T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı



Merkel Hücreli Karsinomda Tanısal ve Prognostik Belirteçler

UZMANLIK TEZİ

Dr. Begüm Yeni Erdem

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Şule Öztürk Sarı

İSTANBUL
2022

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Merkel Hücreli Karsinomda Tanısal ve Prognostik Belirteçler

UZMANLIK TEZİ

Dr. Begüm Yeni Erdem

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Şule Öztürk Sarı

İSTANBUL
2022

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) koordinasyon birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 38402).

TEŞEKKÜR

Asistanlık dönemim boyunca yetişmemde emeği geçen, tüm bilgi ve tecrübelerini her fırsatta aktarmayı bir vazife olarak bilen tüm hocalarıma ve uzmanlarıma,

Tez sürecimde her zaman bana destek olan, her aşamada fikir ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam, tez danışmanım Sn. Doç. Dr. Şule Öztürk Sarı'ya,

Oluşturduğu zengin arşiv ile çalışmamızın temelini oluşturan, engin bilgisiyle bize daima doğru yolu gösteren Sn. Prof. Dr. Nesimi Büyükbabani'ye,

Deneyimi ve değerli fikirleriyle çalışmamızda bize destek olan Sn. Prof. Dr. Yasemin Özlük'e,

Klinik bilgilere ulaşmamda bana büyük yardımları dokunan İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü'nde görevli Sn. Prof. Dr. Pınar Saip, Uzm. Dr. Melin Aydan Ahmed ve İstanbul Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda görevli Sn. Uzm. Dr. Erol Kozanoğlu'na,

Her zaman çok keyifli ve yardımsever bir çalışma ortamı yaratan sevgili asistan arkadaşlarıma,

Tezimin preanalitik sürecinde arşivimizden iade edilen konsültasyonlara ait parafin blokların immünhistokimyasal incelemeler yapabilmem için tekrar tarafıma teslimini sağlayan Sn. Dr. Özerk Doğuş Görgün, Dr. Ali Yılmaz Altay, Dr. Pelin Yıldız, Dr. Adnan Erim ve Dr. Tamer İmamoğlu'na,

Teknik çalışmalardaki yardımlarından ötürü Sn. Jülide Hocaoğlu, Elif Okutan Akcan ve Davut Özbek'e,

Arşiv çalışmalarındaki katkılarından ötürü Sn. Balabey Kalaçay ve emekli Necati Üzüm'e,

Her zaman sırtımı yaslayabildiğim, eğitim ve mesleki hayatımdaki en büyük destekçilerim olan annem ve babama,

Öneri ve düşünceleriyle yaptığım işe her fırsatta katkıda bulunan, benden asla yardımını esirgemeyen, hayattaki en büyük destekçilerimden biri olan yol arkadaşım, canım eşim Dr. Ozan Erdem'e sonsuz teşekkürlerimle…

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **İİ**

İÇİNDEKİLER ..... **İİİ**

KISALTMALAR ..... **Vİ**

TABLO LİSTESİ ..... **Vİİ**

GRAFİK LİSTESİ ..... **Vİİİ**

ŞEKİL LİSTESİ ..... **İX**

RESİM LİSTESİ ..... **X**

BÖLÜM I **1**

I. ÖZET 1

II. ABSTRACT 3

BÖLÜM II **5**

I. GİRİŞ 5

II. GENEL BİLGİLER 8

A. Tanım 8

A1. Merkel Hücreli Karsinom 8

A2. Nodal MHK 8

B. Patogenez 9

B1. Hücre Kökeni 9

B2. Etiyopatogenez 11

C. Epidemiyoloji 14

C1. Dünyada Merkel Hücreli Karsinom 14

C2. Türkiye'de MHK 16

D. Risk Faktörleri 16

E. Klinik Özellikler 17

F. Histopatolojik Özellikler 18

G. Tanıda Kullanılan İmmünhistokimyasal Belirteçler 19

H. Moleküler Gelişmeler 21

I. Evreleme 22

J. Prognostik Faktörler 24
J1. Klinik Faktörler 24
J2. Histopatolojik Faktörler 24
K. Tedavi ve Takip 25
K1. Cerrahi Tedavi 25
K2. Sistemik Tedavi 26
K3. Güncel Çalışmalar 26
K4. Hastaların Takibi 27
L. Çalışmada Kullanılan İmmünhistokimyasal Belirteçlerle İlgili Genel Bilgiler 28
L1. Merkel Cell Polyomavirüs 28
L2. SK20 29
L3. p53 29
L4. Rb1 30
L5. Ki67 31

BÖLÜM III 32

GEREÇ VE YÖNTEM 32
I. Çalışma Grubunun Oluşturulması 32
II. Klinik Parametreler 32
III. Histopatolojik Değerlendirme 33
IV. İmmünhistokimyasal Yöntem 33
V. İmmünhistokimyasal Değerlendirme 36
VI. İstatistiksel Analiz 39

BÖLÜM IV 40

BULGULAR 40
I. Tanımlayıcı İstatiksel Bulgular 40
A. Demografik ve Klinik Bulgular 40
B. Histopatolojik Bulgular 44
C. İmmünhistokimyasal Bulgular 46
II. Analitik İstatistiğe Ait Bulgular 50
A. Kütane ve Nodal MHK'lerin immünhistokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması 50
B. MCPyV (+) ve MCPyV (-) Grupların Belirlenmesi 50
C. MCPyV (+) ve MCPyV (-) Gruplara Göre Demografik ve Klinik Bulgular 52
D. MCPyV (+) ve MCPyV (-) Gruplara Göre Histopatolojik Bulgular 52

E. MCPyV (+) ve MCPyV (-) Gruplara Göre İmmünhistokimyasal Bulgular 54
III. Sağ Kalıma İlişkin Veriler 60

BÖLÜM V 68

TARTIŞMA 68

BÖLÜM VI 80

SONUÇLAR 80

BÖLÜM VII 83

KAYNAKLAR 83
ÖZGEÇMİŞ 102

KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

GEP: Gastroenteropankreatik

HE: Hematoksilen-eozin

KHK: Küçük hücreli karsinom

KT: Kemoterapi

LTag: Büyük tümör antijeni

MCPyV: Merkel cell polyomavirüs

MHK: Merkel hücreli karsinom

NEK: Nöroendokrin karsinom

NET: Nöroendokrin tümör

p53: p53 proteini

RB1: Retinoblastom geni

Rb1: Retinoblastom proteini

RT: Radyoterapi

SHK: Skuamöz hücreli karsinom

SK7: Sitokeratin 7

SK20: Sitokeratin 20

SLNB: Sentinel lenf nodu biyopsisi

sTag: Küçük tümör antijeni

SV40: Simian virüs 40

TİL: Tümörü infiltre eden lenfositler

TP53: Tümör p53 geni

UV: Ultraviyole

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Merkel cell polyomavirüse kadar olan insan polyomavirüsleri 12
Tablo 2. pT evresi 23
Tablo 3. pN evresi 23
Tablo 4. pM evresi 23
Tablo 5. Evre grupları 23
Tablo 6. Çalışmada kullanılan immünhistokimyasal belirteçlere ait özellikler 36
Tablo 7. Tüm MHK hastalarının demografik ve klinik özellikleri 43
Tablo 8. Tüm MHK hastalarının evrelerini etkileyen tümör parametreleri ve TNM evreleri. 44
Tablo 9. Tüm MHK hastalarının histopatolojik özellikleri 46
Tablo 10. Tüm MHK hastalarında uygulanan immünhistokimyasal belirteçlere ait sonuçlar 49
Tablo 11. Kütane ve nodal MHK'lerin immünhistokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması 50
Tablo 12. MCPyV Ab3 ve MCPyV CM2B4 klonları ile saptanan MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguların belirlenmesi 51
Tablo 13. MCPyV Ab3 ile (+), MCPyV CM2B4 ile (-) olan MHK olguları 51
Tablo 14. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguların demografik ve klinik özellikleri 52
Tablo 15. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguların histopatolojik özellikleri 54
Tablo 16. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olgularda SK20 (Ks20.8 ve SP33 klonları) ile boyanma özellikleri 55
Tablo 17. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olgularda p53 ile boyanma özellikleri 56
Tablo 18. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olgularda Rb1 ile boyanma özellikleri 57
Tablo 19. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olgularda Ki67 skorları 58
Tablo 20. SK20, p53, Rb1 ve Ki67'nin MCPyV (+) ve MCPyV (-) olgular arasında MCPyV (+)'i saptamadaki sensitivite, spesifisite, PPD, NPD ve doğruluk değerleri 59
Tablo 21. Sağ kalıma ilişkin veriler 61
Tablo 22. Uzak metastazı olan ve olmayan hastalarda p53, Rb1, Ki67'nin durumu 64
Tablo 23. Sağ kalımı etkileyebilecek faktörlerin tek değişkenli Cox regresyon analizi ile değerlendirilmesi 67

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguları saptamada Ki67 skoru için ROC eğrisi..... 60
Grafik 2. Hastaların takip süresi..... 61
Grafik 3. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olgularda sağ kalım 62
Grafik 4. Hastalığa bağlı ölenlerin sağ kalım süreleri (ay) 63
Grafik 5. Ki67 skoru (eşik değer=%55) ve sağ kalım ilişkisi 65
Grafik 6. Sağ kalımı öngörmede Ki67 skoru için ROC eğrisi 65
Grafik 7. Ki67 skoru (eşik değer=%50) ve sağ kalım ilişkisi 66

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Çalışmamızdaki MHK olgularının vücut figürü üzerinde lezyon dağılımı. 40
Şekil 2. Kütane ve nodal MHK'lerin primer yerleşim yerleri. 41

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Sol frontal bölge kaş üzeri yerleşimli eritematöz nodül (Olgu 23). 17
Resim 2. MHK'nin klasik histopatolojisi. 18
Resim 3. SK20'nin perinükleer noktasal ve yarımay tarzında pozitifliği (Olgu 24). 20
Resim 4. MCPyV antikoru ile boyanma. 28
Resim 5. Mikroskop başında fotoğraf çekimi. 38
Resim 6. Basılan fotoğraflarda asetat kağıdı yardımıyla hücre sayma işlemi. 38
Resim 7. MHK'nin klasik klinik görüntüsü. 41
Resim 8. Karaciğer transplantlı genç hastada parmak yerleşimli lezyon (Olgu 53). 42
Resim 9. MHK olgularındaki histopatolojik özellikler. 45
Resim 10. MCPyV antikorunun iki klonunun boyanma özellikleri. 47
Resim 11. SK20 antikorunun iki klonunun boyanma özellikleri. 48
Resim 12. Yüzeyinde in situ skuamöz hücreli karsinom bulunan kombine MHK (Olgu 30). 53
Resim 13. SK20 ile boyanma. 55
Resim 14. p53 ile boyanma. 56
Resim 15. Rb1 ile boyanma. 57

BÖLÜM I

I. ÖZET

Amaç: Derinin primer nöroendokrin karsinomu olarak da bilinen Merkel hücreli karsinom (MHK), oldukça agresif seyirli ama nadir görülen bir tümördür. Tanısı histopatolojik ve immünhistokimyasal incelemelere dayanmakta olup, Sitokeratin 20 (SK20) ile perinükleer noktasal tarzda boyanması diğer nöroendokrin karsinomlarda beklenmeyen tanı koydurucu bir bulgudur. 2008'de Feng ve arkadaşlarının Merkel cell polyomavirüsü (MCPyV) keşfi ve moleküler çalışmalar ışığında artık tümör gelişiminde güneş hasarı ve MCPyV'nin rol oynadığı bilinmektedir. Coğrafi bölge ve viral patojen identifikasyon tekniğine göre MCPyV pozitif vaka oranı literatürde %49-89 arasında değişkenlik göstermektedir. Son zamanlarda virüs ilişkili (MCPyV (+)) ve güneş hasarı ilişkili (MCPyV (-)) vakaların morfolojik, immünhistokimyasal ve prognostik açılardan birbirinden farklı olabileceği ileri sürülmektedir. Bizim de amacımız serimizde, immünhistokimyasal belirteçler yardımı ile olguları MCPyV (+) ve (-) alt gruplara ayırmak ve aralarındaki farkları ortaya koymaktır.

Gereç ve Yöntem: 2002-2022 yılları arasında İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda MHK tanısı alan hastalar bilgisayar ortamında oluşturulmuş arşiv kayıtları taranarak belirlendi. 67 hastaya ait biyopsi ve eksizyon materyaline ait lamlar tekrar değerlendirildi. Parafin blok materyaline ulaşılamayan ya da çalışma için uygun olmadığı düşünülen toplam 13 olgu çalışma dışı bırakıldı ve çalışmaya 54 olgu ile devam edildi. İmmünhistokimyasal değerlendirmenin sağlıklı yapılabilmesi için uygun bloklar seçildi. SK20 (Ks20.8 ve SP33 klonları), MCPyV (Ab3 ve CM2B4 klonları), p53 (DO-1), Rb1 (358) ve Ki67 (MIB-1) antikorları uygulandı. Olgulara ait klinik parametreler hastane otomasyon sistemi, onkoloji dosya arşivleri ve bu yolla ulaşılamayan durumlarda hasta veya hasta yakınlarıyla birebir irtibat kurularak sağlandı.

Bulgular: Elli dört hastanın tanı anındaki yaşları 24-91 arası değişmekte olup, ortalama 67'ydi. 26 hasta kadın, 28 hasta erkekti. 42 olgu ekstremite, baş-boyun ve gövde dağılımı göstermekte olup, 12 olgu ise kütane lezyonu olmadan primer nodal tutulum gösteren MHK olgularıydı. Hastaların tanı anındaki tümör çapları 0,6-20 cm arasında değişmekte olup, ortalama tümör çapı 3,8'di. Başvuru anında 10 (%18,5) hasta evre I, 14 (%25,9) hasta evre II, 25 (%46,3) hasta evre III ve 5 (%9,3) hasta evre IV'tü. Histopatolojik incelemelerde tümör hücreleri sıklıkla dar sitoplazmalı, açık kromatinli ve yuvarlak şekilliydiler. Olguların mitozdan zengin olduğu ve mm^2'deki mitoz sayısının 4-85 arasında değiştiği görülmekteydi.

Lenfovasküler invazyon %37 hastada saptandı. İmmünhistokimyasal incelemelerde MCPyV Ab3 klonu ile 44 olgu (%81,5) MCPyV (+) saptandı. MCPyV (+) ve (-) grupların klinik özelliklerine baktığımızda yaş ve yerleşim yeri açısından aralarında anlamlı bir fark yokken, MCPyV (-)'ler %90 oranında erkek cinsiyetti. MCPyV (+) ve (-) olgular arasında morfolojik olarak MCPyV (-)'lerde daha fazla oranda geniş sitoplazma saptanabilmesi dışında anlamlı bir fark saptanmadı. MCPyV'yi saptamada Ab3 klonuna kıyasla CM2B4 klonunun boyamadığı 5 olgu ve zayıf ve/veya düşük yüzdelerde boyadığı 8 olgu mevcuttu. SK20 Ks20.8 ve SP33 klonları ile yalnızca 2 olgu negatifti ve bu iki olgu MCPyV (-)'ti (p=0,031). p53 ile mutasyonla uyumlu boyanma, eşik değer %20 ve %50'de MCPyV (-) grupta %70 ve %50 olarak, MCPyV (+) grupta ise %31,8 ve %11,4 olarak saptandı (p=0,025 ve 0,013). Rb1 ile ekspresyon kaybı MCPyV (-) grupta %40, MCPyV (+) grupta ise %22,7 oranında saptandı (p=0,020). Rb1 ile yüksek boyanma (≥%20) yalnızca MCPyV (+) grupta görüldü. Olguların Ki67 skorları %15-95 arasında değişmekte olup, Ki67 skorları açısından MCPyV (+) ve MCPyV (-) grupların ortalamasına baktığımızda MCPyV (+)'lerde %54,7, MCPyV (-)'lerde %71,3'tü (p=0,020). Serimizde hastalığa bağlı ölüm %39,6 oranında izlenmiş olup, MCPyV (+) hastalarda beklenen sağ kalım süresi ortalama 111,5±12,8 ay, MCPyV (-) hastalarda beklenen sağ kalım süresi ise ortalama 50±12,7 ay olarak hesaplandı (p=0,393). Uzak metastazı olan ve olmayan hastalarda ortalama Ki67 skorlarına bakıldığında %65,9 ve %54,3 değerleri bulundu (p=0,048). Sağ kalım analizinde Ki67 eşik değeri %50 kabul edildiğinde, Ki67 skoru %50'nin altında kalan olguların sağ kalımı anlamlı derecede uzun saptandı (p=0,030). Sağ kalımı etkileyebilecek faktörlerin Cox regresyon analizi ile incelenmesinde erkek cinsiyet ve ileri evre (III - IV)'nin sürviyi kısalttığı belirlendi (p=0,041 ve 0,005).

Sonuç: Serimizdeki 44 MCPyV (+) ve 10 MCPyV (-) olgu arasında yaş ve yerleşim yeri açısından anlamlı bir fark saptanmazken, MCPyV (-) olguların sıklıkla erkek cinsiyette olduğu gözlendi. Morfolojik olarak MCPyV (+) ve (-) olgular arasında sitoplazma özellikleri dışında ayırt ettirici morfolojik bir bulgu saptanmadı. MCPyV (+) ve (-) grupların belirlenmesinde Ab3 klonu CM2B4'e kıyasla daha başarılı bulundu. SK20 negatifliği, p53 ile mutasyonla uyumlu boyanma, Rb1'de ekspresyon kaybı ve yüksek Ki67 skorunun MCPyV (-)'lerin MCPyV (+)'lere göre ayırt ettirici özellikleri olduğu saptandı. Ki67 skorunun uzak metastazı öngörmede ve eşik değerini %50 aldığımızda sağ kalım sürelerinin belirlemesinde faydalı olduğu görüldü. Bununla beraber erkek cinsiyet ve ileri evre (III - IV)'nin hastalık ilişkili sağ kalıma etkisi olduğu saptandı. MCPyV (+) ve (-)'liğinin ise sağ kalıma anlamlı bir etkisi olmadığı gösterildi.

II. ABSTRACT

Objective: Merkel cell carcinoma (MCC), also known as primary neuroendocrine carcinoma of the skin, is a rare but aggressive tumor. Its diagnosis is based on histopathological and immunohistochemical examinations, and perinuclear punctate staining with Cytokeratin 20 (CK20) is an unexpected diagnostic finding in other neuroendocrine carcinomas. In the light of the discovery of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) by Feng et al. in 2008 and molecular studies, it is now known that sun damage and MCPyV play the major role in tumor development. According to geographical region and viral pathogen identification technique, the rate of MCPyV positive cases varies between 49-89% in the literature. Recently, it has been suggested that virus-associated (MCPyV (+)) and sun-damage-related (MCPyV (-)) cases may differ from each other in terms of morphology, immunohistochemistry, and prognosis. Our aim is to divide cases into MCPyV (+) and (-) subgroups with the help of immunohistochemical markers and to investigate the differences between them.

Material and Methods: Between 2002 and 2022, patients diagnosed with MCC in the Department of Pathology of Istanbul Faculty of Medicine were identified by scanning the archive records created in the computer environment. Slides of biopsy and excision material of 67 patients were re-evaluated. A total of 13 cases, whose paraffin block material could not be reached or considered unsuitable for the study, were excluded from the study and the study was continued with 54 cases. Appropriate blocks were selected so that the immunohistochemical evaluation could be performed properly. Antibodies to CK20 (clones Ks20.8 and SP33), MCPyV (clones Ab3 and CM2B4), p53 (DO-1), Rb1 (358) and Ki67 (MIB-1) were administered. The clinical parameters of the cases were obtained through the hospital automation system, oncology file archives and, in cases that could not be accessed in this way, one-on-one contact with the patient or patient relatives.

Results: Fifty-four patients' ages at the time of diagnosis ranged from 24-91 years, with a mean of 67. 26 patients were female, 28 patients were male. 42 cases demonstrated extremity, head-neck and trunk distribution, and 12 cases were MCC cases with primary nodal involvement without a cutaneous lesion. Tumor diameters of the patients at the time of diagnosis ranged from 0.6-20 cm, and the mean tumor diameter was 3.8 cm. At admission, 10 (18.5%) patients were stage I, 14 (25.9%) patients were stage II, 25 (46.3%) patients were stage III, and 5 (9.3%) patients were stage IV. On histopathological examinations, tumor cells were often round shaped, with narrow cytoplasm and clear chromatin. Cases were rich in mitosis and

the number of mitoses per mm^2 ranged from 4 to 85. Lymphovascular invasion was detected in 37% of the patients. Immunohistochemical study with MCPyV (clone Ab3) revealed 44 (81.5%) cases with positive results. When we investigated the clinical characteristics of MCPyV (+) and (-) patients, there was no significant difference between them in terms of age and location, while MCPyV (-) cases were male at a rate of 90%. There was no significant difference between MCPyV (+) and (-) cases in terms of morphology, other than larger cytoplasm that is detected more often in MCPyV (-) cases. There were 5 cases which the CM2B4 clone did not stain and 8 cases which it stained weakly and/or at low percentages while they were positive with the Ab3 clone. Only 2 cases were negative with CK20 Ks20.8 and SP33 clones and these cases were MCPyV (-) (p=0.031). Staining compatible with mutation of p53 was found to be 70% and 50% in the MCPyV (-) group and 31.8% and 11.4% in the MCPyV (+) group at the cut-off values of 20% and 50%, respectively (p=0.025 and 0.013). Loss of expression of Rb1 was detected at a rate of 40% in the MCPyV (-) group and 22.7% in the MCPyV (+) group (p=0.020). ≥20% staining with Rb1 was seen only in the MCPyV (+) cases. Ki67 scores of the cases ranged from 15 to 95%, and when we assess the mean of the MCPyV (+) and MCPyV (-) groups in terms of Ki67 scores, it was 54.7% in MCPyV (+) and 71.3% in MCPyV (-) (p=0.020). In our series, disease-related death was observed at a rate of 39.6%, and the mean expected survival time in MCPyV (+) patients was calculated as 111.5±12.8 months, and in MCPyV (-) patients as 50±12.7 months (p=0.393). When the mean Ki67 scores of patients with and without distant metastasis were evaluated, 65.9% and 54.3% values were found (p=0.048). With a threshold value of 50%, patients whose Ki67 score was below 50% was found to have a significantly longer survival (p=0.030). Cox regression analysis showed that male gender and advanced stage (III - IV) shortened the survival (p=0.041 and 0.005).

Conclusion: No significant difference was found between 44 MCPyV (+) and 10 MCPyV (-) cases in our series in terms of age and location; nevertheless, it was observed that MCPyV (-) cases were mostly male. Morphologically, no distinctive morphological finding was found between MCPyV (+) and (-) cases, except for cytoplasmic features. Clone Ab3 was found to be more successful in identifying MCPyV (+) and (-) groups compared to CM2B4. It was determined that CK20 negativity, staining compatible with p53 mutation, loss of expression of Rb1 and high Ki67 score were the distinguishing features of MCPyV (-) compared to MCPyV (+) group. Ki67 score was found to be useful in predicting distant metastasis and determining survival times when we set the threshold value of 50%. It was also determined that male gender and advanced stage (III - IV) had an effect on disease-related survival. It was shown that MCPyV status did not have a significant effect on survival.

BÖLÜM II

I. GİRİŞ

Derinin primer nöroendokrin karsinomu olarak da bilinen Merkel hücreli karsinom (MHK), oldukça agresif seyirli, nadir görülen bir tümördür (1). Genellikle ileri yaş hastalarda ortaya çıkan MHK'nin insidansı 100 binde 1'den az olmakla birlikte mortalite oranı kütane melanomların iki katını geçmektedir (sırasıyla, %33'e %15) (1–3). MHK, akciğer kökenli nöroendokrin karsinomlardan (NEK) 10 kat daha az görüldüğü bildirilen ekstrapulmoner NEK'ler arasında da küçük bir kısmı oluşturmaktadır (4). Fakat yaşlı nüfusun artmasına paralel bir şekilde insidansı artan MHK'nin ilerleyen yıllarda ekstrapulmoner NEK'lerin büyük bir kısmını oluşturacağı öngörülmektedir (5).

MHK tanısı, biyopsi veya eksizyon materyalinin histopatolojik incelemesi ve dokuda immünhistokimyasal olarak Pansitokeratin ve/veya Sitokeratin 20'nin (SK20) perinükleer noktasal pozitifliği ile birlikte nöroendokrin belirteç pozitiflikleriyle konabilmektedir. SK20'nin negatif olduğu nadir olgularda klinik ve radyolojik olarak ekstrakütane primer odağın varlığının dışlanması gereklidir.

Tüm dünyadaki kanser olgularının %20'sinin etiyolojisinde enfeksiyöz ajanların, sıklıkla da virüslerin, sorumlu olduğu düşünülmektedir (6). 2008 yılında, Feng ve arkadaşları da yaptıkları araştırmalarında Merkel cell polyomavirüs (MCPyV) adını verdikleri polyomavirüs grubuna ait yeni bir virüs tanımlamış ve bu virüsün MHK patogenezinde rolü olduğunu göstermişlerdir (7). Güncel moleküler çalışmalar ile MCPyV saptanmayan olgularda ultraviyole (UV) hasara özgü mutasyonlar saptanmış ve tüm bu bulgular ışığında tümör gelişiminde MCPyV ve güneş hasarının ana rol oynayan iki etken olduğu belirlenmiştir (1,7) . Coğrafi bölge ve viral patojen identifikasyon tekniğine göre MHK'de MCPyV pozitif vaka oranı literatürde %49-89 arasında değişkenlik göstermektedir (8).

MCPyV pozitif (MCPyV (+)) ve MCPyV negatif (MCPyV (-)) olguların belirlenmesinde PCR ve immünhistokimya yöntemleri değişen sensitivite ve spesifite oranlarıyla birlikte kullanılabilmektedir (9). En sık tercih edilen yöntem ise MCPyV (CM2B4 klonu) antikoru ile yapılan immünhistokimyasal çalışmadır. Literatürdeki çalışmaların çoğu bu klonla (CM2B4) yürütülmüş olup, 2012'de piyasaya Ab3 adında yeni bir klon girmiştir. Ab3 klonuyla yapılan az sayıda çalışma mevcut olup, bu iki klonun MCPyV pozitifliğini belirlemede birbirlerine üstünlüğünü değerlendiren çalışma sayısı ise çok azdır (10–12).

MHK tanısında kullanılan en temel belirteç ise SK20'dir. Fakat özellikle MCPyV (-) vakalarda SK20'nin negatif olabileceği bilinmektedir (8). Günlük pratiğimizde bizler de SK20 negatif olgularla karşılaşmaktayız. Ancak Türkiye'de ve bölümümüzde MHK'de MCPyV sıklığı ve negatif vakalarda SK20 durumu hakkında rutin gözlem dışında bilgi yoktur.

Yapılan çalışmalarda MCPyV (-) vakalarda somatik mutasyon ile retinoblastom (RB1) ve tümör p53 (TP53) genlerinde inaktivasyon olduğu moleküler yöntemlerle gösterilmektedir (13,14). Öte yandan MCPyV (+) vakalarda bu proteinlerde olağan boyanma saptanmaktadır (15). MCPyV (+) ve MCPyV (-) vakalarda retinoblastom (Rb1) ve p53 proteininin (p53) durumunu immünhistokimyasal olarak karşılaştıran az sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalardan çıkan ortak sonuç, MCPyV (-) vakalarda p53 ile immünhistokimyasal olarak yüksek pozitif boyanma, Rb1 ile ise negatif boyanmanın olduğudur (16–19). MCPyV (+) vakalarda ise p53 olağan, Rb1 pozitif bulunmuştur. Komplike ve masraflı moleküler teknikler yerine immünhistokimyasal olarak Rb1 ve p53'ün güvenilir eşik değerler belirlenerek değerlendirilmesi MCPyV durumunu öngörmede çok daha hızlı ve pratik olarak uygulanabilir.

MHK'nin prognozuna yönelik belirteçler araştırılmakla beraber, seriler az sayıda vaka içermekte ve tümör patogenezi net olarak aydınlatılamamaktadır (20–23). Tümörlerin proliferasyon indekslerini gösteren Ki67 immünhistokimyasal belirteci ise pek çok tümörde özellikle nöroendokrin tümörlerde (NET) prognostik belirteç olarak kullanılmaktadır (24–27). Bazı tümörlerde Ki67 için eşik değerler belirlenmekte, klinik tedaviler ve hasta yönetimi bu eşik değerlere göre yapılmaktadır. MHK yüksek dereceli bir nöroendokrin karsinomdur. Ki67 skoru çoğu vakada oldukça yüksektir. Ancak şimdiye kadar yapılan çalışmaların çok azında Ki67 skoruna yer verilmiş ve bu çalışmalarda skor yaklaşık tahmin ("eyeballing") yöntemi ile belirlenmiş, tekrarlanabilir, güvenilir, kesin bir sonuç veren hücre sayma yöntemi kullanılmamıştır. 2020 yılında La Rosa ve arkadaşları ilk defa MHK'de Ki67 skorunu hücre sayma yöntemi ile belirleyerek prognoz analizleri yapmış ve Ki67'nin kesin olarak belirlenmesi durumunda önemli bir prognostik belirteç olabileceğini ortaya koymuştur (28).

Araştırmamızda, MHK olgularında MCPyV ve UV yolaklarının ne oranda etkili olduğunun immünhistokimyasal seviyede araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda MCPyV antikorunun CM2b4 ve Ab3 olmak üzere iki klonu kullanılmıştır. Bu iki klonun birbirlerine olan üstünlükleri ve dezavantajları araştırılmıştır. Aynı zamanda MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguların morfolojik ve immünhistokimyasal farklarının gösterilmesi, bu iki grup arasında ayırıcı tanıda kullanılabilecek antikorların değerlendirilmesi ve bu iki alt grubun prognostik açıdan fark içerip içermediğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Serimizde MCPyV pozitifliği oranı ve bunun SK20 ile ilişkisine bakılmıştır. Bu çalışmada daha önce rutinde uyguladığımız ve literatürde pek çok seride kullanılan Ks20.8 klonuna ek olarak, SK20'nin SP33 isimli farklı bir klonu kullanılmıştır. Böylece gözlemlenen SK20 negatifliğinin kullanılan klon ile ilişkisi olup olmadığı, farklı bir klonun daha sensitif olup olmayacağı ve bu negatifliğin iki grup arasında bir farklılık gösterip göstermediğine bakılmıştır. MCPyV (+) ve MCPyV (-) vakaların p53 ve Rb1 immünhistokimyasal boyanmalarının anlamlı farklılık içerip içermediği ve bu iki belirtecin MCPyV (+) ve MCPyV (-) ayrımı yapabilmemizde yardımcı olup olamayacağının araştırılması da bir diğer hedef noktasıdır. Ayrıca Ki67 skorunun, hücre sayma yöntemi ile belirlenerek, prognostik olarak kullanılabilecek bir eşik değer ile, MCPyV durumu ve sağ kalım ile ilişkisi araştırılmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

A. Tanım

A1. Merkel Hücreli Karsinom

Merkel hücreli karsinom (MHK) ilk olarak 1972 senesinde Cyril Toker tarafından beş hasta ile trabeküler paterninden dolayı derinin trabeküler karsinomu olarak tanımlanmıştır (29). Derinin primer nöroendokrin karsinomu olarak da bilinen Merkel hücreli karsinom, kökeni hala tam olarak bilinmese de derinin primer nöroendokrin hücreleri olan Merkel hücrelerine benzerliği nedeniyle hala bu isimle anılmaktadır (30). Nadir görülen ama oldukça agresif seyirli bir tümördür (1). En sık baş, boyun bölgesi ve ekstremitelerde görülmektedir (31). Erkeklerin biraz daha fazla etkilendiği ve çoğu hastanın yedinci ve daha üst dekatlarda başvurduğu bildirilmekle birlikte geniş bir yaş aralığında saptanabilmektedir (32). Genç ve çocukluk çağındaki hastalarda özellikle solid organ transplantasyonunu takiben immünsüpresyon zemininde ortaya çıktığı bildirilmektedir (33).

A2. Nodal MHK

MHK'nin deri dışında primer olarak lenf nodundan da çıkabileceği bilinmektedir (34). MHK primer deri lezyonu olmadan %8-14 arası değişen oranlarda lenf nodu metastazı şeklinde, veya daha nadiren viseral yerleşim ile prezente olabilmektedir (35,36).

Nodal MHK'leri kapsayan ilk seri 1992'de Eusebi ve arkadaşları tarafından 8 vaka ile bildirmiştir (34). Beşi inguinal, ikisi aksiller, biri submandibuler lenf nodu yerleşimli olan bu vakaların hiçbirinde primer tümör olabilecek bir odak saptanmamış ve okült ya da regrese primer olasılığı bulunduğu gibi bu vakaların lenf nodlarındaki epitelyal inklüzyonlardan veya kök hücrelerden gelişebileceğini düşündüklerini de belirtmişlerdir (34). Başka bir görüş ise bu tümörlerin derin yerleşimi sebebiyle sekonder olarak lenf nodlarını etkilemiş olabilecekleri yönündedir (37).

