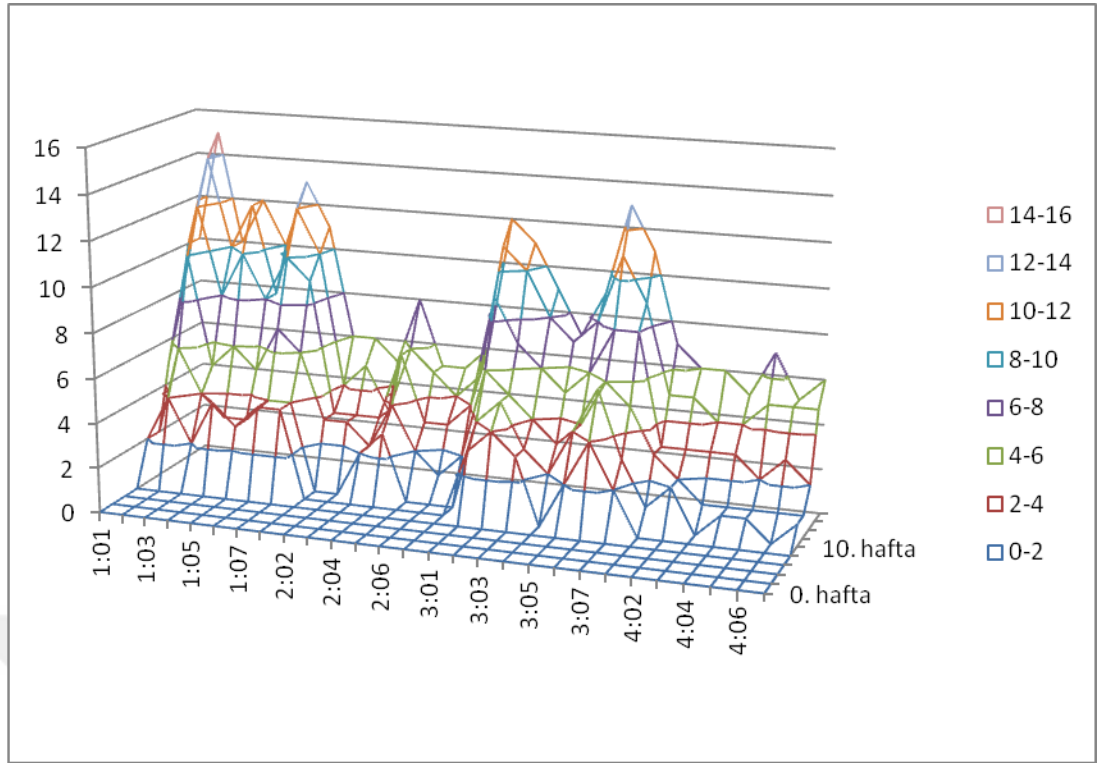
Tablo 7: Gruplara ve Haftalara Göre Ağırlık (gram) Artışlarının Karşılaştırılması

Haftalar	Kontrol	Topikal	Oral	Topikal+Oral	F ve p değeri
0	21.64	21.71	22.71	22.64	$F_{\text{toplam}}=126.375$ $p_{\text{toplam}}<0.001$ $F_{\text{haftalar}}=509.311$ $p_{\text{haftalar}}<0.001$ $F_{\text{grup}}=1.815$ $p_{\text{grup}}=0.185$
2	22.86	22.93	24.29	24.14	
4	24.07	24.21	25.50	25.57	
6	25.21	25.57	26.93	27.00	
8	26.36	26.71	28.43	28.50	
10	27.43	27.93	29.50	30.00	
12	28.57	29.14	30.50	31.29	
14	29.58	30.29	31.29	32.21	
16	30.21	31.43	31.93	33.00	
18	31.36	32.36	32.57	34.64	

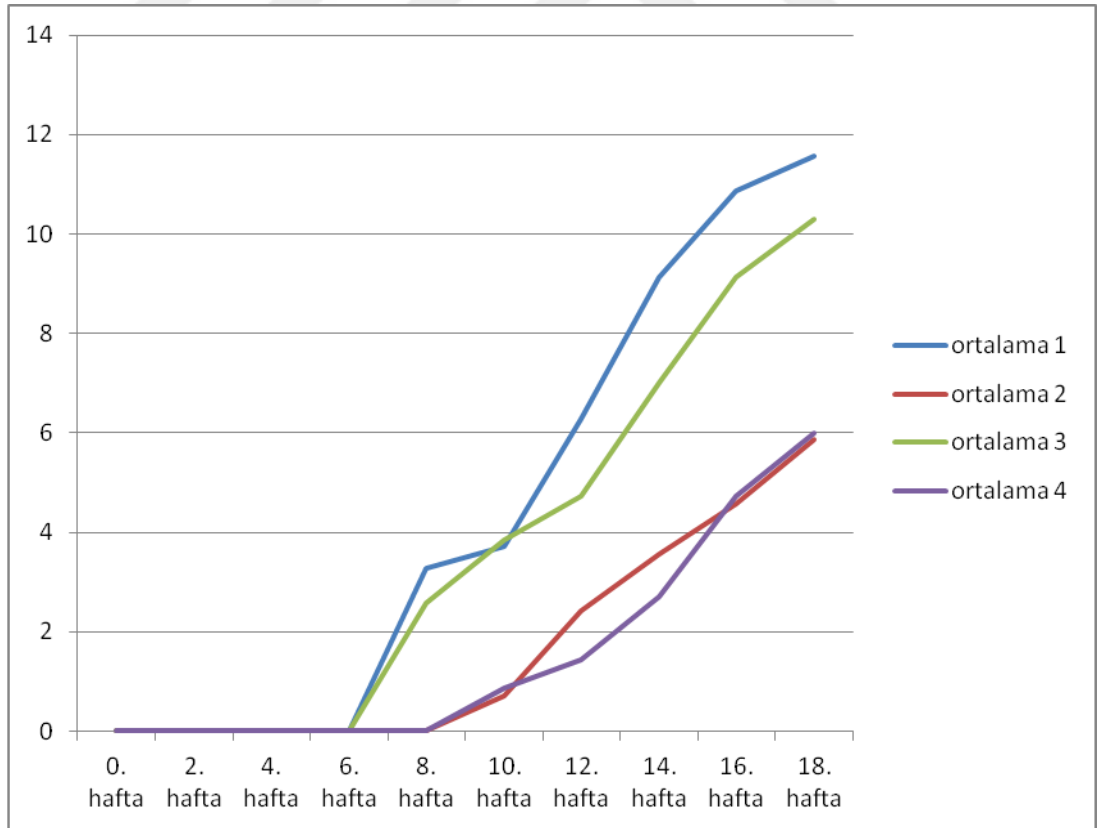
4.1.2 Aktinik Keratoz Sayısı ve Prevalansı

Yapılan gözlemlerde deneyin 8. haftasına kadar hiçbir denekte tümöral oluşum gözlenmezken 8. haftada 1. gruptaki tüm hayvanlarda, 3. grupta ise deneklerin %85.7'sinde makroskopik olarak aktinik keratoz ile uyumlu tümörler saptandı. Sekizinci haftada 2. ve 4. grupta ise hiç tümör gözlenmezken 10. haftada bu gruplarda sırasıyla tümör prevalansı %28.5 ve %71.4 olarak görüldü. On ikinci haftada ise tüm gruplardaki tümör prevalansı %100 seviyesine ulaştı. Topikal skualen uygulanan gruplarda iki hafta daha geç tümör oluşumu başladığı söylenebilir. Ancak 10. haftadan itibaren deney sonuna kadar gruplar arasında tümör sayısı açısından fark olsa da prevalans açısından fark saptanmadı.

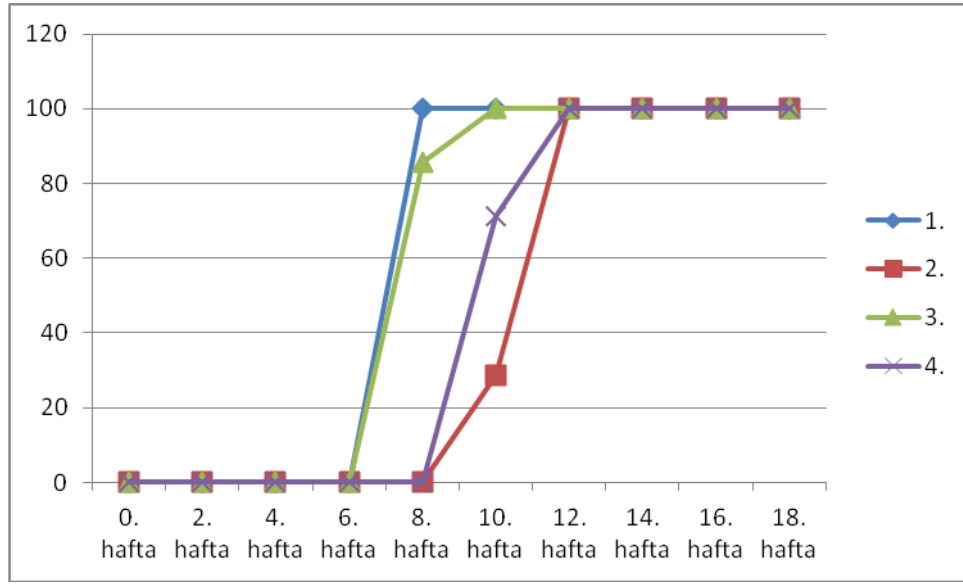
Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, deney sonunda topikal skualen grubunda %49.5, topikal + oral skualen grubunda %48.1 daha az sayıda tümör saptandı. Oral skualen grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında %11.1 daha az tümör görülmüştür.



Şekil 12: Gruplardaki deneklerin tümör sayılarının haftalara göre dağılımı



Şekil 13: Gruplardaki tümör sayısı ortalamalarının haftalara göre dağılımı



Şekil 14: Gruplardaki tümör prevalansının haftalara göre dağılımı

Tümör sayım değerleri üzerinden dört grubun 18. haftadaki tümör sayıları nonparametrik koşulda Kruskal Wallis analiziyle aynı zaman dilimi için karşılaştırılmıştır (Tablo 8).

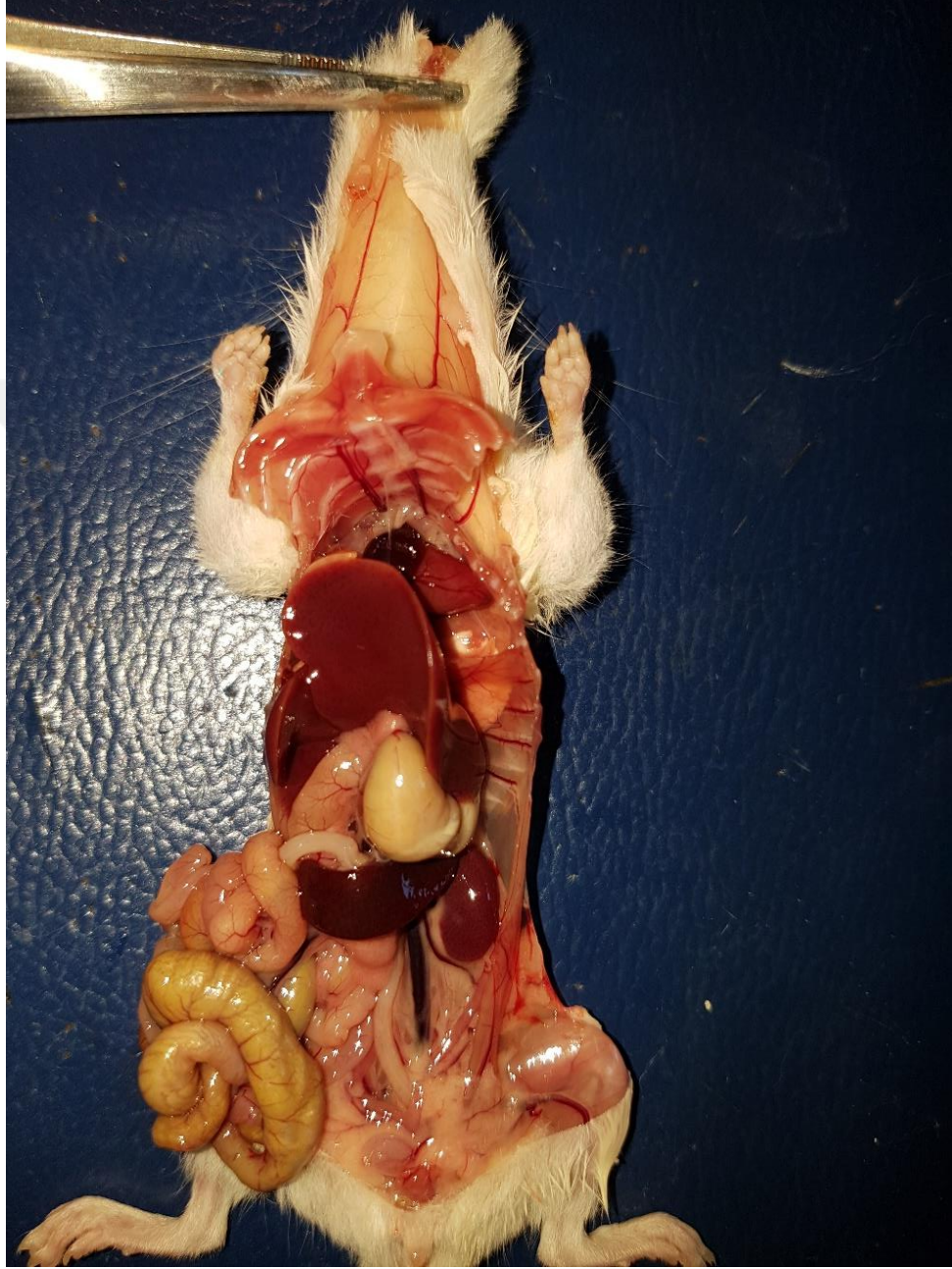
Tablo 8: Gruplardaki tümör sayılarının dağılımlarının 18. hafta için karşılaştırılması