2010 yılına kadar literatürde toplam bildirilmiş 34 vaka mevcutken, bu konuyla ilgili farkındalığın artmasıyla daha büyük seriler de yayınlanmıştır (37). Serilerde sıklıkla ortalama 8. dekatta erkek cinsiyetin etkilendiği görülmektedir (36). Lokalizasyonuna baktığımızda ise en sık inguinal, aksiller ve baş-boyun lenf nodu yerleşimi bildirilmektedir (36,37).

Nodal MHK ile başka NEK'lerin lenf nodu metastazlarının ayrımı klinik yaklaşım açısından önem arz etmektedir (38). Nodal MHK'de yaklaşım lenf nodu diseksiyonu ve radyoterapi (RT) iken diğer NEK metastazlarında ise yaklaşım kemoterapi (KT) olmaktadır (38). Nodal NEK ile başvuran olgularda primer odak araştırması açısından immünhistokimyasal yöntemlere başvurulmalı, viseral orijine işaret etmesiyle TTF1 ve kütanöz orijine işaret etmesiyle SK20 özellikle panelde yer almalıdır (39). Seriler kütane MHK'lerde olduğu gibi bu vakalarda da, SK20'nin pozitif olduğunu ve etiyolojide MCPyV'nin rol aldığını söylemektedir (40).

2017'de Nodal MHK'yi diğer NEK'lerin lenf nodu metastazlarından ayırmak için ELECTHIP kriterleri yayınlanmıştır (41). Bu kriterlere göre 70 yaş ve üzeri hasta, inguinal ve parotis gland içi yerleşim, lokalize hastalık, histolojik tipin küçük hücreli karsinom (KHK) benzeri olması, SK20 pozitifliği, TTF1 negatifliği ve MCPyV pozitifliği kriterlerinden 5 veya daha fazlasının olması nodal MHK tanısı koydurabilirken, çalışmalarda diğer NEK metastazlarında bu kriterlerden yalnızca 3 veya daha azı saptanmıştır (41).

Çalışmalar kütane lezyonu olmayan nodal MHK olgularının, kütane MHK'si olup aynı zamanda lenf nodu metastazı olan olgulardan daha iyi seyrettiğini işaret etmektedir (42). Ancak hastalar lenf nodu diseksiyonundan fayda görse bile nüks ve metastaz riski yine de yüksektir (36). Serilerde hastalar tanı anında %12-24 oranında evre IV yani metastatik evrede başvurmakta ya da kısa süre içerisinde uzak metastazlar geliştirebilmektedir (36,37).

B. Patogenez

B1. Hücre Kökeni

MHK'de neoplastik sürecin ilk başladığı hücre pek çok çalışmada araştırma konusu olmuştur. Toker önce tümördeki trabeküler patern sebebiyle MHK'yi karsinoid tümörlere benzetmiş fakat vakalarda karsinoid tümörlerde olması beklenen sitoplazmik granülleri saptayamadığını söyleyerek bu düşünceden vazgeçmiştir (29). Sonra bazı vakalarda gözlemlediği tübül benzeri yapılar, boşluklar ve yarıklar sebebiyle tümörün ekrin orijinli olduğu düşüncesini ortaya atmıştır (29). Altı yıl sonra ise elektron mikroskobik incelemelerle tümör hücrelerinin nöroendokrin Merkel hücresine benzerliği saptanmış ve bu nedenle tümörün Merkel hücre kökenli olabileceği öne sürülmüştür (43).

Merkel hücresi epidermisin bazal tabakasında ve kıl folikülü etrafında bulunan, hafif dokunma ile yavaş adapte olan bir mekanoreseptör ve aynı zamanda nöroendokrin özellikler taşıyan bir hücredir (44). Hematoksilen-eozin (HE) kesitlerde saptayamadığımız bu hücrelerin elektron mikroskobik çalışmalar ile sitoplazmalarında yoğun nörosekretuar granüller saptandığı için nöral krest orijinli olduğu düşünülmektedir (45). Merkel hücrelerinin dar bir sitoplazması, invajine nükleusu ve perinükleer alanda sitokeratin iplikçiklerinin kümelendiği bir bölgesi bulunmaktadır (46). Merkel hücresindeki sitokeratin agregatları SK8, SK18, SK19 ve SK20 gibi düşük molekül ağırlıklı sitokeratinlerden oluşmaktadır (47). Yapısal benzerlikleri ve MHK hücrelerinde de elektron mikroskobik çalışmalar ile nörosekretuar granüllerin saptanması sebebiyle MHK'de hücre orijininin Merkel hücresi olabileceği düşünülmüştür (43). İmmünhistokimyasal bulgularına baktığımızda da tümörde Merkel hücrelerinde olduğu gibi SK20, Kromogranin, Sinaptofizin ve NSE pozitifliği bu görüşü desteklemektedir (48). Fakat SK20 ve nörofilamentin hücre içindeki dağılımının farklı oluşu, Merkel hücresinde gevşek ve diffüz bir dağılım gösterirken, MHK'de agregatlar halinde görülmesi, ile ckit'in çoğu MHK'de saptanıp Merkel hücrelerinde saptanamaması bu görüşü sorgulatan birkaç veriden bazılarıdır (48). Daha da önemlisi Merkel hücrelerinin "postmitotik hücreler" olmaları ve prolifere olamadıklarının gösterilmesi, yenilenirken de epidermal progenitör hücreler tarafından sağlanmaları MHK'de hücre kökeninin Merkel hücresi olduğu hipotezinin doğruluğunu sarsan en çarpıcı bulgudur (49). Tümörün dermiste yerleşmesi, epidermisle hiçbir ilişkisinin bulunmaması ve çeşitli farklılaşma alanları gösterebilmesi de yine Merkel hücresi aleyhine saptanan bulgulardandır (48).

Fizyolojik pluripotent kök hücrelerin, hem uzun ömürleri hem de kendilerini yenileyebilmeleri sebebiyle onkojenik mutasyonları biriktirerek neoplaziye yol açan hücrelere dönüşebileceği teorisi ise daha sonra ortaya atılan görüşlerin temelini oluşturmaktadır (50). Derideki progenitör hücrelere epidermal kök hücre denmektedir (51). Bu hücreler Merkel hücreleri gibi birçok hücrenin kaynağıdır (52). SK14 ve SK19 kök hücreleri de içine alan epidermis bazal tabakasının işaretleyicileri olarak bilinmektedir (53,54). Bu kapsamda MHK'de SK14 ve SK19 immünhistokimyası çalışılmış, örneklerin bir kısmında pozitif bulunmuştur ama kanıt düzeyi teşkil eden bir çalışma henüz yoktur (55). ATOH1 ve SOX2 ise, Merkel hücresinin epidermal progenitörlerden gelişiminde rol aldığı bilinen transkripsiyon faktörleridir (56). Fare embriyolarında ATOH1 ve MCPyV ekspresyonunun birlikte görülmesinin MHK fenotipinde hücreler oluşturduğu gösterilmiştir (56).

Yapılan diğer immünhistokimyasal çalışmalarda, ayırıcı tanıda kullanılan PAX5 ve TdT gibi belirteçlerin de MHK'yi boyayabildiği gösterilmiş, bu nedenle hücre kökeninin lenfoid

olabileceği görüşü de ortaya atılmıştır ancak bu konuda henüz hücre düzeyinde deneysel araştırmalar bulunmamaktadır (57).

B2. Etiyopatogenez

2a. Merkel Cell Polyomavirüs

2008'de Feng ve arkadaşlarının MHK'nin daha çok yaşlı ve immünsüprese bireyleri etkilediğini farkederek enfeksiyöz bir ajandan şüphelenmeleri ile yola çıktıkları çalışmalarında MCPyV keşfedilmiştir (7). Yola çıkış noktaları immünsüprese, transplantlı ve AİDS tanılı hastaların daha çok etkilendiği Kaposi sarkomunda olduğu gibi MHK patogenezinde de bir virüsün etken olabileceğiydi (7). 10 olguda yaptıkları araştırmalarında hastaların sekizinde bu virüsün insan genomuna entegre olduğunu saptadılar (7). Virüsün T antijeni ile insan tirozin fosfataz reseptörüne bağlandığını ve altı vakada klonal bir paternle karşılaştıkları için de bunun MHK gelişimine yol açtığı sonucuna varmışlardır (7).

Polyomavirüsler (polyoma="many tumors") ilk olarak Gross tarafından 1953'de lösemi üzerinde çalışılırken tanımlanmış ve farelerde tümör gelişiminde bir etken olarak bildirilmiştir. Keşfedilen bu ilk polyomavirüs "Mürin polyomavirüs" olarak adlandırılmış olup, insanda hastalık oluşturmamaktadır (58,59). Simian virüs (SV40) ise 1955-1963 yılları arasında polyo aşılarından kontaminasyon ile yanlışlıkla insanlara geçtiğinde keşfedilmiştir (60). Bu iki polyomavirüse ve şuana kadar tanımlanmış 14 insan polyomavirüsüne ek olarak doğada farklı türlerde yüzlerce polyomavirüs saptanabilmektedir (61). İnsandan ilk izole edilen ve hastaların isimlerinin baş harfleriyle anılan, BK ve JC virüsler ise 1971'de, sırayla renal transplantlı bir hastanın idrarından ve progresif multifokal lökoensefalopatili bir hastanın beyin dokusundan izole edilmiştir (62,63). 2007'de ise birbirinden bağımsız iki araştırma grubu tarafından nazofarengeal aspirat örneklerinde iki farklı polyomavirüs daha keşfedilmiş, tanımlandıkları merkezlerin isimleri "Karolinska Institute" ve "Washington University" kısaltmaları olan KI (KiPyV) ve WU (WUPyV) polyomavirüsleri olarak adlandırılmışlardır (64,65). 2010'da deri sürüntülerinden alınan örneklerde HPyV 6 ve HPyV 7 ismi verilen iki insan polyomavirüsü daha izole edilmiştir (66). 35 sağlıklı bireyden elde edilen örneğin 14'ünde (%40) yeni tanımlanan bu iki polyomavirüsün ve MCPyV'nin kronik olarak insan derisinden döküldüğü bildirilmiştir (66). Arkasından bu alandaki araştırmalar hızla artmış ve aynı yıl içerisinde Trikodisplazia spinuloza denilen nadir bir deri hastalığına sebep olan TSPyV (HPyV 8), 2012'de ise serum ve deride saptanan HPyV 9 ve gaita örneklerinde Malawi polyomavirus

(MWPyV) keşfedilmiştir (67,68). Daha sonra bir hastanın kondilomundan izole edilen HPyV10 ve yine gaita örneğinden elde edilen Mexico polyomavirüslerin (MXPyV) MWPyV ile yüksek oranda homoloji gösterdiği ve aslında bunların birbirlerinin varyantları olduğu ortaya çıkmıştır (69–72). Genom amplifikasyon tekniklerinin gelişmesiyle hızla 2013, 2014, 2017'de sırayla insan polyomavirüsleri 11-14 de keşfedilmiştir (69). JC ve BK virüsler normal bireylerde idrarla atılırken, immünsüprese hastalarda özellikle BK virüs nefropati ve hemorajik sistit gibi tablolara yol açabilmektedir (63). HPyV 3, 4, 6, 7, 9-14'ün ise insanda herhangi bir hastalığa yol açtığı gösterilememiştir (69). **Tablo 1**'de MCPyV'nin keşfine kadar olan polyomavirüsleri yer almaktadır.

Tablo 1. Merkel cell polyomavirüse kadar olan insan polyomavirüsleri

Adı	Yaygın kullanılan adı	İlk izolasyon	Yol açtığı hastalık
Human polyomavirüs 1	BK virüs	1971	Polyomavirüs ilişkili nefropati, hemorajik sistit
Human polyomavirüs 2	JC virüs	1971	Progresif multifokal lökoensefalopati
Human polyomavirüs 3	KI polyomavirüsü	2007	-
Human polyomavirüs 4	WU polyomavirüsü	2007	-
Human polyomavirüs 5	Merkel cell polyomavirüs	2008	Merkel hücreli karsinom

İnsan polyomavirüsleri yapısal olarak küçük (5 kb), zarfsız, sirküler ve çift-sarmallı DNA virüsleridir (73). Üç fonksiyonel bölgeye ayrılmaktadırlar; erken bölge ("early region"), geç bölge ("late region") ve bunları ayıran kontrol bölgesi ("non-coding control region") (73). Kontrol bölgeleri replikasyon orijin ve transkripsiyon kontrol bölgelerini içerirken, erken bölge DNA replikasyonundan hemen önce kopyalanıp büyük tümör antijeni (LTag) ve küçük tümör antijenlerini (sTag) kodlamaktadır (73). Bunlara tümör antijeni denmesinin sebebi aslında ilk olarak tümörlü hayvanlarda saptanmış olmalarından dolayıdır (61). LTag'ın virüs replikasyonunda hayati bir önemi olup, sTag ise daha çok yardımcı görevdedir (74). Geç bölge ise kapsid proteinleri olan VP1, VP2 ve VP3'ü meydana getirir (73). VP1 en dıştaki kapsid proteini olup, VP2 ve VP3 iç tarafta yer almaktadır. İmmün sistemin zayıflamasıyla tetiklenen polyomavirüs litik enfeksiyonlarında önce erken bölge proteinleri, sonra da kapsid proteinlerinin ekspresyonu görülmektedir (75). Kapsid proteinleri ayrıca hücreye girmeden önce virüsün hücreye tutunmasını da sağlamaktadır (69). MHK'de ise yalnızca erken bölge proteinleri olan LTag ve sTag'lar saptanabilmektedir (61,76).

Polyomavirüslerin DNA sekansları birbirleriyle benzerlik gösterebilmektedir. SV40'ın DNA sekansı BKV ile %70 oranında, JCV ile %69 oranında uyum göstermektedir (77,78). BKV ve JCV ise %83 oranında benzerlik göstermektedir (79). MCPyV ise bunlardan bir hayli farklı olup, genomik olarak bu polyomavirüslere sadece %30 gibi bir benzerlik göstermektedir (79). SV40, BKV ve JCV'nin LTag'ları birbirleriyle çapraz reaksiyon gösterirken, geç bölge kapsid proteinleri olan VP'ler o kadar güçlü bir çapraz reaksiyon gösterememektedir (60,80).

İnsan polyomavirüsleri ile primer enfeksiyon erken yaşta ve asemptomatik olarak gerçekleşmektedir (61). Bulaş respiratuar, oral, fekal-oral ve vücut sıvıları ile olabilmektedir (61). Polyomavirüs seroprevalansları çalışmalarda %18-99 arası değişmektedir (69). MCPyV seroprevalansı için ve diğer polyomavirüsler için kapsid proteinlerine yönelik geliştirilmiş antikorlar bulunmaktadır (81).

Sonuç olarak deri florasının bir üyesi olduğu saptanan MCPyV, konak DNA'ya integre olup, geçirdiği mutasyonlar sonucu tümör gelişimine sebep olabilmektedir (75). Virüs özellikle LTag ve sTag'ları ile hücre siklüsünün düzenleyici proteinleri olan p53 ve Rb1'in fonksiyonlarını bozmaktadır (82). Virüsün keşfedildiği aynı laboratuvarda daha sonra 9 tümörden elde edilen LTag'ların genomik sekansları incelenmiş, hepsinde MCPyV LTag helikazını kırpan mutasyonlar saptanmıştır (83). Bu mutasyonlar sonucu virüs replike olamamakta ve başka fonksiyonlar kazanmaktadır, bunlardan biri de retinoblastomun (Rb1) sitoplazmaya relokalize edilmesidir (83). Virüsün bu mutasyonlar sonucu Rb1'e bağlanan bölgesi "LXCXE" korunmakta olup, bu tümör süpresör proteine bağlanarak inaktivasyonunu sebep olmaktadır (83). İnaktive olan Rb1 ile, hücre hızla sentez (S) fazına geçmektedir (61). 2011'de ise yine aynı ekip virüs sT antijeninin de tümör gelişiminde gerekli olduğunu göstermiştir (84). sT'nin mTOR sinyal yolağı üzerine inhibitör etkileri olduğunu, 4E-BP1 proteininin hiperfosforilasyonundan sorumlu olduğunu ve bunun da translasyonu bozduğunu, sonuç olarak bu antijenin de bir onkoprotein olduğunu belirtmişlerdir (84). Fare deneylerinde de MCPyV LTag ve sTag'ın proliferasyon ve tümör oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (85). Virüsün direkt olarak p53'e bağlanan bir bölgesi bulunmayıp, p53 indirekt mekanizmalar sonucu etkilenmektedir (84).

Çalışmalarda MCPyV'nin spesifik olarak MHK'ye yol açtığı ve diğer kanserlerle ilişkisi olmadığı gösterilmiştir (61,86,87). MCPyV'nin keratinosit ve dermal fibroblastlarda enfeksiyona yol açabildiği ve replike olabildiği gösterilse de, hala MHK'nin hangi hücreden köken aldığı tam olarak anlaşılamamıştır (88). MCPyV insanda onkojenik olduğu kanıtlanmış tek polyomavirüstür, diğer polyomavirüslerin insanda karsinogenezde rol alıp almadıkları ise tam olarak anlaşılamamıştır (75).

2b. Güneş Hasarı

MCPyV'nin keşfinden sonra bu virüsün saptanmadığı daha az sayıdaki olguda virüs negatifliğinin sebepleri araştırılmaya başlanmıştır (7,15). Önce PCR ve immünhistokimyanın virüsü saptamada bu olgularda yetersiz kaldığı ve aslında etiyolojinin aynı ve tek olduğu savunulsa da moleküler gelişmeler ile bu görüş değişmiştir (11). Polyomavirüs saptanmayan olgularda yapılan çalışmalarda bu olgularda UV hasara özgü mutasyonlar saptanmış ve aslında olguların ya virüs-bağımlı ya da UV-bağımlı şeklinde iki farklı yolaktan geliştiği görüşü ortaya atılmıştır (15). Virüs negatif (MCPyV (-)) vakalarda, virüs pozitif (MCPyV (+)) vakalardan farklı olarak çok daha fazla mutasyon yükü olduğu da gösterilmiştir (15).

Hem virüs-bağımlı hem UV-bağımlı patogenezde sonuç olarak aynı onkojenik yolaklar etkilendiği için ortaya benzer fenotipte nöroendokrin bir tümör çıkmaktadır (89). MCPyV (+) tümörlerde virüsün T antijenleri, MCPyV (-) tümörlerde ise somatik mutasyonlar sonucu, yani farklı mekanizmalar ile TP53 ve RB1 genlerinde değişiklikler olmaktadır (89). Virüs negatif tümörlerde TP53 mutasyonu %75 vakada, RB1 mutasyon %67 vakada saptanabilmektedir (14). Bu mutasyonlar çoğunlukla protein düzeyinde kayıp ile sonuçlansa da, p53'deki aktivasyon tarzındaki mutasyonların p53 mutasyonu saptanan vakaların %45'ini oluşturduğu da bilinmektedir (14).

C. Epidemiyoloji

C1. Dünyada Merkel Hücreli Karsinom

MHK etiyoloji ve insidansı coğrafi bölgelere göre değişkenlik göstermektedir (1). Son yıllarda insidansının arttığına dair veriler bulunmaktadır (90). Bu artışın hem yaşlı nüfusun artmasına, hem de immünsüprese hasta sayısının artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (90). En çok vakanın bildirildiği yerlerden biri olan Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 1986-2001 yılları arası insidans yılda %8 artış göstermiştir (91). 2013 verilerine göre ABD'deki yıllık vaka oranı yüz binde 0,79'dur (5). 2015 senesinde ise 2000 vakanın tanı aldığı bildirilmektedir (5).

Avrupa geneline baktığımızda ise insidans yüz binde 0,13'tür (92). Avrupa'da vakaların daha çok bildirildiği, Hollanda'da da 1993-1997 ve 2003-2007 arası insidans yüz binde 0,17'den 0,35'e çıkmıştır (93). İnsidansın daha stabil seyrettiği Danimarka'nın verilerine göre

ise, 1978-2006 yılları arasında 185 kişi MHK tanısı almıştır ve 1995-2006 arasındaki insidans yılda ortalama yüz binde 0,22 kişi, İsveç'de ise yüz binde 0,3 olarak hesaplanmıştır (92,94,95). Kuzey Amerika ve Avrupa'da olguların %70-80'inde değişen oranlarda MCPyV pozitif saptanmaktadır (7,96,97).

MHK'nin Avustralya'daki insidansı bildirilen en yüksek insidans olup, 1993-2010 verilerine göre yüz binde 1,6'dır (98). Yeni Zelanda'da ise yüz binde 0,88 olup, bu iki ülkede dünyanın geri kalanına göre, MCPyV oranları çok düşük çıkmaktadır (97,99). Garneski ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Avustralya ve Kuzey Amerika'dan alınan 37 MHK örneğinde PCR yöntemi ile MCPyV varlığı araştırıldığında 16'sında (%43) MCPyV saptanmıştır (97). Bunların 11'inin (11/16) Kuzey Amerika'dan olan hasta grubunda olduğu (%69), 5'inin (5/21) ise Avustralya'dan olan hasta grubunda olduğu (%24) saptanmıştır (97). MCPyV'deki bu düşüklüğün sebebi olarak Avustralya'daki UV hasarın çok olması ve buradaki kanserlerin çok sık olarak UV hasara bağlı gelişmesi gösterilmiştir (97). Yapılan başka bir çalışmada da MCPyV'yi belirlemek için MCPyV antikoru (CM2B4 klonu) kullanılmış ve benzer şekilde Avrupa ve Kuzey Amerika'ya kıyasla Avustralya'da düşük sonuçlar elde edilmiştir (%18) (100). Başka bir seride de Yeni Zelanda'da PCR yöntemiyle saptanan MCPyV oranı %22,9 çıkmıştır (99).

Asya'da ise bildirilen az sayıdaki vakaya göre insidansın çok daha düşük seviyelerde olduğu düşünülmektedir (101). Hindistan'da 12 vaka üzerinde yapılan bir çalışmada olguların %25'inde polyomavirüs pozitif bulunmuştur (102).

Sonuç olarak ülkeler arasında hatta aynı ülke içerisinde bile serilerde farklı polyomavirüs oranları bildirilebilmektedir. Bunun sebebi serilerin genelde az sayıda olgu içermesi ve virüs saptama yöntemi olarak kullanılan metodların değişkenliği olarak açıklanabilir. Japonya'dan yayınlanan bir seride %55 oranında, başka bir seride ise %88,5 oranında MCPyV pozitif bulunmuştur (103,104). Almanya'dan bildirilen bir seride %85 oranında PCR ile pozitiflik saptanmıştır (96). İtalya'da %89 oranında PCR ile pozitiflik saptanmıştır (105). İsviçre'den bir serideki vakalar ise yine PCR yöntemi ile %66 oranında pozitiftir (106). Macaristan'dan yapılan bir çalışmada %37,5 oranında pozitiflik bulunmuştur (107).

Yukarıda bahsedilen farklı oranların coğrafi bir farklılık olabileceği öne sürülebilse de serilerin az sayıda olgu içerdiği ve virüs tespitinde kullanılan yöntemlerin farklı olduğu göz önünde tutulmalıdır.

C2. Türkiye'de MHK

Ülkemizde Merkel hücreli karsinomun sıklığı ve yıllık insidansı ile ilgili verilere ulaşmak mümkün değildir. Ancak 2019 yılından itibaren MHK olgularını derleyen birkaç seri yayınlanmıştır (108). Yirmi merkezin dahil edildiği çok merkezli klinik bir çalışmada 1999-2018 yılları arasında Türkiye'de MHK tanısı alan olgular derlenmiştir (109). Türkiye'deki insidansın da arttığını belirten yazarlar, serilerindeki 8 hastanın tanısını 1999-2008 arasında aldığını, 81 hastanın ise son 10 yılda aldığını söylemişlerdir (109).

Yine Türkiye'den yapılan histopatolojik ve immünhistokimyasal analiz temelli bir çalışmada ortalama yaşı 68 olan 24 olgu bildirilmiştir (108).

Türkiye'den bildirilen ve MCPyV datası içeren tek çalışma ise 13 vakalık bir seridir. Bu seride vakaların yarısında MCPyV (+) saptanmıştır (110).

D. Risk Faktörleri

Güneş hasarı ve ileri yaş bu hastalık için temel risk faktörleridir (111). Hastaların %10'undan azında ciddi immünsüpresyon görülmektedir. Solid organ transplantasyonu sonrası kullanılan immünsüpresif ilaçlardan dolayı iatrojenik etki ile hastalık riski 5-10 kat veya T hücre immünitesini etkileyen, lösemi ve KLL gibi hastalıklar ile risk 40 kat kadar artabilmektedir (33,112,113). HİV enfeksiyonlu bireylerde ise MHK gelişme riski 10 kat fazladır, bu hastalar AİDS tablosu gelişmeden MHK tanısı alabilmekte ve bu sebeple kaybedilebilmektedir (114).

İmmünsüpresif ilaç kullanımı da önemli bir risk faktörüdür ve bir seride idiopatik pulmoner fibrozis, ülseratif kolit ve romatoid artrit için olan ilaç kullanımları da bu MHK için risk faktörü olarak yer almıştır (115). TNF alfa ve Janus kinaz inhibitörü gibi immünmodülatör ilaç kullanımları da MHK riskini arttırabilmektedir (116,117).

Transplantasyon sonrası gelişen MHK'lerde tümör gelişiminde güneş hasarının, açık ten renkli erkek olmanın, transplantasyon yaşının geç olmasının ve transplantasyon olalı uzun süre geçmiş olmasının öneminden de bahsedilmekte ve bu hastaların sık takip edilmesi gerektiği söylenmektedir (118).

İmmünsüpresyonun tümöre karşı geliştirilebilecek immün cevabın baskılanmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Ayrıca ileri yaşın da etkisiyle immün sistemin fizyolojik olarak zayıflaması MHK'nin ileri yaş popülasyonun artması ile insidansının artmasını da açıklayabilir

(119). İmmünsüpresyon zemininde gelişen MHK'lerin prognozunun da daha düşük olduğu yönünde veriler mevcuttur (113,120).

E. Klinik Özellikler

MHK'nin klinik olarak patognomonik bir bulgusu yoktur. Hastalar genelde hızlı büyüme gösteren, kırmızı-mor (eritematöz), hassas olmayan (ağrısız), sert papül veya nodül ile başvururlar (121). Tanı anında tümörler sıklıkla 2 cm veya daha küçüktür (121). MHK ileri yaşın hastalığıdır ve vakaların %76'sı 65 yaş üstüdür (111). 50 yaş altı vakalar %5'in altında bildirilebilmektedir (122). Ortalama tanı koyulma yaşı 75'dir (122). İmmünsüprese popülasyonda ise bu yaş ortalaması düşebilmektedir (1). Irk dağılımına bakıldığında ise sıklıkla beyazları etkilemektedir (1). ABD verilerine göre hastaların %95'i beyaz, %1'i siyahi ve %4'ü diğer ırklardandır (123). Cinsiyet dağılımı yoktur, fakat bazı serilerde erkeklerde biraz daha fazla çıkabilmektedir (28,111). Bir çalışmada ise erkek kadın oranı 2:1 bulunmuştur (124). Güneş gören yerleri, en sık baş-boyun bölgesini tercih eder (%48) **(Resim 1)** (111). Bazı çalışmalar ise ekstremite ve baş-boyun yerleşimini benzer sıklıklarla bildirmektedir (115). Gövde daha nadir bir lokalizasyondur (%10) (1).

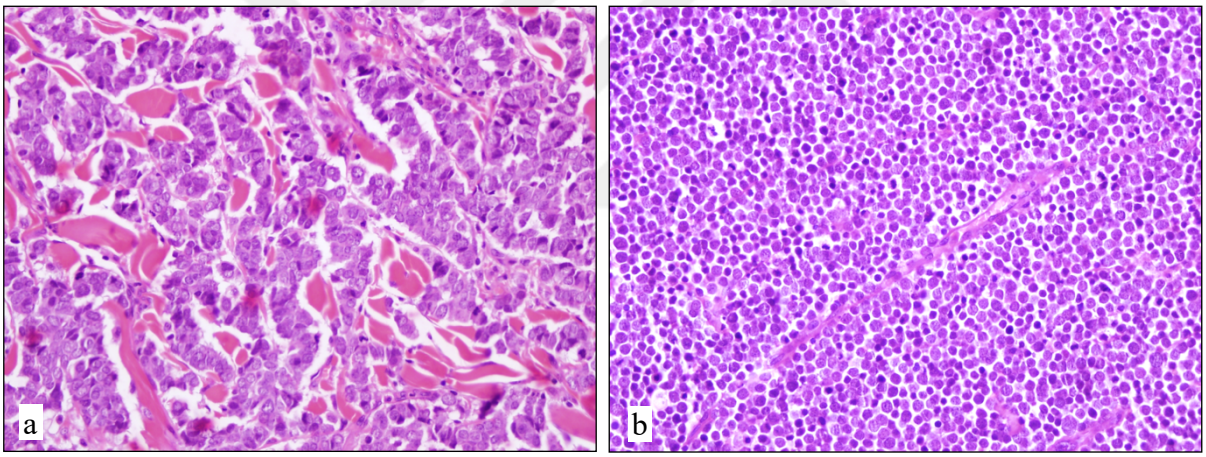
Hastalar tanı anında sıklıkla lokal evrede başvurmakta olup (%63-66), hastaların tanı anında %31'inde nodal, %11'inde uzak metastaz izlenebilmektedir (2,111,121).



Resim 1. Sol frontal bölge kaş üzeri yerleşimli eritematöz nodül (Olgu 23).

F. Histopatolojik Özellikler

Tümör dermis ve/veya subkutiste yer alır (29). Epidermis genelde etkilenmez ama nadiren intraepidermal komponent (%10) bulunabilir ve bazı olgularda erozyon/ülserasyon gözlenebilir (125). Tümörde sıklıkla solid, trabeküler ve yuva paternleri mikst bir şekilde görülür (20). Rozet benzeri oluşumlar gözlenebilir (29). Hücreler sınırları belirsiz, dar sitoplazmalı, granüler tuz-biber kromatinli, küçük ve oval nükleuslu veya daha büyük boyutlu ve belirgin nükleollü olabilir **(Resim 2)** (29). Hücrelerde belirgin ezilme artefaktı, hiperkromazi ve iğsileşme ile KHK'ye benzer bir morfoloji de saptanabilir (104). Histopatolojik olarak küçük yuvarlak hücreli tümörler ile benzerlik gösterir. Mitozdan ve apoptozdan zengin lezyonlardır (20). Daha önceleri trabeküler, "intermediate" ve küçük hücreli varyantlar olarak üç gruba ayrılmış da olsa artık bu ayrımın önemi tartışmalıdır. Bu grupta intermediate varyant en sık izlenen varyant olup, nodüller ve diffüz tabakalardan oluşmaktadır.



Resim 2. MHK'nin klasik histopatolojisi.

a. Anastomozlaşan irregüler trabeküler yapılanma; **b.** Dar sitoplazmalı küçük-oval nükleuslu hücreler (Olgu 26 ve 7).

Tümörlerde çeşitli diferansiyasyonlar gözükebilir. Skuamöz, sarkomatöz, melanositik ve ekrin diferansiyasyonlar bildirilmiştir (126). Bu da hücre kökeninin Merkel hücresi değil primitif bir kök hücre olduğunu düşündürmektedir (127).

Serilerinde MCPyV varlığını araştıran bir çalışma, MCPyV (+) ve MCPyV (-) vakalarının morfolojik farklarını da sunmuştur (124). Çoğu vakalarında diskoheziv, monoton, yuvarlak, tuz-biber kromatinli ve dar sitoplazmalı tümör hücreleri gördüklerini söylerlerken, bazı vakalarda ise iğsileşme veya belirgin nükleol gibi bulgulara rastladıklarını ve bu vakaların daha çok MCPyV (-) vakalar olduğunu söylemişlerdir (124).

MCPyV antikorunun kullanımının yaygınlaşması ile MHK'lerde virüs saptanan ve saptanmayan olgulardaki morfolojik farklar daha da irdelenmeye başlanmıştır. Bildirilen bir seride öncekine benzer şekilde MCPyV (+) vakaların daha yuvarlak, veziküle nükleuslu ve küçük nükleollü olduğu, MCPyV (-) vakaların daha köşeli nükleuslara sahip olduğu söylenmiştir (103). Ayrıca MCPyV (-) olguların bazılarında duktal diferansiyasyon odakları da saptanabilmektedir (103).

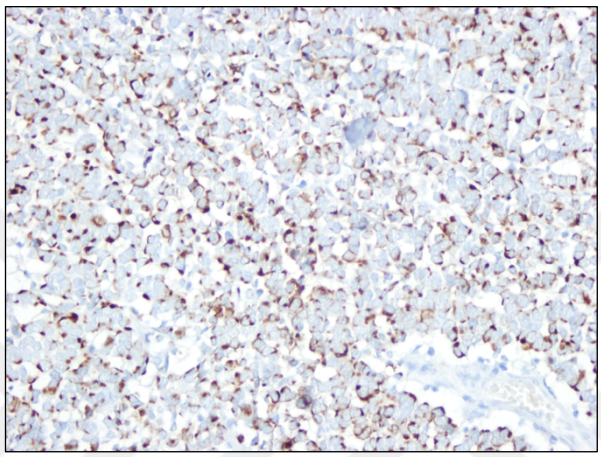
Kuwamoto ve arkadaşları ise, ImageJ programını kullanarak morfometrik bir analiz yapmışlardır (104). MCPyV (-) vakalarda daha irregüler nükleus ve daha geniş sitoplazma, MCPyV (+) vakalarda ise üniform yuvarlak nukleus ve dar sitoplazma saptadıklarını bildirmişlerdir (104). Sonuç olarak çalışmalar iğsi-elonge nükleus, belirgin nükleol, geniş sitoplazma, berrak sitoplazma ve büyük hücre boyutunun daha çok MCPyV (-)'lerde olduğunu özetlemektedir (128,129). Skuamöz, glandüler ve sarkomatöz diferansiyasyonların görüldüğü olgularda da MCPyV'nin olmadığı ve epidermiste displazik değişikliklerin bulunduğu belirtilmiştir (127).

G. Tanıda Kullanılan İmmünhistokimyasal Belirteçler

MHK'nin tanısı immünhistokimyanın yardımı ile konabilmektedir. Tümörde epitelyal belirteçler (CAM5.2, AE1/AE3, 34BE12, BerEP4, EMA) pozitiftir. Karakteristik tanı koydurucu bulgusu olan SK20 ile perinükleer noktasal pozitiflik oranı literatürde %88-95 arası değişmektedir **(Resim 3)** (130,131). Bu boyanma paterni onu diğer NEK metastazlarından ayırmada faydalı olduğu gibi, nöroendokrin diferansiasyon gösteren deri eki tümörlerinden ve bazal hücreli karsinomdan ayırmada da kullanılabilmektedir. Gastroenteropankreatik (GEP) NET'ler %25 oranında SK20 ile pozitif saptanabilirken, ekstrapulmoner viseral ve akciğer kaynaklı NEK'lerde SK20 boyanma olasılığı sırasıyla %6 ve %5 olarak bildirilmektedir (130). MHK'de ayrıca SK7 de nadiren pozitif olabilmektedir (132,133). MHK'de SK20'nin negatif olduğu olgularda, klinik ve radyolojinin de desteği ile, pansitokeratinin perinükleer noktasal tarzda boyanması tanısal olarak anlamlı kabul edilmektedir (20,134).

Nöroendokrin tümörlerde en sık kullanılan nöroendokrin belirteçler hücredeki sinaptik-benzeri vezikülleri işaretleyen sinaptofizin ve kromafin granüllerini gösteren kromogranindir (39). Sinaptofizin daha sensitif, kromogranin daha spesifik belirteçler olarak bilinmektedir. NEK'lerde kromafin granüllerine NET'lere oranla daha az rastlandığından NET'lerdeki diffüz sitoplazmik kromogranin boyanmasından ziyade NEK'lerde noktasal tarzda boyanmalar saptanmaktadır (39). Genel olarak NEK'lerde yaklaşık %25 oranında ise iki belirteçle de

negatiflik söz konusu olabilmektedir (39). Bu gibi durumlarda daha az spesifik olan nöroendokrin belirteçlere, NSE, CD57 ve CD56'ya başvurulabilmektedir (135,136). INSM1 ise daha yeni kullanıma giren ama hem nükleer olmasıyla, hem de sensitivite ve spesifitesinin yüksek olmasıyla tek başına kullanılabilecek bir nöroendokrin belirteçtir (108,137). Yapılan bir çalışmada tüm MHK olgularında INSM1 pozitif bulunmuştur (108). Ayrıca NF1'in de SK20 ile birlikte perinükleer noktasal pozitifliği MHK için oldukça spesifik bulunmakla birlikte SK20 ve MCPyV (-) olgularda NF1'in de negatif (%47) olabileceği bildirilmektedir (138).



Resim 3. SK20'nin perinükleer noktasal ve yarımay tarzında pozitifliği (Olgu 24).

Dokuda MCPyV tespiti için başlarda PCR bazlı yöntemler tercih edilse de, bu yöntemle özellikle virüs tespitinde, laboratuvar kontaminasyonu ve yanlış pozitiflik ihtimali yer almaktadır (139). Artık piyasada bizim de çalışmamızda kullandığımız MCPyV'nin immünhistokimyasal antikorunun iki klonu mevcuttur (9,11). SV40 antikoru ise BK ve JC polyomavirüslerin çapraz reaksiyonu sayesinde polyoma ilişkili hastalıklarda kullanılmakla beraber, MCPyV'yi tespit edememektedir (140).

MCPyV'nin patogenezdeki rolü gösterildikten sonra MCPyV (+) ve MCPyV (-) vakalar arasındaki immünhistokimyasal farklar da araştırılmaya başlanmıştır. Bir çalışmada MCPyV (-) olguların SK7 (%29) ve TTF1 (Klon SP141) (%50) ile pozitif boyanabildiği söylenmiştir (138). MCPyV (+) vakalarda ise SK20'nin daha çok boyandığını belirtmişlerdir (138). MHK'nin etiyopatogenezinde yer alan iki faktöre baktığımızda ise, güneş hasarında TP53 ve RB1 mutasyonu sonucunda protein seviyesinde p53 mutasyonu ile uyumlu boyanma (yani tam kayıp ya da eşik değerin üzerinde pozitiflik) ve Rb1'de kayıp olması beklenmektedir (138,141,142). MCPyV (+) vakalarda ise p53 ile olağan boyanma ve virüsün Rb1'i hücre içinde

tutmasıyla Rb1 ile yüksek pozitif boyanma beklenmektedir (138,141). Fakat bu konuda MHK'de kabul görmüş eşik değer ve kriterler bulunmamaktadır.

MHK morfolojik olarak lösemi/lenfoma, Ewing sarkom/PNET gibi diğer küçük yuvarlak hücreli malign tümörler ile ve daha nadir olarak malign melanom, bazal hücreli karsinom ve hatta skuamöz hücreli karsinom (SHK) ile bile ayırıcı tanıya girebilmektedir. MHK'de LCA, S100 ve vimentin negatif beklenmekte olup, yine bu lezyonlar ile ayrımında kullanılan Pax5, TdT, CD99 ve Bcl2'nin ise çalışmalarda MHK'leri de boyayabildiği gösterilmiştir (20,112). Çalışmalarda özellikle MCPyV (+) olguların CD99 ile perinükleer noktasal karakterde boyandığı (%81'e %10) söylenmektedir (138).

Osteoblastik bir belirteç olarak da kullanılan SATB2'nin de MHK'lerde boyandığı da ilk defa 2014'de Dragomir ve arkadaşları tarafından aslında kolorektal karsinomlar üzerinde yapılan bir çalışmada fark edilmiştir (143). Daha sonra başka bir çalışmada MHK'lerde %75 oranında boyanma saptanmış ve SK20 ile MCPyV (-) vakalarda MHK'nin diğer NEK'lerden ayrımında tanısal bir belirteç olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (144–146).

Ckit immünhistokimyası da MHK'de pozitif olabilmekle birlikte, çalışmalarda KIT mutasyonu saptanmadığı için tedavi açısından bir önem arz etmemektedir (19). Tanı amaçlı ise spesifik olmadığı için pek önerilmemektedir.

Son olarak da bazı çalışmalarda MHK vakalarının yaklaşık yarısında p63 pozitif saptanabilmektedir. p63'ün ayrıca sağ kalım ve evreyle ilişkili olduğu da gösterilmiştir (21,28,147). Çoklu analizlerde ise bağımsız bir prognostik faktör olarak bulunmamıştır (148,149).

H. Moleküler Gelişmeler

Bu konudaki gelişmeler 2008'de MCPyV'nin keşfi ile daha çok gündeme gelmiş, insidansın da artmasıyla çalışmalar artmıştır. MCPyV varlığı en sık quantitative real-time PCR testiyle belirlenebilmektedir (9,145). Ancak kontaminasyon riski sebebiyle, bu testlerde laboratuvarlar eşik değer belirlemelidir (96). Porokarsinomlarda yürütülen bir çalışmada, vakalarının %68'inde MCPyV DNA'sı saptanmış fakat seviyeleri normal deri florasıyla benzer miktarda olduğu için kontaminasyon olduğu sonucuna varmışlardır (87). Shuda ve arkadaşları ise MHK'de MCV genomunun hücrede ortalama 5,2 (0,8-14,3) kopya sayısı olarak bulunduğunu belirtmişlerdir (9). Literatürde kabul gören eşik değerler değişmekle birlikte >1,2 kopya sayısı/hücre en sık kabul görenlerden biridir (145). Bir seride de PCR'de eşik değer >2 kopya sayısı/hücre alındığında MHK'de %80 (48/60) oranında pozitiflik saptanırken, eşik

0,03'e kadar indirildiğinde tüm MHK vakalarında MCPyV saptayabildiklerini söylemişlerdir (11). Başka bir çalışmada ise pulmoner KHK'ler MCPyV PCR ve immünhistokimyası ile araştırılmış, hepsinde negatif sonuç elde edilmiştir (86). PCR'de kullanılan primer setleri MCPyV'nin LTag ve sTag'larını hedef almaktadır (97).

MCPyV (+) ve MCPyV (-) vakalardaki moleküler farklılıklar da sıklıkla araştırılmaktadır. MCPyV (-) vakalarda %85 oranında Sitozin ve Timin tranzisyonları yani UV hasara özgü mutasyonlar saptanırken, MCPyV (+) grupta bu bulgulara rastlanmamıştır (15). MCPyV (+) vakalarda viral onkoproteinlerin tümör süpresör RB1'i ve bazı vakalarda TP53'ü inaktive ettiği, MCPyV (-) vakalarda ise yine bu mutasyonların %60-70 oranında bulunduğu ama ek olarak başka mutasyonların da saptandığı söylenmektedir (14,150). Son dönemde NGS ile yapılan çalışmalarda birkaç vakada BAP1 delesyonu saptanmıştır (151). 2012'de 60 vaka üzerinde yapılan 13 sık görülen kanser geni taramasında altı vakada PIK3CA geninde aktifleşmeye yol açan mutasyonlar görülmüş ve bunların biri haricinde MCPyV (-) vakalar olduğu söylenmiştir (124). Onkojenik mutasyonlardan ayrıca AKT1, EZH2 ve HRAS da değişen oranlarda bulunabilmektedir (15,151).

2021'de nanostring teknolojisiyle MHK'deki gen ekspresyon profillerine, duplikasyon ve delesyonlarına bakılmış ve MHK 3 gruba ayırmıştır. Birinci grupta RB1 ve WT1'i içeren multipl delesyonlar, ikinci grupta düşük seviyede genomik değişikliklerin saptandığı MCPyV (+) vakalar, son grupta ise multipl amplifikasyonlar saptadıkları vakalar mevcuttur (152).

Saptanan mutasyonlar virüs pozitif vakalarda tümörogeneze yardımcı mekanizmalar yaratabilecekleri gibi, virüs negatif vakalardaki tümör gelişimini de açıklayabilir. MHK'de saptanan farklı onkojenik mekanizmalar hastaların klinikte öngörülemeyen gidişatlarına da bir açıklık getirebilir. Bu alandaki gelişmeler hastalar için yeni tedavilerin umudu olabilir.

I. Evreleme

En son AJCC tarafından 2017 yılında güncellenen 8. edisyon patolojik evre sınıflaması (pTNM) (153) **Tablo 2, 3 ve 4**'de özetlenmiştir. 2010'da yayınlanan 7. edisyonda MHK ilk defa kendine ait bir bölümde yer almaktaydı. Önceki edisyonda farklı olarak evre IA lenf nodu patolojik olarak negatif olup, tümör çapı 2 cm ve küçük olan olgulardan oluşurken, evre IB lenf nodu patolojik incelemesi olmayan aynı çaptaki tümörlü olgulardan oluşmaktaydı. 2017'de sentinel lenf nodu biyopsisi (SLNB) uygulamasının yaygınlaşması ve komorbiditeleri yüzünden lenf nodu biyopsisi uygulanamayan hastaların evreleme sisteminde bias oluşturması

sebebiyle evreleme güncellendi (154). Yeni evrelemede Evre I ve II ayrımında tümör çapının yeri olup, lenf nodu tutulumu evreyi III yapmaktadır.

Rehberlerde klinik ve patolojik olarak iki ayrı evreleme sistemi bulunmakta olup, aralarındaki tek fark patolojik evrede evre III'ün kategorilere ayrılmasıdır. Evre grupları **Tablo 5**'de yer almaktadır. MHK'de lenf nodunda izole tümör hücresi ve mikrometastaz kavramları olmayıp, boyuttan bağımsız olarak lenf nodu metastazı varlığında hasta N1 kabul edilmektedir.

Tablo 2. pT evresi

pT	
pT1	Maksimum tümör çapı 2 cm veya daha küçük
pT2	Maksimum tümör çapı 5 cm veya daha küçük
pT3	Maksimum tümör çapı 5 cm'den büyük
pT4	Tümör kemik, kas, fasya ya da kıkırdak invazyonu yapıyor.

Tablo 3. pN evresi

pN	
pN1a(sn)	Klinik olarak okült metastazın SLNB'de saptanması
pN1a	Klinik olarak okült metastazın lenf nodu diseksiyonunda saptanması
pN1b	Klinik ve/veya radyolojik olarak saptanabilen metastaz
pN2	İn transit metastaz* (ayrıca lenf nodu metastazı yok)
pN3	İn transit metastaz (ayrıca lenf nodu metastazı var)

*İn-transit metastaz primer tümörle ilişkisi olmayan, tümör ile drene olunan lenf nodu bölgesi arasında veya primer tümörün distalinde bulunan intralenfatik bölgesel metastaz olarak tanımlanır.

Tablo 4. pM evresi

pM	
pM1a	Uzak deri, subkutan doku veya uzak lenf noduna metastaz
pM1b	Akciğere metastaz
pM1c	Diğer

Tablo 5. Evre grupları

Evre	T	N	M
Evre I	T1	N0	M0
Evre IIA	T2-3	N0	M0
Evre IIB	T4	N0	M0
Evre IIIA	T1-4	N1a	M0
Evre IIIA*	T0	N1b	M0
Evre IIIB	T1-4	N1b-3	M0
Evre IV	T0-4	N0-3	M1

*Primeri bilinmeyen nodal MHK'lerde T evresi T0, uzak metastaz yoksa evre IIIA'dır.

J. Prognostik Faktörler

J1. Klinik Faktörler

Lenf nodu tutulumu ve uzak metastaz varlığı en önemli prognostik parametrelerdir (20). MHK'de bölgesel lenf noduna yayılım olguların ortalama %55'inde saptanır. Uzak metastaz ise hastaların %35'inde saptanmakta olup, en sık karaciğer, kemik, akciğer ve uzak deride beklenmektedir (155). Lokal nüks de oldukça sıktır ve olguların %40'ında saptanmaktadır (156). Beş yıllık genel sağ kalım evreye göre %30-60 arası değişmektedir (2,32). Bir seride beş yıllık sağ kalım lokalize hastalık için %50, bölgesel hastalık için %35 ve metastatik MHK için %15 olarak bildirilmiştir (108). Türkiye'den bildirilen bir seride ise 2 yıllık genel sağ kalım lokalize hastalık için %71,3, metastatik hastalık için %18,5 olarak bildirilmiştir (109).

Çalışmalar tümörün baş-boyun bölgesi yerleşimli olmasının kötü prognostik belirteç olduğunu söylemektedir (109,153). Ayrıca başka bir çalışmada da ekstremite lokalizasyonu, erken evre, genç yaş (<65 yaş) ve kadın cinsiyet pozitif prognostik faktörler olarak belirlenmiştir (111).

J2. Histopatolojik Faktörler

Tümör çapı kanıtlanmış tek bağımsız prognostik faktördür (20,157,158). Lokal evredeki hastalar için tümör çapının 2 cm ve daha küçük olması iyi prognostik parametre olarak kabul edilmektedir (2). Tümör çapının 2 cm'nin üzerinde olması ve lenfovasküler invazyon saptanmış olması hem kötü prognoz göstergesi hem de artmış lenf nodu metastazı riskini işaret etmektedir (157,159).

Kesitlerde izlenen tümörün sonlanma paterni de prognostik önem taşımaktadır. Tümör çevre dokudan iyi sınırlarla ayrılıyorsa nodüler/itici sınırlı olarak isimlendirilmektedir (159). Nodüler tümörler bir veya birkaç nodülden oluşabilir. İnfiltratif sınırlı tümörlerde patern genelde tek hücreler, sıralanmalar ve trabeküler yapılanmalar şeklindedir (159). Tümörde hem nodüler hem infiltratif sınırlar görülüyorsa tümör infiltratif sınırlı olarak sınıflandırılmalıdır (159). Tümör sınırlarının nodüler/itici olmasının iyi, infiltratif olmasının ise kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (157,158).

Tümör kalınlığı stratum granülozumdan en derin infiltrasyon noktasına kadar ölçülerek verilmekte ve tümör kalınlığının prognoza katkısını anlamlı bulan çalışmalar olduğu gibi,

katkısı olmadığını belirtenler çalışmalar da mevcut olmaktadır (158,160). İnvazyon derinliğinin anatomik seviyesinin malign melanomda olduğu gibi önemli olabileceğini söyleyen de küçük birkaç seri olmakla birlikte, bunu desteklemeyen çalışmalar da mevcuttur (159,160).

Tümörü infiltre eden lenfositler (TİL) tümör ve stroma arasında bulunan lenfositler olarak tanımlanır. Kütane melanomlarda kullanılan TİL sınıflaması MHK'lerde de önerilmektedir. Bu sınıflamaya göre TİL yok (lenfosit hiç yok veya var ama tümörü infiltre etmiyor), var ama düşük yoğunluklu (lenfositler tümörü fokal olarak infiltre ediyor), var ve yoğun (tümör tabanını tamamen sarıyor ya da invaziv tümörün içerisine giriyor) şeklinde belirtilmelidir. TİL'in prognoza etkisi konusunda literatürde çelişkili sonuçlar mevcuttur (20). TİL varlığının daha çok MCPyV (+) vakalarda olduğu ve bu vakaların prognozunun daha iyi olduğunu söyleyenler mevcuttur (20,157,161). Başka bir seride ise yoğun TİL kötü prognostik parametreler arasında yer almıştır (158). Ayrıca TİL'e yönelik immünfenotipleme çalışmaları da yapılmakta olup, bir seride MCPyV (+) tümörlerde CD8 seviyelerinin daha yüksek olduğu ve bu grubun daha iyi prognozlu olduğu ileri sürülmüştür (110).

MHK'ler mitozdan zengin lezyonlardır. Bir çalışmada bir büyük büyütmede 10'dan fazla mitoz olması kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (20).

Malign melanomda önemli bir prognostik parametre olan ülserasyon ise MHK'de prognostik bir anlam taşımamaktadır (159).

K. Tedavi ve Takip

K1. Cerrahi Tedavi

MHK'de esas tedavi lezyonun total eksizyonu olup, çıkarılabilen tüm tümörler hasta ileri evre dahi olsa eksize edilir (162). Bir-iki cm temiz marjin ile geniş eksizyon en sık uygulanan cerrahi tedavi yöntemidir. MOHS cerrahisi de tercih edilebilen bir yöntem olmakla beraber, in-transit metastaz riskini arttırdığı yönünde bulgular ortaya atıldığı için şuan için kullanımı tartışmalıdır (162).

Klinikte lenfadenopati saptanırsa hastalara primer tümörün eksizyonuyla beraber lenf nodu diseksiyonu da yapılmaktadır (162). SLNB'nin fizik muayene ve radyolojide lenf nodu metastazı saptanmayan olgularda uygulanması önerilmektedir. Preoperatif radyoaktif işaretleyici madde lezyon çevresine enjekte edildikten sonra gama prob yardımı ile sentinel lenf nodları çıkarılmaktadır. Bu yöntemle primer tümörü küçük olan olgularda bile tanı anında %10-

20 oranında okült nodal metastazlar saptanabileceği söylenmektedir (154). Bir çalışmada klinikte palpabl lenf nodu olmayan ve radyolojisi negatif olan olguların %30,6'sında SLNB uygulamasıyla metastaz saptandığı bildirilmiştir (169). SLNB'si pozitif çıkan olgular tamamlayıcı lenf nodu diseksiyonuna gitmektedir.

K2. Sistemik Tedavi

Cerrahi sonrası adjuvan RT lokalize hastalıkta en sık tercih edilen tedavi yöntemidir. Risk faktörü olmayan, erken evredeki cerrahi sınırı negatif olan olgularda tercih edilmeyedebilmektedir. Bazı olgularda ise tümörün R0 çıkarılması mümkün olmayıp, primer tedavi RT olabilmektedir (163). Adjuvan RT'nin lokal nüksü azalttığı bildirilmekle birlikte etki etmediğini söyleyenler de mevcuttur (150,164). Sadece cerrahi tedavi uygulanan hastalar ile beraberinde RT alan olgular arasında sağ kalım açısından sınırda anlamlı fark elde eden çalışmalar da mevcuttur (93). RT bölgesel hastalıkta primer lezyon dışında lenf nodu bölgesini de hedefleyebilmektedir.

MHK kemosensitif bir tümör gibi düşünülse de, KT'ye olan cevaplar geçicidir. Morbiditesi çok yüksek olduğu ve evre III hastalarda faydası gösterilemediği için evre IV metastatik hasta grubu dışında önerilmemektedir (165). Metastatik hastalarda palyatif amaçlı da KT denenebilmektedir ancak etkisi tartışmalıdır (165). Sitotoksik KT'ler ile ileri evre hastalarda başlangıçta hızlı bir yanıt alınsa bile, genelde 3-15 ay içerisinde progresyon/nüks izlenmekte ve yalnızca %10 hasta grubunda anlamlı bir klinik cevap gösterilebilmektedir (166). En sık kullanılan ilaçlar sisplatin veya karboplatin ve etoposid kombinasyonudur.

K3. Güncel Çalışmalar

Anti-PD-1 ve PD-L1 ajanlar çeşitli tümörlerde ve çeşitli evrelerdeki hastaların tedavisinde tümör regresyonunda faydalı ajanlar olarak gösterilmektedir (167–169). MHK'de tümör mikroçevresi ile ilgili araştırmalar sonucunda %49 oranında MHK'nin PD-L1 içerdiği görülmüş ve bu vakalarda intratümöral lenfositlerin de varlığı ile MHK'nin immünojenik bir tümör olduğu düşünülmüştür (170). MHK'de klinik çalışmalarda PD-1 inhibitörü üç ilaç denenmiştir (171). Anti-PD-L1 ajan Avelumab 2017'de yılında ilk onay alan ilaçtır (171). Pembrolizumab (anti PD-1) ve Nivolumab'ın (anti PD-1) da tedavide faydalı olduğu gösterilmiştir (171). İmmünoterapi daha önceleri Evre IV'de KT sonrası ikincil tedavi seçeneği

olarak sunulurken, KT'nin PD-1/PD-L1 inhibitörü ilaçlara olan cevabı azalttığı ortaya konulduğundan bu yana bu yaklaşımdan uzaklaşılmaktadır (171). Artık immünoterapi tedavileri evre IV metastatik MHK olgularında birinci basamak tedavi olarak kullanılmaya başlanmıştır (172).

Dokudaki PD-L1 ekspresyon durumu ile tedavi-cevap ilişkisine bakıldığında ise, PD-L1 ekspresyonu olmayan tümörlerle ekspresyon gösteren tümörler arasında fark saptanmamıştır. Bu nedenle dokuda immünhistokimyasal olarak PD-L1 bakılması önerilmemektedir (172,173).

İmmünoterapinin etkinliğine baktığımızda ise günümüze kadar yapılan çalışmalarda hastaların yaklaşık %50'sinde immünoterapinin fayda sağladığı gösterilmiştir. Ancak elde edilen yanıtın ortalama sürviye katkısının ayları aşmadığı belirtilmektedir (ortalama 6 ay) (174).

K4. Hastaların Takibi

MHK'de nüks ve metastazlar hastalık seyrinde genelde ilk iki ila üç yılda ortaya çıktığı için hastaların takibinde bu süreç çok önemlidir (175). İlk üç yılda 3-6 ay aralıklarla, sonrasında ise 6-12 ay aralıklarla takip önerilmektedir. Takiplerde fizik muayene ve radyolojik incelemeler yer almaktadır. İmmünsüprese hastalarda takip daha da sıkılaştırılabilmektedir. İmmünsüprese hastalarda immünsüpresif ilaçların dozunun ayarlanması önerilmektedir.

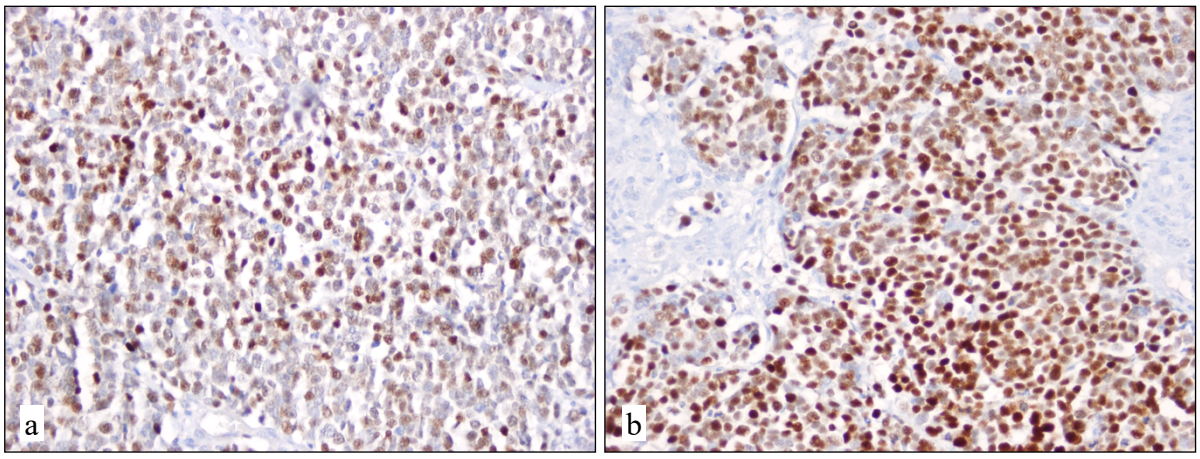
Viral onkoproteine karşı gelişen antikorun serumda bakılabilmesiyle, hastaların takibinde kullanılabileceği öngörülmüştür. Bu kapsamda Paulson ve arkadaşları 219 MHK vakasını tanıdan itibaren başlayarak ortalama iki yıl boyunca bu yöntemle takip etmiştir. Sağlıklı bireylerdeki antikor düzeylerine de bakılmış, %1 olarak bulunmuş, MHK hastalarında ise %52 gibi yüksek bir oran saptanmıştır (176). Tanı anında titresi yüksek saptanan olgularda daha az nüks saptanmış ve tedavi ile ortalama 8 ayda antikorun negatifleştiği belirtilmiştir (176). Bu hastalar arasında nüks geliştirenlerde ise seri antikor takipleriyle nüksün habercisi olarak antikor titrelerinin yükseldiği saptanmıştır (176).

L. Çalışmada Kullanılan İmmünhistokimyasal Belirteçlerle İlgili Genel Bilgiler

L1. Merkel Cell Polyomavirüs

Feng ve arkadaşları 2008'de dijital transkriptom sekanslama yöntemiyle MCPyV'ye ait keşfini yaptıktan ve laboratuvarlar farklı primerler kullanarak PCR metodlu çalışmalarını yayınladıktan sonra 2009'da MCPyV'ye yönelik ilk monoklonal antikor (CM2B4) geliştirilmiştir **(Resim 4a)** (9). Antikor virüsün LTag'ındaki ekzon 2'nin peptid sekansı baz alınarak geliştirilmiş olup, bu ekzon MCPyV'ye spesifiktir. Diğer insan polyomavirüslerinin T antijenleri ile çapraz reaksiyon göstermemektedir. MCPyV (CM2B4) nükleer bir belirteçtir (9). Oldukça spesifik olan bu antikorun sensitivitesi biraz düşük olup, PCR ile pozitif olan olguların %67-77'sini boyadığı gösterilmiştir (86,138). Başka bir çalışmada yine MCPyV PCR ve monoklonal antikorun sensitivitesi karşılaştırıldığında, PCR ile vakaların %88'inde virüs saptanırken, immünhistokimyasal yöntem ile %58'inde pozitivite saptandığı belirtilmiştir (177). Vakaların virüs durumlarını primer ve metastatik lezyonlarda karşılaştırdıklarında ise bir fark bulunmamıştır (177).

Rodig ve arkadaşları MCPyV'nin immünhistokimyasal tespiti için 2012 yılında yeni bir klon (Ab3) geliştirmiştir **(Resim 4b)** (11). Bu klonun CM2B4'e oranla hem daha sensitif, hem de daha temiz bir boyanma yaptığı düşünülmektedir (11). Bu klon da CM2B4 gibi virüsün LTag'ına bağlanmakta olup, sTag'ı saptamamaktadır. Bağlanma bölgesi LTag üzerindeki 79. ve 260. aminoasitler arasındadır.



Resim 4. MCPyV antikoru ile boyanma.

a. CM2B4 klonu; **b.** Ab3 klonu (Olgu 47).

L2. SK20

Sitokeratinler hücre iskeleti yapıtaşlarından birini oluşturan intermediyer iplikçiklerin "epitelyal" alt grubunda yer almaktadırlar (82). Molekül ağırlıklarına göre düşük molekül ağırlıklı veya yüksek molekül ağırlıklı olarak iki gruba ayrılmakta ve buna göre isimlendirilmektedirler (82). Farklı sitokeratinler farklı hücrelerde yer almakta olup, epitelyal farklılaşmayı göstermede ve farklı organlardan kaynaklanan karsinomların, özellikle de metastazların tanısında kullanılabilmektedirler (82).

SK20 düşük molekül ağırlıklı grupta yer almakta olup, normal gastrik, intestinal, ürotelyal epitel ve Merkel hücrelerini işaretlemektedir (178). Çalışmalar SK20'nin kolon, mide, pankreatobiliyer sistem adenokarsinomlarında, müsinöz over tümörleri, ürotelyal karsinom ve MHK'de reaksiyon verdiğini göstermiştir (178). Meme, akciğer ve endometrium adenokarsinomları bu antikor ile negatif sonuç vermektedir (179). SHK'lerde reaksiyon saptanmamaktadır (178). Çalışmamızda kolon adenokarsinomu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrolde SK20 ile sitoplazmik boyanma görülürken, MHK olgularında keratin iplikçikleri perinükleer sitoplazmada kümelendiği için yarımay şeklinde membranöz ve noktasal boyanmalar izlenmektedir (125).

L3. p53

TP53 17. kromozomda yer alan bir tümör süpresör gendir. DNA çeşitli sebeplerle hasara uğradığında diğer tümör süpresör proteinlerle birlikte TP53 geni tarafından kodlanan p53 proteini hücre bölünme siklusunu durdurarak, hasarın düzeltilmesini sağlayan ya da düzeltilemezse hücre apoptozunu tetikleyen bir göreve sahiptir (82). CDKN2A tümör süpresör geni tarafından kodlanan p14/ARF, MDM2'ye bağlanıp, hücredeki p53 seviyesini arttırmaktadır (82). p53 hücre içinde birikmekte ve hücre bölünmesini G1-S fazında durdurmaktadır (180). Hücredeki p53 fonksiyonu MDM2 ve MDM4 ile inaktive edilebilmektedir (82).

Kanserlerde en sık mutasyona uğradığı bilinen gendir (82). Tüm kanserlerin en az %50'sinde mutasyona uğradığı veya silindiği gösterilmektedir (180). Böylece hücre apoptoz sürecini başlatamamakta ve ölümsüzleşmektedir (82).

Çoğu DNA virüsünün de p53'ü inaktive ettiği bilinmektedir (82). MHK'de de kromoza entegre olan MCPyV mutant LTag üretmekte ve konak hücrede onkojenik süreçleri başlatmaktadır (79). LTag'ın p53'e bağlanma noktası olmamakla birlikte, Rb1'e bağlanması,

indirekt olarak p53'ü etkilemektedir (79) Rb1'deki fonksiyon kaybı E2F-1 transkripsiyon faktörlerinin regülasyonunu bozmakta ve E2F-1'in yine tümör süpresör bir protein olan p14ARF'ı aktive etmesine, p14ARF'ın MDM2-p53 kompleksine bağlanarak p53 regülasyonunun bozulmasına sebep olmaktadır (181). Çalışmamızda p53 ekspresyonu immünhistokimyasal seviyede araştırılmış ve kolon adenokarsinomu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

L4. Rb1

RB1 13. kromozomda yer alan ilk keşfedilen tümör süpresör gendir (82). RB1 inaktivasyonu ile pediatrik retinoblastom tümörüne yol açmaktadır (182). Çalışmalar başka birçok kanserde de RB1 geninde mutasyon olduğunu göstermektedir (183,184).