Gruplar	Ortanca (min-max)	p _{KW}	Posthoc Dunn's Test
1 (kontrol)	11 (10-15)	p<0.001	P ₂₋₃ =0.016
2 (topikal skualen)	6 (5-8)		P ₁₋₂ =0.002
3 (oral skualen)	11 (7-13)		P ₃₋₄ =0.037
4 (topikal+oral skualen)	6 (5-7)		P ₁₋₄ =0.006

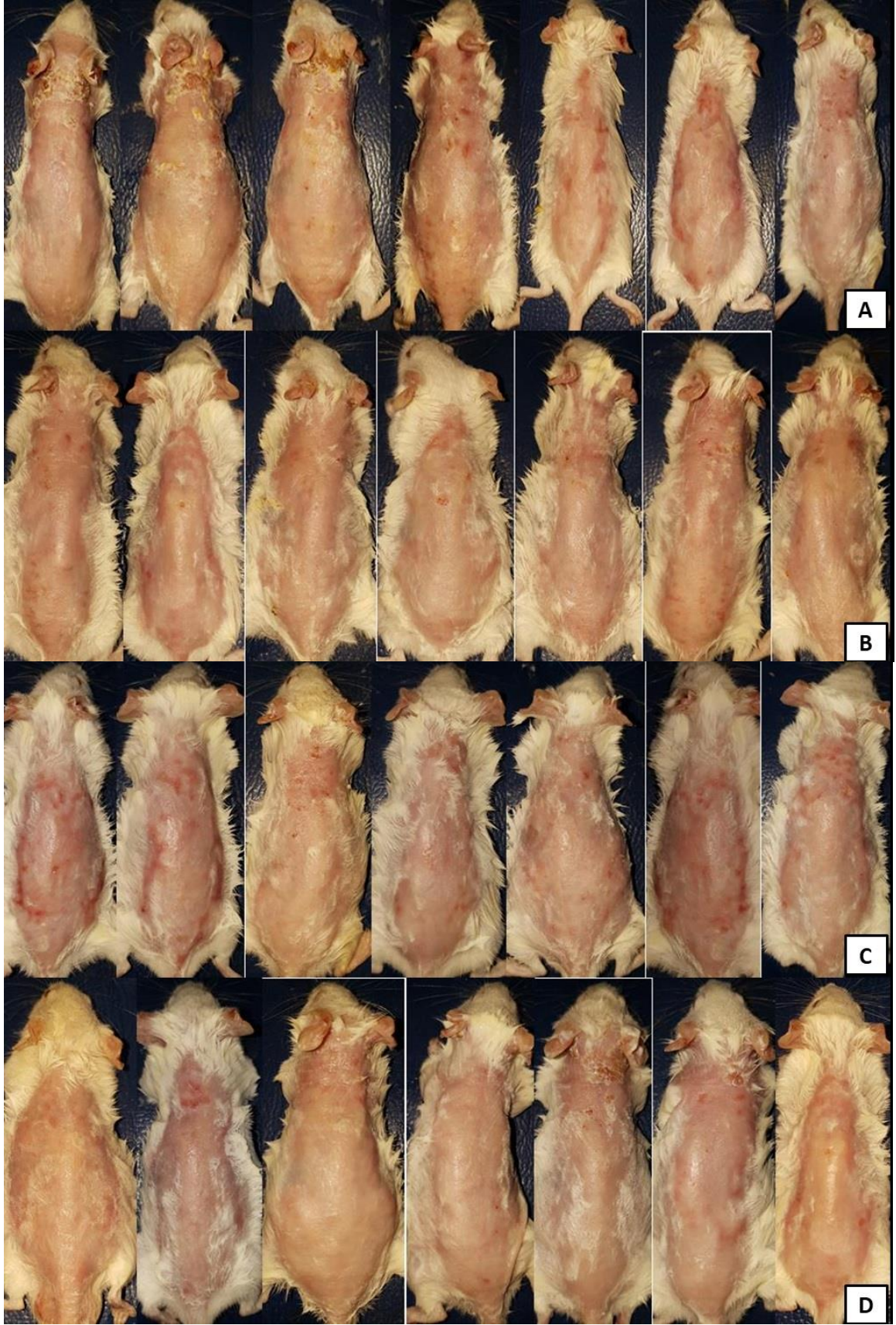
Grupların 18. haftadaki tümör sayıları arasında anlamlı fark vardır ve bu fark 2. ve 4. grubun 1 ve 3. gruplar ile arasındaki farktan kaynaklanmaktadır. İkinci ve 4. grup, 1. ve 3. gruptan daha az sayıda tümör içermektedir.

4.1.3 İç Organ İncelemesi

Deney sonunda sakrifikasyon sonrası tüm deneklerin kontrol edilen i organlarında kuşkulu bir lezyon saptanmadı.



Resim 13: Sakrifiye edilen deneklerin i organlarının incelenmesi



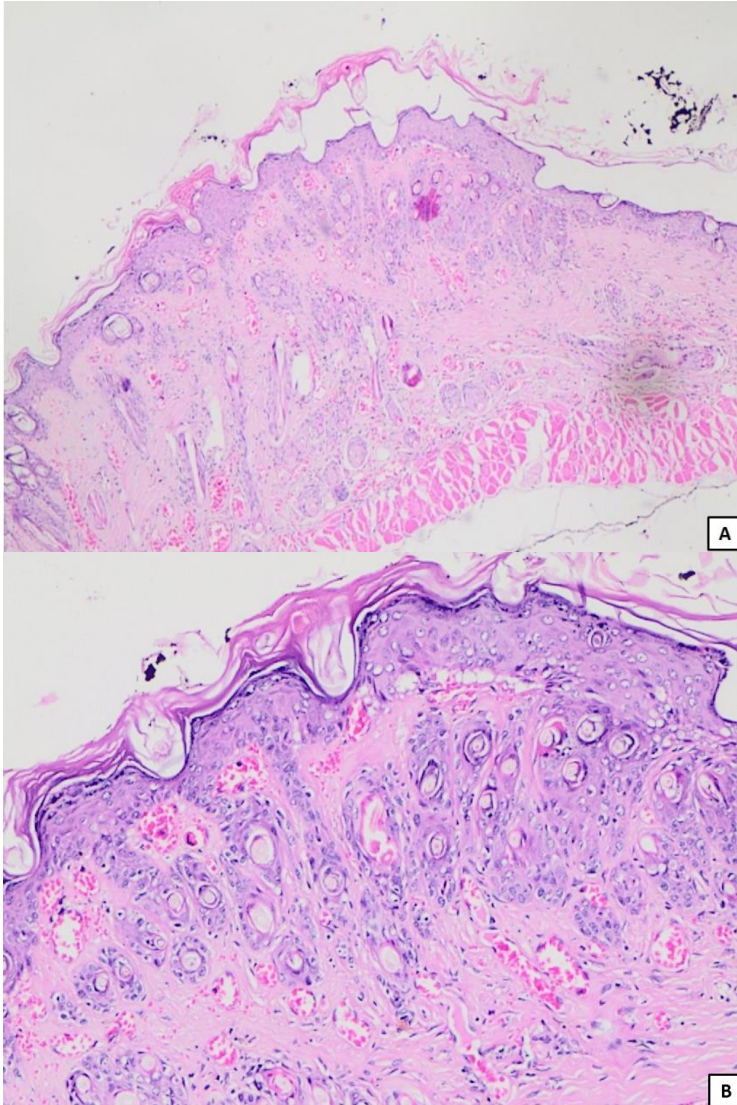
Resim 14: Deney sonu sırt derisi görüntüleri

A)Kontrol **B)**Topikal skualen **C)**Oral skualen **D)**Topikal+oral skualen

4.2 Mikroskopik Bulgular

4.2.1 Hematoksilen Eozin Boyama Bulguları

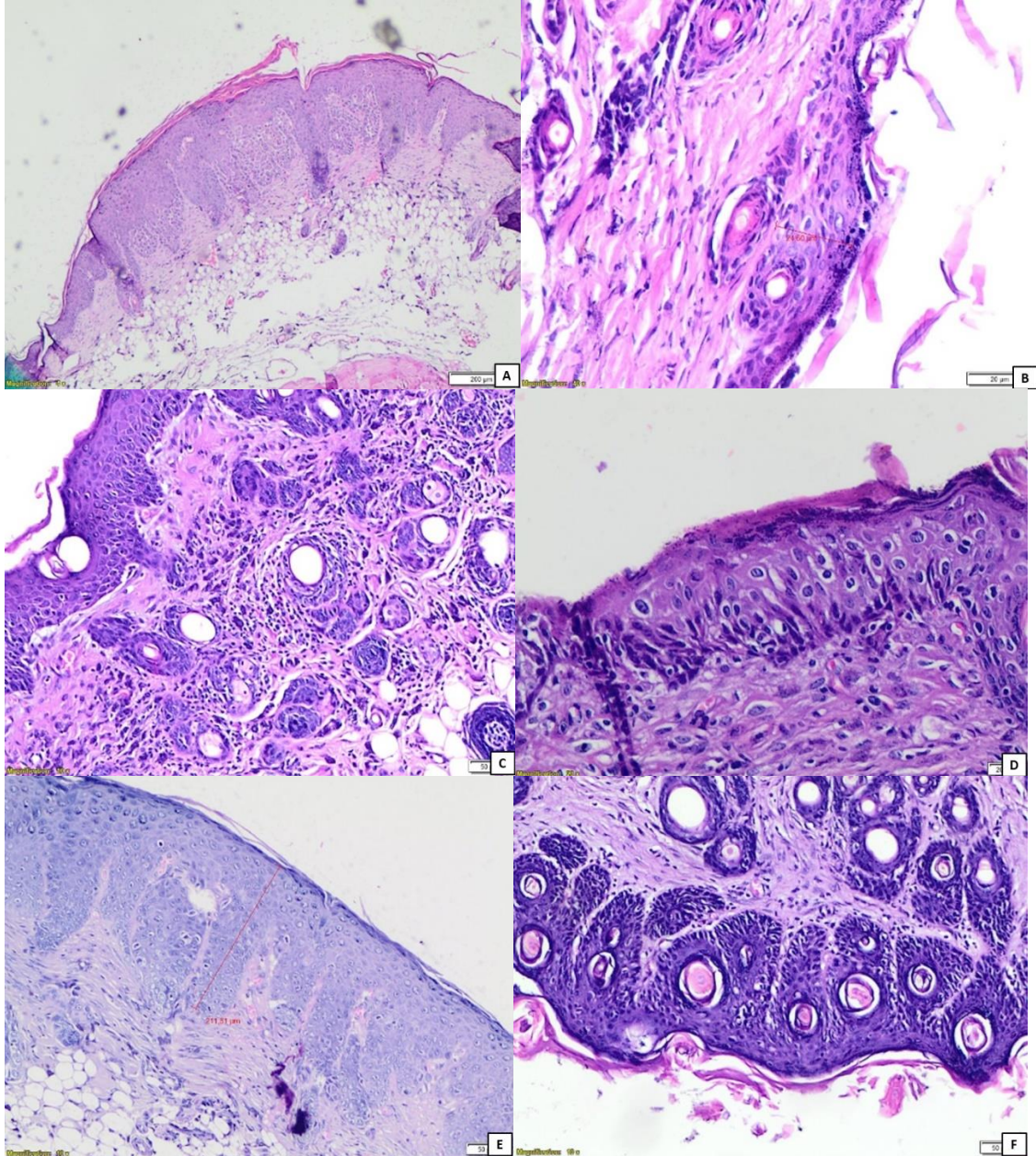
Elde edilen kesitler ışık mikroskopunda histolojik olarak değerlendirildi ve dokunun mikro yapısını incelememize olanak sağladı. On dördüncü haftada 1. ve 2. grupta birer denekten alınan sırt cildi insizyonel biyopsileri daha önce anlatıldığı şekilde hazırlanarak hematoksilen-eozin ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi: Aktinik keratoz ile uyumlu lezyonlar tanımlandı. Etkilenen alanlarda epidermiste kalınlaşma, parakeratoz ve hiperkeratoz en dikkat çeken bulguları. Epidermiste ve özellikle kıl foliküllerinde inflammatuar hücrelerde artış tespit edildi. Yer yer keratin incileri ve mitotik figürler izlendi.



Resim 15: 14. haftada alınan insizyonel biyopsi bulguları.(Boweonid aktinik keratoz)

A)10'luk büyütme **B)**40'luk büyütme

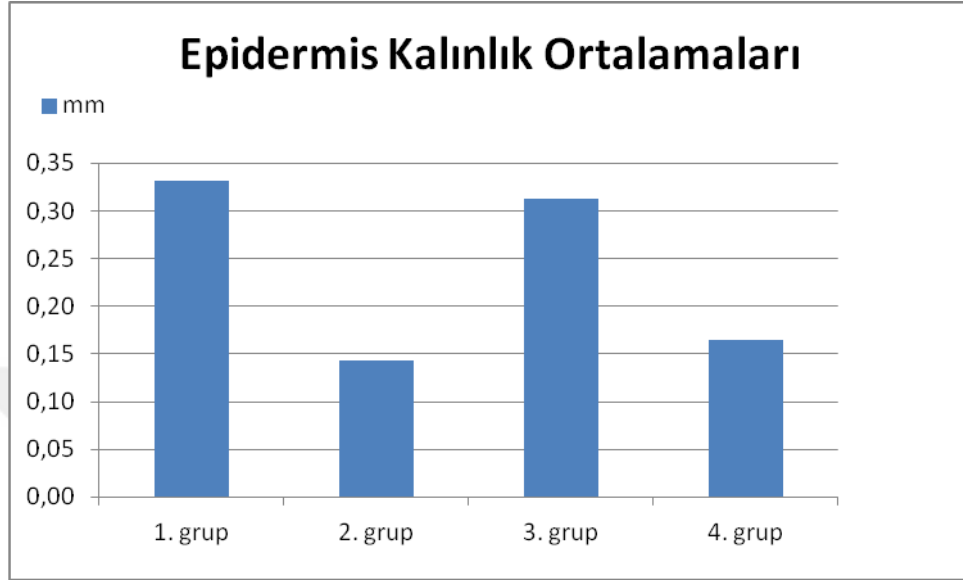
Etkilenmiş alanlarda stratum spinosumda hafif diskeratoz izlendi. Bu bölgelerdeki kıl foliküllerinde de epidermal proliferasyon olduğu, bazı kıl foliküllerinin keratinle dolmuş olduğu görüldü. Hiperkeratozun yoğun olduğu alanlarda yer yer ülser lezyonlar vardı ve bazılarının içleri keratin ile doluydu. Bazı tümöral alanlarda pleoselüler dermatit ve travma ya da sekonder enfeksiyona bağlı olduğu düşünülen belirgin inflamatuvar reaksiyon gözlemlendi.