RB1 geni nükleer bir fosfoprotein olan Rb1'i kodlamaktadır (185). Hipofosforile Rb1 E2F transkripsiyon faktörlerine bağlanarak ve onları inhibe ederek hücre siklüsünde G1'den S fazına geçişi engelleyebilen ve denetleyen bir göreve sahiptir (186). Hiperfosforile konumda iken ise inaktiftir (82).

RB1 geninde çoğunlukla fonksiyon kaybına yol açan mutasyonlar görülmekte ve bu immünhistokimyasal seviyede ekspresyon kaybı olarak saptanabilmektedir (187). Bazı durumlarda ise CDK / Siklin D aktivitesini arttıran mutasyonlar sonucu Rb1 inaktif hiperfosforile konumuna geçebilmektedir (82). Kolorektal karsinomlardaki RB1 mutasyonları ise farklı olup, çalışmalarda RB1 gen kopya sayısında artış görülmüş ve bu immünhistokimyasal seviyede de gösterilebilmiştir (188).

Onkojenik DNA virüslerinin proteinleri ile hücre siklüsünün kontrolunu bozduğu ve proliferasyona yol açtığı ilk olarak 1988'de adenovirüsün E1A proteinin Rb1'e bağlandığının saptanması ile gösterilmiştir (189,190). Benzer şekilde serviks kanserinde HPV'nin E7 proteini ve Burkitt lenfoma'da EBV viral onkoproteinleri de Rb1'e bağlanmaktadır (186). Bu bağlanmalar sonucu Rb1 E2F'ye bağlanamamakta ve hücre sürekli bölünmektedir (82). Polyomavirüslerdeki LTag'ın da yine Rb1'e bağlandığı ve bunun malign transformasyon için gerekli olduğu kanıtlanmıştır (191,192). Çalışmamızda Rb1 ekspresyonu immünhistokimyasal seviyede araştırılmış ve kolon adenokarsinomu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

L5. Ki67

Ki67 proliferasyon gösteren neoplastik ve non-neoplastik hücrelerde nükleer ve nükleoler ekspresyonu olan bir non-histon proteindir (193,194). İlk olarak Kiel (Ki) şehrinde bir patoloji laboratuvarında keşfedildiğindeki klon numarası (67) ile anılmaktadır (194). Daha sonra 90'lı yıllarda MIB-1 klonunun geliştirilmesi ve frozen dışında parafin bloklarda da kullanılabilmesiyle kullanımı yaygınlaşmıştır (195). 2000'lerde ise prognostik önemi daha da kavranmış ve NET'ler başta olmak üzere birçok tümörde gradlama sistemlerine dahil olmuştur (196).

HE'de veya PHH3 yardımı ile sayılan mitoz sadece mitoz (M) fazındaki hücreleri kapsarken, Ki67 interfaz (G1, S ve G2 fazları) ve mitoz (M) fazındaki hücreleri işaretlemektedir (193). Hücre siklusu ilerledikçe Ki67 ekspresyonu da artmakta ve en çok G2/M'de boyanmaktadır (193). Hücreler zayıf, güçlü, diffüz veya fokal reaksiyonlar verebildiğinden saptanan bütün boyanmaların dikkate alınması önerilmektedir (197). Non-neoplastik hücreler de reaksiyon gösterebildiğinden hedef hücrenin doğru belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Primer tümörlerde olduğu gibi metastazlarda da sayılması önerilebilmektedir (197).

Ki67 tümör içinde heterojen bir boyanma sergilediği için "hücre sayma metodları" geliştirilmiştir (197). Ki67 değerlendirmesi çeşitli yöntemlerle yapılabilir. En sık "eyeballing" yöntemi yani mikroskop başında tahmin yöntemi kullanılmaktadır (197). Fakat bu değerlendirme değerlendiriciler arası fark içerebilmekte ve her zaman doğru değeri yansıtmamaktadır (197). Çalışmalarda da gösterilen en çok kabul gören hücre sayma metodu basılı fotoğrafta manuel hücre sayımıdır (197). Hotspotta, yani Ki67'nin en yüksek olduğu alanda, en az 500 ila 1000 hücre sayılması önerilmektedir. Bu yöntem en güvenilir yöntem olduğu halde çok zaman almaktadır (198). Sürenin kısaltılması bizim de çalışmamızda seçtiğimiz asetat kağıdı yardımı gibi yöntemlerle mümkündür (25).

BÖLÜM III

GEREÇ VE YÖNTEM

I. Çalışma Grubunun Oluşturulması

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nın bilgisayar kayıtlarında "nöroendokrin karsinom ve merkel hücreli karsinom" anahtar kelimeleri kullanılarak yapılan detaylı araştırma sonucunda 2002-2022 yılları arasında MHK tanısı almış 67 adet biyopsi ve/veya eksizyon materyali tespit edildi. Hastaların dijital ortamda patoloji raporları yeniden gözden geçirildi. Böylece çalışmada yer alması planlanan hasta grubu belirlenmiş oldu.

Olgulara ait arşiv materyalini oluşturan tüm HE boyalı lamlar ve daha önce tanı amaçlı yapılmış olan immünhistokimyasal preparatlar yeniden incelenerek immünhistokimyasal inceleme için uygun parafin bloklar seçildi. Konsültasyon materyallerinde parafin blokların iade edildiği durumda, arşivimizde son 5 yıla ait boş lamlar mevcut ise immünhistokimyasal incelemeler için bu lamlar kullanıldı. Parafin blok ve boş lam bulunamaması durumunda hastaya ait ikinci bir biyopsi varlığı kontrol edildi, hastaya ait herhangi bir materyal yok ise hasta çalışma kapsamından çıkarıldı. Böylece parafin bloklarına ulaşılamayan 12 olgu çalışma dışı bırakılmış oldu. Bir olgu ise morfolojik ve immünhistokimyasal değerlendirmeyi mümkün kılmayan fiksasyon yetersizliği sebebiyle çalışma dışı bırakıldı ve çalışmaya 54 olgu ile devam edildi.

II. Klinik Parametreler

Olgulara ait anamnez geçmişi, patoloji ve radyoloji kayıtları hastane otomasyon sistemi kayıtlarından ayrıntılı olarak incelendi. Klinik öykü ve klinisyen ön tanıları not alındı. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü'nde takipli 28 hastanın tedavi, takip ve sağ kalım verilerine onkoloji dosya arşivinden ulaşıldı. Kalan 26 hastayla birebir iletişim kurularak eksik veriler tamamlandı.

Olgular NCCN 2021 rehberinde belirlenmiş MHK için temel risk faktörleri olan, KLL, HİV enfeksiyonu ve transplantasyon öyküsü açısından tekrar gözden geçirildi. Ayrıca eşlik eden başka hastalıklar, maligniteler ve özellikle immünsüpresif ilaç kullanımları sorgulandı.

III. Histopatolojik Değerlendirme

Olgulara ait HE boyalı preparatların incelenmesi sırasında bir matbu form oluşturularak tümörlere ait prognostik etkisi olduğu kanıtlanmış histopatolojik parametreler not edildi. Daha sonra virüs durumuyla ilişkili olabilecek özellikler ayrıca not edildi. Bu özellikler daha önce yapılan benzer araştırmalar örnek alınarak incelendi (138). Nükleus şekli, nükleol belirginliği, kromatin yapısı, sitoplazma özellikleri, rozet benzeri yapılar, intraepidermal komponent varlığı üç patolog tarafından araştırıldı.

Prognoza etkisi olduğu kanıtlanmış histopatolojik parametreler patoloji raporlarından ve lamların tekrar incelenmesiyle elde edildi. Bu parametrelerden sayılan lenfovasküler invazyon ve mm^2'deki mitoz sayısı lamların tekrar incelenmesiyle elde edildi. Mitoz en yüksek olduğu 2 mm^2'lik alanda sayılıp, mm^2 cinsinden verildi. Literatürde 10 mitoz üstü kötü prognostik parametre olarak kabul edildiği için istatistikte bu eşik değer kullanıldı (20). TİL yani tümör ve stroma arasında bulunan lenfositler belirlendi. TİL yok (lenfosit hiç yok veya var ama tümörü infiltre etmiyor), var-düşük yoğunluklu (lenfositler tümörü fokal olarak infiltre ediyor), var-yoğun (tümör tabanını tamamen sarıyor ya da invaziv tümörün içerisine giriyor) şeklinde skorlandı. Tümör sınırları değerlendirildi. Nodüler/itici patern ve infiltratif patern olmak üzere iki grup oluşturuldu. İnfiltratif paternde tek hücreler, sıralanmalar ve trabeküler yapılanmalar yer almaktaydı. Küçük bir alanda bile infiltran patern saptanması durumunda tümör infiltratif kategorisine alındı (158,159).

IV. İmmünhistokimyasal Yöntem

İmmünhistokimyasal değerlendirmenin sağlıklı yapılabilmesi için önce kontrol blokları oluşturuldu. SK20, p53 ve Rb1 için pozitif eksternal kontrol olarak kolon adenokarsinomu kullanıldı. Ki67 için internal kontrol olarak epidermisin bazal tabakası esas alındı. MCPyV antikorları için MHK dışında kontrol bulunmadığı için çok sayıda parafin blok materyali bulunan 3 olgu birleştirilip bir lama kesilerek denemeler yapıldı. Antikorlar için ideal dilüsyon ve inkübasyon süreleri bu bloklar üzerinde çalışılarak belirlendi.

Çalışılacak parafin bloklar belirlenirken canlı doku oranı ve optimal fiksasyon hususları göz önüne alındı. Primer lezyona ait parafin bloğu olmayan 5 olguda, literatürde primer ve metastazlarda idantik immünhistokimyasal sonuçlar elde edilmesi gözetilerek, immünhistokimyasal incelemeler metastaza ait parafin bloğa uygulandı (100,199). Bloklardan pozitif şarjlı lamların üzerine 3 mikrometre kalınlığında yeni kesitler alındı. Bu preparatlar 56

derecelik etüvde bir gece boyunca bekletilerek kurutuldu ve kesitlerin bu şekilde lama yapışması sağlandı. Preparatlar immünhistokimyasal yöntemin uygulanacağı güne kadar üstü kapalı olarak oda sıcaklığında bekletildi. Belirlenmiş parafin bloklar üzerinde tabloda ayrıntıları belirtilen belirteçler uygulandı.

Bir gece etüvde bekletilen lamlar Ventana Medical System-Benchmark XT IHC/ISH Staining modülüne yerleştirildi ve sırasıyla aşağıdaki prosedürler uygulandı:

A. MCPyV (Ab3)

1. Ksilen içinde deparafinizasyon sonrası alkol solüsyonlarından geçerek distile su ortamına geliş
2. EDTA ile pH 8'de (CC1) antijen geri kazanımı
3. 37 derecede primer antikor MCPyV (Ab3) (1/200) inkübasyonu (60 dakika)
4. DAB kromojen uygulaması
5. Distile su ile yıkama
6. Hematoksilen ile zıt boyama

B. MCPyV (CM2B4)

1. Ksilen içinde deparafinizasyon sonrası alkol solüsyonlarından geçerek distile su ortamına geliş
2. EDTA ile pH 8'de (CC1) antijen geri kazanımı
3. 37 derecede primer antikor MCPyV (CM2B4) (1/50) inkübasyonu (120 dakika)
4. Amplifier uygulaması
5. DAB kromojen uygulaması
6. Distile su ile yıkama
7. Hematoksilen ile zıt boyama

C. SK20 (Ks20.8)

1. Ksilen içinde deparafinizasyon sonrası alkol solüsyonlarından geçerek distile su ortamına geliş
2. EDTA ile pH 8'de (CC1) antijen geri kazanımı
3. 37 derecede primer antikor SK20 (Ks20.8) (1/100) inkübasyonu (32 dakika)
4-6. aşamalar *MCPyV (Ab3)* ile aynı

D. SK20 (SP33)

1. Ksilen içinde deparafinizasyon sonrası alkol solüsyonlarından geçerek distile su ortamına geliş
2. Citrat ile pH 6'da (CC2) antijen geri kazanımı
3. 37 derecede primer antikor SK20 (SP33) inkübasyonu (32 dakika)
4-6. aşamalar *MCPyV (Ab3)* ile aynı

E. p53 (DO-7)

1. Ksilen içinde deparafinizasyon sonrası alkol solüsyonlarından geçerek distile su ortamına geliş
2. EDTA ile pH 8'de (CC1) antijen geri kazanımı
3. 37 derecede primer antikor p53 (DO1) (1/100) inkübasyonu (32 dakika)
4-6. aşamalar *MCPyV (Ab3)* ile aynı

F. Rb1 (358)

1. Ksilen içinde deparafinizasyon sonrası alkol solüsyonlarından geçerek distile su ortamına geliş
2. EDTA ile pH 8'de (CC1) antijen geri kazanımı
3. 37 derecede primer antikor Rb1 (358) (1/100) inkübasyonu (32 dakika)
4-6. aşamalar *MCPyV (Ab3)* ile aynı

G. Ki67 (MIB-1)

1. Ksilen içinde deparafinizasyon sonrası alkol solüsyonlarından geçerek distile su ortamına geliş
2. EDTA ile pH 8'de (CC1) antijen geri kazanımı
3. 37 derecede primer antikor Ki67 (MIB-1) inkübasyonu (1 saat)
4-6. aşamalar *MCPyV (Ab3)* ile aynı

Makineden çıkarılan preparatlar oda sıcaklığında kurutulup 30 saniye boyunca ksilende bekletildikten sonra 'DPX mount' kapatma maddesi ile kapatıldı. Aynı işlemler tüm immünhistokimyasal belirteçler için uygulandı.

Çalışmada kullanılan immünhistokimyasal belirteçlere ait özellikler **Tablo 6**'da özetlenmiştir.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan immünhistokimyasal belirteçlere ait özellikler

Antikor	Üretici firma	Klon	Dilüsyon	İnkübasyon süreleri
MCPyV – Mouse monoclonal antibody	Abcam	Ab3	1/200	60 dakika
MCPyV – Mouse monoclonal antibody	Santa cruz	CM2B4	1/50	120 dakika
SK20 – Mouse monoclonal antibody	Cell marque	Ks20.8	1/100	32 dakika
SK20 – Rabbit monoclonal antibody	Ventana	SP33	Kullanıma hazır	32 dakika
p53 – Mouse monoclonal antibody	Novocastra	DO-7	1/100	32 dakika
Rb1 – Mouse monoclonal antibody	Leica	358	1/100	32 dakika
Ki67 – Mouse monoclonal antibody	Dako	MIB-1	Kullanıma hazır	60 dakika

V. İmmünhistokimyasal Değerlendirme

İmmünhistokimyasal boyalar değerlendirilirken hem lam üzerindeki eksternal kontrolün çalışıp çalışmadığı hem de dokudaki internal kontroller kontrol edildi, boyalar güvenilir bulunmadığı durumlarda tekrar edildi.

A. MCPyV (CM2b4 ve Ab3 klonları için)

Hücrelerde nükleer boyanma arandı (10,11). Yüzde verilmedi, vakalar pozitif ya da negatif olarak yorumlandı. Kervarrec ve aradaşlarının kabul ettikleri Allred skorlama sistemine göre skor 2'nin üzerinde olan vakalar yani %1'in üzerinde orta şiddette boyanan vakalar pozitif kabul edildi (145). Vakalarda nükleer boyanma ile birlikte sitoplazmik boyanmanın da olabileceği bilinmekteydi, sitoplazmik boyanma tek başına pozitif kabul edilmedi (100). Boyanmalar granüler patern sergileyebilmekteydi (100).

Ab3 klonu ile benzer değerlendirme kriterleri uygulanmış olup, yine boyanmaların nükleer veya nükleer ve sitoplazmik olabileceği bilinmekteydi (11). Tek başına sitoplazmik boyanma negatif kabul edildi.

B. SK20 (Ks20.8 ve SP33 klonları için)

Hücrelerde membranöz, perinükleer noktasal ve yarımay tarzında boyanmalar arandı (145,200). Eşik değer bulunmamakta olup, fokal boyanmalar bile olsa olgu SK20 ile pozitif kabul edildi.

Eksternal kontrol olarak kolon adenokarsinomu, internal kontrol olarak Merkel hücreleri değerlendirildi.

C. p53 (DO-7)

Hücrelerde nükleer boyanma arandı. p53'ün MHK'de immünhistokimyasal değerlendirmesi ve eşik değerleriyle ilgili az sayıda çalışma mevcut olduğu için p53 skorlamasının ilk geliştirildiği ve rutinde yaygın kullanımı olan, immünhistokimya ile gen mutasyonu arasındaki uyumun da optimize edildiği jinekopatolojik değerlendirme rehberleri göz önüne alındı (201,202). Mutasyonla uyumlu boyanma için ya tüm tümör hücrelerinde kayıp (internal ve eksternal kontrollerde olağan boyanmaya karşı) yani "null" patern ya da diffüz ve güçlü boyanma yani "missense" mutasyon paternleri arandı. Değerlendirme yapılırken olgulara boyanma yüzdesi verildi, istatistiksel analizlerde MHK'de literatürde de kullanılmış olan %20 ve %50 eşik değerleri dikkate alındı (142,203). Arada kalan tüm boyanmalar olağan kategoride yer aldı.

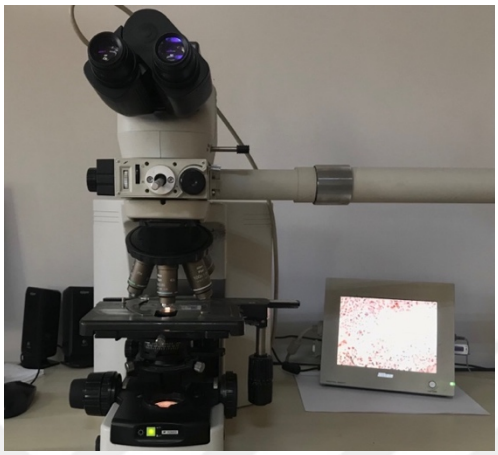
D. Rb1 (358)

Hücrelerde nükleer boyanma arandı. Rb1'in MHK'de immünhistokimyasal değerlendirmesi ve eşik değerleriyle ilgili az sayıda çalışma mevcut olduğu için Rb1 immünhistokimyasının sıklıkla kullanıldığı akciğer KHK ile ilgili kaynaklar göz önüne alındı (187). Çalışmamızda Rb1'de tam kayıp veya yüksek boyanma arandı. Arada kalan tüm boyanmalar olağan kategoride yer aldı. Yüksek boyanma için oturmuş bir eşik değer olmayıp, literatürde kullanılan PCR ile de korele olduğu söylenen %20 eşik değeri kullanıldı (18,204).

E. Ki67 (MIB-1)

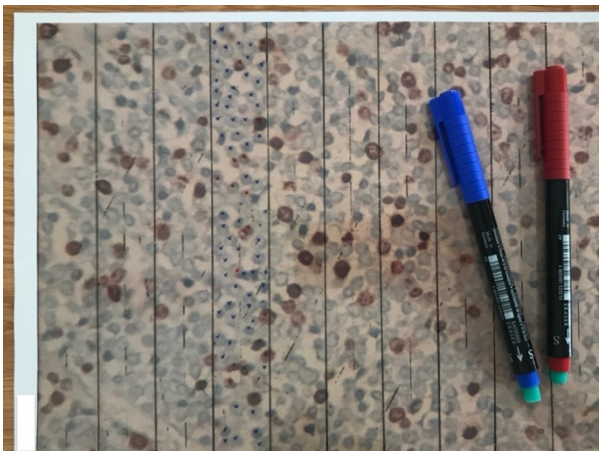
Tümör hücrelerinde nükleer boyanmalar pozitif kabul edildi. Hücre sayma yöntemi kullanılarak yüzde verildi (25,198) . Tümöre ait en uygun bir blok seçildi ve Ki67 o bloğa

uygulandı. Tümörde Ki67'nin en yoğun olduğu ("hotspot") alanlar tespit edilip, Nikon Eclipse 80i kullanılarak 400x büyütmede en az 1000 hücre yakalamak için her olgudan 2-4 arası fotoğraf çekildi **(Resim 5).** Çekilen fotoğraflar renkli A4 kağıtlara basıldı. Fotoğraflar üzerinde boyanma şiddetine bakılmaksızın tüm boyanan nükleuslar sayıldı.



Resim 5. Mikroskop başında fotoğraf çekimi.

Hücreleri sayarken asetat kağıdı yönteminden faydalanıldı **(Resim 6)** (25). Asetat kağıdındaki aralıklar 2,6 cm olup, 10 alandan oluşmaktaydı. Çekilen fotoğraflardaki tüm pozitif hücreler sayılıp, negatif hücreler sadece fotoğrafın 1/10'luk bir kısmında sayıldı ve 10 ile çarpıldı. Asetat kağıdı üzerinde sayılan hücreler cam yazma kalemi ile işaretlendi, böylece sayılan hücrelerin tekrar sayılmaması sağlandı. Biri pozitif biri negatif için olmak üzere iki renk cam kalemi kullanıldı. Sayılan tüm hücreler ve pozitif hücreler oranlanarak Ki67 yüzdeleri hesaplandı.



Resim 6. Basılan fotoğraflarda asetat kağıdı yardımıyla hücre sayma işlemi.

MHK'de Ki67 skorunu değerlendiren az sayıda çalışma mevcuttur. Ki67'nin GEP NET ve NEK ayrımında %55 eşik değeri alındığında prognostik bir parametre olarak kullanılabileceği bilinmektedir (196,197). Bir çalışmada MHK'de de bu değer hücre sayma yöntemi kullanılarak benzer şekilde sağ kalımla ilişkili bulunmuştur (28). Sayma metodu kullanılmadan yapılan başka bir çalışmada ise %50 eşik değeri agresif klinikle ilişkili bulunmuştur (20). Ayrıca Ki67 skorunun MCPyV (+) ve (-) gruplar arasında farkları da olabileceği söylenmiştir (8,17,177).

Çalışmamızda her iki eşik değerle de istatiksel analiz yapılmış olup, ROC analiziyle de en uygun Ki67 eşik değerleri saptanmaya çalışılmıştır. Ki67 skorunun MCPyV (+) ve (-) gruplar arasındaki farkına ve sağ kalım ile ilişkisine bakılmıştır.

VI. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın biyoistatistiksel çözümlemelerinde Statistical Package for Sociel Sciences (SPSS) for Mac 24.0 paket programı kullanılmıştır. Kategorik değişkenlerin tanımlayıcı istatistiklerinde veriler sayı (n) ve yüzde (%) şeklinde verilmiştir. Sayısal değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu, Shapiro Wilks testi ve Kolmogorov Simirnov testi ile ölçülmüştür. Normal dağılım gösteren sayısal veriler ortalama±standard sapma (sd), normal dağılıma uymayan sayısal veriler ortanca (çeyrekler arası uzaklık) şeklinde gösterilmiştir. Bağımsız kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Pearson Ki-kare testi; Ki-Kare test koşulları sağlanmadığı durumlarda ise Fisher'in kesin testi kullanılmıştır. Bağımsız iki sayısal değişkenin karşılaştırılmasında, normal dağılıma uygunluk göz önünde bulundurularak, veriler normal dağılıyor ise Student T testi, normal dağılmıyor ise Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Ki67 skorunun eşik değerinin saptanması için ROC (Receiver Operating Characteristic) eğrisi analizi uygulanmıştır. Kümülatif sağ kalım eğrileri Kaplan-Meier metodu ile oluşturulmuş olup, iki grubun sağ kalım fonksiyonlarının karşılaştırılmasında Log-Rank testi kullanılmıştır. Sağ kalıma etki eden faktörler için tek değişkenli Cox regresyon analizi uygulanmıştır. Tüm istatistiksel analizler %95 güven aralığında yorumlanmış olup, anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

BÖLÜM IV

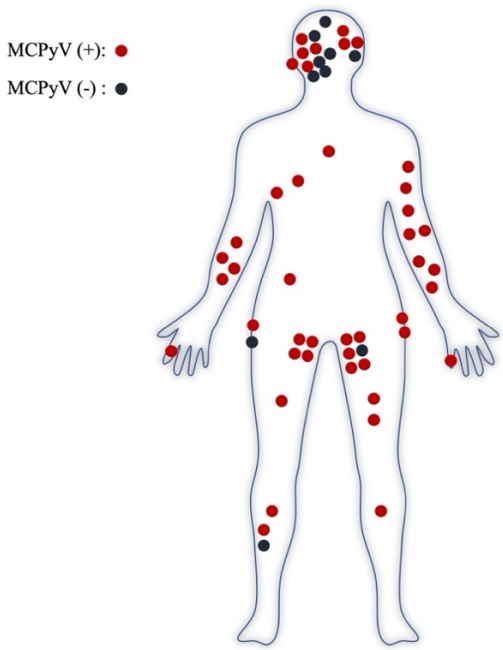
BULGULAR

I. Tanımlayıcı İstatiksel Bulgular

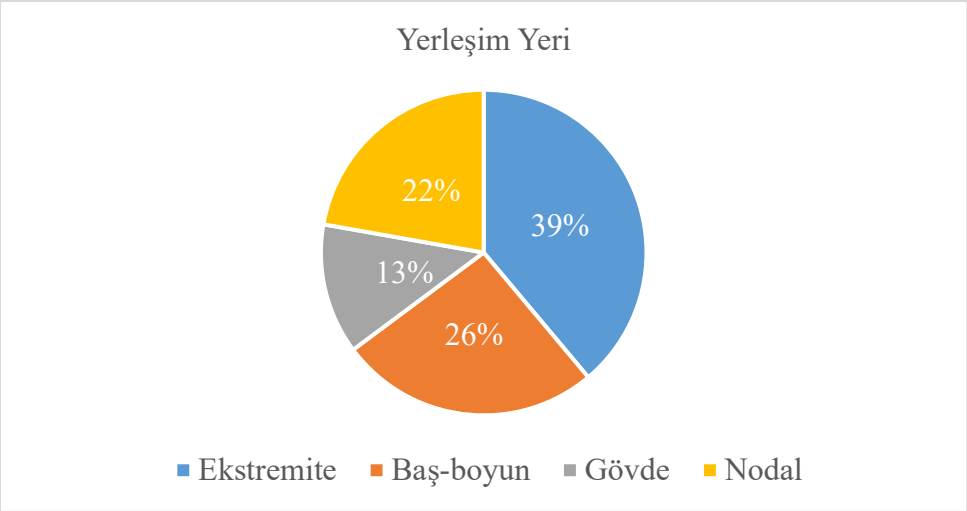
A. Demografik ve Klinik Bulgular

Anabilim dalımızda 2002-2022 yılları arasında MHK tanısı alan ve çalışmaya dahil edilme kriterlerini karşılayan 54 hasta vardı. Hastaların tanı anındaki yaşları 24-91 arası değişmekteydi. Ortalama yaş 67'ydi. 26 hasta kadın, 28 hasta erkekti.

On iki hastada detaylı fizik muayene ve radyolojik araştırmalar sonucu herhangi bir primer deri lezyonu saptanmamış olup, nodal MHK tanısı verilmişti. Bu hastaların içinde yaş ortalaması 66,3 olup, cinsiyet dağılımı eşitti. Nodal MHK hastalarının tutulan lenf nodları sıklıkla inguinal yerleşim göstermekte olup (%83,3), biri aksiller, biri ise parotis gland içi lenf nodu yerleşimliydi. On hastada tek lenf nodu, 2 hastada ise multipl lenf nodu tutulumu mevcuttu. 42 primer kütane MHK olgusuna baktığımızda ise, en sık yerleşim yeri ekstremite (%50), kalanlar baş-boyun ve gövde dağılımı göstermekteydi **(Şekil 1, 2).** Ekstremite yerleşimi gösteren olguların %66,7'si üst ekstremitede, %33,3'ü alt ekstremitedeydi.

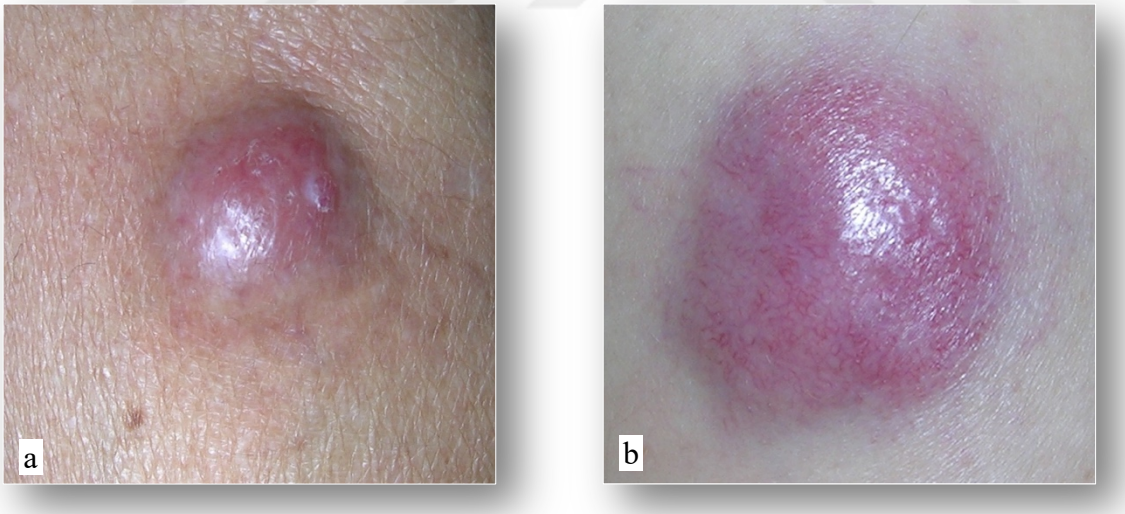


Şekil 1. Çalışmamızdaki MHK olgularının vücut figürü üzerinde lezyon dağılımı.



Şekil 2. Kütane ve nodal MHK'lerin primer yerleşim yerleri.

Hastaların şikayetleri çoğunlukla birkaç aydır hızla büyüme gösteren eritematöz nodül şeklindeydi **(Resim 7, a-b).** Klinik ön tanılarına baktığımızda yalnızca 5 hastada MHK'den şüphelenilmişti. MHK dışında benign kistlerden kütane metastazlara kadar çok farklı ön tanılar mevcuttu. Yirmi hasta dış merkezden bize blok konsültasyonu için başvuran hastalardı.



Resim 7. MHK'nin klasik klinik görüntüsü.
a. Önkol ve **b.** Kol yerleşimli eritematöz nodüller (Olgu 2 ve 20).

Serimizdeki 5 hasta aldıkları tedaviler sebebiyle immünsüpresifti. 4 hasta transplant sebebiyle, bir hasta ise romatoid artrit sebebiyle immünsüpresif ilaç kullanıyordu. Transplantlı hastalardan ikisi karaciğer, ikisi böbrek transplantlıydı **(Resim 8).** Transplantları üzerinden 4 ila 17 sene (ortalama, 9 sene) geçmişti. Transplantlı hastaların yaş ortalaması 50,7'ydi. 3 hasta erkek, bir hasta kadındı. İki hastada tümör üst esktremite, bir hastada baş-boyun, bir hastada nodal (inguinal) yerleşimliydi. Hastalar tanı anında evre II veya III'tü. İki hasta hastalık sebebiyle, bir hasta hastalık dışı sebeple kaybedildi.



Resim 8. Karaciğer transplantlı genç hastada parmak yerleşimli lezyon (Olgu 53).

Sekiz hastanın özgeçmişinde, MHK tanısından önce, MHK ile eşzamanlı veya MHK tanısından daha sonra ortaya çıkan başka primer maligniteler yer alıyordu. Bunlar SHK (üç olgu), ürotelyal karsinom, prostatik adenokarsinom, pankreatik adenokarsinom, invaziv meme karsinomu ve miksofibrosarkomdu. SHK yerleşimleri deri, dudak ve larenksti. Bir hasta MHK tanı ve tedavisinden yaklaşık 2 yıl sonra pankreas kanseri tanısı aldı ve kaybedildi. Sağ kalımını belirleyen ana hastalık bu oldu. Hastaların demografik ve klinik özelliklerine ait veriler **Tablo 7**'de yer almaktadır.