Resim 16: Hematoksilen eozin boyama bulguları

A)Bowenoid aktinik keratoz B)Normal epidermis C)İnflamasyon ve folikülit
D)Aktinik keratoz E)Epidermal hiperplazi F)Keratin incileri

1- Epidermis Kalınlığı



Şekil 15: Gruplara göre epidermis kalınlık ortalamaları

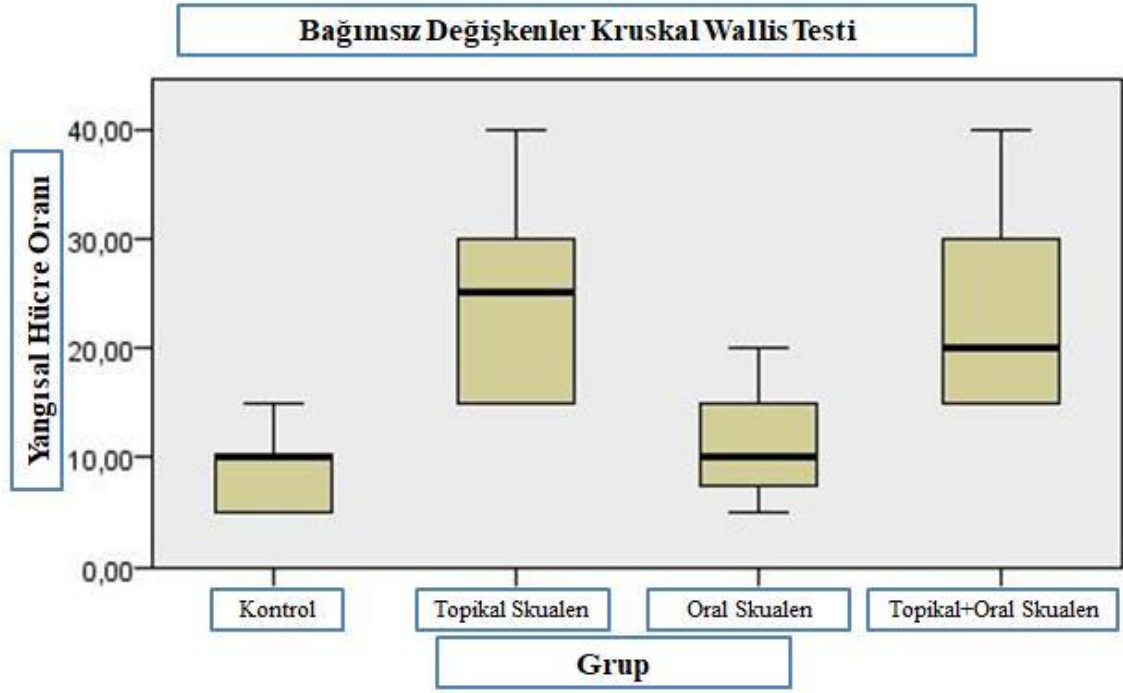
Tablo 9: Gruplardaki epidermal kalınlıkların dağılımlarının karşılaştırılması

Gruplar	Ortanca (min-max)	p _{KW}	Posthoc Dunn's Test
1 (Kontrol)	0.33 (0.25-0.42)	p<0.001	P ₂₋₃ =0.005
2 (Topikal skualen)	0.13 (0.10-0.20)		P ₁₋₂ =0.001
3 (Oral skualen)	0.32 (0.26-0.32)		P ₃₋₄ =0.041
4 (Topikal+oral skualen)	0.15 (0.13-0.23)		P ₁₋₄ =0.015

Epidermis kalınlığı ortancası gruplara göre sırasıyla 0.33, 0.13, 0.32 ve 0.15'tir. Epidermis kalınlıkları nonparametrik dağılım gösterdiği için ortanca değeriyle sunulmuştur ve bağımsız dört grup Kruskal-Wallis analiziyle karşılaştırılmıştır.

Grupların epidermis kalınlıkları arasında anlamlı fark vardır ($p<0.001$) ve bu fark 2. grubun 1 ve 3 ile; 4. grubun 1 ve 3 ile arasındaki farktan kaynaklanmaktadır. İkinci ve 4. grup, 1. ve 3. gruptan daha az epidermal kalınlaşma geliştirmiştir.

2- Yangısal Hücre



Şekil 16: Yangısal hücre oranlarının Kruskal Wallis testiyle karşılaştırılması

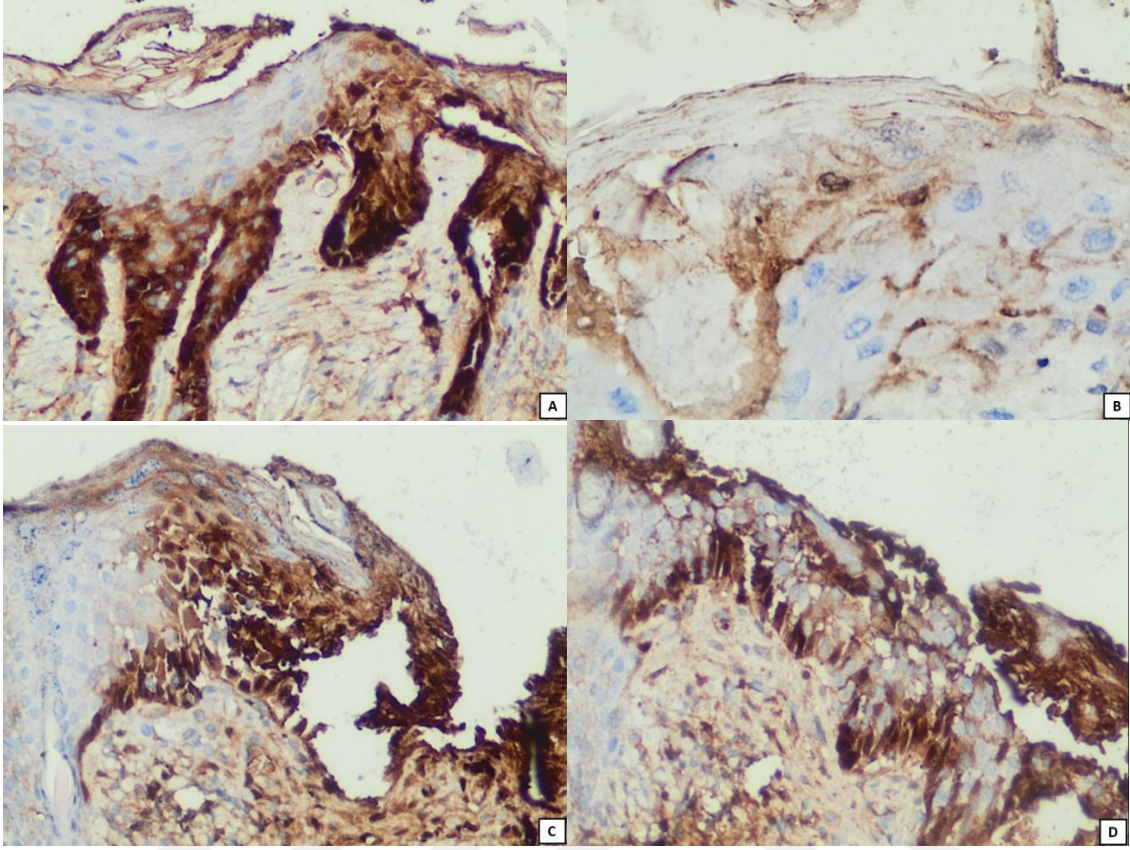
Tablo 10: Yangısal hücre dağılımının gruplara göre karşılaştırılması

Gruplar	Ortanca (min-max)	p _{KW}	Posthoc Dunn's Test
1 (Kontrol)	10 (5-15)	p<0.001	p ₁₋₂ =0.009 p ₁₋₄ =0.011
2 (Topikal skualen)	25 (15-40)		
3 (Oral skualen)	10 (5-20)		
4 (Topikal+oral skualen)	20 (15-40)		

Yangısal hücre sayıları nonparametrik dağılım gösterdiği için ortanca değeriyle sunulmuştur ve bağımsız dört grup Kruskal Wallis analiziyle karşılaştırılmıştır.

Grupların yangısal hücre yüzdeleri arasında anlamlı fark vardır ($p<0.001$) ve bu fark 2. ve 4. grubun 1. grupla arasındaki farktan kaynaklanmaktadır. İkinci ve 4. grupta 1. gruba göre yangısal hücre infiltrasyonu belirgin olarak daha fazla saptanmıştır (sırasıyla $p=0.009$; $p=0.011$).

4.2.2 İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları



Resim 17: Mutant p53 protein ekspresyonunun gösterilmesi

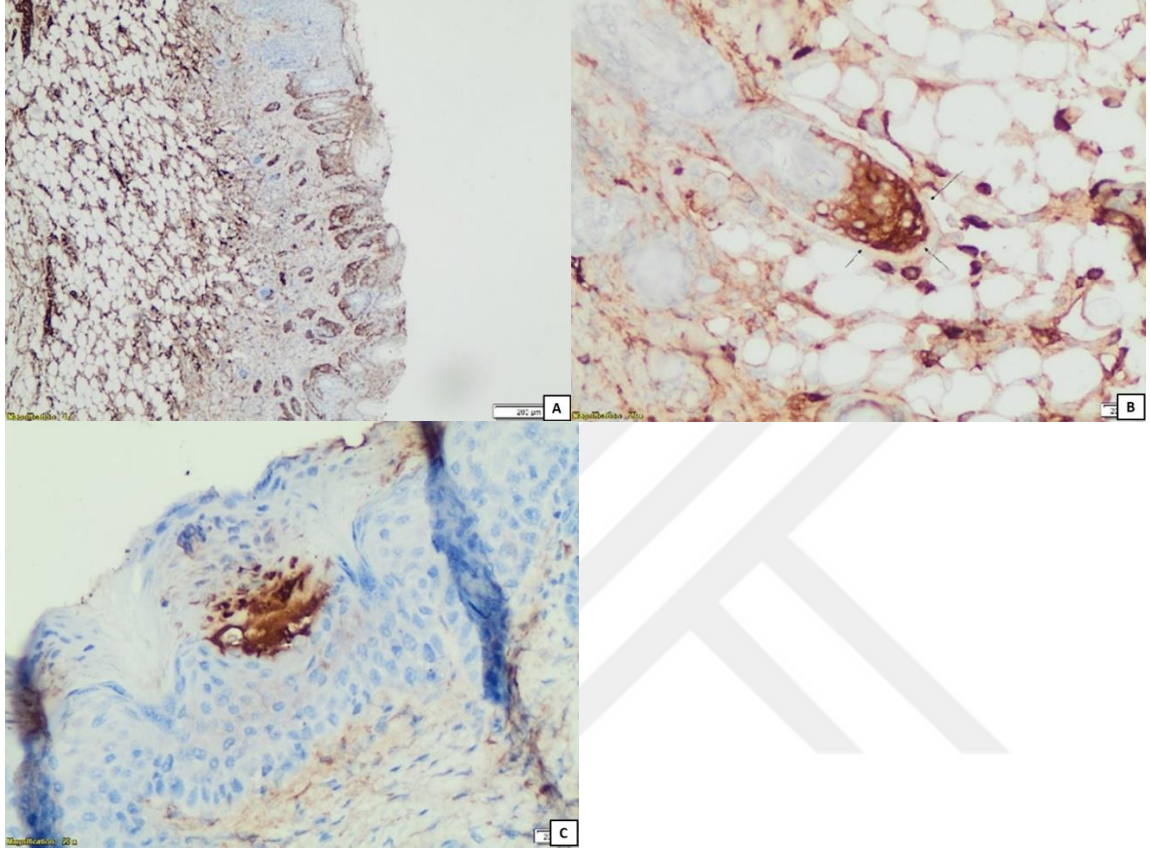
A)Bazal tabakadaki artmış tutulum **B)**Nükleer boyanma **C)**Yoğun nükleer ve kısmi sitoplazmik boyanma **D)**Özellikle bazal tabakadaki nükleer boyanma

Mutant p53 boyanma oranları nonparametrik dağılım gösterdiği için ortanca değeriyle sunulmuştur ve bağımsız dört grup Kruskal-Wallis analiziyle karşılaştırılmıştır.

Tablo 11: Mutant p53 protein dağılımının gruplara göre karşılaştırılması

Gruplar	Ortanca (min-max)	p _{KW}
1 (Kontrol)	35 (20-50)	p=0,381
2 (Topikal skualen)	30 (10-60)	
3 (Oral skualen)	15 (10-60)	
4 (Topikal+oral skualen)	35 (15-50)	

Grupların p53 boyanma yüzdeleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,381$).