Tablo 7. Tüm MHK hastalarının demografik ve klinik özellikleri

Demografik ve Klinik Özellikler	**Tüm MHK hastaları (n=54), n (%)**
Tanı anındaki yaş, yıl	
Minimum-maksimum	24-91
Ortalama±sd	67,4±13,3
Cinsiyet	
Kadın	26 (48)
Erkek	28 (52)
Primer yerleşim yeri	
Deri	42 (77,8)
Lenf nodu	12 (22,2)
Bölge (n=42)*	
Ekstremite	21 (50)
Baş ve boyun	14 (33,3)
Gövde	7 (16,7)
Lezyon süresi, ay (n=32)**	
Minimum-Maksimum	1-12
Ortalama±sd	4,8±3,2
Klinik ön tanı (n=42)*	
MHK ön tanısı var	5 (11,9)
MHK ön tanısı yok	37 (88,1)
İmmünsüpresyon	
Var	5 (9)
Yok	49 (91)
Sekonder malignite	
Var	8 (15)
Yok	46 (85)

MHK: Merkel hücreli karsinom, *Kütane MHK olguları için, **Lezyon süresi bilinen olgular için.

Hastaların tanı anındaki tümör çapları 0,6-20 cm arasında değişmekteydi. Kütane MHK'lerde ortalama tümör çapı 3,8, nodal MHK'lerde 3,3'tü. İnfiltrasyon derinliklerine baktığımızda ise 9 olguda histopatolojik ve/veya radyolojik olarak saptanan fasya, kas, kıkırdak ya da kemik invazyonu söz konusuydu.

Tanı anında 20 olguda lenf nodu metastazı, 5 olguda ise uzak metastaz bulunmaktaydı. Takipte ise 13 hastada daha uzak metastaz gelişti. Uzak metastaz geliştiren 5 hasta nodal MHK'ydi. Başvuru anında 10 hasta evre I (%18,5), 14 hasta evre II (%25,9), 25 hasta evre III (%46,3) ve 5 hasta evre IV'tü (%9,3). Evre IIIA'da başvuran hastaların 12'si primeri olmayan nodal MHK'ydi. Hastaların evrelerini etkileyen tümör parametreleri ve TNM evreleri **Tablo 8**'de yer almaktadır.

Tablo 8. Tüm MHK hastalarının evrelerini etkileyen tümör parametreleri ve TNM evreleri

Özellikler	**Tüm MHK hastaları (n=54), n (%)**
Tümör çapı, cm (n=42)*	
Minimum-Maksimum	0,6-20
Ortalama	3,8
Ortanca	2,4
İnfiltrasyon derinliği (n=42)*	
Dermis ve/veya subkutan yağ doku	33 (78,6)
Fasya/kas/kıkırdak/kemik	9 (21,4)
Lenf nodu tutulumu (n=42)*	
Var	22 (47,6)
Yok	20 (52,4)
Tanı anında uzak metastaz	
Var	5 (9,3)
Yok	49 (90,7)
Takipte uzak metastaz (n=48)**	
Var	13 (27,1)
Yok	35 (72,9)
Evre	
I	10 (18,5)
II	14 (25,9)
IIA	8 (14,8)
IIB	6 (11,1)
III	25 (46,3)
IIIA	13 (24,1)
IIIB	12 (22,2)
IV	5 (9,3)

MHK: Merkel hücreli karsinom. *Kütane MHK olguları için, **Bir olguya ait takip verilerine ulaşılamamıştır. Tanı anında uzak metastaz saptanan hastalar dahil değildir.

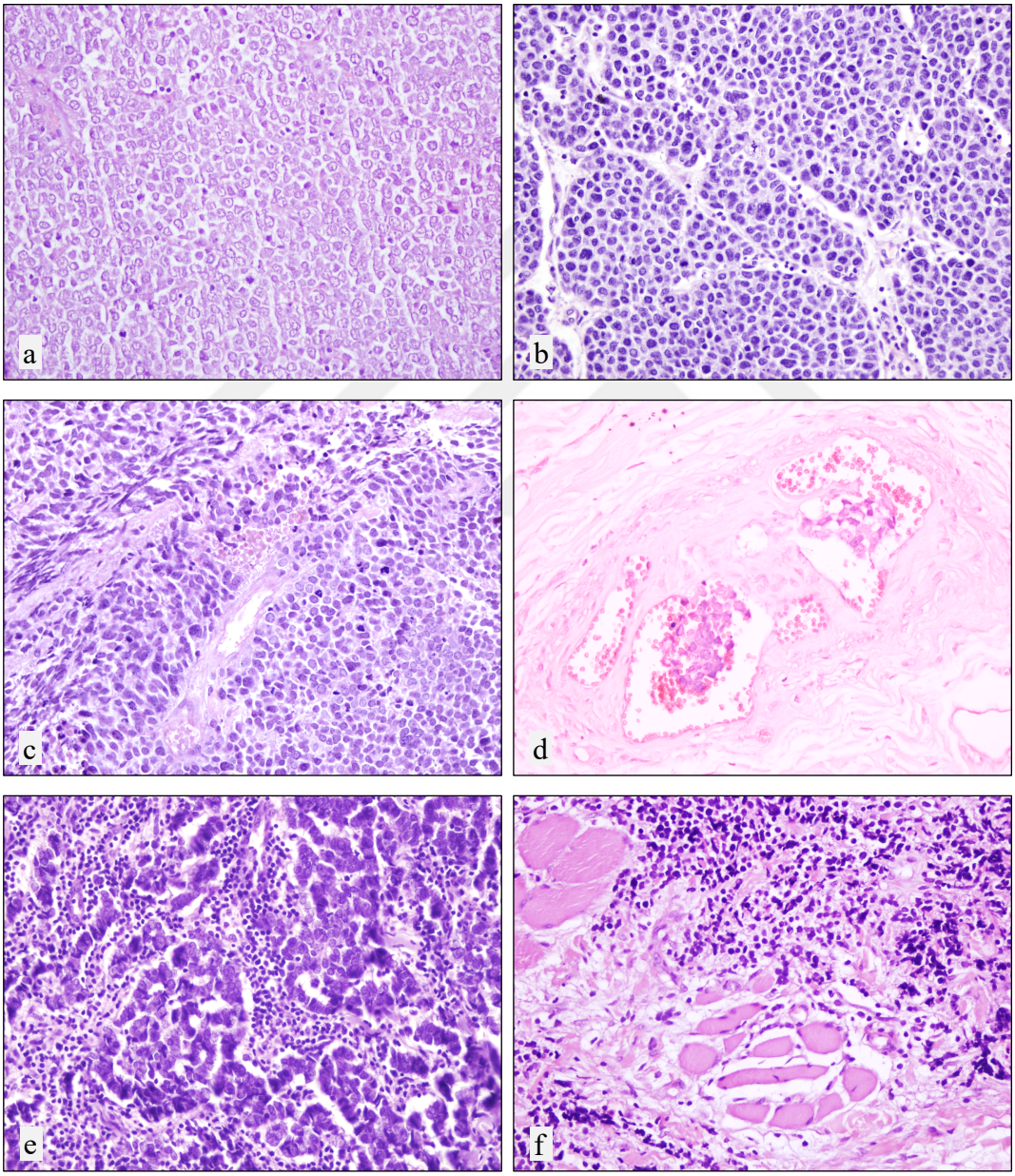
B. Histopatolojik Bulgular

Sekiz hastanın eksizyon materyaline ait parafin bloklar ve HE boyalı lamlar olmadığı için bu olgularda incelemeler biyopsi materyali üzerinde yapılabildi. Bu olgulardan ikisi primeri olmayan nodal MHK, altısı kütane MHK'ydi. Sonuç olarak 6 kütane MHK olgusuna ait sadece eksizyon materyalinde verilebilecek tümör kalınlığı ölçümü verilemedi.

Bakılacak parametreler belirlenirken prognostik açıdan anlamı olabilecek ve/veya olgunun virüs pozitivitesini öngörebilecek özellikler ön planda seçilmeye çalışıldı. Tümör sınırları çoğunlukla infiltratifti (%79,6). Tümör kalınlıkları 4-26 mm arasında değişmekteydi. Tümörler çoğunlukla dermis ve subkutan yağ dokusu yerleşimli olup, epidermisle ilişkileri yoktu. On bir olguda ülser saptandı (%26,2). Olgular mitozdan zengin olup, mm^2'deki mitoz

sayısı 4-85 arası değişmekteydi. Nekroz %63, lenfovasküler invazyon %37 hastada saptandı. TİL %47,6 olguda saptansa bile çoğunlukla düşük yoğunluktaydı **(Resim 9).**

Tümörlerde değişen oranlarda solid ve organoid yapılanmalar izlendi. Tipik trabeküler dizelenme 23 olguda mevcuttu. On vakada çoğunlukla fokal olmak üzere stromada müsin birikimi saptandı. Hücrelere baktığımızda sıklıkla dar sitoplazmalı (%79,6), açık kromatinli (%61,1) ve yuvarlak şekilliydiler (%63). Tuz-biber kromatin seçilebiliyordu, nükleoller belirsizdi. Histopatolojik özellikler **Tablo 9**'da özetlenmiştir.



Resim 9. MHK olgularındaki histopatolojik özellikler.

a. Dar sitoplazmalı, yuvarlak şekilli, açık kromatinli hücreler, **b.** Daha geniş sitoplazmalı, köşeli ve pleomorfik hücrelerden oluşan tümör, **c.** Solid tabakalar yapan mitozdan zengin tümör, **d.** Lenfovasküler invazyon, **e.** Tümörü infiltre eden lenfositler, **f.** Çizgili kas invazyonu (Olgu 13, 16, 14, 32, 1 ve 35).

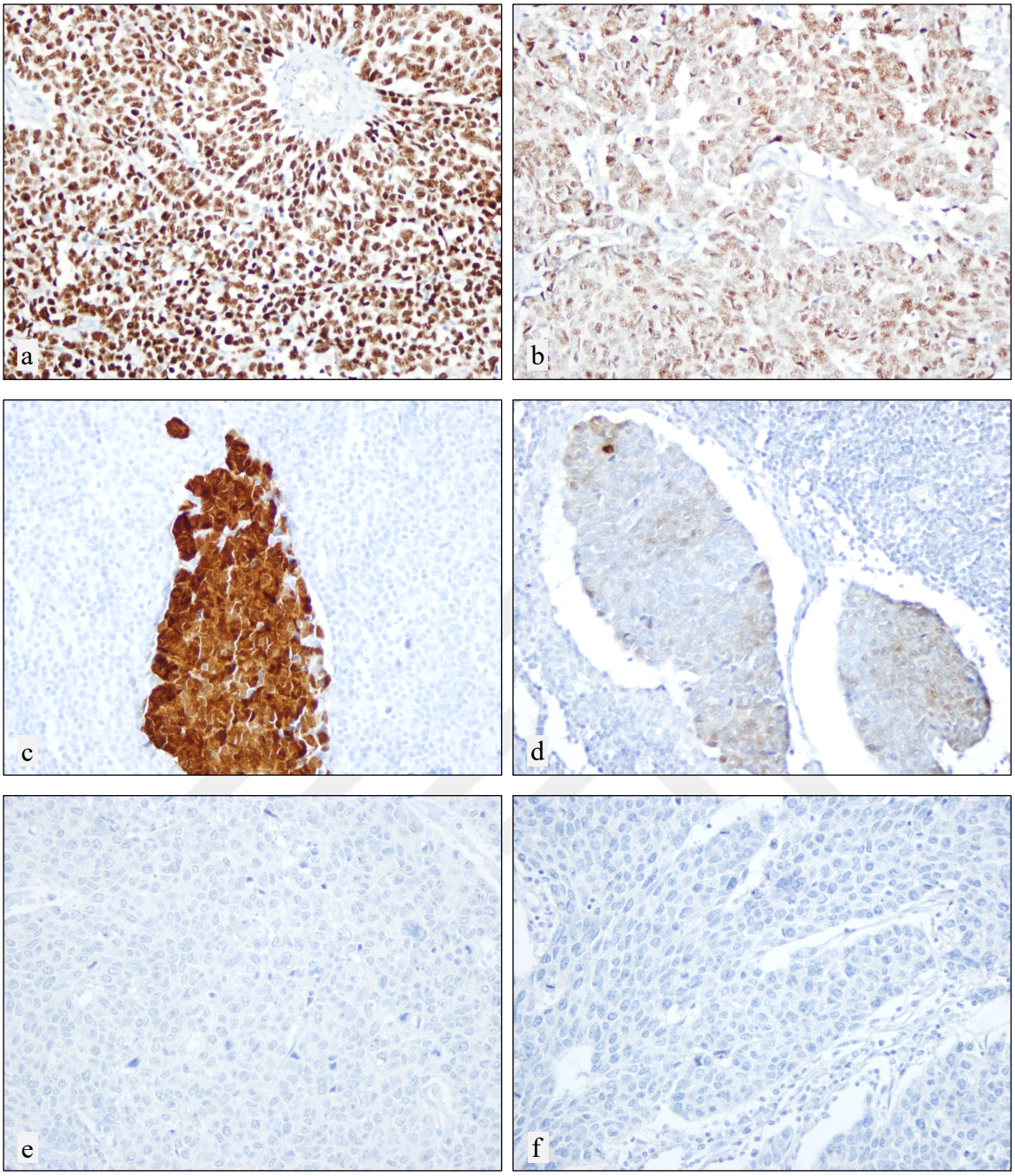
Tablo 9. Tüm MHK hastalarının histopatolojik özellikleri

Histopatolojik Özellikler	**Tüm MHK hastaları (n=54), n (%)**
Tümör sınırları	
İnfiltratif	43 (79,6)
Nodüler	11 (20,4)
Kalınlık, mm (n=36)*	
Minimum-maksimum	4-26
Ortalama±sd	13,7±6,5
Ülser (n=42)**	
Var	11 (26,2)
Yok	31 (73,8)
Mitoz (n=53)***	
≥ 10 /mm^2	48 (90,6)
< 10 /mm^2	5 (9,4)
Nekroz	
Var	34 (63)
Yok	20 (37)
Lenfovasküler invazyon	
Var	20 (37)
Yok	34 (63)
Tümörü infiltre eden lenfositler (TİL) (n=42)**	
Var	20 (47,6)
Yoğun	4 (9,5)
Düşük yoğunluklu	16 (38,1)
Yok	22 (52,4)
Hücre şekli	
İğsi ve/veya köşeli	20 (37)
Yuvarlak	34 (63)
Kromatin yapısı	
Açık	33 (61,1)
Koyu	21 (38,9)
Sitoplazma özellikleri	
Geniş	11 (20,4)
Dar	43 (79,6)

MHK: Merkel hücreli karsinom, *Eksizyonu olan kütane MHK olguları için, **Kütane MHK olguları için, ***Bir olguda yoğun ezilme artefaktı nedeniyle mitoz sayılamadı.

C. İmmünhistokimyasal Bulgular

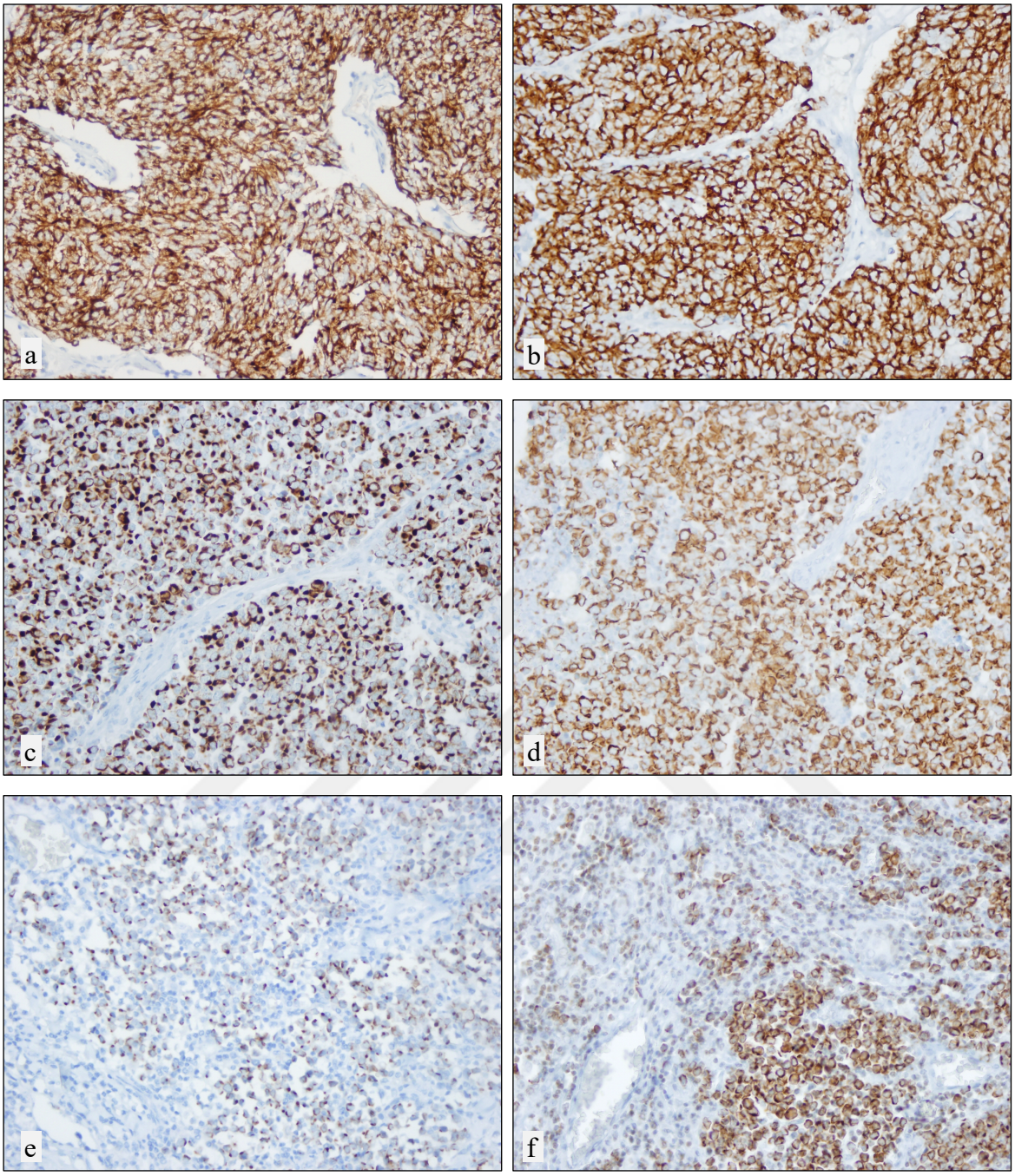
MCPyV Ab3 klonu ile 44 olgu (%81,5), MCPyV CM2B4 klonuyla ise 39 olgu (%72,2) pozitifti. MCPyV Ab3 ile reaksiyon veren olguların hepsinde diffüz boyanma saptanırken, CM2B4'ün zayıf ve/veya düşük yüzdelerde boyadığı 8 olgu mevcuttu **(Resim 10).**



Resim 10. MCPyV antikorunun iki klonunun boyanma özellikleri.

a. MCPyV (Ab3) (+), **b.** MCPyV (CM2B4) (+), **c.** Lenf nodu metastazında MCPyV (Ab3) (+), **d.** Lenf nodu metastazında MCPyV (CM2B4) ile düşük ve zayıf boyanmalar, **e.** MCPyV (Ab3) (-), **f.** MCPyV (CM2B4) (-) (Olgu 24, 4 ve 16).

Elli dört olgudan SK20 Ks20.8 ve SP33 klonları ile yalnızca 2 tanesi negatifti. İki klon arasında negatif ya da pozitif olgu saptama açısından bir fark yoktu. Pozitif olgulardaki boyanma paternlerine baktığımızda perinükleer noktasal boyanma ile birlikte membranöz ve yarımay tarzında boyanmaları %61,1 oranında saptadık. İki klon arasındaki tek fark, SP33 ile saptanan inflamatuar hücre reaksiyonlarıydı **(Resim 11).**



Resim 11. SK20 antikorunun iki klonunun boyanma özellikleri.

a. SK20 (Ks20.8) ile membranöz boyanma, **b.** SK20 (SP33) ile membranöz boyanma, **c.** SK20 (Ks20.8) ile yarımay ve noktasal boyanma, **d.** SK20 (SP33) ile yarımay ve noktasal boyanma, **e.** SK20 (Ks20.8) ile yarımay ve noktasal boyanma, **f.** SK20 (SP33) ile tümör hücrelerinde ve zeminde inflamatuar hücrelerde reaksiyon (Olgu 24, 28 ve 23).

p53 ile mutasyonla uyumlu boyanma için üst eşik değeri %20 kabul ettiğimizde 21 olguda mutasyonla uyumlu boyanma saptandı. Eşik değeri %50'ye çıkardığımızda ise 10 olguda mutasyonla uyumlu boyanma mevcuttu. 2 olgu p53 ile negatifti.

Rb1 ile ekspresyon kaybı %29,6 olguda saptandı. 12 olguda olağan boyanma için kabul edilen %20 eşik değeri kabul ettiğimizde eşik değeri aşan yüksek boyanma izledik.

Olguların Ki67 skorları %15-95 arasında değişmekteydi. %55'in altında kalan 21 olgu vardı. Primer lezyona ait parafin bloğu olmayan ve immünhistokimyasal incelemelerin metastaza ait materyalde yapılabildiği 5 olguda MCPyV ile pozitiflik saptanabildi, diğer immünhistokimyasal incelemelerle birlikte Ki67 sayımı da gerçekleştirilebildi. Uygulanan immünhistokimyasal belirteçlere ait sonuçlar **Tablo 10**'da yer almaktadır.

Tablo 10. Tüm MHK hastalarında uygulanan immünhistokimyasal belirteçlere ait sonuçlar

İmmünhistokimyasal Belirteçler	**Tüm MHK hastaları (n=54), n (%)**
MCPyV (Ab3 klonu)	
Pozitif	44 (81,5)
Negatif	10 (18,5)
MCPyV (CM2B4 klonu)	
Pozitif	39 (72,2)
Negatif	15 (27,8)
SK20 (Ks20.8 ve SP33 klonları)	
Pozitif	52 (96,3)
Mikst boyanma*	33 (61,1)
Perinükleer noktasal boyanma	19 (35,2)
Negatif	2 (3,7)
p53 (Eşik değer=%20)	
Mutasyonla uyumlu boyanma	21 (38,9)
Negatif	2 (3,7)
≥ %20 boyanma	19 (35,2)
Olağan boyanma (%1-19)	33 (61,1)
p53 (Eşik değer=%50)	
Mutasyonla uyumlu boyanma	10 (18,5)
Negatif	2 (3,7)
≥ %50 boyanma	8 (14,8)
Olağan boyanma (%1-49)	44 (81,5)
Rb1	
Mutasyonla uyumlu boyanma	16 (29,6)
Olağan boyanma (%1-19)	26 (48,1)
Artmış boyanma (≥%20)	12 (22,2)
Ki67 skoru	
Minimum-Maksimum	15-95
Ortalama±sd	57,8±20,5
Ki67 skoru	
≥ %55 boyanma	33 (61,1)
< %55 boyanma	21 (38,9)

MHK: Merkel hücreli karsinom. *Membranöz, perinükleer noktasal ve yarımay tarzında boyanma.

II. Analitik İstatistiğe Ait Bulgular

A. Kütane ve Nodal MHK'lerin immünhistokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması

Primeri olmayan nodal MHK hastaları ile kütane MHK hastaları arasındaki immünhistokimyasal farkları incelediğimiz tablo aşağıda yer almaktadır. Buna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiştir.

Tablo 11. Kütane ve nodal MHK'lerin immünhistokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması

İmmünhistokimyasal Özellikler	Kütane MHK (n=42), n (%)	Nodal MHK (n=12), n (%)	p değeri
MCPyV (Ab3 klonu)			
Pozitif	33 (78,6)	11 (91,7)	0,303 [x]
Negatif	9 (21,4)	1 (8,3)	
MCPyV (CM2B4 klonu)			
Pozitif	28 (66,7)	11 (91,7)	0,088 [x]
Negatif	14 (33,3)	1 (8,3)	
SK20 (Ks20.8 ve SP33 klonları)			
Pozitif	40 (95,2)	12 (100)	0,999 [F]
Negatif	2 (4,8)	0	
p53*			
Mutasyonla uyumlu boyanma	7 (16,7)	3 (25)	0,512 [x]
Olağan boyanma	35 (83,3)	9 (75)	
Rb1*			0,067 [x]
Mutasyonla uyumlu boyanma	15 (35,7)	1 (8,3)	
Olağan boyanma	27 (64,3)	11 (91,7)	
Ki67 skoru			0,768 [T]
Minimum-Maksimum	15-91,5	26-95	
Ortalama±sd	58,2±20,6	56,2±21,1	
Ki67 skoru			0,371 [x]
≥ %55 boyanma	27 (64,3)	6 (50)	
< %55 boyanma	15 (35,7)	6 (50)	

MHK: Merkel hücreli karsinom, [x]: Pearson Ki-kare testi, [F]: Fisher'in kesin testi, [T]: Student T test. *p53'de ekspresyon kaybı ve %50 eşik değer ve üstü boyanma, Rb1'de ekspresyon kaybı mutasyonla uyumlu boyanmalar olarak kabul edilmiştir.

B. MCPyV (+) ve MCPyV (-) Grupların Belirlenmesi

Çalışmamızda MCPyV Ab3 klonu tümörde virüs varlığını belirlemede altın standart yöntem olarak kabul edilmiştir. MCPyV Ab3 klonu ile boyanan MHK olguları MCPyV pozitif

(MCPyV (+)), MCPyV Ab3 klonu ile boyanmayan MHK olguları MCPyV negatif (MCPyV (-)) olarak belirlenmiştir. MCPyV (+) tümörler dışında her iki klonla da zemin reaksiyonu ya da farklı bir hücre boyanması saptanmamıştır. Böylece MCPyV CM2B4 klonunun Ab3'e kıyasla MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguları saptamadaki sensitivitesi %88,6, spesifitesi %100 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak iki belirteç arasında önemli derecede uyum mevcuttur (Kappa: 0,713 ve p<0,001). **Tablo 12**'de iki klon ile boyanan ve boyanmayan olgu sayısı görülmektedir.

Tablo 12. MCPyV Ab3 ve MCPyV CM2B4 klonları ile saptanan MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguların belirlenmesi

MCPyV Klonu	**MCPyV Ab3 (+), n (%)**	**MCPyV Ab3 (-), n (%)**	Toplam
MCPyV CM2B4 (+)	39 (88,6)	0 (0)	**39**
MCPyV CM2B4 (-)	5 (11,4)	10 (100)	**15**
Toplam	**44**	**10**	**54**

MCPyV Ab3 ile boyanmayıp CM2B4 ile boyanan olgu yoktu. MCPyV Ab3 ile boyanıp MCPyV CM2B4 ile boyanmayan 5 olguda virüs pozitifliği açısından ayırt ettirebilecek diğer immünhistokimyasal özelliklere baktığımızda tüm olgular SK20 pozitifti, mutasyonla uyumlu boyanma için eşik değer %50 kabul edildiğinde p53 ile 3 olgu olağan boyanmıştı, Rb1 ile 2 olgu olağan boyanmıştı ve tüm olguların Ki67 skorları %50'nin altındaydı. **Tablo 13**'de bu olgulara ait immünhistokimyasal sonuçlar yer almaktadır.

Tablo 13. MCPyV Ab3 ile (+), MCPyV CM2B4 ile (-) olan MHK olguları

	SK20	**p53**	**Rb1**	**Ki67 skoru (%)**
Olgu 18	+	olağan	-	34
Olgu 38	+	olağan	-	20
Olgu 41	+	-	-	19
Olgu 45	+	olağan	olağan	36
Olgu 49	+	olağan	olağan	31

C. MCPyV (+) ve MCPyV (-) Gruplara Göre Demografik ve Klinik Bulgular

İki grup arasındaki klinik farklar araştırıldığında yaş ve yerleşim yeri açısından anlamlı bir fark saptanmadı. Öte yandan MCPyV (-) olgulardan yalnızca biri kadındı (%10). MCPyV (+) ve MCPyV (-) gruplarda demografik ve klinik farklar **Tablo 14**'de yer almaktadır.

Tablo 14. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguların demografik ve klinik özellikleri

Demografik ve Klinik Özellikler	**MCPyV (+) (n=44), n (%)**	**MCPyV (-) (n=10), n (%)**	**p değeri**
Tanı anındaki yaş, yıl			
Ortanca	67,5	70	0,246 [M]
IQR	14,8	22,3	
Cinsiyet			
Kadın	25 (56,8)	1 (10)	***0,007*** [x]
Erkek	19 (43,2)	9 (90)	
Primer yerleşim yeri			
Deri	33 (75)	9 (90)	0,303 [x]
Lenf nodu	11 (25)	1 (10)	
Bölge (n=42)			
Ekstremite	20 (60,6)	1 (11,1)	*Uygun değil*
Baş ve boyun	7 (21,2)	7 (77,8)	
Gövde	6 (18,2)	1 (11,1)	
Evre			
I	9 (20,5)	1 (10)	
II	11 (25)	3 (30)	*Uygun değil*
III	21 (47,7)	4 (40)	
IV	3 (6,8)	2 (20)	

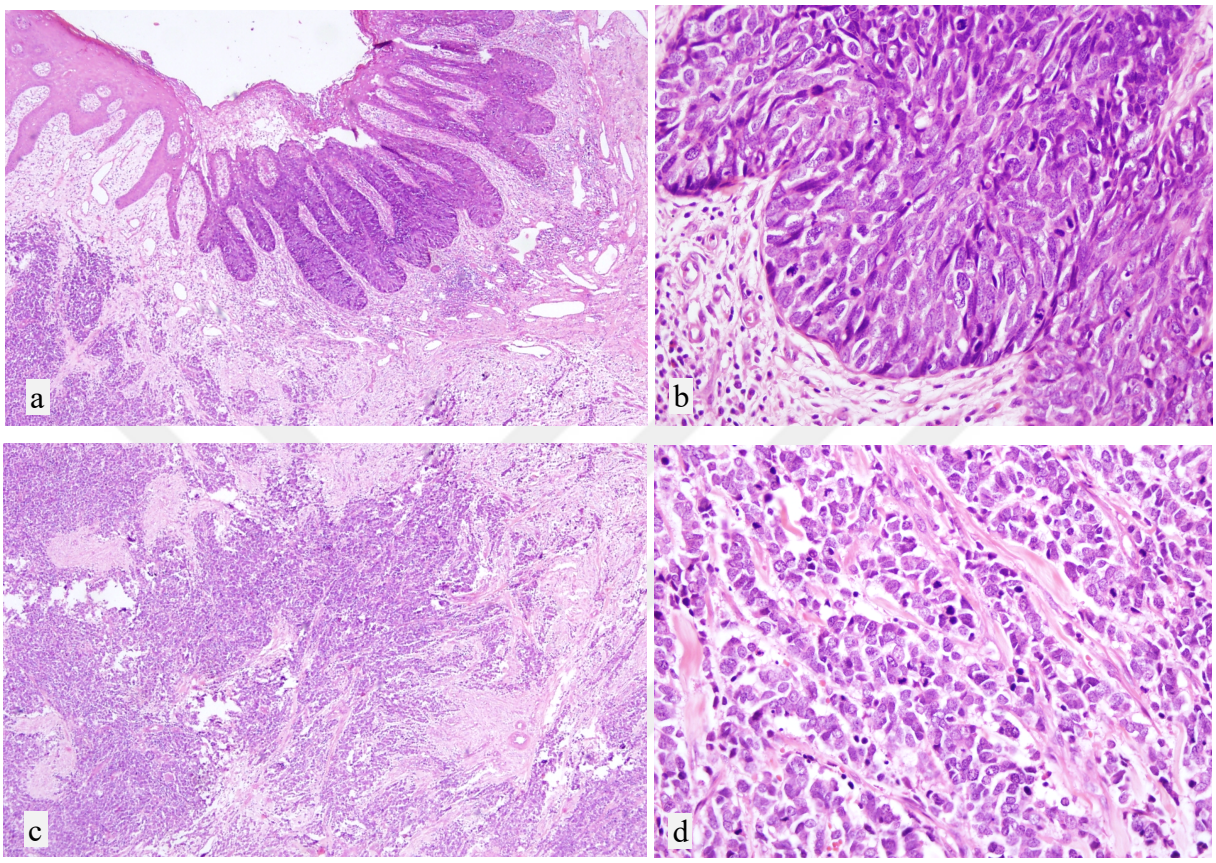
MCPyV (+): MCPyV Ab3 (+), MCPyV (-): MCPyV Ab3 (-). IQR: interquartile range (çeyrekler arası uzaklık). [M]: Mann-Whitney U test, [x]: Pearson Ki-Kare testi.

D. MCPyV (+) ve MCPyV (-) Gruplara Göre Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik bulgular açısından olgulara baktığımızda ülser varlığı ve hücrenin geniş sitoplazmalı olması anlamlı bir şekilde virüs negatiflerde daha çok görülüyordu. Lenfovasküler invazyon sınırda anlamlı olmakla birlikte virüs negatiflerde daha sıktı.

On polyomavirüs negatif olgudan birinde MHK üzerinde epidermiste in situ SHK (Bowen Hastalığı) yer almaktaydı **(Resim 12).** Hastanın hikayesinde de uzun süreli ve yoğun güneş maruziyeti sonucu yıllardır olan plak lezyon zemininde kısa süre içerisinde gelişen kabarıklık hikayesi mevcuttu. İki vakanın ise farklı bölgelerinde yine güneş hasarına bağlı

aktinik keratoz, seboreik keratoz ve SHK gelişimi vardı. Başka bir hastada ise hem aynı lokalizasyonda (burun) hem de dudakta 10 yıl önce aldığı SHK tanısı ve RT öyküsü mevcuttu. Olgulara ait histopatolojik özellikler **Tablo 15**'de yer almaktadır.



Resim 12. Yüzeyinde in situ skuamöz hücreli karsinom bulunan kombine MHK (Olgu 30).

Tablo 15. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguların histopatolojik özellikleri

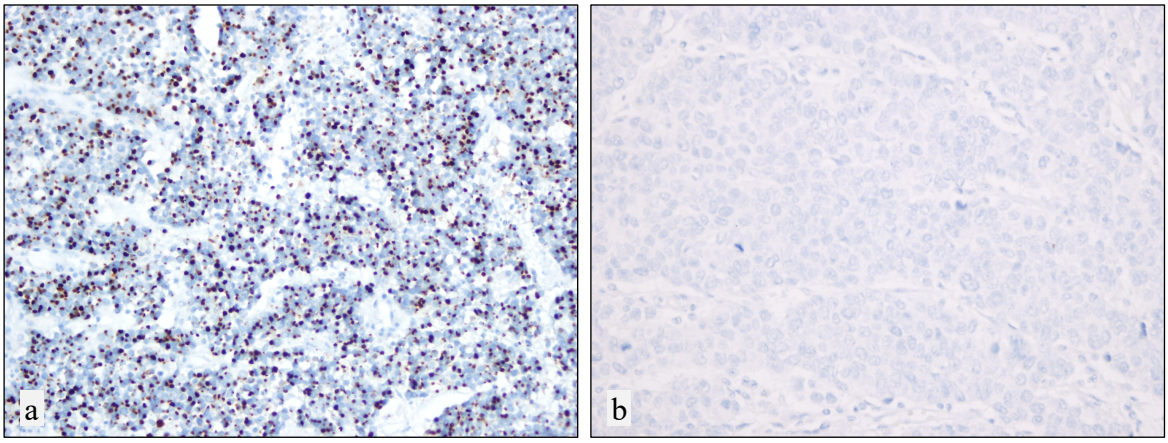
Histopatolojik Özellikler	MCPyV (+) (n=44), n (%)	MCPyV (-) (n=10), n (%)	p değeri
Tümör sınırları			
İnfiltratif	33 (75)	10 (100)	0,076 [x]
Nodüler	11 (25)	0 (0)	
Ülser (n=42)*			
Var	5 (15,2)	6 (66,7)	***0,002*** [x]
Yok	28 (84,8)	3 (33,3)	
Mitoz (n= 53)**			
≥ 10 /mm^2	39 (88,6)	9 (100)	0,574 [F]
< 10 /mm^2	5 (11,4)	0 (0)	
Nekroz			
Var	26 (59,1)	8 (80)	0,216 [x]
Yok	18 (40,9)	2 (20)	
Lenfovasküler invazyon			
Var	19 (43,2)	1 (10)	0,050 [x]
Yok	25 (56,8)	9 (90)	
TİL (n=42)*			
Var	15 (45,5)	5 (55,6)	0,714 [F]
Yok	18 (54,5)	4 (44,4)	
Hücre şekli			
İğsi ve/veya köşeli	10 (22,7)	5 (50)	0,082 [x]
Yuvarlak	34 (77,3)	5 (50)	
Kromatin yapısı			
Açık	28 (63,6)	5 (50)	0,425 [x]
Koyu	16 (36,4)	5 (50)	
Sitoplazma özellikleri			
Geniş	6 (13,6)	5 (50)	***0,010*** [x]
Dar	38 (86,4)	5 (50)	

MCPyV (+): MCPyV Ab3 (+), MCPyV (-): MCPyV Ab3 (-), TİL: Tümörü infiltre eden lenfositler.
*Kütane MHK olguları için, **Bir olguda yoğun ezilme artefaktı nedeniyle mitoz sayılamadı.
[x]: Pearson Ki-Kare testi, [F]: Fisher'in kesin testi.

E. MCPyV (+) ve MCPyV (-) Gruplara Göre İmmünhistokimyasal Bulgular

E1. SK20 (Ks20.8 ve SP33 klonları)

SK20 ile tüm MCPyV (+) olgularda pozitif reaksiyon saptanırken, iki SK20 negatif olgu da MCPyV (-)'di **(Resim 13)** (p=0,031). SK20 ile boyanma paternlerine baktığımızda ise anlamlı bir fark yoktu. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olgularda SK20 boyanma özellikleri **Tablo 16**'da yer almaktadır.



Resim 13. SK20 ile boyanma.

a. SK20 ile noktasal boyanma, **b.** SK20 (-) (Olgu 26 ve 16).

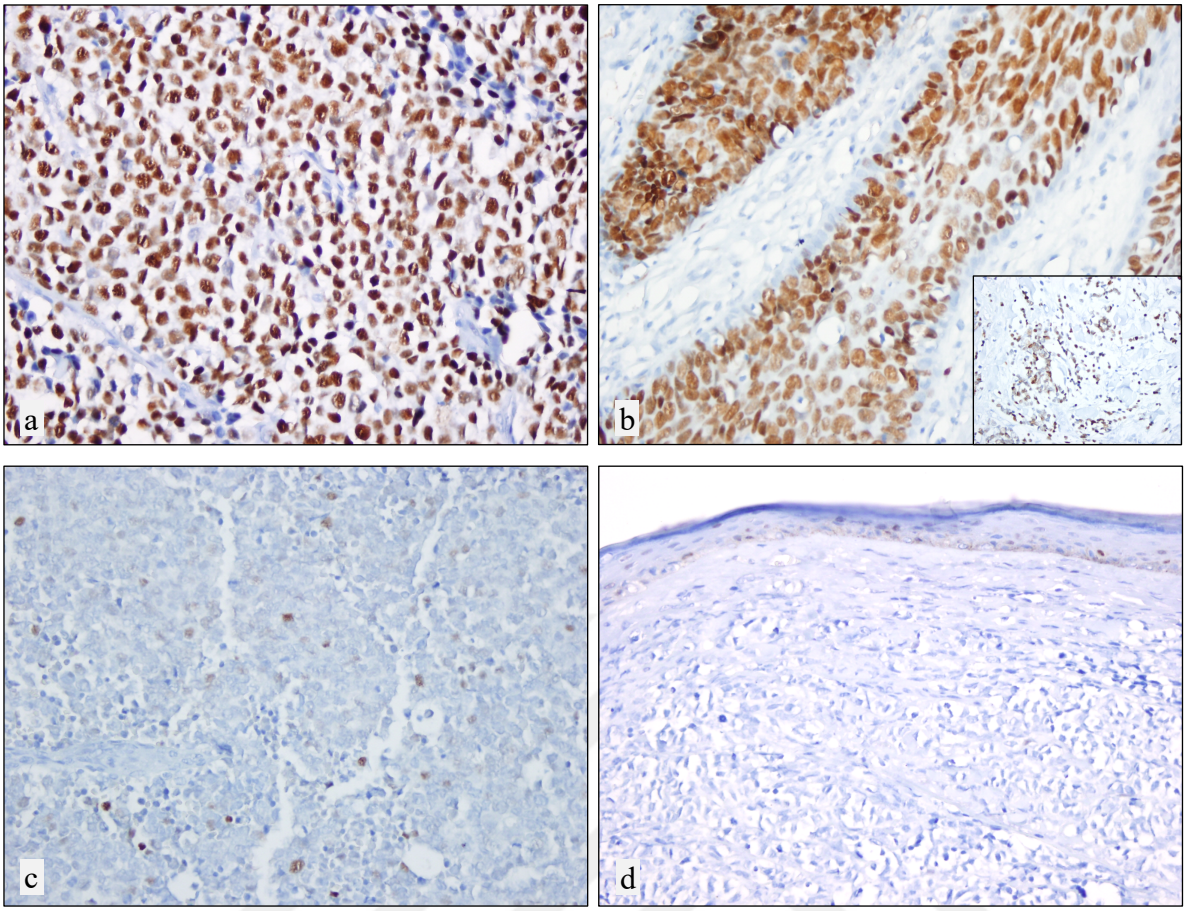
Tablo 16. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olgularda SK20 (Ks20.8 ve SP33 klonları) ile boyanma özellikleri

SK20 Boyanma Özellikleri	**MCPyV (+) (n=44), n (%)**	**MCPyV (-) (n=10), n (%)**	**p değeri**
SK20 (Ks20.8 ve SP33 klonları)			
Pozitif	44 (100)	8 (80)	***0,031*** [F]
Negatif	0 (0)	2 (20)	
SK20 boyanma paterni, (n=52)*			
Mikst boyanma**	28 (63,6)	5 (62,5)	0,951 [x]
Perinükleer noktasal boyanma	16 (36,4)	3 (37,5)	

MCPyV (+): MCPyV Ab3 (+), MCPyV (-): MCPyV Ab3 (-). *SK20 pozitif olgular için, **Membranöz, perinükleer noktasal ve yarımay tarzında boyanma. [F]:Fisher'in kesin testi, [x]: Pearson Ki-kare testi.

E2. p53

p53 ile mutasyonla uyumlu boyanma için eşik değer %20 ya da %50 alındığında her ikisiyle de MCPyV (+) ve MCPyV (-) gruplar arasında anlamlı fark ortaya çıkıyordu. MCPyV (+) olgularda mutasyonla uyumlu negatif boyanma 1 olguda, eşik değer %50 alındığında mutasyonla uyumlu pozitif boyanma 4 olguda görüldü **(Resim 14).** MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguların p53 ile boyanma özellikleri **Tablo 17**'de yer almaktadır.



Resim 14. p53 ile boyanma.

a. p53 ile mutasyonla uyumlu yüksek boyanma, **b.** İn situ skuamöz hücreli karsinom ile kombine MHK'de p53 ile mutasyonla uyumlu boyanma (iç resim MHK komponenti), **c.** p53 ile olağan boyanma, **d.** p53 ile ekspresyon kaybı (internal kontrol epidermis bazal tabakasında pozitif) (Olgu 32, 30, 28 ve 35).

Tablo 17. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olgularda p53 ile boyanma özellikleri

p53 Boyanma Özellikleri	MCPyV (+) (n=44), n (%)	MCPyV (-) (n=10), n (%)	p değeri
p53 (Eşik değer=%20)			
Mutasyonla uyumlu boyanma*	14 (31,8)	7 (70)	***0,025*** ^{x}
Olağan boyanma (%1-19)	30 (68,2)	3 (30)	
p53 (Eşik değer=%50)			
Mutasyonla uyumlu boyanma**	5 (11,4)	5 (50)	***0,013*** ^{F}
Olağan boyanma (%1-49)	39 (88,6)	5 (50)	

MCPyV (+): MCPyV Ab3 (+), MCPyV (-): MCPyV Ab3 (-). *Mutasyonla uyumlu boyanma: Negatif ya da ≥%20 boyanma, **Mutasyonla uyumlu boyanma: Negatif ya da ≥%50 boyanma.
^{F}:Fisher'in kesin testi, ^{x}: Pearson Ki-kare testi.

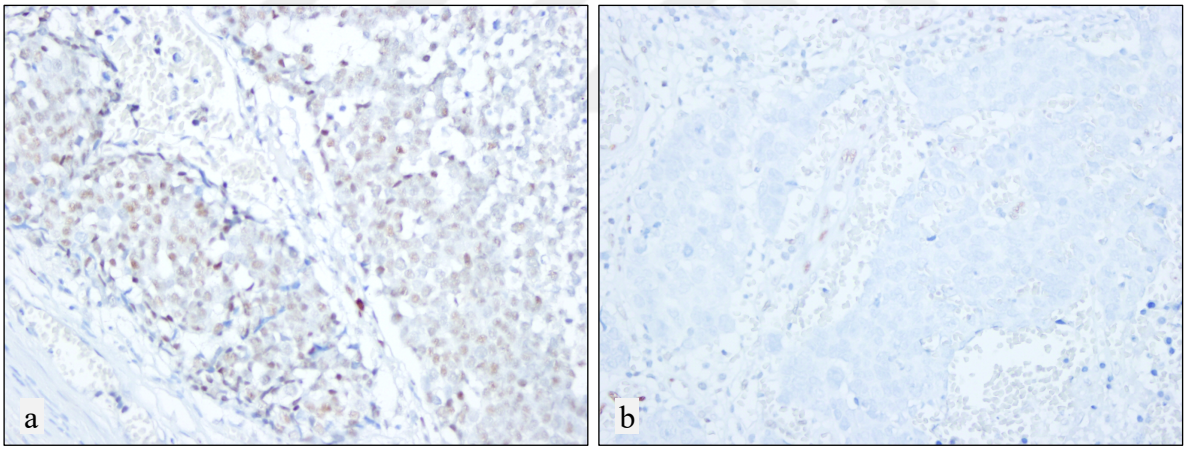
E3. Rb1

Rb1 ile yüksek ya da olağan boyanma gözetmeksizin ekspresyon kaybı olup olmamasına göre MCPyV (+) ve MCPyV (-) gruplar arası farka baktığımızda anlamlı sonuçlar elde ettik. Rb1 ile yüksek boyanma (≥%20) yalnızca MCPyV (+)'lerde görülüyordu (12 olgu) **(Resim 15).** MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguların Rb1 ile boyanma özellikleri **Tablo 18**'de yer almaktadır.

Tablo 18. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olgularda Rb1 ile boyanma özellikleri

Rb1 Boyanma Özellikleri	**MCPyV (+) (n=44), n (%)**	**MCPyV (-) (n=10), n (%)**	**p değeri**
Rb1			
Ekspresyon kaybı var	10 (22,7)	4 (40)	***0,020*** [x]
Ekspresyon kaybı yok	34 (77,3)	6 (60)	

MCPyV (+): MCPyV Ab3 (+), MCPyV (-): MCPyV Ab3 (-). [x]: Pearson Ki-kare testi.



Resim 15. Rb1 ile boyanma.

a. Rb1 ile yüksek boyanma, **b.** Rb1 ile ekspresyon kaybı (internal kontrol endotel hücrelerinde pozitif) (Olgu 28 ve 35).

E4. Ki67

Ki67 skorları açısından MCPyV (+) ve MCPyV (-) grupların ortalamasına baktığımızda MCPyV (+)'lerde (%54,7), MCPyV (-)'lere (%71,3) göre anlamlı derecede düşük değerler saptadık (p=0,020). Ki67 skoru için eşik değer %55 kabul edildiğinde de yine benzer şekilde iki grup arasında anlamlı fark mevcuttu. MCPyV (-) grupta yalnızca bir olgu %55'in altında

proliferasyon indeksine sahipti. Üzerinde Bowen Hastalığı saptanan bu olgunun Ki67 skoru %40,5'du. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguların Ki67 skorları ilgili özellikler **Tablo 19**'da yer almaktadır.

Tablo 19. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olgularda Ki67 skorları

Ki67 skoru	**MCPyV (+) (n=44), n (%)**	**MCPyV (-) (n=10), n (%)**	**p değeri**
Ki67 skoru			
Minimum-Maksimum	15-95	40,5-91,5	***0,020*** ^{T}
Ortalama±sd	54,7±20,3	71,3±16,1	
Ki67 skoru			
≥ %55 boyanma	24 (54,5)	9 (90)	***0,038*** ^{x}
< %55 boyanma	20 (45,5)	1 (10)	

MCPyV (+): MCPyV Ab3 (+), MCPyV (-): MCPyV Ab3 (-). ^{T}: Student T test, ^{x}: Pearson Ki-Kare testi.

E5. SK20, p53, Rb1 ve Ki67'nin MCPyV (+) ve MCPyV (-) Olguları Saptamadaki Sensitivite ve Spesifitesi

Çalışmamızda kullanılan immünhistokimyasal belirteçlerin MCPyV (+) ve MCPyV (-) olgular arasında MCPyV (+)'i saptamadaki sensitivite ve spesifiteleri **Tablo 20**'de yer almaktadır. SK20 en sensitif, Ki67 skoru en spesifik sonuçları vermiştir.

Tablo 20. SK20, p53, Rb1 ve Ki67'nin MCPyV (+) ve MCPyV (-) olgular arasında MCPyV (+)'i saptamadaki sensitivite, spesifisite, PPD, NPD ve doğruluk değerleri

Özellikler	Sensitivite (%)	Spesifite (%)	PPD (%)	NPD (%)	Doğruluk (%)
SK20 pozitifliği	100	20	84,6	100	85,2
p53 %20 eşik değerde mutasyon olmaması	68,2	70	90,9	33,3	68,5
p53 %50 eşik değerde mutasyon olmaması	88,6	50	88,6	50	81,5
Rb1'de kayıp olmaması	77,3	40	85	28,6	70,4
Ki67 skoru <%55	45,5	90	95,2	27,3	53,7

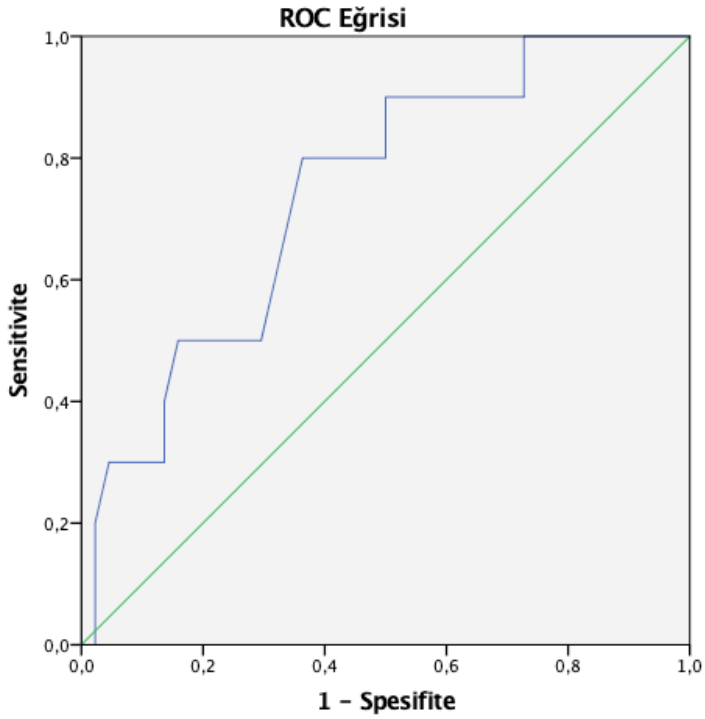
PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer.

Rb1'de olağan boyanma saptanan olgularda beraberinde p53'ün kullanımının yarar sağlayıp sağlayamayacağına baktığımızda ise p53 mutasyonu için eşik değeri %50 seçtiğimizde, MCPyV (+) ve Rb1'de olağan boyanma olan olguların %95,5'inde p53 de olağandı (21/22).

E6. MCPyV (+) ve MCPyV (-) Olguları Saptamada Ki67 Skoru İçin Eşik Değer Belirlenmesi

Ki67 skorunun MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguları saptamada hangi değerde eşik kabul edilmesi gerektiğinin tespiti için ROC eğrisi analizine başvurduğumuzda eşik değer %56,75 alındığında en yüksek sensitivitenin %90 ve en yüksek spesifitenin %50 olduğunu gördük. **Grafik 1**'de ROC eğrisi yer almaktadır.

Grafik 1. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguları saptamada Ki67 skoru için ROC eğrisi



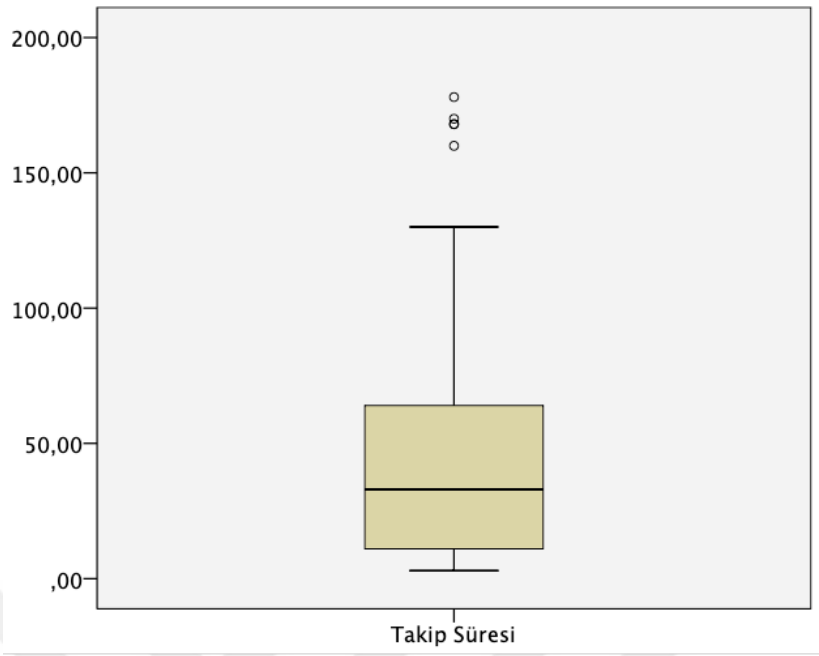
	Eşik değer	Sensitivite (%)	Spesifite (%)	EAA (%95 GA)	p değeri
Ki67	56,75	90	50	0,742 (0,583-0,901)	0,018

EAA: Eğri altı alan, GA: Güven aralığı.

III. Sağ Kalıma İlişkin Veriler

Takip ve sağ kalım verilerine ulaşabildiğimiz 53 hasta vardı. Sağ kalımına ulaşılamayan bir hasta nodal MHK olgularındandı. Hastaların tanıdan itibaren ortalama takip süresi 47,9 ay, en az takip süresi 3 ay, en uzun takip süresi ise 178 aydı. Hastaların takip süresi **Grafik 2**'de yer almaktadır. 5 hastanın takibi 150 aydan uzundu.

Grafik 2. Hastaların takip süresi



Yirmi yedi hasta sağ (%50,9), bunlardan ikisi hastalıkla sağ idi. Ölenlerin yirmi biri hastalık ilişkili, beşi hastalık dışı sebeplerden kaybedilmişti. Hastalığa bağlı ölüm %39,6 oranında izlendi. Kütane MHK grubu içinde hastalığa bağlı ölüm %38,1, nodal MHK grubu içinde hastalığa bağlı ölüm %45,5'di. Sağ kalıma ilişkin veriler **Tablo 21**'de yer almaktadır.

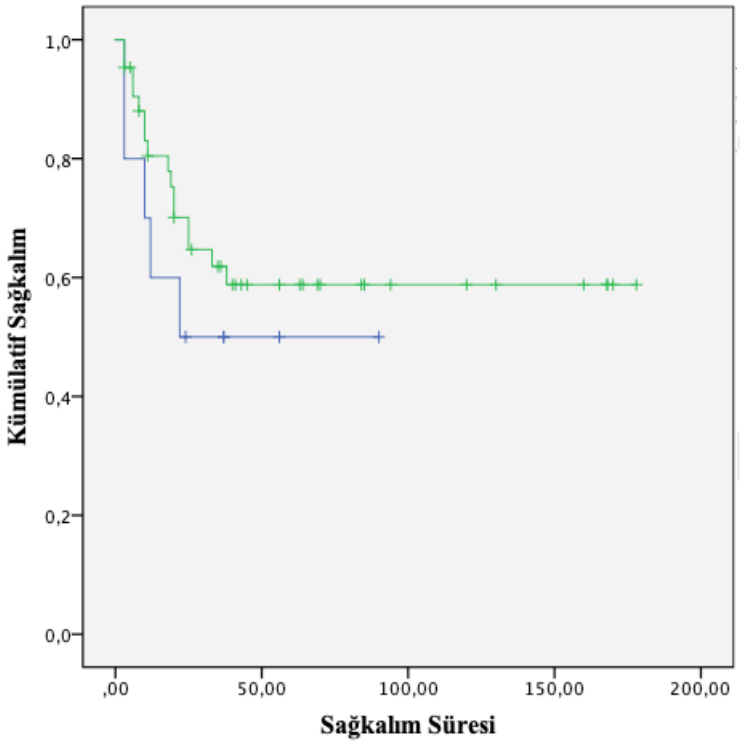
Tablo 21. Sağ kalıma ilişkin veriler

Özellikler	**Toplam MHK hastaları (n=53), n (%)**
Takip süresi, ay	
Minimum-Maksimum	3-178
Ortalama±sd	47,9±49,6
Ortanca	33
Sağ kalım durumu	
Sağ	27 (50,9)
Hastalıksız	25 (47,2)
Hastalıkla	2 (3,7)
Ölü	26 (49,1)
Hastalığa bağlı	21 (39,6)
Hastalık ilişkisiz	5 (9,5)
Hastalığa bağlı ölenlerin sağ kalım süreleri, ay (n=21)*	
Minimum-Maksimum	3-38
Ortalama±sd	14,5±10,2
Ortanca	11

MHK: Merkel hücreli karsinom. *Hastalığa bağlı ölen hastalar için.

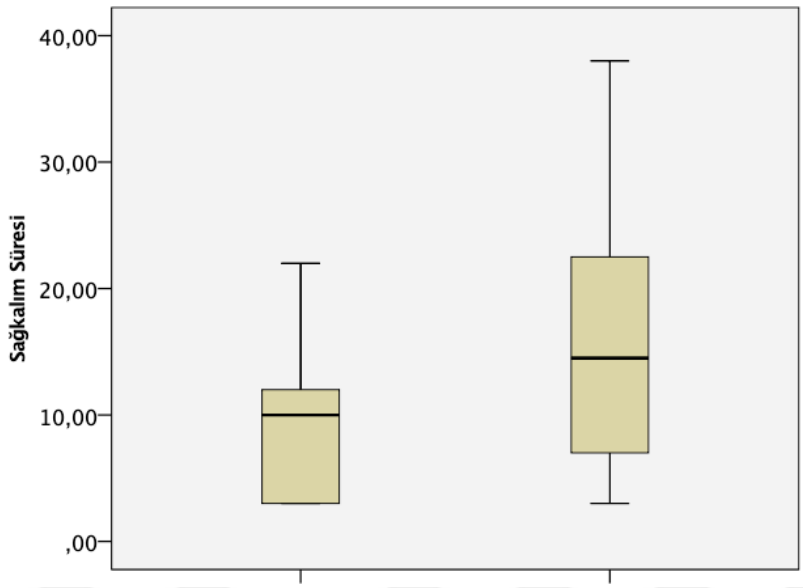
MCPyV (+) ve MCPyV (-) hastalar arası sağ kalım fonksiyonları değerlendirildiğinde, MCPyV (+) hastalarda beklenen sağ kalım süresi ortalama 111,5±12,8 ay (GA: 86,3-136,7), MCPyV (-) hastalarda beklenen sağ kalım süresi ise ortalama 50±12,7 ay (GA: 25,0-75,0) olarak saptandı. Bu farka rağmen iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı seviyede değildi (p=0,393). MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguların sağ kalım süreleri **Grafik 3**'de yer almaktadır.

Grafik 3. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olgularda sağ kalım



Hastalığa bağlı ölen MCPyV (+) olgularda ortanca yaşam süresi 14,5 ay iken MCPyV (-) olgularda ortanca yaşam süresi 10 ay olarak hesaplandı. İki grup arası yaşam süresi açısından anlamlı fark yoktu (p=0,354). Ölen hastaların sağ kalım süreleri **Grafik 4**'de yer almaktadır.

Grafik 4. Hastalığa bağlı ölenlerin sağ kalım süreleri (ay)



Serimizdeki evre IV hastalara baktığımızda tanı anında beş hasta metastatikti. On üç hastanın da takibinde uzak metastaz gelişmişti. Bu hastalar çoğunlukla disemineydi. Tutulan organlar başlıca akciğer, karaciğer, kemik, beyin, deri ve uzak lenf nodlarıydı. Hastaların takip ve tedavileri farklı merkezlerde yapıldığı ve bir kısmının da tedaviyi tolere edemeyecek kadar komorbiditesi ve düşkünlüğü olduğundan dolayı tedavi protokollerinde homojen veri elde edilemedi. Elde edebildiğimiz bilgilere göre 49 hastadan 17'si cerrahi dışında tedavi almadı ya da alamadı (%34,7). SLNB altı hastaya yapıldı. İki hastada pozitif geldi (%33,3). On hastadan dokuzu postoperatif RT, biri preoperatif RT aldı. 8 hasta cerrahi ile birlikte KT aldı. 12 hasta cerrahi + RT + KT tedavilerinin hepsini aldı (%24,5). 2 hastaya ikinci basamak tedavi olarak immünoterapi başlanması planlandı ama tedavi başlatılamadan hastalar kaybedildi. İki hasta ise immünoterapi alabildi, biri hastalıktan kaybedildi, diğeri hastalıkla olarak sağ.

Çalışmada kullanılan immünhistokimyasal belirteçlerin uzak metastazı öngörüp öngöremeyeceğini saptamak için yaptığımız analizlerde uzak metastaz saptanan olguların Ki67 skoru ortalama %65,9, uzak metastaz saptanmayanların ise %54,3 çıktı ve bu iki grup arasında anlamlı fark elde edildi. **Tablo 22**'de diğer immünhistokimyasal belirteçlerin uzak metastazı olan ve olmayan hastalardaki farkları yer almaktadır.

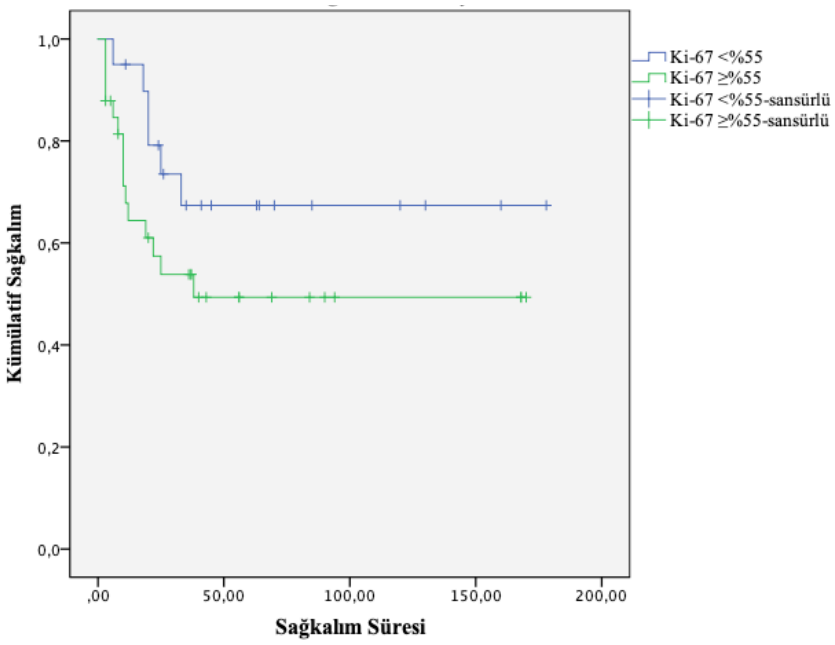
Tablo 22. Uzak metastazı olan ve olmayan hastalarda p53, Rb1, Ki67'nin durumu

Özellik	Uzak Metastaz (+)	Uzak Metastaz (-)	p değeri
p53 (eşik değer=%50)			
Mutasyonla uyumlu	5 (27,8)	5 (14,3)	0,234 [x]
Olağan boyanma	13 (72,2)	30 (85,7)	
Rb1			
Ekspresyon kaybı var	5 (27,8)	11 (31,4)	0,784 [x]
Ekspresyon kaybı yok	13 (72,2)	24 (68,6)	
Ki67 skoru			
Minimum-Maksimum	19-95	15-91,5	***0,048*** [T]
Ortalama±sd	65,9±18,9	54,3±20,3	
Ki67 skoru			
≥ %55 boyanma	14 (77,8)	19 (54,3)	0,095 [x]
< %55 boyanma	4 (22,2)	16 (45,7)	

[x]: Pearson Ki-Kare testi, [T]: Student T test.