Resim 18: Çeşitli immünohistokimyasal boyanma paternleri

A)Aktinik keratoz alanında özellikle bazal tabakada artmış tutulum **B)**Kıl kökündeki artmış sitoplazmik boyanma **C)**Nükleer+sitoplazmik boyanma

5. TARTIŞMA

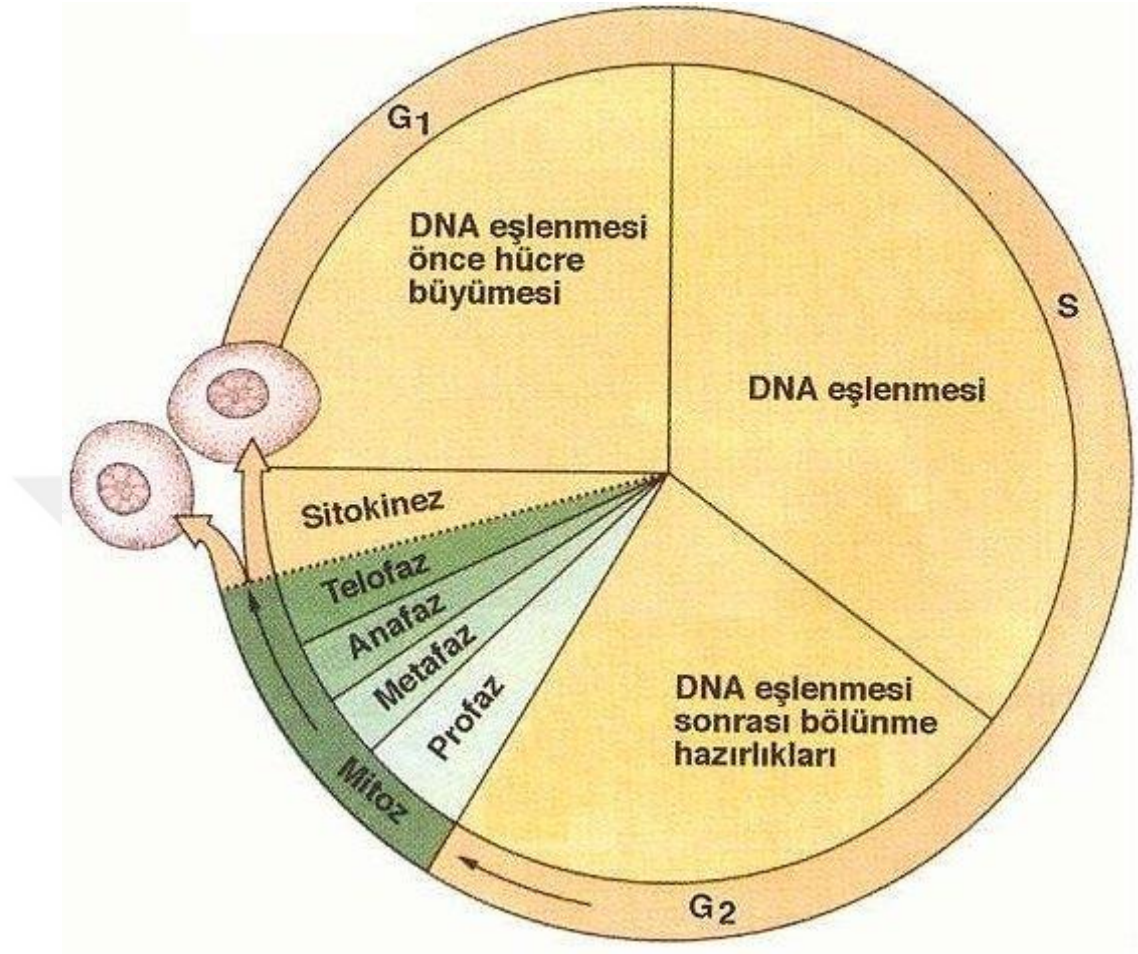
Deri kanseri, insanlarda en sık rastlanan kanser türüdür. Melanom ve melanom dışı deri kanseri (MDDK) insidansı tüm dünyada hızla artmakta olup önemli bir toplum sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Genellikle ileri yaşta ve beyaz tenli popülasyonda görülmekle birlikte immünsüprese hastalarda da prevalansı yüksektir (2). MDDK'nin en önemli iki tipi bazal hücreli karsinom (BHK) ve skuamöz hücreli karsinomdur (SHK). BHK, SHK'den 4-5 kat daha fazla görülür (1). Bu tümörlerde mortalite oranı melanomla kıyaslandığında düşük olsa da özellikle SHK vakalarında ileri yaş ve baskılanmış immün sistem eşlik ediyorsa mortalite artabilmektedir (25). SHK, MDDK grubunda en önemli metastatik hastalık ve ölüm nedenidir (139).

MDDK oluşumunda risk faktörleri olarak güneş maruziyeti, kanserojen etkilerin kümülatif etkisi nedeniyle ileri yaş, sigara tüketimi, UV maruziyeti (PUVA tedavisi, solaryum), HPV enfeksiyonu (tip 16, 31 ve 34), arsenik ve polisiklik aromatik hidrokarbon maruziyeti, immünsüpresyon, yağdan zengin beslenme, kronik dermatozlar, ülserler, sinus hatları ve kronik fistüller yer alır (47).

SHK gelişimiyle ilişkili deri lezyonları ise parakeratoz, lupus eritematozus, liken planus, liken sklerozis, epidermolizis bülloza, akrodermatitis kronik atrofikans, iktiyozis, kromoblastomikozis, arteriyovenöz malformasyon, nevus sebaceus, lineer epidermal nevüs, granüloma inguinale, akne konglobata, nekrobiyozis lipodika, verrüsiform ksantoma, lenfogranüloma venereum olarak sayılabilir (140,141).

Deri kanseri insidansının artışından en çok sorumlu tutulan etken ise güneş kaynaklı ultraviyole ışınlarıdır (2). UV'ye maruziyet sonucu epidermisteki keratinosit DNA'larında mutasyonlar gerçekleşir. DNA hasarı olduğunda normal hücre işleyişinde p53 isimli gen aktive olur ve p53 tümör baskılayıcı proteini üretir. Bu protein hücre siklusunu durdurarak DNA tamir enzimlerini aktive eder ve onarım için fırsat tanır; ancak onarım yapılamıyorsa apoptoz yoluyla hücrenin ölmesini sağlar. UV aynı zamanda p53 geninde de mutasyonlara sebep olur. Bu da hücre DNA hasarlarının onarım mekanizmasını bozacağından kontrol edilemeyen hücre çoğalmasına neden olur ve malignite gelişimine yatkınlık yaratır. SHK'lerin %90'dan fazlasında, BHK'lerin %50'den fazlasında p53 mutasyonu saptanmıştır (25). Sitozinden timine (C'den T'ye) ve/veya CC (sitozin-sitozin)'den TT (timin-timin)'ye mutasyonlar UV hasarının karakteristiğidir ve bu spesifik mutasyon UVR

kaynaklı DNA hasarının tanınmasını sağlar (71,78). UV ışınları ayrıca immün sistemi baskılayarak da deri kanserinin gelişmesine zemin hazırlar (32).



Şekil 17: Mitoz bölünmenin aşamaları

Deri kanseri, Dermatoloji ve Plastik Cerrahi klinik pratiğinde önemli bir yer tutmaktadır. Her geçen gün tedavi ve profilaksi ile ilgili yapılan klinik ve preklinik çalışmalar dünya genelinde artmaktadır (2). Preklinik çalışma olarak ise kemoprofilaksi çalışmaları hız kazanmıştır.

Kemoprofilaksi; doğal ya da yapay maddelerin uygulanarak kanser gelişiminin tamamen engellenmesi, kanserojen ilerlemenin yavaşlatılması veya tersine çevrilmesiyle kanser gelişme riskini azaltmak için kullanılan yaklaşımdır (106,142). Çeşitli deri kanserlerine karşı kemoprofilaktik çalışmalar 1970 yılında Sporn ve arkadaşları tarafından ilk kez tanımlanmıştır (143). O günden bu yana deri kanseri modelleri geliştirilmiş ve

fitokimyasallar, doğal antioksidanlar, mineraller ve vitaminler kullanılarak yapılan araştırma çalışmaları özellikle son yıllarda şaşırtıcı bir oranda artmıştır (2,68).

Kemoprofilaktik maddelerle ilgili prelinik çalışmalar invitro ya da invivo (hayvan deneyi) olarak planlanabilir. İnvitro olarak planlanacak bir çalışma, doku ve organ sistemleri düzeyindeki birçok değişkenden arındırılmış olacak ve organizmaya bütünsel yaklaşımı sağlayamayacaktır. Bu gibi dezavantajları nedeniyle invitro çalışmadan uzaklaşarak deneyimizi invivo çalışma olarak kurguladık.

Hayvan modeli olarak literatürde kimyasal karsinogenez ve fotokarsinogenez olarak iki temel yöntem bulunmaktadır. Kimyasal karsinogenezde tümör başlatıcı faktör olarak DMBA isimli bir kimyasal madde topikal olarak kullanılırken, tümör ilerletici faktör olarak TPA isimli kimyasal madde kullanılmaktadır (70,76). Fotokarsinogenez modelinde ise tümör başlatıcı ve ilerletici aşamaların her ikisi de UV ışınlarıyla yapılmaktadır. Bazı çalışmalarda ise tümör başlatıcı olarak UV, ilerletici olarak TPA veya başlatıcı olarak DMBA, ilerletici olarak UV kullanılmıştır (76). Bu gibi hibrit yöntemler denendiyse de literatürde genel kabul gören uygulama tümör oluşumunun ya tamamen kimyasal ajanlarla ya da tamamen UV ile gerçekleştirilmesidir (76).

UV ile indüklenen fare deri kanseri modeli iki aşamalı kimyasal karsinogenez modeline göre daha fizyolojiktir. Deri karsinogenezi altında yatan mekanizmaları incelemek için en uygun olan yöntemdir, çünkü kullanılan karsinojenler insandaki deri kanseri etkenlerine benzerdir. Ek olarak p53 tümör süpresör genlerindeki mutasyonlar, insan ve fare üzerindeki UV kaynaklı karsinogenezde önemli bir rol oynarken, DMBA/TPA ile tümör oluşturulan farelerin sadece bir kısmında (~% 30) görülür (38).

İnsan deri kanseri etyolojisindeki temel faktör güneş kaynaklı ultraviyole ışınları olduğu için deneyimizde buna benzer yöntem olan fotokarsinogenez yöntemini hayvan modeli olarak seçtik. Böylece insan deri kanseri oluşumunu daha gerçekçi bir şekilde taklit etmeyi amaçladık. UV alttıplerinden ise UVB hayvan çalışmalarında en sık kullanılan fotokarsinojendir (144). Bu nedenle deneyimizde UVB ışını yayan lambalar kullanılmıştır.

Bu yöntemin en önemli dezavantajlarından biri ise modeli uygulamak için genel kabul görmüş bir prosedürün olmamasıdır (74,75). UV ile deri kanseri modeli uygulanan deneysel çalışmalarda her seansta farklı dozda UV uygulaması [30, 180, 200, 250 mJ/cm²] her hafta farklı sayıda uygulama seansı [2,3,5] ve farklı uzunlukta [16,20,25,30,40 hafta]

deneyler yapıldığı görülmüştür (2,3,93). Literatürdeki bu çalışmalar incelendiğinde her seansta uygulanan ışın dozu azaldıkça ve haftalık UV seans sayısı azaldıkça tümör ortaya çıkma süresinin de uzamakta olduğu görüldü. Ancak bu faktörler arasında doğrusal bir ilişki saptanamadı. Her seanstaki UV dozunu düşük tutmak aktinik keratoz ve skuamöz hücreli karsinom gelişme süresini uzatmaktadır. Bu da haftalar ilerledikçe denek kaybı olasılığını artırmaktadır. Bunun yanında her seansta verilen UV dozu gereğinden fazla artırılırsa da deneklerde hipertermi ve dehidrasyon gibi toksisite belirtileri görülebilir ve yine bu durum denek kaybına neden olabilir.

Fare, kimyasal ya da UV deri karsinogenez protokolüne en duyarlı laboratuvar hayvanı olarak kabul edilmiştir (68). Bu nedenle çalışmamızda deney hayvanı olarak fare seçilmiştir. Genetik olarak immünsüprese (nude) fareleri kullanmak gruplar arası farkları ve çalışmanın sonuçlarını olumsuz etkileyebileceği için immünkompetan fareler tercih edilmiştir. Literatürde skuamöz hücreli deri kanseri modellerinde SENCAR, SKH-1, CD-1, BALB/c türü fareler kullanılmıştır (66–68). SENCAR ve SKH-1 türü fareler ülkemizde bulunmamaktadır. CD-1 türü fareler ise çoğunlukla çok aşamalı kimyasal karsinogenez modelinde kullanılmış olup fotokarsinogenez modellerinde kullanım örneği saptanmamıştır (68). Fotokarsinogenez modeliyle deri kanseri oluşturulabildiği ve profilaktik ajanların denendiği literatürde gösterilen BALB/c türü fareler deneyimize uygun hayvan olarak seçilmiştir (110,135).

Karsinojen maruziyeti sonrası ilk evre olan tümör başlama aşamasında deride morfolojik değişiklikler görülmez; ancak DNA’da moleküler değişiklikler ve mutasyonlar oluşur. İlerleme aşamasında ise epidermal hücre proliferasyonu ve hiperplazi görülür. Karsinojene maruziyet devam ettikçe premalign aktinik keratozun faredeki karşılığı olan papillom lezyonları görünür hale gelir. Daha uzun süreli maruziyet sonucu ise dönüşüm aşaması başlar ve ek genetik değişiklikler meydana gelerek invaziv SHK oluşumu görülür (145). Aktinik keratozların görülmesi ilerleme aşamasına denk gelmektedir ve karsinojen maruziyetinin devam etmesi halinde invaziv deri kanserine dönüşecek premalign lezyon olarak kabul edilmektedir ve kemoprofilaksi çalışmaları değerlendirilirken bu kitlelerin insidansı ve sayısı hesaplanmaktadır (145,146).

Zeytinyağı, Akdeniz diyetindeki en önemli yağ kaynağıdır (147). Zeytinyağı tüketiminin birçok kanserin düşük insidansı ve prevalansı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (148–150). Bu antitümöral etkiden sorumlu olan maddenin ise zeytinyağı içeriğinde

bulunan skualen olduğu düşünölmüştür. Skualen ile yapılan çalışmalarda ise önemli bir biyoaktif madde olduğu, antioksidan ve antitümöral özellikleri olduğu belirtilmiştir (149). İnvitro çalışmalarda çok etkili bir serbest oksijen tutucu ajan olduğu ve serbest oksijen radikallerini elimine ederek sitoprotektif etki gösterdiği görölmüştür (125,151).