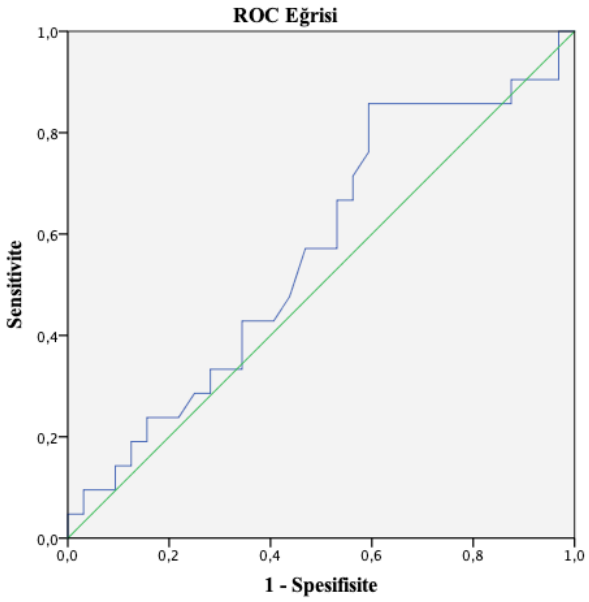
Ki67 skoru ve sağ kalım ilişkisine bakıldığında ise, önce Ki67 skoru %55 eşik değerinin altında olan hastalar ile %55 ve üzerindeki hastaların sağ kalım fonksiyonları karşılaştırıldı. Ki67 skoru %55'in altında olan hastalarda beklenen sağ kalım süresi ortalama 126,7±17,3 ay (GA: 92,8-160,7), %55 ve üzerinde olan hastalarda beklenen sağ kalım süresi ortalama 90,6±14,7 ay (GA: 61,8-119,4) olarak hesaplandı. Fark istatistiksel olarak anlamlı seviyede değildi (p=0,142). Ki67 skoru (eşik değer=%55) ve sağ kalım ilişkisi **Grafik 5**'de yer almaktadır.

Grafik 5. Ki67 skoru (eşik değer=%55) ve sağ kalım ilişkisi



Ki67 skoru için %55 eşik değer ile sağ kalım açısından anlamlı fark saptanmayınca, Ki67 skorunun sağ kalımı öngörebilmesi için gerekli eşik değeri bulma amacıyla ROC eğrisi analizi yapıldı. Bu grafiğe göre eşik değer %50,5'e çekildiğinde sensitivite artıyor, spesifite azalıyordu. **Grafik 6**'da ROC eğrisi yer almaktadır.

Grafik 6. Sağ kalımı öngörmede Ki67 skoru için ROC eğrisi

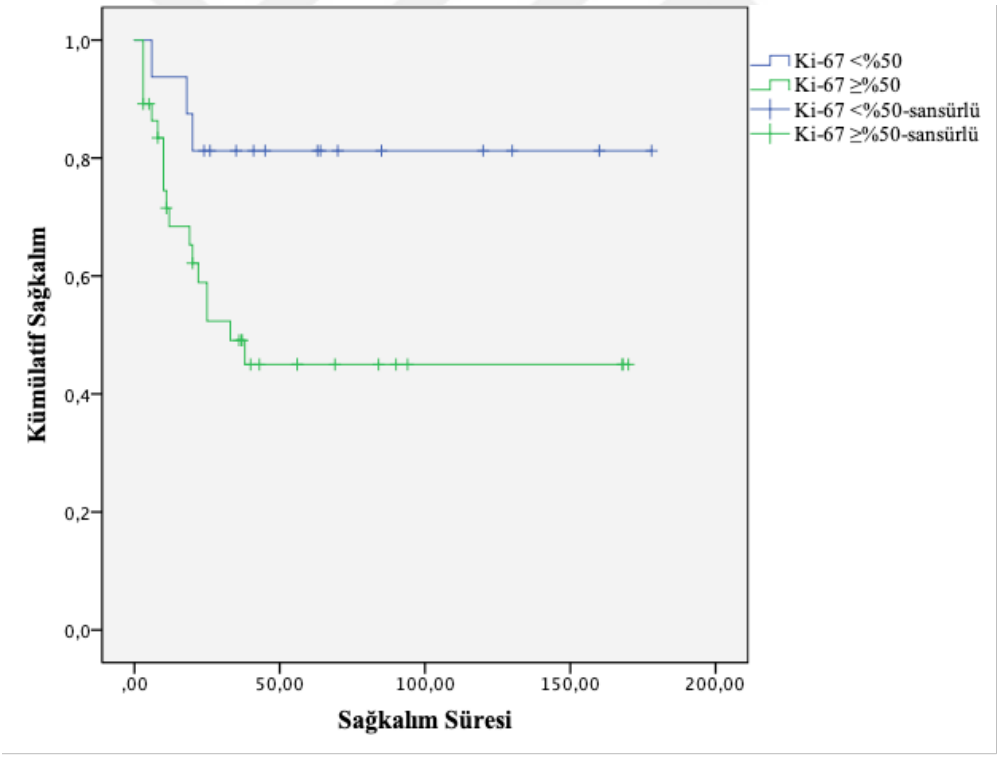


	Eşik değer	Sensitivite (%)	Spesifite (%)	EAA (%95 GA)	p değeri
Ki67	55	71,4	43,7	0,565 (0,406-0,724)	0,429
Ki67	50,5	85,7	40,6		

EAA: Eğri altı alan, GA: Güven aralığı.

Ki67 skoru için eşik değer %50 olarak belirlendiğinde Ki67 skoru %50'nin altında kalan hastaların sağ kalım süresi ortalama 147,4±15,9 ay (GA: 116,1-178,6), %50 ve üzerinde olan hastaların sağ kalım süresi ortalama 85,0±13,7 ay (GA: 58,1-112,0) olarak hesaplandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı seviyede saptandı ***(p=0,030).*** Ki67 skoru (eşik değer=%50) ve sağ kalım ilişkisi **Grafik 7**'de yer almaktadır.

Grafik 7. Ki67 skoru (eşik değer=%50) ve sağ kalım ilişkisi



Sağ kalımı etkileyebilecek faktörlerin Cox regresyon analizi ile incelenmesinde erkek cinsiyet, ileri evre (III - IV) ve Ki67 skorunun %50 ve üzerinde olmasının hastalığa bağlı sağ kalımı anlamlı derecede etkilediğini saptadık. Hastalığın yerleşim yerinin, kütane ya da nodal MHK olmasının sağ kalıma anlamlı etkisi olmadı. Analize TİL faktörü, yoğun TİL içeren olgu sayısı yalnızca 4 olduğu için alınamadı. Bu 4 olgunun hastalık seyrine baktığımızda, 16.olgu

takibinin 37.ayında hastalıksız ve sağ idi. Olgu 4 takibinin 43.ayında nüks etti, sağ ama hastalıkla idi. Diğer iki olgu ise takibinin henüz 6. ayı içerisinde, sağ ve hastalıksız idiler. Sağ kalımı etkileyebilecek faktörlerin Cox regresyon analizi **Tablo 23**'de yer almaktadır.

Tablo 23. Sağ kalımı etkileyebilecek faktörlerin tek değişkenli Cox regresyon analizi ile değerlendirilmesi

	Genel sağ kalım		**Hastalığa özgü sağ kalım**	
	HR (%95 GA)	**p değeri**	**HR (%95 GA)**	**p değeri**
Yaş (≥65)	1,118 (0,498-2,513)	0,787	1,188 (0,479-2,949)	0,710
Erkek cinsiyet	2,201 (0,950-5,098)	0,066	2,848 (1,043-7,781)	***0,041***
Primer nodal MHK	0,949 (0,354-2,544)	0,918	1,117 (0,409-3,052)	0,829
Bölge*				
Ekstremite	1,347 (0,474-3,827)	0,576	0,936 (0,306-2,863)	0,907
Baş-boyun	0,706 (0,201-2,473)	0,586	0,819 (0,237-2,831)	0,752
Gövde	0,933 (0,223-3,909)	0,925	0,931 (0,222-3,899)	0,922
İleri evre (III-IV)	2,494 (1,088-5,718)	***0,031***	4,810 (1,612-14,353)	***0,005***
Virüs negatifliği	1,650 (0,653-4,166)	0,290	1,537 (0,561-4,206)	0,403
p53 mutasyonu**	1,493 (0,591-3,769)	0,397	1,384 (0,506-3,787)	0,527
Rb1 mutasyonu**	1,108 (0,493-2,491)	0,804	1,066 (0,430-2,645)	0,890
Ki67 skoru ≥ %50	1,714 (0,716-4,102)	0,226	3,501 (1,029-11,914)	***0,045***
Ülser varlığı	1,767 (0,731-4,273)	0,206	1,330 (0,461-3,836)	0,597
LVİ varlığı	1,085 (0,481-2,446)	0,845	1,583 (0,665-3,766)	0,299

HR: Hazard ratio, GA: Güven aralığı, MHK: Merkel hücreli karsinom, LVİ: Lenfovasküler invazyon. *Referans kategori: Primer nodal MHK, **p53 mutasyonuyla uyumlu boyanma için ekspresyon kaybı veya ≥%50 eşik değer üstü boyanmalar, Rb1 mutasyonuyla uyumlu boyanma için ekspresyon kaybı kabul edilmiştir.

BÖLÜM V

TARTIŞMA

MHK nadir görülen ama agresif seyirli bir nöroendokrin karsinomdur (1). Tedaviyle kür sağlanabildiği gibi, hastaların yaklaşık yarısı hastalık ilişkili sebeplerle kaybedilebilmektedir. Bizim de amacımız serimizde immünhistokimyasal seviyede tanısal ve prognostik olabilecek belirteçlerin araştırılmasıydı. Bu kapsamda çalışmamıza 54 MHK hastası dahil ettik. Bu hastaların tanı anındaki yaşları 24 – 91 arası değişmekte olup, yaş ortalaması 67'ydi. Literatürde de tanı anında hastalar sıklıkla yedinci dekatta başvurmakta olup, ortalama 73-76 yaş arasında tanı almaktaydı (28,124). Türkiye'den bildirilen bir seride ise bizim serimize yakın bir şekilde ortalama yaş 68 bulunmuştu (108). Bu seride kadınlar hastalıktan biraz daha fazla etkileniyordu (%54) (108). Kendi serimizdeki hastaların cinsiyet dağılımına baktığımızda ise, %48'i kadın, %52'si erkekti.

Serimizde MHK'nin en sık yerleşim yeri ekstremiteydi, sonra sırayla baş-boyun ve gövde gelmekteydi. Diğer serilerde ise en sık lokalizasyon sıklıkla baş-boyun olmakla birlikte (%48), bizim gibi ekstremiteyi en sık bulanlar da mevcuttu (%66) (111,115). Türkiye'den bildirilen bir seride ise tümörler %42 ekstremite, %29 baş-boyun, %29 ise lumbosakral ve gluteal yerleşimliydi (108). Başka bir seride de en sık lokalizasyon alt ekstremite olmuştu (%32,5) (109).

Literatürde hastaların 3/4'ünün erken evrelerde başvurduğu söylenmektedir (1,28,115). Bunun sebebinin klinik ve radyolojik olarak saptanamayan metastatik lenf nodlarının SLNB uygulamasının da yaygın olmadığı zamanlarda atlanmış olması olarak düşünülmektedir. Primer nodal MHK'ler de şimdiye kadar bu lezyonların metastatik olduğuna dair herhangi bir veri ortaya konulamamış olmasına rağmen AJCC sınıflamasında evre III kategorisinde yer almaktadır (153). Dolayısıyla SLNB uygulanmış güncel seriler dikkate alındığında ve nodal MHK olguları da eklendiğinde, MHK'de evre III hastalık oranı %60'a kadar yükselmektedir (115). Bizim serimizde de nodal MHK olguları ve SLNB yapılan olgular dahil edilmiş olup, evre I %18,5, evre II %25,9, evre III %46,3 ve evre IV hastalık %9,3 oranında saptanmıştır. Türkiye'den evreleme bilgilerini içeren tek seride hastaların %85'inin Evre I-III'de tanı aldığı bildirilmiştir (109).

Olgularımızın kırk ikisi primer kütane MHK iken, on iki hasta primeri olmayan nodal MHK'ydi. Nodal MHK'lerin ortalama tanı yaşı 66 olup, cinsiyet dağılımı eşitti. Nodal MHK oldukça nadir görülmekte olup, literatürdeki serilerde ortalama tanı koyma yaşı 66-70 arası değişmekte ve hastaların çoğu erkek olarak bildirilmektedir (37,41). Serimizde olduğu gibi

literatürde de en sık inguinal bölgenin etkilendiği bildirilmiştir (37,41). Literatürde bu hastaların prognozlarının aynı evredeki lenf nodu metastazlı kütane MHK hastalarına göre daha iyi olduğu ve hastalık ilişkili ölümün daha düşük olduğu söylenmektedir (37). Ancak bizim serimizde nodal MHK'de hastalık ilişkili ölüm oranı istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte kütane MHK'lere göre daha yüksekti. Serimizde bulunan nodal MHK'lerin 2 tanesi eşlik eden komorbiditeleri yüzünden primer tedavileri olan eksizyonu yaptıramamıştı, bu nedenle ortalama sağ kalım sürelerinin etkilenmiş olabileceğini düşünmekteyiz.

Literatürle benzer şekilde çalışma grubumuzun %10'unu oluşturan 5 olguda immünsüpresyon mevcuttu (115). Bunlardan dördü solid organ transplantlı idi. Bu 4 olgunun yaş ortalaması 50,7'ydi. Literatürde de benzer şekilde solid organ transplantlı MHK olguları erken yaşta tanı almakta olup, transplantlı 41 olgu ile yapılan bir çalışmada MHK tanısı alma ortalama yaşı 53 bulunmuştu. Bu seride transplanttan sonra MHK gelişme süresi ortalama 7 seneydi ve yerleşim yerleri diğer MHK'ler ile benzerdi (33). Bizim serimizde olgularımızda MHK transplanttan ortalama 9 sene sonra gelişiyordu. Yerleşim yerleri literatürde söylendiği gibi serimizdeki diğer olgularla benzer dağılım göstermekteydi (33). Penn ve arkadaşlarının serisinde %56 hasta hastalık sebebiyle kaybedilmişti (33). Bizde de benzer şekilde hastaların yarısı hastalıktan kaybedildi.

İmmünsüpresyon insidansının yüksek olduğu MHK hastalarında ayrıca başka primer malignitelerin insidansının da arttığı bildirilmektedir. Bir çalışmada önce MHK tanısı alan hastalarda sekonder malignite insidansının anlamlı derecede arttığı, ayrıca bilinen bir malignitesi olan hastaların da MHK geliştirme riskinin yine normal popülasyona göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (205). Schwartz ve arkadaşlarının 150 hastalık serilerinde hastaların yarısının MHK tanısı almadan önce başka malignitelerinin olduğu bildirilmiş ve bildirilen bu malignitelerin de yaklaşık yarısının kütane tümörler olduğu belirtilmiştir (115). Başka bir seride ise hastaların %25'inde MHK tanısından önce veya sonra ikincil bir neoplazi öyküsü mevcut olup ve bunların da yarısı deri yerleşimli SHK'ler olarak bildirilmektedir (206). Bizim serimizde sekonder malignite %14,8 oranında saptandı ve literatüre benzer şekilde en sık deri yerleşimli SHK'nin eşlik ettiğini gözlemledik.

MHK etiyolojisinde MCPyV ve güneş hasarının değişen oranlarda etkili olduğu bilinmektedir (7,15). Kuzey Amerika ve Avrupa'daki %70-80 arası değişen oranlardaki MCPyV (+)'liğine benzer şekilde, kendi serimizde de MCPyV Ab3 klonu ile %81,5 oranında pozitiflik saptadık (7,96,97).

Uzun yıllar boyunca MCPyV'nin varlığı PCR ile belirlenmiş ve bunun en sensitif yöntem olduğu düşünülmüştür (104,124,138,145). 2009 yılında MCPyV durumunu belirleyen

bir immünhistokimyasal antikorun keşfedilmesiyle birlikte virüs tespitinde yeni bir döneme geçilmiştir (9). İlk olarak monoklonal CM2B4 klonu piyasaya sürülmüş ve çok yüksek spesifiteye sahip olan bu antikorun sensitivitesinin %65-75 olduğu gösterilmiştir (86,138). 2012 yılında MCPyV antikorunun Ab3 isimli yeni bir klonu piyasaya sürülmüş ve klonun ilk geliştirildiği laboratuvarda PCR, antikorun ilk klonu olan CM2B4 ve ortaya atılan yeni klon Ab3 karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu seride her iki klonun da yüksek spesifiteye sahip olduğu, negatif kontrollerde reaksiyon saptanmadığı, ancak Ab3 klonunun %97 gibi yüksek bir oranda sensitivite gösterdiği vurgulanmıştır (11). Bunun arkasından literatürde birkaç seri ile MCPyV PCR ve immünhistokimyasal antikorları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Starrett ve arkadaşlarının çalışmalarında 28 olgudan 20'sinde hem PCR ile hem de MCPyV antikorunun her iki klonu ile reaksiyon saptanmış, PCR negatif olgularda immünhistokimyasal reaksiyona rastlanmamıştır (12). Kervarrec ve arkadaşlarının 100 olgu içeren daha geniş serilerinde ise MCPyV antikorunun CM2B4 klonu PCR ile karşılaştırılmış, PCR pozitif olguların %77'si antikor ile pozitif saptanmıştır. Bu seride de PCR negatif olup immünhistokimyasal olarak pozitif olguya rastlanmamıştır (138). Bizim serimizde PCR ile karşılaştırma yapılamamış olmakla birlikte antikorun iki klonu arasındaki boyanma farklılıkları araştırılmıştır. Diğer serilerde olduğu gibi CM2B4 klonu ile boyanıp Ab3 klonu ile boyanmayan olgumuz olmamıştır. Ab3 klonu ile, CM2B4 klonu ile reaksiyon vermeyen 5 olguyu daha yakalamanın mümkün olduğunu gösterdik. Bu sayı MCPyV (+) olgularımızın %11'ine tekabül etmektedir. İki klon karşılaştırması yapan başka bir seride Arora ve arkadaşları da benzer şekilde Ab3 klonunun sensitivitesinin daha yüksek olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca bu seride MCPyV (+) olguların yaklaşık %25'inde CM2B4 ile zayıf ve fokal bir boyanma izlenirken, Ab3 klonu ile diffüz ve yaygın bir boyanma saptandığı da belirtilmiştir (102). Benzer bulgular bizim de serimizde mevcut olup, serimizde CM2B4 ile pozitif olan olguların %20'sinde değerlendirmeyi zorlaştıran zayıf ve/veya düşük yüzdelerde boyanmalar dikkatimizi çekmekteydi. Busam ve arkadaşları da vakalarının CM2B4 ile %75'inde diffüz boyanmanın saptandığını, kalan vakalarında ise parsiyel boyanmalar izlendiğini belirtmişlerdir (86). PCR ve CM2B4 karşılaştırmalı olarak yapılan çalışmalarda yaşanan bu heterojenite ve değerlendirme zorlukları nedeniyle yüzde veya eşik değer belirlenmesinin faydalı olabileceği öne sürülmüş, %5 veya %10 eşik değerinin kullanıldığı seriler olmuştur (8,176,207). Ancak bu klon ile %1 oranında orta şiddette boyanmanın bile PCR ile korele olduğunu ileri sürenler de mevcuttur (138,145). Kervarrec ve arkadaşları ise CM2B4 klonu ile eşik değer belirlense bile bazı vakaların boyanmasını yorumlayamadıklarını belirtmişlerdir (138). Tüm bu sonuçların ışığında ve kendi deneyimlerimize dayanarak MCPyV antikorunun Ab3 klonunun, CM2B4'e oranla

değerlendirmesinin daha kolay ve güvenilir olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca şimdiye kadar yapılan çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde Ab3 klonunun sensitivitesinin daha yüksek olduğu da anlaşılmaktadır. Türkiye'den bildirilen polyomavirüs varlığının araştırıldığı tek seride de CM2B4 klonu kullanılarak %53,8 oranında pozitiflik saptanması da (7/13 vaka) bizim oranlarımıza göre oldukça düşüktür ve muhtemelen klonun sensitivitesi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir (110).

Literatürde MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguların yerleşim yeri açısından farklılıklar gösterdiği yönünde veriler mevcuttur. Serilerde MCPyV (-) olguların daha çok baş-boyun yerleşimi gösterdiği, MCPyV (+)'lerin ise ekstremiteyi tuttuğu gösterilmiştir (17,208–210). Biz de serimizde MCPyV (-) olguların daha çok baş-boyun yerleşimli olduğunu söyleyebiliriz. Bazı çalışmalarda ise virüs durumuyla yerleşim yerinin ve cinsiyetin bir ilişkisi bulunamamıştır (16,86). Biz ise serimizde virüs pozitifliğini anlamlı bir şekilde kadınlarda daha fazla izledik. Literatürde de bizim gibi sonuçlar elde eden çalışmalar mevcut (17,124).

MCPyV (+) ve MCPyV (-) gruplar arasında yapılan tanı anındaki evre karşılaştırmalarında ise genel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (16,159). Fakat MCPyV (+) olguların daha erken evrede başvurduğunu ileri süren bir çalışma da mevcuttur (124). Bizim serimizde olgu sayımız ileri istatistiksel değerlendirme için yeterli olmadığı için bu konuda veri elde edemedik.

Kütane MHK ile nodal MHK'nin MCPyV durumu açısından karşılaştırıldığı çalışmalarda nodal MHK'de MCPyV oranının %88-100 arasında değiştiği gösterilmektedir (40,41). Bir çalışmada ise MCPyV'nin nodal MHK'lerde kütane MHK'lere göre çok daha düşük saptandığı söylenmiştir (211). Bizim de nodal MHK'lerde MCPyV oranımız hem Ab3 hem CM2B4 klonuyla aynı ve literatürle benzer bir şekilde %91,7'ydi. Literatürde immünsüpresif olan ya da olmayan olgular arasında MCPyV pozitifliği için bir fark belirtilmemiştir (86). Bizim de immünsüpresif beş olgumuzdaki MCPyV pozitifliği tüm seriyle benzer şekilde %80'di.

MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguların histomorfolojik farkları olup olmadığı birkaç çalışmanın da konusu olmuştur (124,138). Virüs etkisiyle oluşan tümörlerin daha monoton görüldüğü, virüs negatiflerin ise daha heterojen bulgular ve daha fazla atipi içerdiği öne sürülmüştür (138). MCPyV (-) vakaların akciğerin KHK'sine benzer şekilde daha iğsi şekilli ve elonge nükleuslu olduğu, daha geniş sitoplazma ve belirgin nükleollere sahip olduğu söylenmektedir (138). MCPyV (-) olgularda geniş sitoplazma özelliği MCPyV (+) olgulara göre daha yüksek oranda saptanan bir bulgudur. MCPyV (-) vakaların daha iğsi olduğu başka çalışmalarda da gözlemlenmiştir (124). MCPyV (-) olgularda atipinin daha belirgin olmasının

UV hasar nedeniyle ve mutasyon yükünün daha fazla olmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (15). Biz de olgularımızı sitoplazma ve çekirdek özelliklerine göre üç ayrı patolog olarak değerlendirdik. MCPyV (-) grupta biraz daha fazla oranda geniş sitoplazma özelliğine rastlanması dışında ayırt ettirici bir bulguya rastlamadık. Çoğu bulgu tümörlerde karışık oranlarda bulunmaktaydı. Sadece sitoplazmanın geniş olmasının MCPyV (-) grupta anlamlı olarak daha çok görüldüğüne katılabildik. Benzer şekilde Iwasaki ve arkadaşları da MCPyV (-) MHK'lerde sitoplazmanın daha geniş ve nükleer pleomorfizmin daha belirgin olduğunu saptamışlardır. Morfolojiye bakarak bir MHK olgusunun MCPyV (-) olduğunu sadece öngörebileceğimizi ancak morfolojik özelliklerine dayanarak bu vakaları iki gruba ayırmanın mümkün olmadığını vurgulamışlardır. Bunun nedeninin de formalin fiksasyonu olduğunu ileri sürmüşlerdir (128).

Histopatolojik olarak iki grup arasında ayrım yapmaya yardımcı en önemli özellik MHK'nin güneş hasarı etiyolojisiyle gelişmiş başka bir tümöre, en sık olarak da SHK'ye eşlik etmesidir (86). Bildirilen serilerde kombine tümörlerin hiç birisinde MCPyV (+)'liğine rastlanmamıştır (104). MHK etiyolojisinde daha çok UV hasarın rol aldığı Avustralya'dan bildirilen 104 vakalık geniş bir seride olguların 15'inde skuamöz farklılaşma bildirilmiştir (100). Farklılaşma izlenen tüm olgular MCPyV (-)'dir. Biz de MCPyV (-) 10 olgumuza baktığımızda bunlardan birinde MHK üzerinde Bowen Hastalığı ile uyumlu bulgular saptadık. SHK komponenti her zaman invaziv olmayabilir, in situ SHK'lerin de bu lezyonlara eşlik edebildiği bilinmektedir (104). Bowen Hastalığı ve MHK birlikteliğinin UV hasar zemininde gelişen benzer mutasyonların etkisiyle oluştuğu, herhangi birinin diğerinin prekürsörü olmadığı düşünülmektedir (134). MHK'de ek olarak RB1 kaybı olduğu ve bunun nöroendokrin fenotipte bir karsinom gelişmesinde etkili olduğu bilinmektedir (134).

SK20 özellikle MCPyV antikorunun keşfinden önce ve günümüzde MHK'de önemli bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Literatürde MHK'de SK20 ile pozitiflik oranı %88-95 arasında değişmektedir (39,131). Biz de benzer şekilde serimizde olguların %96,3'ünde pozitiflik saptadık.

MHK tanısında SK20'nin özel bir boyanma paterni mevcuttur. Bu patern genellikle perinükleer noktasal ve yarımay tarzında olabilmektedir. Bu paternde SK20 pozitifliği MHK'de tanısal olarak kullanıldığından literatürde az miktarda olmakla birlikte varlığı bilinen SK20 (-) olgular rutin pratikte tanı zorluğu oluşturmaktadır. Biz de çalışmamızda SK20'nin rutinde en sık kullanılan iki klonunu (Ks20.8 ve SP33) kullanarak nadiren saptanan SK20 negatifliğinin klon ile ilişkili bir durum olup olmadığını test etmek istedik. Her iki klonla da benzer sonuçlar elde ederek, %96,3 oranında pozitiflik saptadık. Bir klonla negatif boyanıp, diğer klonla pozitif

boyanan vakamız yoktu. MCPyV (+) gruptaki tüm olgularımız SK20 ile pozitifken, MCPyV (-) grupta %20 oranında negatifliklik saptadık. Literatürde de SK20'nin MCPyV (+) grupta %8, MCPyV (-) grupta %10 oranında negatif olduğu söylenmekte ve her iki grupta SK20 (+) vakaların mikst bir boyanma gösterdiği belirtilmiştir (138). Bizim serimizde vaka sayısının az olması aradaki farklı yüzdelere bir açıklık getirebilir. Membranöz, perinükleer noktasal ve yarımay tarzında boyanma paternleri dikkate alındığında çoğu olgumuzda her üç patern mikst bir şekilde yer almaktayken, daha az oranda sadece perinükleer noktasal boyanma içeren olgular da saptadık. SK20'nin neden bazı vakalarda negatif olduğu tam olarak anlaşılamasa da, dediferansiyasyonun bir sonucu olabileceği öne sürülmüştür (131).

SK20 negatif olgular aynı zamanda daha çok MCPyV (-) olgulardır (131,151). Bu sebeple de SK20 negatif olgularda tanı amaçlı MCPyV kullanılamamaktadır. Fakat MCPyV (-) ve MCPyV (+) olgularda SK20 negatifliği arasında anlamlı fark bulmayan çalışmalar da mevcuttur (103). Bizim gözlemlediğimiz yalnızca 2 olguda SK20 negatifliği izlendiğinden kesin bir şey söylemek zor da olsa, iki olgunun da MCPyV (-) olması bizi ilk gruba inanmaya teşvik ediyor.

SK20'nin farklı klonlarını karşılaştırdığımız çalışmamızda Ks20.8 ve SP33 klonları ile pozitivite oranları açısından fark saptamasak da Ks20.8 ile yapılan boyamalarda herhangi bir zemin reaksiyonu olmazken, SP33 ile inflamatuar hücrelerde boyanmaların izlenmesi dikkatimiz çekti. Literatürde bizim gibi SK20 klon karşılaştırması yapan çalışma yoktu. Yalnızca bir olguya rastlayabildik. MHK tanısı olan bir hastanın SLNB'sinde sinüsler içerisindeki makrofajların SK20 ile reaksiyon verdiği ama aynı zamanda CD68 ile de bunların makrofaj olduğunu doğruladıklarını belirtiyorlardı (200). SK20 Ks20.8 klonu uyguladıklarında ise reaksiyon almadıklarını gösteriyorlardı (200). Sentinel lenf nodlarında klinik ve radyolojik olarak metastaz saptanmayan olgularda immünhistokimyasal incelemenin de yardımıyla %10-20 oranında mikrometastaz saptanabilmektedir, özellikle bu gibi olgularda klon seçiminde dikkatli olunması gerektiğini düşünmekteyiz.

Özellikle SK20 (-) vakalarda ayırıcı tanıda çeldirici olabilecek bir diğer belirteç TTF-1'dir. Primer kütane NEK tanısı koymadan olguda bir metastaz olasılığı klinik ve radyolojik olarak ekarte edilmelidir. Histopatolojik olarak da içerisinde TTF-1'in de yer aldığı ayrıntılı bir immünhistokimyasal panel yer almalıdır. Bu nedenle kullanılan TTF-1 klonunun bilinmesi majör önem taşımaktadır. SK20 (-) olgularda TTF-1 (SP141 klonu) primer akciğer karsinomu ile ayrımda kullanılabilse de, bildirilen TTF-1 pozitifliklerinden bahseden bir derleme makalede 260 MHK olgusunda %0,8 oranında bir boyanma olabileceğini söylemiştir. Bu makalede ayrıca 846 KHK'de %83, 550 ekstrapulmoner viseral NEK'te ise %36 oranında

boyanma saptamışlardır (130). Ancak biz bu çalışma kapsamında olmasa da tanı amaçlı yaptığımız TTF-1'in akciğere spesifik olan klonu 8G7G3/1 ile hiçbir vakamızın boyanmadığını da belirtmek isteriz.

Çalışmamızda değerlendirdiğimiz bir diğer belirteç p53'tür. MHK'de iki patogenetik yolak söz konusu olup, birinde UV hasar, diğerinde MCPyV ana etkendir. Özellikle UV hasarla gelişen MHK olgularında TP53'de mutasyon olduğu bilinmektedir. Bu da tanı amaçlı kullanılabilmektedir. TP53 mutasyonunun MCPyV varlığı ile ters korelasyonu olduğu belirtilmekle beraber, TP53 mutasyonunun MCPyV pozitif olgularda da daha az oranda bile olsa görülebildiği söylenmektedir (8,124). Bir çalışmada TP53 mutasyonu tüm MCPyV (-) olgularda saptanırken, MCPyV (+)'lerin yaklaşık yarısında saptanmış ve bunun immünhistokimyasal seviyede de gösterilebileceği söylenmiştir (16). Öte yandan p53 mutasyonu ve immünhistokimyası arasında anlamlı ilişki bulmayanlar bir çalışma da mevcuttur (204). Literatürdeki immünhistokimyasal çalışmalara baktığımızda p53'ün MCPyV (-)'lerde daha yüksek boyandığını söyleyen ama bunu istatiksel açıdan anlamlı bulmayan çalışmalar da olmaktadır (16,39,142).

MHK'de p53'ü immünhistokimyasal seviyede eşik değerler belirleyerek araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. NEK'lerden en sık görüleni akciğer yerleşimli olanlardır. Bu tümörlerin tanısında yardımcı bir belirteç olarak kullanılan p53 değerlendirmesinde sıklıkla %50 eşik değeri kullanılmakta, mutasyon gösteren olgular sıklıkla bu eşik değeri geçen boyanmalar ya da nadiren ekspresyon kayıpları göstermektedir (212). MHK'de p53 immünhistokimyası değerlendirmesine baktığımızda ise eşik değer ya akciğer NEK'lerine benzer şekilde %50 ya da %20 olarak alınmıştır (16,17,19). Biz de olgularımızı değerlendirirken, hem %50 hem %20 eşik değerlerini kullandık. Sonuç olarak da her iki eşik değerle de MCPyV (+) ve MCPyV (-) gruplar arasında anlamlı farklar elde ettik.

p53 için eşik değer %20 iken MCPyV (-)'lerde %70 oranında mutasyonla uyumlu boyanma saptadık. Eşik değeri %50 kabul ettiğimizde ise MCPyV (+)'lerde %88 oranında olağan boyanma saptadık. Kervarrec ve arkadaşları da benzer şekilde MHK serilerinde MCPyV (-) olgularının immünhistokimyasal olarak p53 ile sıklıkla negatif olduğunu ya da yüksek ekspresyon gösterdiğini söylemişlerdir. MCPyV (+) grupta ise %95 oranında olağan boyanma saptamışlardır. Fakat bu seride herhangi bir eşik değer belirlenmemiş ya da belirlendiyse de bu değer belirtilmemiştir. Ayrıca iki MCPyV (+) olgularında p53'de ekspresyon kaybı bulmuş, bir olgu da ise yüksek ekspresyon saptamışlardır (138). Bizde de benzer şekilde bir MCPyV (+) olguda mutasyonla uyumlu ekspresyon kaybı, eşik değer %50 alındığında ise dört MCPyV (+) olguda mutasyonla uyumlu pozitif boyanma saptadık.