Skualen binlerce yıldır kullanılan bir madde olmasına rağmen kimyasal formölü 1906'da tanımlanmıştır. 1930'da Keijiro Kogami skualenin insan sağlığı üzerine olumlu etkilerini bildirmiştir. 1963'te Nobel ödüllü bilim insanı Paul Kerrer skualenin insan vücudunda da bulunduğunu keşfetmiştir. 1963'te skualenin makrofaj aktive edici etkisi, 1982'de detoksifiye edici etkisi, 1993'te radyasyon maruziyetine karşı koruyucu etkisi, 1995'te UV kaynaklı lipit oksidasyonunu önleyici etkisi gösterilmiştir (152).

Skualenin kolon kanseri, akciğer kanseri, oksidatif DNA hasarı ve deri yaşlanmasına karşı olumlu etkisi hayvan deneylerinde gösterilmiştir (9,10,151). Çalışmamızda ise skaulenin oral ve topikal uygulanmasının UVB ile geliştirilen fare deri kanseri modelindeki etkisini ortaya koymayı amaçladık.

UV ve oksijenle temas eden skualenin antioksidan etkisini kaybederek prooksidan özellikler kazandığı gösterilmiştir (125,153). Bu nedenle skualen düşük hacimli koyu renk cam şişelerde saklanmıştır. Her bir şişe açıldıktan sonra içeriğindeki skualen kısa sürede tüketilerek skualenin hava ve ışık ile minimum teması sağlanmıştır. Bu sayede skualenin antioksidan etkisinin korunması amaçlanmıştır. Bu saklama koşulları önemlidir; çünkü skualenin oksidasyonu sonrası skualen hidroksit ve skualen peroksit bileşikleri oluşmakta ve moleküler düzeyde koruyucu etkisi kalmamakla birlikte aksine oksidan etki nedeniyle hücre hasarı ve yaşlanmasını hızlandırıcı etkiye neden olabilir (125,153).

Sıvı ajanlar peroral verilirken dozun her denekte aynı ve doğru miktarda olmasını garantilemek için oral gavaj yöntemi önerilmektedir (154,155). Mide esneyebilen bir organ olup maksimum hacmi 50 ml/kg (vücut ağırlığının kilogramı başına 50 ml) olarak belirtilmiştir. Ancak farede gavajla güvenli ve iyi uygulama olarak önerilen doz 10 ml/kg ve altıdır (156). 20 gram vücut ağırlığı olan fare için bu değer 0,2 ml'ye karşılık gelmektedir.

Literatürde skualenin sistemik etkili olması için önerilen oral doz diyet miktarının %5'idir (152). Ortalama 20-25 g ağırlığındaki bir BALB/c farenin günlük beslenme miktarı yaklaşık 3 gramdır (12 g/100 g vücut ağırlığı/gün) (157). Bu miktarın %5'i ise 0,15

gram olarak hesaplanmaktadır. Skualenin 0,2 ml'si ise yaklaşık olarak 0,17 gram ağırlıktadır (858 kg/m³). Böylece oral yolla verilen 0,2 ml skualenin sistemik etki oluşturmak için yeterli dozda olduğu görülmektedir.

Midenin fazla doldurulması pasif reflü, aspirasyon pnömonisi, farengeal, özefageal irritasyon ve gastrik perforasyon riski bulundurmaktadır (154). Bu komplikasyonlardan korunmak için çalışmamızda midenin aşırı doldurulmasından kaçınılmıştır. Aynı zamanda da skualenin sistemik etkili dozunun alt limitinin üzerinde kalınmıştır.

Literatürde topikal uygulama için standart bir doz saptanamamakla birlikte yüksek dozlarda bile iritan ya da toksik olmadığı gösterilmiştir (152). Çalışmamızda denek başına her seansta 0,5 ml topikal skualen kullanılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar, 0,2 ml asetonun (topikal) deri kanseri gelişimine etkisi olmadığını göstermiştir (70,136). Bu nedenle topikal skualen uygulanan gruplara skualen çözücüsü olarak aseton uygulanmıştır. Gruplar arasında uygulama farkı olmaması amacıyla asetonla çözülmüş topikal skualen uygulanmayan gruplara ise sadece topikal aseton diğer gruplarla aynı miktarda uygulanmıştır.

Literatürdeki skuamöz hücreli deri kanseri kemoprofilaksi çalışmalarında aktinik keratoz lezyonları değerlendirmeye alınmış, karsinojenlerin maruziyetinin devam etmesi durumunda bu lezyonların invaziv SHK'ye dönüşecekleri belirtilmiştir (76,109,112). Bu nedenle çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak aktinik keratoz lezyonlarının prevalansı ve sayısı dikkate alınarak istatistiki incelemeler bu tümörlere yönelik yapılmıştır. Farelere uygulanan UV seanslarının 8. haftasında kontrol grubu ile oral skualen grubunda sırt derilerinde aktinik keratoz ile uyumlu tümörler görülmüştür. Topikal skualen grubu ile topikal+oral skualen grubunda ise bu tümörler 2 hafta daha geç ortaya çıkmıştır. On ikinci haftadan deney sonuna kadar olan süreçte ise tüm gruplarda tümör prevalansı %100 olarak saptanmıştır. On sekizinci haftada tümör sayıları değerlendirildiğinde ise 2. ve 4. gruplarda belirgin bir şekilde daha az tümör olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Bu nedenle topikal olarak uygulanan skualenin aktinik keratoz lezyonları sayısında belirgin azalma oluşturduğu sonucuna ulaşabiliriz.

Budiyanto ve arkadaşları UVB ile farelerde geliştirilen deri karsinogenezi modelinde skualenin temel kaynağı olan zeytinyağını topikal olarak kullanmışlar ve kemoprofilaktik etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada zeytinyağının topikal olarak uygulanmasının deri tümörlerinin ortaya çıkışını 2 hafta geciktirdiği; ancak deney sonunda tümör insidansının

tüm gruplarda aynı (% 100) olduğu belirtilmiştir. Yine de deney sonunda gruplar arasında tümör sayısı olarak anlamlı derecede fark bulunmuş ve topikal uygulanan zeytinyağının UVB ile deri karsinogenezine karşı kemoprofilaktik etkisi olduğu belirtilmiştir (111). Zeytinyağının içeriğindeki önemli moleküllerden skualenin kemoprofilaktik etkisinin gözlemlendiği çalışmamızda da topikal skualen uygulanan gruplarda tümörler kontrol grubuna göre 2 hafta daha geç ortaya çıkmış, deney sonunda tümör insidansı tüm gruplarda aynı olsa da tümör sayısı açısından anlamlı fark bulunmuştur.

Kolon ve akciğer gibi organların malignitelerinin kemoprofilaksisinde oral skualenin kemoprofilaktik etkisi gösterilmiş olsa da literatürde deri kanseri modelinde oral skualenin kemoprofilaktik etkisini araştıran çalışma bulunamamıştır (9,10). Çalışmamızdaki oral skualen verilen gruplarda, skualen sistemik etkili minimum dozun üzerinde verilmesine rağmen kemoprofilaktik etki gözlenememiştir. Bunun nedeni topikal skualen uygulanan gruplarda skualenin deride bariyer görevi görerek UV ışınlarının deriye ulaşmasını önlemesi olabilir. Aynı zamanda topikal olarak uygulandığında doğrudan hedef dokuya ulaşması, oral uygulamaya kıyasla deri dokusu düzeyinde daha yüksek konsantrasyonda olması ve böylece daha fazla sitoprotektif ve antioksidan etki göstermiş olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda UV uygulanan ve herhangi bir koruyucu uygulanmayan kontrol grubunda 8. haftada aktinik keratoz gelişmesi bilgisi literatür ile uyumlu görünmektedir. Düşük doz UV verilenler dışındaki çalışmalarda 8-10. haftalarda aktinik keratoz görülmeye başlanmıştır (76).

Deri sürekli olarak UV ışınlarına maruz kalır ve derideki lipidler, proteinler ve DNA UV kaynaklı hasarlara karşı son derece duyarlıdır. UV ışınının zararlı etkileri serbest radikallerin oluşumu aracılığıyla gerçekleşir. Lipit peroksidasyonunun kanser gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Çoklu doymamış yağ asitleri, hücre zarlarında ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerde bol miktarda bulunur. Bazı antioksidanların farelerde UV ışınının indüklediği deri kanserinin gelişimini azaltabildiği bulgusu, bu işlemde oksidatif reaksiyonların önemli olduğunu ve deri kanserini önleme hedefleri olarak kullanılabileceğini göstermektedir (2). Diyet ürünlerinde bulunan yeşil çay, üzüm çekirdeği özü, silimarin gibi çeşitli antioksidanların hayvan modellerinde UV kaynaklı deri kanseri oluşumunu baskılayabildiği gösterilmiştir (71). Skualen altı adet konjuge olmamış çifte bağ içermekte olup doğadaki doymamışlık oranı en yüksek lipidlerden biridir (158).

Bu sayede, UV etkisi ile hücrede oluşan serbest oksijen radikallerini tutarak etkisiz hale getirip DNA'yı ve hücreyi korumaktadır (127). Çalışmamızda topikal olarak uyguladığımız skualenin kemoprofilaktik etki göstermesinin nedenlerinden birinin bu antioksidan etkisi olduğunu düşünmekteyiz.

Cilde kronik UVB uygulanması epidermal kalınlığı artırmaktadır. Epidermal hiperplazi kronik UV maruziyetine karşı vücudun savunma yanıtıdır. Bu artışta epidermal hücre tabakalarının sayısının artması ve doku ödemi etken olarak gösterilmektedir (83,159). Yapılan çalışmalarda skualenin hücrelerde anormal hiperproliferasyonu azalttığı gösterilmiştir (152). Çalışmamızda fare deri örneklerinde normal olarak saptanan bölgelerde yapılan ölçümlerde stratum korneum hariç epidermis kalınlığı yaklaşık 22-26 µm aralığında saptanmıştır. Epidermal hiperplazi alanlarında ise 1,2,3,4. gruplardaki median değerler sırasıyla 330, 130, 320 ve 150 µm olarak ölçülmüştür. Skualenin koruyucu etkisinin gözlemlendiği 2. ve 4. gruplarda bile epidermis kalınlığı normal deriye göre yaklaşık 5-6 kat artmış olup diğer gruplarda bu artış 13-14 kata kadar çıkmaktadır. Bu gözlemler sonucunda topikal skualen uygulamasının UVB'nin epidermal hiperplazi etkisini sınırladığını söyleyebiliriz. Skualen cilt yüzeyine uygulandığında epidermisten yüksek oranda emilmekte ve deride yağlı bir etki bırakmadan deri elastikiyetini ve yumuşaklığını artırmaktadır. Aynı zamanda deride ince bir film tabakası oluşturarak UV ışınlarına karşı bariyer görevi görmektedir (158). Bu bariyer görevi ile derideki antioksidan ve sitoprotektif etkiden dolayı UV ışınlarının epidermal hiperplaziye artırıcı etkisini sınırlamış olabilir. Skualen UV ışınlarının deriye ulaşmasını sınırladığından epidermal hiperplazi daha az uyarılmaktadır. Bu etki muhtemelen hem keratinosit çoğalmasını sınırlayarak hem de ödemi azaltarak oluşmaktadır.

UV ile indüklenen immünsüpresyonun deri kanseri oluşumu patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir. Gensler ve arkadaşları UV ile fare deri tümörü modelinde topikal uygulanan E vitamininin immünsüpresyonu ve karsinogenezi azalttığını göstermişlerdir. Deri dokusunda immün sistem hücrelerinin artışının kansere karşı savunma mekanizması olması dolayısıyla kemoprofilaktik etkiyi gösteren bir bulgu olduğunu belirtmişlerdir (8). Deneysel çalışmalarda skualenin immün sistem performansını ve makrofaj fonksiyonunu artırdığı, immün sistem hücrelerinin biyomembranlarını fagositoz sırasındaki oksidatif stresten koruduğu, retikuloendotelial sistemi stimüle ettiği gösterilmiştir. Çalışmamızda topikal skualen uygulanan gruplarda belirgin derecede inflamatuvar hücre artışı görülmesi

bu bilgiyi destekler niteliktedir ve topikal skualenin, uygulandığı bölgede UV ışınlarının immünsüpresif etkisini baskıladığını göstermektedir.

p53 genindeki nokta mutasyonları insan kanserlerinde en sık görülen genetik değişikliktir ve rolü en iyi tanımlanmış olanlardan biridir (160). Akciğer, kolon, özefagus, meme, karaciğer, retiküloendotelyal sistem ve deri maligniteleri bu mutasyonların sebep olduğu bazı tümörlerdir. Mutant p53'ün yüksek oranda saptandığı kanserler radyoterapi ve kemoterapiye direnç ile ilişkilidir (161).

UV ile indüklenmiş p53 mutasyonları deri kanseri gelişiminde önemli rol oynar. Bu mutasyonlar premalign lezyon olan aktinik keratozda da görülmekle birlikte tümörler makroskopik olarak ortaya çıkmadan aylar önce UV uygulanmış farelerin deri dokusunda bulunduğu gösterilmiştir (162,163). Çalışmamızdaki premalign aktinik keratoz lezyonlarında da mutant p53 yoğun miktarda saptanmıştır.

UV ile indüklenmiş deri kanserlerinde en sık etkilenen gen p53 tümör süpresör genidir. UV uygulaması öncesi derilerine topikal olarak SPF-15 güneş koruyucu krem uygulanan farelerde p53 mutasyon sıklığının anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir (164). Skualen uyguladığımız gruplarda mutant p53 içeren hücre oranının düşük olacağı hipotezi ile çalışmayı planladık.

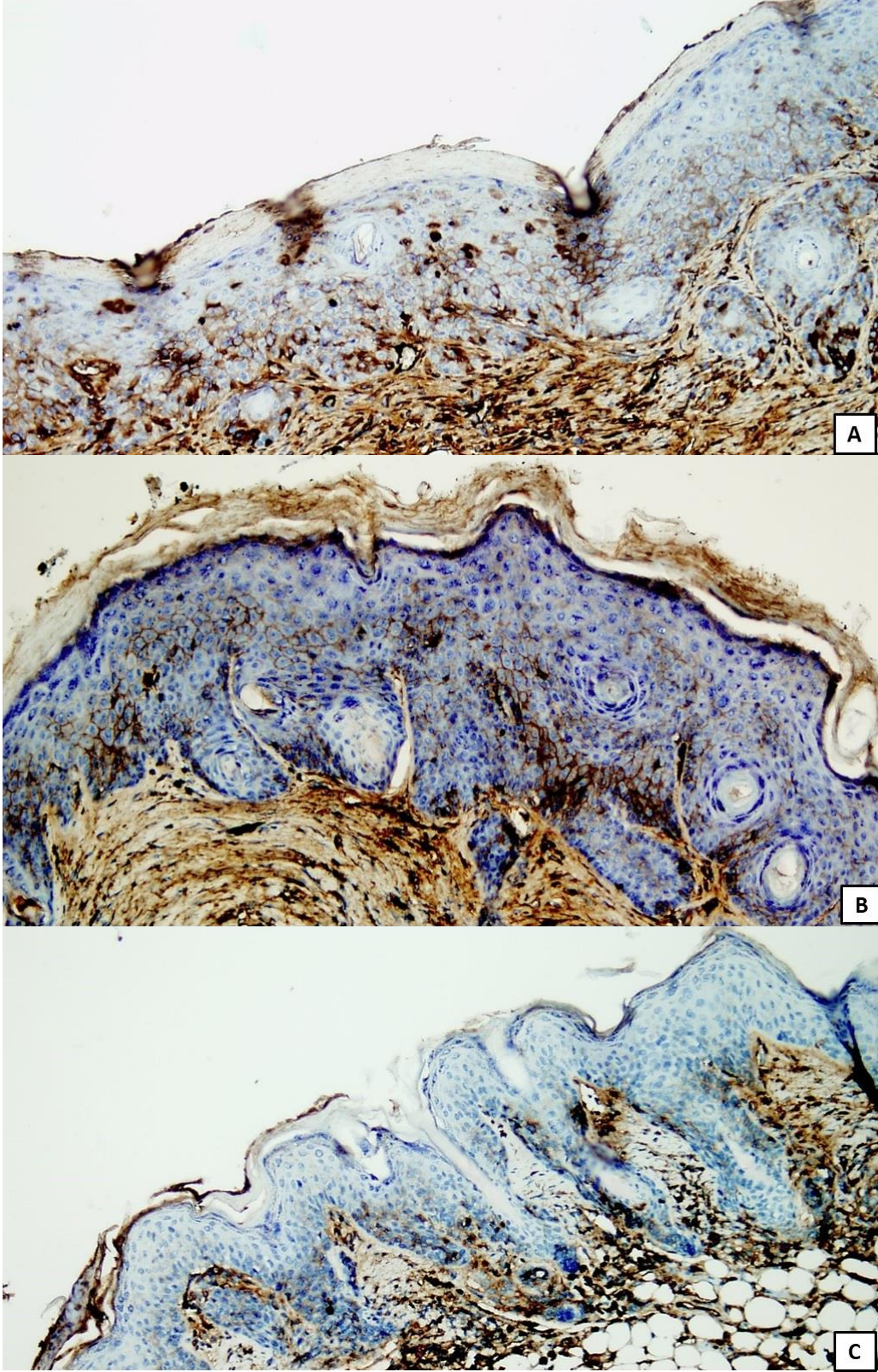
Çalışmamızda anti-p53 antikoru ile yapılan inkübasyon sonrası mikroskopik incelemede epidermal keratinositlerde hem nükleer hem de sitoplazmik tutulum izlenmiştir. Tutulan hücre oranları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p=0,381$).

Budiyanto ve arkadaşlarının farelerde UVB ile cilt karsinogenezine karşı zeytinyağının kemoprofilaktik etkisini araştırdıkları çalışmada topikal uygulanan zeytinyağının kemoprofilaktik etki gösterdiği, deney sonunda tümör sayısını anlamlı olarak azalttığı gösterilmiş; ancak mutant p53 düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (111). Çalışmamızda da benzer şekilde mutant p53 düzeyleri açısından gruplar arası anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Literatürde deneysel çalışmalarda UV ışını sonlandırıldıktan sonra mutant p53 içeren hücre oranlarının zamanla azaldığı gösterilmiştir. Bu azalmanın, mutant protein elimine edilerek ya da mutant p53 içeren hücrelerin diferansiyasyonu ve deskuamasyonu ile oluşmaktadır. Ancak bu azalmanın genellikle çok yavaş olduğu ve mutant p53

boyanmasının UV maruziyeti sonlandırıldıktan sonra 22 haftaya kadar devam edebildiği bildirilmiştir (165). Bu durum mutant p53 içeren hücre açısından gruplar arası fark olmaması bulgusunu kısmen açıklayabilir; çünkü hücre malign dönüşümden korunsa bile nükleus ve sitoplazmasında mutant p53 proteini birikmiş olarak aylarca saptanabilmektedir.

Malignitelerin patolojik incelemesinde anti-p53 immünohistokimyasal çalışmalarda genellikle nükleer birikim beklenir. Araştırmalar göstermiştir ki nükleus ve sitoplazma arasında sürekli geçiş yapan bu protein sitoplazmada da birikebilmektedir (166). Hatta p53 sitoplazmik birikiminin kemoterapiye kötü yanıt, tümör metastazı ve uzun dönemde düşük sağkalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir (161). DNA hasarı onarılamayacak durumdaysa p53 proteini sitoplazmaya geçerek mitokondriyal apoptoz yolunu başlatır ve hücreyi ölüme götürür. Yine bu aşamada olan hücrede immünohistokimyasal yöntemle sitoplazmik mutant p53 saptanabilir (167).



Resim 19: p53 boyanma paterni

A)Nükleer ve sitoplazmik **B)**Sitoplazmik **C)**Nükleer

Çalışmamızda kullanılan anti-p53 (PAb240, Invitrogen) antikoru ile yapılan bir çalışmada bu antikorun mutant p53'e spesifik olmakla birlikte mutant olmayan (wild-type) p53'ün denatüre formuna da bağlanabildiği gösterilmiştir (160). Bu durum da preparatlarımızdaki sitoplazmik boyanma oranını artıran bir etmen olarak düşünülmüştür.

Oral olarak uygulanan skualenin tümör sayısı, epitel kalınlığı, inflamatuvar hücre oranı gibi ölçümlerde anlamlı bir fark yaratamamasının bir nedeni doz olabilir. Fare için önerilen peroral sıvı limitini (0,2 ml) aşmadan ve skualenin minimum etkili oral dozunun üzerinde kalarak (0,15 mg) oral skualen uygulanmış olmasına rağmen anlamlı bir etki gösterilememiştir. Daha yüksek dozlar, daha sık seanslar halinde oral gavaj yöntemiyle verilebilir. Farklı oral dozlarda tasarlanmış çalışmalarda deri kanserine karşı etkisi araştırılabilir. Ayrıca bazı çalışmalarda skualenin suya karıştırılarak farelerin diyetine eklendiği belirtilmiş olmasına rağmen skualen lipid yapıda olup suda çözünmeyen bir maddedir. Bu yolla fareler yeterli miktarda ve sabit bir oranda skualen tüketemeyeceklerdir. Bir başka seçenek ise skualeni farelerin pellet yemlerine karıştırmak olabilir; ancak bu durumda da hava ve ışık ile temas eden skualenin antioksidan ve diğer olumlu etkileri azalabileceğinden ve her fareye sabit miktarda skualen verilme imkanı olmayacağından bu yöntem tercih edilmemiştir. Tüm bu durumları göz önünde bulundurarak oral gavaj yöntemini kullanmayı tercih ettik. Böylece her fareye sabit ve eşit miktarda skualeni peroral yolla vermeyi sağladık. Ancak bu yöntemin de uygulanmasının zor olduğunu vurgulamak önemlidir. Doğru kanül seçimi yapıp doğru teknik uygulansa bile denekler için her zaman özefagus, trakea, mide perforasyonu ve denek kaybı ihtimali bulunmaktadır. Deney süresinin uzunluğu ve çok fazla sayıda gavaj uygulaması gerektiği göz önünde bulundurulursa bu yöntemin denek kaybını artırabileceği ve çok güvenilir bir yöntem olmadığı görülebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

UV karsinogenez yöntemi ile farelerde aktinik keratoz lezyonları oluşturulabilir. Maruziyete devam edildiği takdirde invaziv karsinomlara dönüşüm gerçekleşir. Kemoprofilaksi çalışmaları değerlendirilirken premalign aktinik keratoz lezyonlarının sayısı ve insidansı değerlendirilmektedir.

Literatürde akciğer kanseri, kolon kanseri ve iki aşamalı kimyasal deri karsinogenezine karşı koruyucu etkisi ile antioksidan ve sitoprotektif etkileri gösterilmiş olan skualenin UVB ile oluşturulan skuamöz hücreli deri kanserine karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır.

Çalışmamız, deri karsinogenezi modellerinde oral skualenin kemoprofilaktik etkisinin araştırıldığı ve UVB ile deri karsinogenezi modelinde topikal skualenin koruyucu etkisinin araştırıldığı literatürdeki ilk çalışmadır. Bu çalışmada topikal skualen uygulanan 2. ve 4. grupta diğer gruplara göre tümör sayısının ve epitel kalınlığının daha az olduğu, inflamatuvar hücre oranının daha fazla olduğu görülmüştür. Tüm bu bilgiler ışığında skualenin topikal uygulanmasının UVB ile geliştirilen deri kanserine karşı kemoprofilaktik etki gösterdiği söylenebilir. Bu etkinin ortaya çıkmasında skualenin UVB'ye karşı deride yaptığı bariyer görevi, antioksidan etkisi, apoptoz indüksiyonu, hücre proliferasyonunun azaltılması, immünsüpresyonun önlenmesi gibi birçok mekanizmanın rol oynadığı düşünülmektedir. Tüm bu bulgular ışığında topikal skualenin deri karsinogenezini tamamen önlemediği; ama tümör oluşumunu geciktirdiği ve oluşacak tümör sayısını azaltabildiğini söylemek daha doğru olacaktır.

UVB ile deri karsinogenezi modelinde topikal uygulanan skualenin inflamatuvar hücre yoğunluğunu artırdığı gösterilmiş olup mutant p53 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Literatürde mutant p53'ün deri karsinogenezinde prediktif olduğunu ve bunun aksini iddia eden çalışmalar bulunmaktadır. Bu nedenle deri karsinogenezi çalışmalarında mutant p53 düzeyinin araştırılması anlamlı ve güvenilir sonuçlar vermeyebilir.

Deri kanseri modelinde skualenin topikal etkisini destekleyici benzer çalışmalar yapılabilir. Skualenin bariyer etkisini ortadan kaldırmak amacıyla UVB uygulamasının hemen ardından topikal skualen uygulanan çalışmalar yapılabilir. Deri kanseri hücre

serilerindeki etkisi in vitro olarak araştırılabilir. Başka kemoprofilaktik ajanlarla birlikte uygulandığındaki etkisi ile kemoterapötik ajanlarla birlikte verilerek mevcut tümörlere karşı tedavi edici etkisi incelenebilir. Skualen içeren preparatların randomize kontrollü olarak uygulandığı prospektif klinik çalışmalar tasarlanabilir.

Topikal skualenin skuamöz hücreli deri karsinomuna karşı koruyucu etkisinin gösterilmiş olması yapılacak sonraki çalışmalar için umut vericidir. Daha fazla prelinik ve klinik çalışmayla desteklendiği takdirde çok daha farklı etki mekanizmaları açıklanabilir, doğru doz ve uygulama şekli konusunda bilgimizi artırmaya yardımcı olabilir.



7.KAYNAKLAR

1. Bowden GT. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2004;4(1):23–35.
2. Bommareddy A, Hora J, Cornish B, Dwivedi C. Chemoprevention by α -santalol on UVB radiation-induced skin tumor development in mice. *Anticancer Res.* 2007;27(4 B):2185–8.
3. Won YK, Ong CN, Shi X, Shen HM. Chemopreventive activity of parthenolide against UVB-induced skin cancer and its mechanisms. *Carcinogenesis.* 2004;25(8):1449–58.
4. Kim RH, Armstrong AW. Nonmelanoma Skin Cancer. *Dermatol Clin.* 2012;30(1):125–39.
5. Xiang F, Lucas R, Hales S, Neale R. Incidence of Nonmelanoma Skin Cancer in Relation to Ambient UV Radiation in White Populations, 1978-2012. *JAMA Dermatology.* 2014;150(10):1063.
6. Kohen R. Skin antioxidants: Their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 1999;53(4):181-92
7. Lopez-Torres M, Thiele JJ, Shindo Y, Han D, Packer L. Topical application of α -tocopherol modulates the antioxidant network and diminishes ultraviolet-induced oxidative damage in murine skin. *Br J Dermatol.* 1998;138(2):207-15.
8. Gensler HL, Magdaleno M. Topical Vitamin E Inhibition of Immunosuppression and Tumorigenesis Induced by Ultraviolet Irradiation. *Nutr Cancer.* 1991;15(2):97-106.
9. Rao C V., Newmark HL, Reddy BS. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis.* 1998;19(2):287–90.
10. Smith TJ, Yang GY, Seril DN, Liao J, Kim S. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis.* 1998 Apr;19(4):703–6.
11. Fuchs E. Scratching the surface of skin development. *Nature.* 2007;445(7130):834-42.
12. McGrath JA, Eady RAJ, Pope FM. Anatomy and Organization of Human Skin. In: *Rook's Textbook of Dermatology.* Blackwell Publishing Inc.; 2008. p. 45–128.
13. Moore KL, Persaud TVN. Development of Skin and Skin Appendages. In: *The Developing Human, Clinically Oriented Embriyology* 8th Edition. Saunders Elsevier; 2015. p. 646–70.
14. Baldi A, Pasquali P, Spugnini E. Embryology and Anatomy of the Skin. In: *Skin Cancer, A Practical Approach.* 2014. p. 1–15.
15. Paletta CE, Pokorny JJ, Rumbolo P. Skin Grafts. In: Mathes SJ, editor. *Plastic Surgery General Principles.* 2006. p. 293–9.

16. Ivanova IA, D'Souza SJA, Dagnino L. Signalling in the epidermis: the E2F cell cycle regulatory pathway in epidermal morphogenesis, regeneration and transformation. *International journal of biological sciences*. 2005;1(2):87-95.
17. Obagi S, Gandhi RK. Skin Rejuvenation and Resurfacing. In: Schliephake H, Ghali GE, Cascarini L, editors. *Maxillofacial Surgery*. Third Edit. Elsevier Inc.; 2017. p. 286–301.
18. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatology*. 2002;12(4):390-9.
19. Chu D. Overview of biology, development, and structure of skin. In: Fitzpatrick TB, editor. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 7th Edition. McGraw- Hill; 2008. p. 57–73.
20. Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and Physiology of the Skin. *J Dermatol Nurses Assoc*. 2011;3(4):203-13.
21. Girolomoni G, Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Lebecque S, Ricciardi-Castagnoli P. Langerhans cells: Still a fundamental paradigm for studying the immunobiology of dendritic cells. In: *Trends in Immunology*. 2002.
22. Mescher AL. Skin. In: *Junquiera's Basic Histology*. McGraw- Hill; 2016. p. 372–3.
23. Kocatürk DÇ, Uysal A, Oltulu F, Özdil B. Deri ve deri eklerinin embriyolojik gelişimi. *Güncel Dermatoloji Derg*. 2016 Aug;1(1):1–10.
24. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):9-29.
25. Barton R. Malignant Tumors of the Skin. In: Mathes SJ, editor. *Plastic Surgery Tumors of the Head, Neck and Skin*. 2006. p. 273–300.
26. Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13(3):332-7.
27. Brash DE, Ziegler A, Jonason AS, Simon JA, Kunala S, Leffell DJ. Sunlight and sunburn in human skin cancer: P53, apoptosis, and tumor promotion. *J Investig Dermatology Symp Proc*. 1996;1(2):136-42.
28. Epstein JH. Photocarcinogenesis, skin cancer, and aging. *J Am Acad Dermatol*. 1983;9(4):487-502.
29. Fitzpatrick TB, Pathak MA, Parrish JA, Mathews-Roth M. Topical and Systemic Approaches to Photoprotection. *J R Soc Med*. 1971;64(8):861-2.
30. Lim HW, Cooper K, Rubenstein R, Hufford D, Downham T, Trancik R, et al. The health impact of solar radiation and prevention strategies: Report of the Environment Council, American Academy of Dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1999;41(1):81-99.
31. Leiter U, Eigentler T, Garbe C. Epidemiology of skin cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2014;810(120):40.
32. Strickland F, Kripke ML. Immune response associated with nonmelanoma skin

- cancer. *Clin Plast Surg*. 1997;24(4):47.
33. Mukhtar H, Agarwal R. Skin cancer chemoprevention. *J Invest Dermatol*. 1996;1(2):14.
 34. Alcalay J, Craig JN, Kripke ML. Alterations in Langerhans Cells and Thy-1+ Dendritic Epidermal Cells in Murine Epidermis during the Evolution of Ultraviolet Radiation-induced Skin Cancers. *Cancer Res*. 1989;49(16):4591-6.
 35. Birkeland S, Storm H. Cancer risk after renal transplantation in the nordic countries, 1964–1986. *Int J Cancer*. 1995;60(2):9.
 36. Hartevelt MM, Bavinck JN, Kootte AM, Vermeer BJ, Vandenbroucke JP. Incidence of skin cancer after renal transplantation in The Netherlands. *Transplantation*. 1990;49(3):506-9.
 37. Königova R, Richterova V. Marjolin's ulcer. *Acta Chir Plast*. 2000;42(3):4.
 38. Nowotarski SL, Feith DJ, Shantz LM. Skin Carcinogenesis Studies Using Mouse Models with Altered Polyamines. *Cancer Growth Metastasis*. 2015;8(Suppl. 1):17–27.
 39. Makhzoumi ZH, Arron ST. Photosensitizing Agents and the Risk of Non-Melanoma Skin Cancer: A Population-Based Case-Control Study. *J Invest Dermatol*. 2013 Aug;133(8):1922–3.
 40. Peters BP, Weissman FG, Gill M a. Pathophysiology and treatment of psoriasis. *Am J Heal Pharm*. 2000;57(7):945-59.
 41. Hall E. From chimney sweeps to astronauts: cancer risks in the work place: the 1998 Lauriston Taylor lecture. *Health Phys*. 1998;75(4):66.
 42. Feltkamp MCW, Broer R, Di Summa FM, Struijk L, Van der Meijden E, Verlaan BPJ, et al. Seroreactivity to epidermodysplasia verruciformis-related human papillomavirus types is associated with nonmelanoma skin cancer. *Cancer Res*. 2003;63(10):2695-700.
 43. Pathak MA, Fitzpatrick TB. The role of natural photoprotective agents in human skin. In: Pathak MA, editor. *Sunlight and Man: Normal and Abnormal Photobiologic Responses*. Tokyo: University of Tokyo Press; 1976. p. 725.
 44. Lloria-Prevatt M, Alberts D. Skin Cancer Prevention. In: Alberts DS, Hess LM, editors. *Fundamentals of Cancer Prevention*. 2nd ed. Springer US; 2008. p. 239–89.
 45. Kornek T, Augustin M. Skin cancer prevention. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2013;11(4):283-96.
 46. Goldsmith L, Koh HK, Bewerse B, Reilley B, Wyatt S, Bergfeld W, et al. Proceedings from the national conference to develop a national skin cancer agenda: American Academy of Dermatology and Centers for Disease Control and Prevention, April 8-10, 1995. In: *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1996;34(5 Pt 1):822-3.
 47. Paolino G, Donati M, Didona D, Mercuri S, Cantisani C. Histology of Non-

Melanoma Skin Cancers: An Update. *Biomedicines*. 2017;5(4):71

48. Lever WF. Tumors and cysts of the epidermis. In: Lever W, Schaumburg-Lever S, editors. *Histopathology of the Skin*. 7th ed. JB. Lippincott; 1990. p. 546.
49. Frierson H, Cooper P. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the lower lip. *Hum Pathol*. 1986;17(4):346.
50. Mendenhall WM, Amdur RJ, Hinerman RW, Werning JW, Malyapa RS, Villaret DB, et al. Skin Cancer of the Head and Neck With Perineural Invasion. *Am J Clin Oncol*. 2007;30(1):93-6.
51. Glogau RG. The risk of progression to invasive disease. *J Am Acad Dermatol*. 2000;42(1 Pt 2):23-4.
52. Loning T, Ikenberg H, Becker J, Gissmann L, Hoepfer I, zur Hausen H. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J Invest Dermatol*. 1985;84(5):417-20.
53. Waldron CA, Shafer WG. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. *Cancer*. 1975;36(4):1386-92.
54. Moriwaki SI, Kraemer KH. Xeroderma pigmentosum - Bridging a gap between clinic and laboratory. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*. 2001;17(2):47-54.
55. Schwartz RA. Keratoacanthoma: a clinico-pathologic enigma. *Dermatol Surg*. 2004;30(2 Pt 2):326-33.
56. Brodland DG, Zitelli JA. Surgical margins for excision of primary cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 1992;27(2 Pt 1):241-8.
57. Sonavane K, Phillips J, Ekshyyan O, Moore-Medlin T, Roberts Gill J, Rong X, et al. Topical Curcumin-Based Cream Is Equivalent to Dietary Curcumin in a Skin Cancer Model. *J Skin Cancer*. 2012;2012:1–9.
58. Chernosky M. Squamous cell and basal cell carcinomas: preliminary study of 3818 primary skin cancers. *South Med J*. 1978;(71):802.
59. Luce EA. Oncologic considerations in nonmelanotic skin cancer. *Clin Plast Surg*. 1995;22(1):39-50.
60. Abide JM, Nahai F, Bennett RG. The meaning of surgical margins. *Plast Reconstr Surg*. 1984;73(3):492-7.
61. Nahhas AF, Scarbrough CA, Trotter S. A review of the global guidelines on surgical margins for nonmelanoma skin cancers. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 2017;10(4):37-46.
62. Cooper SM, Dawber RP. The history of cryosurgery. *J R Soc Med*. 2001;94(4):196-201.
63. Avraham T, Matros E, Mehrara B. Principles of Cancer Management. In: Neligan P, Gurtner G, editors. *Plastic Surgery Principles*. Elsevier Inc.; 2013.

64. Bergh J. Quo vadis with targeted drugs in the 21st century? *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(1):2-5.
65. Balmain A, Yuspa SH. Milestones in skin carcinogenesis: the biology of multistage carcinogenesis. *The Journal of investigative dermatology*. 2014;134(e1):2-7.
66. Strickland PT. Photocarcinogenesis by near-ultraviolet (UVA) radiation in senear mice. *J Invest Dermatol*. 1986;87(2):272-5.
67. Dwivedi C, Maydew ER, Hora JJ, Ramaeker DM, Guan X. Chemopreventive effects of various concentrations of alpha-santalol on skin cancer development in CD-1 mice. *Eur J Cancer Prev*. 2005;14(5):473–6.
68. Dwivedi C, Guan X, Harmsen WL, Voss AL, Goetz-Parten DE, Koopman EM, et al. Chemopreventive effects of α -santalol on skin tumor development in CD-1 and SENCAR mice. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003;12(2):151-6.
69. Abel EL, Angel JM, Kiguchi K, DiGiovanni J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: Fundamentals and applications. *Nat Protoc*. 2009;4(9):1350-62.
70. Zhang X, Bommarreddy A, Chen W, Hildreth MB, Kaushik RS, Zeman D, et al. Chemopreventive effects of sarcophine-diol on ultraviolet B-induced skin tumor development in SKH-1 hairless mice. *Mar Drugs*. 2009;7(2):153–65.
71. Elmetts CA, Athar M. Milestones in photocarcinogenesis. *J Invest Dermatol*. 2013;133(E1):E13–7.
72. Ley RD. Photoreactivation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 May 15;90(10):4337.
73. Cleaver JE. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature*. 1968;218(5142):652-6.
74. Macias E, Rao D, DiGiovanni J. Role of Stat3 in Skin Carcinogenesis: Insights Gained from Relevant Mouse Models. *J Skin Cancer*. 2013;2013:684050.
75. Bruning O, Rodenburg W, Van Oostrom CT, Jonker MJ, De Jong M, Dekker RJ, et al. A range finding protocol to support design for transcriptomics experimentation: Examples of in-vitro and in-vivo murine UV exposure. *PLoS One*. 2014;9(5):e97089.
76. Dwivedi C, Valluri HB, Guan X, Agarwal R. Chemopreventive effects of alpha-santalol on ultraviolet B radiation-induced skin tumor development in SKH-1 hairless mice. *Carcinogenesis*. 2006;27(9):1917–22.
77. Willis I, Menter JM, Whyte HJ. The rapid induction of cancers in the hairless mouse utilizing the principle of photoaugmentation. *J Invest Dermatol*. 1981;76(5):404-8.
78. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;195(3):298–308.
79. Kanjilal S, Pierceall WE, Cummings KK, Kripke ML, Ananthaswamy HN. High Frequency of p53 Mutations in Ultraviolet Radiation-induced Murine Skin Tumors: Evidence for Strand Bias and Tumor Heterogeneity. *Cancer Res*. 1993;53(13):2961-

4.

80. Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S, Sharma HW, Gailani M, Simon JA, et al. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(9):4216-20.
81. Kim I, He Y-Y. Ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cancer: Regulation of DNA damage repair and inflammation. *Genes Dis*. 2014;1(2):188–98.
82. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, et al. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci*. 1991;88(22):10124-8.
83. Rundhaug JE, Fischer SM. Molecular mechanisms of mouse skin tumor promotion. *Cancers (Basel)*. 2010;2(2):436–82.
84. Epstein JH, Epstein WL. Cocarcinogenic effect of ultraviolet light on DMBA tumor initiation in albino mice. *J Invest Dermatol*. 1962;39(455):60.
85. Kripke ML. Antigenicity of Murine Skin Tumors Induced by Ultraviolet Light. *J Natl Cancer Inst*. 1974;53(5):1333-6.
86. Elmetts CA, Bergstresser PR, Tigelaar RE, Wood PJ, Streilein JW. Analysis of the mechanism of unresponsiveness produced by haptens painted on skin exposed to low dose ultraviolet radiation. *J Exp Med*. 1983;158(3):781-94.
87. Kaplan DH, Jenison MC, Saeland S, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. Epidermal Langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity*. 2005;23(6):611–20.
88. Loser K, Apelt J, Voskort M, Mohaupt M, Balkow S, Schwarz T, et al. IL-10 Controls Ultraviolet-Induced Carcinogenesis in Mice. *J Immunol*. 2007;179(1):365-71.
89. Schwarz A, Grabbe S, Aragane Y, Sandkuhl K, Riemann H, Luger TA, et al. Interleukin-12 prevents ultraviolet B-induced local immunosuppression and overcomes UVB-induced tolerance. *J Invest Dermatol*. 1996;106(6):1187-91.
90. Yoshikawa T, Rae V, Bruins-Slot W, Van den Berg JW, Taylor JR, Streilein JW. Susceptibility to effects of UVB radiation on induction of contact hypersensitivity as a risk factor for skin cancer in humans. *J Invest Dermatol*. 1990;95(5):530-6.
91. Cooper KD, Oberhelman L, Hamilton TA, Baadsgaard O, Terhune M, LeVee G, et al. UV exposure reduces immunization rates and promotes tolerance to epicutaneous antigens in humans: relationship to dose, CD1a-DR+ epidermal macrophage induction, and Langerhans cell depletion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(18):8497-501.
92. Ahmad S, Cristensen L, Baron E. History of UV Lamps, Types, and Their Applications. In: Ahmed S, editor. *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment*. 2017. p. 3–11.
93. Guillermo RF, Chilampalli C, Zhang X, Zeman D, Fahmy H, Dwivedi C. Time and dose-response effects of honokiol on UVB-induced skin cancer development. *Drug*

Discov Ther. 2012;6(3):140–6.

94. van Weelden H, de Gruijl FR, van der Putte SCJ, Toonstra J, van der Leun JC. The carcinogenic risks of modern tanning equipment: Is UV-A safer than UV-B? *Arch Dermatol Res*. 1988;280(5):300-7.
95. Sterenborg HJCM, van der Leun JC. Tumorigenesis by a long wavelength UV-A source. *Photochem Photobiol*. 1990;51(3):325-30.
96. Molho-Pessach V, Lotem M. Ultraviolet radiation and cutaneous carcinogenesis. *Curr Probl Dermatol*. 2007;35:14-27.
97. Chun KS, Akunda JK, Langenbach R. Cyclooxygenase-2 inhibits UVB-induced apoptosis in mouse skin by activating the prostaglandin E2 receptors, EP2 and EP4. *Cancer Res*. 2007;67(5):2015–21.
98. Hruza LL, Pentland AP. Mechanisms of UV-Induced Inflammation. *J Invest Dermatol*. 1993;100(1):35-41.
99. Erb P, Ji J, Kump E, Mielgo A, Wernli M. Apoptosis and pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2008;624:283-95.
100. Pupe A, Degreef H, Garmyn M. Induction of Tumor Necrosis Factor- α by UVB: A Role for Reactive Oxygen Intermediates and Eicosanoids. *Photochem Photobiol*. 2003;78(1):68-74.
101. Lee CW, Ko HH, Chai CY, Chen WT, Lin CC, Yen FL. Effect of *Artocarpus communis* extract on UVB irradiation-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. *Int J Mol Sci*. 2013;14(2):3860–73.
102. Moloney SJ, Edmonds SH, Giddens LD, Learn DB. The hairless mouse model of photoaging: evaluation of the relationship between dermal elastin, collagen, skin thickness and wrinkles. *Photochem Photobiol*. 1992;56(4):505-11.
103. Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2005;571(1–2 SPEC. ISS.):153–73.
104. Afaq F, Katiyar SK. Polyphenols: skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. *Mini Rev Med Chem*. 2011;11(14):1200-15.
105. Yin B, Jiang X. Telomere shortening in cultured human dermal fibroblasts is associated with acute photodamage induced by UVA irradiation. *Postep Dermatologii i Alergol*. 2013;30(1):13-18.
106. Wattenberg LW. Inhibition of Carcinogenesis by Naturally-Occurring and Synthetic Compounds. In: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II*. 1990.
107. Hora JJ, Maydew ER, Lansky EP, Dwivedi C. Chemopreventive Effects of Pomegranate Seed Oil on Skin Tumor Development in CD 1 Mice. *J Med Food*. 2003;6(3):157–61.
108. Katiyar SK, Korman NJ, Mukhtar H, Agarwal R. Protective effects of silymarin

- against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(8):556–66.
109. Kundoor V, Zhang X, Bommareddy A, Khalifa S, Fahmy H, Dwivedi C. Chemopreventive effects of sarcotriol on ultraviolet B-induced skin tumor development in SKH-1 hairless mice. *Mar Drugs.* 2007;5(4):197–207.
 110. Barthelman M, Chen W, Gensler HL, Huang C, Dong Z, Bowden GT. Inhibitory effects of perillyl alcohol on UVB-induced murine skin cancer and AP-1 transactivation. *Cancer Res.* 1998;58(4):711–6.
 111. Budiyo A, Nu A, Wu A, Bito T, Nikaido O, Osawa T, et al. Protective effect of topically applied olive oil against photocarcinogenesis following UVB exposure of mice. *Carcinogenesis.* 2000;21(11):2085–90.
 112. Koul A, Kaur N, Chugh NA. Folic Acid Modulates DMBA/TPA-Induced Changes in Skin of Mice: A Study Relevant to Carcinogenesis. *J Diet Suppl.* 2017;0211(December):16.
 113. Lu Y-P, Lou Y-R, Xie J-G, Peng Q-Y, Liao J, Yang CS, et al. Topical applications of caffeine or (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 17;99(19):12455–60.
 114. Patil CR, Sonara BM, Mahajan UB, Patil KR, Patil DD, Jadhav RB, et al. Chemomodulatory potential of bartogenic acid against DMBA/Croton oil induced two-step skin carcinogenesis in mice. *J Cancer.* 2016;7(14):2139–47.
 115. Chilampalli C, Guillermo R, Zhang X, Kaushik RS, Young A, Zeman D, et al. Effects of magnolol on UVB-induced skin cancer development in mice and its possible mechanism of action. *BMCCancer.* 2011;11:456.
 116. Khan S, Katiyar S, Agarwal R, Mukhtar H. Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer. *Cancer Res.* 1992;4050–2.
 117. Gamal-Eldeen AM, Fouad LM, El-Daly SM, El-Hussieny EA, Denshary ES El. Photodynamic therapeutic role of indocyanine green in tumor-associated inflammation in skin cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014;11(2):239–49.
 118. Dhanalakshmi S, Mallikarjuna GU, Singh RP, Agarwal R. Silibinin prevents ultraviolet radiation-caused skin damages in SKH-1 hairless mice via a decrease in thymine dimer positive cells and an up-regulation of p53-p21/Cip1 in epidermis. *Carcinogenesis.* 2004;25(8):1459–65.
 119. Gu M, Singh RP, Dhanalakshmi S, Mohan S, Agarwal R. Differential effect of silibinin on E2F transcription factors and associated biological events in chronically UVB-exposed skin versus tumors in SKH-1 hairless mice. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(August):2121–9.
 120. Passi S, De Pità O, Puddu P, Littarru GP. Lipophilic antioxidants in human sebum and aging. *Free Radic Res.* 2002;36(4):471–7.
 121. Gershbein LL, Singh EJ. Hydrocarbons of dogfish and cod livers and herring oil. *J*

Am Oil Chem Soc. 1969;46(10):554-7.

122. Pragst F, Auwärter V, Kießling B, Dyes C. Wipe-test and patch-test for alcohol misuse based on the concentration ratio of fatty acid ethyl esters and squalene CFAEE/CSQin skin surface lipids. In: Forensic Science International. 2004.
123. Blasco L, Duracher L, Forestier JP, Vian L, Mart-Mestres G. Skin constituents as cosmetic ingredients. Part II: A study of bio-mimetic monoglycerides behavior at the squalene-water Interface by the “pendant drop” method in a dynamic mode. J Dispers Sci Technol. 2006;27(6):811-5.
124. Rissmann R, Oudshoorn MHM, Kocks E, Hennink WE, Ponec M, Bouwstra JA. Lanolin-derived lipid mixtures mimic closely the lipid composition and organization of vernix caseosa lipids. Biochim Biophys Acta - Biomembr. 2008;1778(10):2350-60.
125. Ekanayake Mudiyanse S, Hamburger M, Elsner P, Thiele JJ. Ultraviolet A induces generation of squalene monohydroperoxide isomers in human sebum and skin surface lipids In Vitro and In Vivo. J Invest Dermatol. 2003;120(6):915–22.
126. Kohno Y, Egawa Y, Itoh S, Nagaoka S ichi, Takahashi M, Mukai K. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab. 1995;1256(1):52-6.
127. Kelly GS. Squalene and its potential clinical uses. Altern Med Rev. 1999;4(1):29–36.
128. Auffray B. Protection against singlet oxygen, the main actor of sebum squalene peroxidation during sun exposure, using Commiphora myrrha essential oil. Int J Cosmet Sci. 2007;29(1):23-9.
129. Van Duuren BL, Goldschmidt BM. Cocarcinogenic and tumor-promoting agents in tobacco carcinogenesis. J Natl Cancer Inst. 1976 Jun;56(6):1237–42.
130. Murakoshi M, Nishino H, Tokuda H, Iwashima A, Okuzumi J, Kitano H, et al. Inhibition by squalene of the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse-skin carcinogenesis. Int J cancer. 1992 Dec 2;52(6):950–2.
131. Nakagawa M, Yamaguchi T, Fukawa H, Ogata J, Komiyama S, Akiyama S, et al. Potentiation by squalene of the cytotoxicity of anticancer agents against cultured mammalian cells and murine tumor. Jpn J Cancer Res. 1985 Apr;76(4):315–20.
132. Strandberg TE, Tilvis RS, Miettinen TA. Variations of hepatic cholesterol precursors during altered flows of endogenous and exogenous squalene in the rat. Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab. 1989;1001(2):150-6.
133. Kritchevsky D, Moyer AW, Tesar WC. Squalene feeding in experimental atherosclerosis. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1954;2(4):340-3
134. Strandberg TE, Tilvis RS, Miettinen T a. Metabolic variables of cholesterol during squalene feeding in humans: comparison with cholestyramine treatment. J Lipid Res. 1990;31(9):1637-43.

135. Zhao J-G, Zhang Y-Q. Inhibition of the flavonoid extract from silkworm cocoons on DMBA/UVB-induced skin damage and tumor promotion in BALB/c mice. *Toxicol Res (Camb)*. 2015;4(4):1016–24.
136. Lowe NJ, Connor MJ, Breeding J, Chalet M. Inhibition of ultraviolet-B epidermal ornithine decarboxylase induction and skin carcinogenesis in hairless mice by topical indomethacin and triamcinolone acetonide. *Cancer Res*. 1982;42(10):3941–3.
137. Fawcett A. Guideline 22 Guidelines for the Housing of Mice in Scientific Institutions Table of Contents. *ARRP Guidel*. 2012.
138. Miller ML, Andringa A, Baxter CS. Critical comparison of histological and morphometric changes in sencar mouse epidermis in response to n-dodecane, 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate and mezerein. *Carcinogenesis*. 1988;9(11):1959–65.
139. Apalla Z, Nashan D, Weller RB, Castellsagué X. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. *Dermatology and Therapy*. 2017;7(Suppl 1):5-19.
140. Roest MAB, Keane FM, Agnew K, Hawk JLM, Griffiths WAD. Multiple squamous skin carcinomas following excess sunbed use. *J R Soc Med*. 2001;94(12):636-7.
141. Ibiebele TI, van der Pols JC, Hughes MC, Marks GC, Williams GM, Green AC. Dietary pattern in association with squamous cell carcinoma of the skin: a prospective study. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(5):1401-8.
142. Theisen C. Chemoprevention: What's in a name? *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(10):743.
143. Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc*. 1976;35(6):1332-8.
144. Forbes PD. Relevance of animal models of photocarcinogenesis to humans. *Photochem Photobiol*. 1996;63(4):357-62.
145. Kemp CJ. Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells. *Semin Cancer Biol*. 2005;15(6):460–73.
146. Arora N, Bansal MP, Koul A. Modulatory effects of *Azadirachta indica* leaf extract on cutaneous and hepatic biochemical status during promotion phase of DMBA/TPA-induced skin tumorigenesis in mice. *Indian J Biochem Biophys*. 2013;50(2):105-13.
147. Perez-Jimenez F, Alvarez De Cienfuegos G, Badimon L, Barja G, Battino M, Blanco A, et al. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *European Journal of Clinical Investigation*. 2005;35(7):421-4.
148. Escrich E, Ramírez-Tortosa MC, Sánchez-Rovira P, Colomer R, Solanas M, Gaforio JJ. Olive oil in cancer prevention and progression. *Nutrition Reviews*. 2006;64(4):40-52.

149. Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Würtele G, Spiegelhalder B, et al. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol.* 2000;1(2):107-12.
150. Sotiroudis TG, Kyrtopoulos SA. Anticarcinogenic compounds of olive oil and related biomarkers. *European Journal of Nutrition.* 2008;47(Suppl 2):69-72.
151. Warleta F, Campos M, Allouche Y, Sánchez-Quesada C, Ruiz-Mora J, Beltrán G, et al. Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(4):1092–100.
152. Naziri E, Consonni R, Tsimidou MZ. Squalene oxidation products: Monitoring the formation, characterisation and pro-oxidant activity. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2014;116(10):1400-11.
153. Turner P V, Brabb T, Pekow C, Vasbinder M a. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2011;50(5):600-13.
154. McConnell EL, Basit AW, Murdan S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60(1):63-70.
155. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol.* 2001;21(1):15-23.
156. Gunes F. Medical use of squalene as a natural antioxidant. *J Marmara Univ Inst Heal Sci.* 2013;3(4):220–8.
157. Yan L, Combs GF, DeMars LC, Johnson LK. Effects of the physical form of the diet on food intake, growth, and body composition changes in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2011;50(4):488-94.
158. Boussouira B, Pham DM. Squalene and skin barrier function: From molecular target to biomarker of environmental exposure. In: *Skin Stress Response Pathways: Environmental Factors and Molecular Opportunities.* 2016.
159. Imokawa G, Ishida K. Biological mechanisms underlying the ultraviolet radiation-induced formation of skin wrinkling and sagging I: Reduced skin elasticity, highly associated with enhanced dermal elastase activity, triggers wrinkling and sagging. *Int J Mol Sci.* 2015;16(4):7753–75.
160. Gannon J V, Greaves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J.* 1990;9(5):1595-602.
161. O’Brate A, Giannakakou P. The importance of p53 location: Nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resistance Updates.* 2003;6(6):313-22.
162. Ananthaswamy HN. Sunlight and skin cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2001;1(2):49.

163. Ananthaswamy HN, Loughlin SM, Ullrich SE, Kripke ML. Inhibition of UV-induced p53 mutations by sunscreens: Implications for skin cancer prevention. In: *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 1998;3(1):52-6.
164. Ananthaswamy HN, Loughlin SM, Cox P, Evans RL, Ullrich SE, Kripke ML. Sunlight and skin cancer: Inhibition of p53 mutations in UV-irradiated mouse skin by sunscreens. *Nat Med*. 1997;3(5):510-4.
165. Melnikova VO, Pacifico A, Chimenti S, Peris K, Ananthaswamy HN. Fate of UVB-induced p53 mutations in SKH-hr1 mouse skin after discontinuation of irradiation: Relationship to skin cancer development. *Oncogene*. 2005;24(47):7055-63.
166. Bosari S, Viale G, Bossi P, Maggioni M, Coggi G, Murray JJ, et al. Cytoplasmic accumulation of p53 protein: An independent prognostic indicator in colorectal adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86(9):681-7.
167. Comel A, Sorrentino G, Capaci V, Del Sal G. The cytoplasmic side of p53's oncosuppressive activities. *FEBS Letters*. 2014;588(16):2600-9.