Rb1 proteinindeki inaktivasyonun MHK gelişiminde hem MCPyV (+) hem MCPyV (-) olgularda önemli bir yeri bulunmaktadır ancak bu mutasyonlar MCPyV (-)'lerde daha çok gen delesyonu şeklinde olurken, MCPyV (+)'lerde alternatif yolaklar mevcuttur. MCPyV (+)'lerde Rb1'deki bozukluk virüsün Rb1'e tutunarak onu inaktif hale getirmesine bağlanmaktadır. MCPyV (-)'lerde saptanan Rb1 mutasyonları MCPyV (+)'lerde saptanamamıştır (213).

Rb1 inaktivasyonunun ayrıca nöroendokrin karsinom fenotipi gelişiminde de etkisi olduğu söylenmektedir. Rb1'deki inaktivasyon mutasyonlarının immünhistokimyasal seviyedeki karşılığı ekspresyon kaybı olup, bu özellik akciğer NEK ve NET'lerinin ayırıcı tanısında sıklıkla kullanılmaktadır (187). Bu konuyla ilgili akciğer dışı NEK'lerde ise çalışmalar az sayıdadır. GEP NET ve NEK ayrımı amacıyla Rb1 immünhistokimyasal yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda hiçbir NET olgusunda Rb1 ile kayıp saptanmazken, NEK olgularında %26-59 arasında değişen oranlarda Rb1 ile kayıp olduğu belirtilmiştir (214,215).

MHK'de Rb1'e hem immünhistokimyasal hem PCR yöntemi ile bakan çalışmalar immünhistokimya için yüksek pozitiflik eşik değerini %20 ve üzerisi olarak kabul etmiştir (17,18). Bu durumun, virüsün T antijeniyle Rb1'e bağlanıp onu hücre içinde tutmasına yani MCPyV (+) gruba işaret ettiği ileri sürülmektedir. MCPyV (+) grupta Rb1'in anlamlı derecede daha fazla pozitif olduğunu ve PCR ile Rb1'de kayıp saptanan olguların immünhistokimyasal incelemede de ekspresyon kaybı içerdiğini göstermişlerdir (18). Muto ve arkadaşları ise Rb1'de mutasyon saptadıkları bazı vakaların immünhistokimayasal incelemelerinde düşük de olsa ekspresyon olabildiğini göstermiş ve mutasyon saptanmayan olguların hepsinde immünhistokimyasal olarak pozitif reaksiyon saptayamamışlardır. Çalışmalarında Rb1 immünhistokimyasını %100 sensitif ve %73 spesifik bulmuşlar (204). Başka çalışmalarda da immünhistokimyasal seviyedeki Rb1 kaybının mutasyon ile anlamlı derecede ilişkili olduğu ve çoğu MCPyV (-) olguda saptandığı gösterilmiştir (141,208,213). Çalışmalar polyomavirüs pozitifliği ile Rb1 ekspresyon kaybı arasında ters korelasyon olduğu yönünde sonuçlar vermiştir ama kullanılan antikor klonlarının farklı olması bu yüzdeleri etkilemektedir (208,216). Rb1 MCPyV (+)'lerde boyandığında %50'nin üzerinde boyanma yaparken, MCPyV (-) olgularda pozitif olsa bile genelde çok daha düşük seviyelerde olmaktadır (208). Ancak bu farkları anlamsız bulan çalışmalar da mevcuttur (210,217). Biz çalışmamızda %20 eşik değerini kullanarak Rb1 ile yüksek pozitif boyanmayı yalnızca MCPyV (+)'lerde saptadık. Ekspresyon kaybını ise her iki grupta saptayabilmekle birlikte MCPyV (+) ve MCPyV (-) gruplar arası anlamlı bir fark olduğunu tespit ettik.

Rb1'de olağan boyanma saptanan olgularımızda beraberinde p53'ün kullanımının yarar sağlayıp sağlayamayacağına baktığımızda ise MCPyV (+) olup ve Rb1'de olağan boyanma

saptanan olguların %95,5'inde p53 de olağandı. Sonuç olarak iki antikorun birlikte kullanımının MCPyV (+) ve MCPyV (-) ayrımının yapılmasında faydalı olabileceğini gösterdik.

MHK'de Ki67 skorunu değerlendiren az sayıda çalışma mevcuttur. Ki67 skorunu hücre sayma metodu kullanmadan değerlendiren çalışmalarda iki grup arasında anlamlı farklar saptanmış, MCPyV (+) ve MCPyV (-) gruplar arasında Ki67 skorları karşılaştırılmış, MCPyV (-) grupta daha yüksek Ki67 skorları olduğu görülmüştür (8,17,177). Biz serimizde, hücre sayma metodu da kullanarak Ki67'nin %55'in üstünde olmasının belirgin derecede MCPyV (-)'liğiyle ilişkili olduğunu saptadık. Bizim çalışmamızda MCPyV (+) ve MCPyV (-)'lerdeki Ki67 skoru ortalamaları anlamlı derecede farklılık içermekteydi. Çalışmamız bildiğimiz kadarıyla hücre sayma metodu kullanarak MHK'de Ki67 skorlaması yaparak bunu MCPyV (+)'liğiyle karşılaştıran ilk çalışmadır.

Serimizde hastalık ilişkili ölüm %39,6 olarak izlendi. Çeşitli serilerde hastalık ilişkili sağ kalım oranları %33-66 arasında değişmekteydi (28,124). İleri evre tek başına kanıtlanmış bir kötü prognostik faktör olarak belirtilmektedir (28). Bizim de serimizde sağ kalımla ilişkili en önemli parametre ileri evreydi. MHK'de bildirilen sağ kalımların bir kısmında genel sağ kalım datası kullanılmış, hasta grubu yaş itibariyle komorbiditesi yüksek bir grup olduğundan hastalık ilişkili sağ kalımı tam olarak yansıtamamıştır (218). Türkiye'den bildirilen ve sağ kalım datası içeren tek seride ölümlerin hastalık ilişkili olup olmamasına bakılmamış, genel sağ kalım %38 olarak verilmiştir (109). Literatürde sağ kalım datası içeren en geniş serilerden birinde hastalık ilişkili mortalite %46, genel sağ kalım %40 bulunmuştur (2).

MCPyV'nin prognoza etkisine yönelik literatürde çelişkili sonuçlar mevcuttur. Becker ve arkadaşları 53 hastalık serilerinde MCPyV (+) olguların daha agresif seyirli olduğunu, ama evreleri katıldığında iki grubun da benzer prognozla gittiğini söylemişlerdir (96). Başka çalışmalarda ise MCPyV (+) vakaların daha iyi prognozlu olduğu hem evreler katılarak hem de bağımsız faktör olarak değerlendirilmiş ve bulunmuştur (16,124,138,177). La Rosa ve arkadaşlarının serisinde MCPyV (-) grupta %54 hasta hastalık sebebiyle kaybedilirken, MCPyV (+) grupta %30 hasta kaybedilmiştir (28). Biz de bu çalışmayla benzer şekilde MCPyV (+)'lerin daha iyi seyrettiğini gözlemledik ama istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edemedik. Bizim gibi MCPyV ve prognoz arasında anlamlı ilişki bulamayan çalışmalar mevcut olabilmektedir (21,204,209). Bu bulgunun çalışmaya alınan olguların sayısıyla ilişkili olabileceği de düşünülmüştür.

Çalışmamızda anlamlı bulunan prognostik parametrelerden biri de erkek cinsiyetti. Erkeklerin hastalık ilişkili sağ kalımı kadınlara göre daha kötüydü. Literatürde de benzer

şekilde, kadın cinsiyetin daha iyi prognozla ilişkisi olduğunu söyleyen bir ekip bulunmaktadır (111).

Rb1 mutasyonu ile uzak metastazı ilişkilendiren çalışmalar da olmuştur (204). Rb1 immünhistokimyasında ekspresyon saptanan olguların prognozlarının anlamlı derecede daha iyi olduğu söylenmektedir (18). Biz de kendi serimizde bu karşılaştırmayı yaptık ancak anlamlı bir sonuç elde edemedik.

Prognostik belirteç arayışında, NET'lerde rutin kullanımı olan Ki67 skorlarını sayma metodu kullanarak değerlendirdik. Bu konuyla ilgili en çok çalışma GEP NET'lerde yapılmış olup, NEK'lerde de prognostik öneme sahip olduğu gösterilmiştir. GEP NEK ve NET G3 olgularından oluşan büyük bir seride Ki67 skorları ve prognoz ilişkisine bakıldığında, %55 eşik değeri kullanıldığında, bunun üzerinde kalan olguların KT'ye daha iyi yanıt verdiği, altında kalan olguların ise iyi yanıt vermemekle birlikte sağ kalımlarının daha iyi olduğunu belirtmişlerdir (219). Bu bilgi daha sonra GEP NEK sınıflama ve hasta yönetiminde oldukça önemli değişikliklere de neden olmuştur.

Bizim de örnek aldığımız, Ki67 sayma metodu kullanılarak yapılan 84 MHK olgusunun incelendiği seride, en az 500 tümör hücresi sayılmış ve değerlendirmeler "Hot spot" alanlarda ve basılı fotoğraflar üzerinde yapılmıştır (28). Ortalama Ki67 skoru 51,3 bulunmuş olup, 20 ila 95 arasında değişmektedir (28). Eşik değeri %55 aldıklarında da bu değerin altında olan olgularda daha fazla hastalıksız sağ kalım saptanmıştır (28). Ki67'nin sağ kalıma olan anlamlı etkisine bakıldığında yükseldikçe sağ kalım süresinin kısaldığı görülmüştür (28). Diğer çalışmalar arasında MHK'de agresif klinik ve Ki67 arasında korelasyon bulan bir çalışma daha mevcuttur (22). Muto ve arkadaşları Ki67 ve prognoz arasında ilişki bulmamıştır (204). Başka bir seride ise sayma metodu kullanılmamış ve %50'nin üzerinde Ki67 saptanan hastalar agresif klinikle ilişkili bulunmuştur (20).

Biz serimizde hem 55 hem 50 eşik değerlerini kullanarak Ki67 skorunun sağ kalımla ilişkisi belirlemeye çalıştık. %55'de istatistiksel fark elde edemesek de, %50 eşik değerde Ki67 skoru %50'nin altında kalan hastaların sağ kalım süresi ortalama 147 ay, %50 ve üzerinde olan hastaların sağ kalım süresi ortalama 85 ay olarak hesaplandı ve anlamlı sonuçlar elde ettik. Ancak Bellizzi'nin de NET'lerle ilgili yaptığı derlemesinde yazdığı gibi Ki67'nin %50-55 eşik değerleri sihirli sayılar değil, her tümör için sadece tek bir sayıya bağlı prognoz varsayımı yapmamalıyız (39).

Histopatolojik incelemelerde ülserasyon MHK'lerde raporlarda belirtilmesi gereken bir parametre olmamakla birlikte, histopatolojik incelemenin bir parçası olarak serimizde ülserasyon olan vakaları da not ettik. MHK olgularımızın %26'sında saptadık. Karşılaştırmalı

analize baktığımızda ülserasyonun daha çok MCPyV (-)'lerde olduğunu gördük. Prognoza bir etkisi gösterilememiş olsa da, serilerde %8-40 oranında ülser saptanmakta ve (20,115,159)

Histopatolojik olarak değerlendirilen bir diğer faktör de mitozdur. MHK'de mitotik indeksin oldukça yüksek olduğu bilinmektedir. Mitozun mm^2'de 10'dan fazla olması kötü prognostik faktör olarak bulunmuştur (20). Bizim serimizde de mitoz oranları oldukça yüksek olup, değişken oranlar saptandı (4-85). Serimizde yalnızca 5 vakada mitoz 10'un altında saptandı ve prognoza bir etkisi gösterilemedi. MCPyV (+) ve (-) gruplar arası da anlamlı bir fark saptanmamıştır. Çalışmalarda mm^2'de 100'e kadar mitoz saptanabileceği bildirilmiştir (115)).

Lenfovasküler invazyon literatürde %30-60 oranında değişmekte ve sağ kalıma etkili, kötü bir prognostik faktör olarak bildirilmektedir (115,156,159). Biz LVİ'yi %37 oranında saptadık. Sekiz hastalık küçük bir seride polyomavirüs saptadıkları vakalarda LVİ daha az, prognoz daha iyi denmiştir (107). Ama iki grup arasında anlamlı sonuç elde etmeyenler de bulunmaktadır (16). Biz de sınırlı anlamlı olarak MCPyV (+)'lerde daha az LVİ saptadık.

Değerlendirdiğimiz bir diğer parametre de TİL olmuştur. TİL tümör ve stroma arasında bulunan lenfositler olarak tanımlanmaktadır. Tümör mikroçevresi ve özellikle immünoterapi olanakları açısından önemli ve güncel bir konu olup, TİL'in malign melanomda kabul görülen kriterlerle belirlenmesi gerekmektedir. Biz de olgularımızda önerilen rehbere uygun bir şekilde TİL varlığı araştırdık. Ancak az sayıda vakada yoğun TİL saptayabildik ve bu sebeple prognozla ilişkisini istatistiksel olarak araştıramadık. Öte yandan MCPyV pozitifliği ile ilişkisine baktığımızda ise bu açıdan da bir ilişki saptayamadık. Ancak bazı çalışmalarda TİL varlığı, PD-L1 ekspresyonu ve MCPyV varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmuş ve TİL bulunan grubun diğer gruba göre daha iyi seyrettiği belirtilmiştir (167,220). Ancak TİL'in prognoza etkisi konusunda literatürde çelişkili sonuçlar mevcuttur (20).

Serimizde sağ kalımla ilişkisi anlamlı çıkmamakla birlikte MHK'de MCPyV (+) ve (-) vakaların ayrımı önemli bir konudur. Güncel NCCN rehberinde serumda MCPyV onkoprotein antikoru ile hastaların nüks açısından takibinin yapılabileceğini söylemektedir. Hastalardan tanı amaçlı biyopsi alındığında dokuda MCPyV varlığının gösterilmesiyle, preoperatif tahlillerinde MCPyV onkoprotein antikor seviyeleri ölçülebilmektedir. Postoperatif takiplerde de bu titrede bir yükselme olduğunda nüks indikatörü gibi kullanılabilmektedir. Ülkemizde böyle bir uygulama henüz yoktur.

Ülkemizdeki tedavi basamakları ve yöntemleri uluslararası rehberlere uymakta olup, serimizde, takip ve tedavi verilerini elde edebildiğimiz olguların %65,4'ü cerrahi tedaviye ek olarak RT ve/veya KT almıştı. Türkiye'den yapılmış olan başka bir seride de uzak metastaz

saptanmayan olgularının %52,6'sı cerrahi tedaviye ek olarak RT ve/veya KT aldığı bildirilmiştir (109). Çalışmamızda KT verilen hastalarda rehberlerin de önerdiği sisplatin veya karboplatin ve etoposid kullanılmıştır. Türkiye'den yapılan çalışma da benzer ilaçların kullanıldığı belirtilmektedir (109). Aynı çalışmada bizim serimizle benzer şekilde iki hastada ikinci basamak tedavi olarak immünoterapiye geçilmiştir (109). Artık güncel rehberlerde tedavi olanakları açısından immünoterapi metastatik hastalarda ilk tedavi olarak seçilebilmektedir.

Sonuç olarak serimizde 44 MCPyV (+), 10 MCPyV (-) olgu saptadık. MCPyV (+) ve MCPyV (-) olgular arasında klinik, histopatolojik ve immünhistokimyasal farkların araştırıldığı çalışmamızda, iki grup arasında yaş ve yerleşim yeri açısından anlamlı bir fark saptanmazken, MCPyV (-) olguların sıklıkla erkek cinsiyette olduğu gözlendi. Morfolojik olarak MCPyV (+) ve (-) olgular arasında sitoplazma özellikleri dışında ayırt ettirici morfolojik bir bulgu saptanmadı. MCPyV (+) ve (-) grupların belirlenmesinde Ab3 klonu CM2B4'e kıyasla daha başarılı bulundu. SK20 negatifliği, p53 ile mutasyonla uyumlu boyanma, Rb1'de ekspresyon kaybı ve yüksek Ki67 skorunun MCPyV (-)'lerin MCPyV (+)'lere göre ayırt ettirici özellikleri olduğu saptandı. Ki67 skorunun uzak metastazı öngörmede ve eşik değerini %50 aldığımızda sağ kalım sürelerinin belirlenmesinde faydalı olduğu görüldü. Bununla beraber erkek cinsiyet ve ileri evre (III - IV)'nin hastalık ilişkili sağ kalıma etkisi olduğu saptandı. MCPyV (+) ve (-)'liğinin ise sağ kalıma anlamlı bir etkisi olmadığı gösterildi.

BÖLÜM VI

SONUÇLAR

- Çalışmamıza 54 MHK olgusu dahil edildi. Hastaların tanı anındaki yaşları 24-91 arası değişmekte olup, ortalama tanı yaşı 67'ydi. 26 hasta kadın, 28 hasta erkekti. Kırk iki hastaya kütane MHK, on iki hastaya nodal MHK tanısı verilmişti.
- Nodal MHK hastaları inguinal, aksiller ve parotis gland içi lenf nodu yerleşimliydi. 42 primer kütane MHK olgusu ise ekstremite, baş-boyun ve gövde dağılımı göstermekteydi.
- Serimizdeki 5 hastanın hikayesinde immünsüpresyon, 8 hastanın sekonder malignitesi mevcuttu.
- Hastaların tanı anındaki tümör çapları 0,6-20 cm arasında değişmekte olup, ortalama tümör çapı 3,8 cm'di.
- Başvuru anında 10 hasta evre I (%18,5), 14 hasta evre II (%25,9), 25 hasta evre III (%46,3) ve 5 hasta evre IV'tü (%9,3). Evre IIIA'da başvuran hastaların 12'si nodal MHK'lerdi.
- 5 olguda tanı anında uzak metastaz bulunmaktaydı. Takipte ise 13 hastada daha uzak metastaz gelişti. Metastazlar başlıca akciğer, karaciğer, kemik, beyin, deri ve uzak lenf nodlarınaydı.
- Tümörlerin histopatolojik özelliklerine baktığımızda tümör sınırları çoğunlukla infiltratifti (%79,6). Tümör kalınlıkları 4-26 mm arasında değişmekteydi. On bir olguda ülser saptandı (%26,2). Olgular mitozdan zengin olup, mm^2'deki mitoz sayısı 4-85 arası değişmekteydi. Nekroz %63, lenfovasküler invazyon %37 hastada saptandı. TİL %47,6 olguda saptansa bile çoğunlukla düşük yoğunluktaydı.
- Hücre morfolojisine baktığımızda hücreler sıklıkla dar sitoplazmalı (%79,6), açık kromatinli (%61,1) ve yuvarlak şekilliydiler (%63).
- İmmünhistokimyasal incelemelerde MCPyV Ab3 klonu ile 44 olgu (%81,5), MCPyV CM2B4 klonuyla ise 39 olgu (%72,2) pozitif saptandı. MCPyV Ab3 ile reaksiyon veren olguların hepsinde diffüz boyanma saptanırken, CM2B4'ün zayıf ve/veya düşük yüzdelerde boyadığı 8 olgu mevcuttu. MCPyV Ab3 ile boyanmayıp CM2B4 ile boyanan olgu yoktu.
- MCPyV Ab3 klonu tümörde virüs varlığını belirlemede altın standart yöntem olarak kabul edildiğinde MCPyV Ab3 klonu ile boyanan MHK olgular MCPyV pozitif (MCPyV (+)), MCPyV Ab3 klonu ile boyanmayan MHK olgular MCPyV negatif (MCPyV (-)) olarak belirlendi. MCPyV (+) tümörler dışında her iki klonla da zemin reaksiyonu ya da

farklı bir hücre boyanması saptanmadı. Böylece MCPyV CM2B4 klonunun Ab3'e kıyasla MCPyV (+) ve MCPyV (-) olguları saptamadaki sensitivitesi %88,6, spesifitesi %100 olarak hesaplandı. Sonuç olarak iki belirteç arasında önemli derecede uyum bulundu (Kappa: 0,713 ve p<0,001).

- MCPyV (+) ve (-) gruplar arasındaki klinik farklar araştırıldığında yaş ve yerleşim yeri açısından anlamlı bir fark saptanmadı. Öte yandan MCPyV (-) olgulardan yalnızca biri kadındı (%10).
- Elli dört olgudan SK20 Ks20.8 ve SP33 klonları ile yalnızca 2 tanesi negatifti. SK20 negatif olgular MCPyV (-)'di (p=0,031). SK20 klonları arasında sensitivite açısından fark bulunmadı. İki klon arasındaki tek fark, SP33 ile saptanan inflamatuar hücre reaksiyonlarıydı. Pozitif olgulardaki boyanma paternlerine baktığımızda perinükleer noktasal boyanma ile birlikte membranöz ve yarımay tarzında boyanmaları %61,1 oranında saptandı.
- p53 ile mutasyonla uyumlu boyanma için üst eşik değeri %20 kabul ettiğimizde 21 olguda mutasyonla uyumlu boyanma saptandı. Eşik değeri %50'ye çıkardığımızda ise 10 olguda mutasyonla uyumlu boyanma mevcuttu. 2 olgu p53 ile negatifti. p53 ile mutasyonla uyumlu boyanma için eşik değer %20 ya da %50 alındığında her ikisiyle de MCPyV (+) ve MCPyV (-) gruplar arasında anlamlı fark ortaya çıkıyordu. MCPyV (+) olgularda mutasyonla uyumlu negatif boyanma 1 olguda, eşik değer %50 alındığında mutasyonla uyumlu pozitif boyanma 4 olguda görüldü.
- Rb1 ile ekspresyon kaybı %29,6 olguda saptandı. 12 olguda olağan boyanma için kabul edilen %20 eşik değeri aşan boyanma saptandı. Rb1 ile yüksek ya da olağan boyanma gözetmeksizin ekspresyon kaybı olup olmamasına göre MCPyV (+) ve MCPyV (-) gruplar arası farka baktığımızda anlamlı sonuçlar elde ettik. Rb1 ile yüksek boyanma (≥%20) yalnızca MCPyV (+)'lerde görülüyordu.
- Olguların Ki67 skorları %15-95 arasında değişmekteydi. Ki67 skorları açısından MCPyV (+) ve MCPyV (-) grupların ortalamasına baktığımızda MCPyV (+)'lerde (%54,7), MCPyV (-)'lere (%71,3) göre anlamlı derecede düşük değerler saptadık (p=0,020). Ki67 skoru için eşik değer %55 kabul edildiğinde de yine benzer şekilde iki grup arasında anlamlı fark mevcuttu. MCPyV (-) grupta yalnızca bir olgu %55'in altında proliferasyon indeksine sahipti.
- Nodal MHK hastaları ile kütane MHK hastaları arasında immünhistokimyasal incelemelerde anlamlı istatistiksel bir fark elde edilmedi.

- Yirmi yedi hasta sağ (%50,9), bunlardan ikisi hastalıkla sağ idi. Ölenlerin yirmi biri hastalık ilişkili, beşi hastalık dışı sebeplerden kaybedilmişti. Hastalığa bağlı ölüm %39,6 oranında izlendi.
- MCPyV (+) ve MCPyV (-) hastalar arası sağ kalım fonksiyonları değerlendirildiğinde, MCPyV (+) hastalarda beklenen sağ kalım süresi ortalama 111,5±12,8 ay (GA: 86,3-136,7), MCPyV (-) hastalarda beklenen sağ kalım süresi ise ortalama 50±12,7 ay (GA: 25,0-75,0) olarak saptandı. Bu farka rağmen iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı seviyede değildi (p=0,393). Hastalığa bağlı ölen MCPyV (+) olgularda ortanca yaşam süresi 14,5 ay iken MCPyV (-) olgularda ortanca yaşam süresi 10 ay olarak hesaplandı.
- Serimizde 49 hastadan 17'si cerrahi dışında tedavi almadı (%34,7). SLNB altı hastaya yapıldı. İki hastada pozitif geldi (%33,3). SLNB sonucu pozitif gelen hastalar tamamlayıcı lenf nodu diseksiyonuna gitti. On hastadan dokuzu postoperatif RT, biri preoperatif RT aldı. 8 hasta cerrahi ile birlikte KT aldı. 12 hasta cerrahi + RT + KT tedavilerinin hepsini aldı (%24,5). İki hastaya immünoterapi başlandı. Bu hastalardan biri hastalıktan kaybedildi, diğeri hastalıklı olarak sağ.
- Çalışmada kullanılan immünhistokimyasal belirteçlerin uzak metastazı öngörüp öngöremeyeceğini saptamak için yaptığımız analizlerde uzak metastaz saptanan olguların Ki67 skoru ortalama %65,9, uzak metastaz saptanmayanların ise %54,3 çıktı ve bu iki grup arasında anlamlı fark elde edildi. Diğer belirteçlerle anlamlı veri saptanmadı.
- Sağ kalım fonksiyonları açısından yaptığımız incelemede, Ki67 skoru %55'in altında olan hastalarda beklenen sağ kalım süresi ortalama 126,7±17,3 ay (GA: 92,8-160,7), %55 ve üzerinde olan hastalarda ise ortalama 90,6±14,7 ay (GA: 61,8-119,4) olarak hesaplandı. Fark istatistiksel olarak anlamlı seviyede değildi (p=0,142).
- Ki67 skoru için eşik değer %50 olarak belirlendiğinde ise Ki67 skoru %50'nin altında kalan hastaların sağ kalım süresi ortalama 147,4±15,9 ay (GA: 116,1-178,6), %50 ve üzerinde olan hastaların sağ kalım süresi ortalama 85,0±13,7 ay (GA: 58,1-112,0) olarak hesaplandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı seviyede saptandı (p=0,030).
- Sağ kalımı etkileyebilecek faktörlerin lojistik regresyon analizi ile incelenmesinde erkek cinsiyet, ileri evre (III - IV) ve Ki67 skorunun %50 ve üzerinde olmasının hastalığa bağlı sağ kalımı anlamlı derecede etkilediği saptandı. Hastalığın yerleşim yerinin, kütane ya da nodal MHK olmasının sağ kalıma anlamlı etkisi olmadı.

BÖLÜM VII

KAYNAKLAR

1. Elder DE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R. WHO classification of skin tumours. 4th ed. Lyon: IARC; 2018. 48–50 p.
2. Lemos BD, Storer BE, Iyer JG, Phillips JL, Bichakjian CK, Fang LC, et al. Pathologic nodal evaluation improves prognostic accuracy in merkel cell carcinoma: analysis of 5823 cases as the basis of the first consensus staging system. J Am Acad of Dermatol. 2010 Jun 21;63(5):751–61.
3. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. J Clin Oncol. 2001 Aug 15;19(16):3622–34.
4. Dasari A, Mehta K, Byers LA, Sorbye H, Yao JC. Comparative study of lung and extrapulmonary poorly differentiated neuroendocrine carcinomas: a SEER database analysis of 162,983 cases. Cancer. 2018 Feb 15;124(4):807–15.
5. Paulson KG, Park SY, Vandeven NA, Lachance K, Thomas H, Chapuis AG, et al. Merkel cell carcinoma: current US incidence and projected increases based on changing demographics. J Am Acad Dermatol. 2018 Mar 1;78(3):457–63.
6. Blattner WA. Human retroviruses: their role in cancer. Proc Assoc Am Physicians. 1999 Nov 15;111(6):563–72.
7. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human merkel cell carcinoma. Science (1979). 2008 Feb 22;319(5866):1096–100.
8. Mendoza MD, Santonja C, Gonzalez-Vela C, Concha A, Pena NI, Andres-Esteban EM, et al. The presence of merkel cell carcinoma polyomavirus is associated with a distinct phenotype in neoplastic merkel cell carcinoma cells and their tissue microenvironment. PLoS One. 2020 Jul 1;15(7):1–12.
9. Shuda M, Arora R, Kwun HJ, Feng H, Sarid R, Fernández-Figueras MT, et al. Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. Int J Cancer. 2009 Sep 15;125(6):1243–9.
10. Moshiri AS, Doumani R, Yelistratova L, Blom A, Lachance K, Shinohara MM, et al. Polyomavirus-negative merkel cell carcinoma: a more aggressive subtype based on

analysis of 282 cases using multimodal tumor virus detection. J Invest Dermatol. 2017 Apr 1;137(4):819–27.

11. Rodig SJ, Cheng J, Wardzala J, DoRosario A, Scanlon JJ, Laga AC, et al. Improved detection suggests all merkel cell carcinomas harbor merkel polyomavirus. J Clin Invest. 2012 Dec 3;122(12):4645–53.
12. Starrett GJ, Thakuria M, Chen T, Marcelus C, Cheng J, Nomburg J, et al. Clinical and molecular characterization of virus-positive and virus-negative merkel cell carcinoma. Genome Med. 2020 Mar 18;12(1):1–22.
13. Pulitzer MP, Brannon AR, Berger MF, Louis P, Scott SN, Jungbluth AA, et al. Cutaneous squamous and neuroendocrine carcinoma: genetically and immunohistochemically different from merkel cell carcinoma. Mod Pathol. 2015 Aug 1;28(8):1023–32.
14. Goh G, Walradt T, Markarov V, Blom A, Riaz N, Doumani R, et al. Mutational landscape of MCPyV-positive and MCPyV-negative merkel cell carcinomas with implications for immunotherapy. Oncotarget. 2015 Dec 7;7(3):3403–15.
15. Harms PW, Vats P, Verhaegen ME, Robinson DR, Wu YM, Dhanasekaran SM, et al. The distinctive mutational spectra of polyomavirus-negative merkel cell carcinoma. Cancer Res. 2015 Sep 15;75(18):3720–7.
16. Higaki-Mori H, Kuwamoto S, Iwasaki T, Kato M, Murakami I, Nagata K, et al. Association of merkel cell polyomavirus infection with clinicopathological differences in merkel cell carcinoma. Hum Pathol. 2012 Apr 4;43(12):2282–91.
17. Sihto H, Kukko H, Koljonen V, Sankila R, Böhling T, Joensuu H. Merkel cell polyomavirus infection, large T antigen, retinoblastoma protein and outcome in merkel cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2011 Jul 15;17(14):4806–13.
18. Sahi H, Savola S, Sihto H, Koljonen V, Bohling T, Knuutila S. RB1 gene in merkel cell carcinoma: hypermethylation in all tumors and concurrent heterozygous deletions in the polyomavirus-negative subgroup. APMIS. 2014 Dec 1;122(12):1157–66.
19. Waltari M, Sihto H, Kukko H, Koljonen V, Sankila R, Böhling T, et al. Association of merkel cell polyomavirus infection with tumor p53, KIT, stem cell factor, PDGFR-alpha and survival in merkel cell carcinoma. Int J Cancer. 2011 Aug 1;129(3):619–28.
20. Llombart B, Monteagudo C, López-Guerrero JA, Carda C, Jorda E, Sanmartín O, et al. Clinicopathological and immunohistochemical analysis of 20 cases of merkel cell carcinoma in search of prognostic markers. Histopathology. 2005 Jan 7;46(6):622–34.

21. Hall BJ, Pincus LB, Yu SS, Oh DH, Wilson AR, McCalmont TH. Immunohistochemical prognostication of merkel cell carcinoma: p63 expression but not polyomavirus status correlates with outcome. J Cutan Pathol. 2012 Jun 20;39(10):911–7.
22. Iwasaki T, Matsushita M, Nonaka D, Kato M, Nagata K, Murakami I, et al. Phosphohistone-H3 (PHH3) is prognostic relevant in merkel cell carcinomas but merkel cell polyomavirus is a more powerful prognostic factor than AJCC clinical stage, PHH3, Ki-67 or mitotic indices. Pathol Int. 2015 Aug 1;65(8):404–9.
23. Husein-Elahmed H, Ramos-Pleguezuelos F, Ruiz-Molina I, Civico-Amat V, Solis-García E, Galán-Gutierrez M, et al. Histological features, p53, c-kit, and poliomavirus status and impact on survival in merkel cell carcinoma patients. Am J Dermatopathol. 2016 Aug 1;38(8):571–9.
24. Mccall CM, Shi C, Cornish TC, Klimstra DS, Tang LH, Basturk O, et al. Grading of well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors Is improved by the inclusion of both Ki67 proliferative index and mitotic rate. Am J Surg Pathol. 2013 Nov 1;37(11):1671–7.
25. Ozturk Sari S, Taskin OC, Yegen G, Ozluk Y, Gulluoglu M. Ki67 scoring in pancreatic neuroendocrine tumors by a new method. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2016 Apr;26(4):283–7.
26. Raverot G, Dantony E, Beauvy J, Vasiljevic A, Mikolasek S, Borson-Chazot F, et al. Risk of recurrence in pituitary neuroendocrine tumors: a prospective study using a five-tiered classification. J Clin Endocrinol Metab. 2017 Sep 1;102(9):3368–74.
27. Dermawan JKT, Farver CF. The role of histologic grading and Ki67 index in predicting outcomes in pulmonary carcinoid tumors. Am J Surg Pathol. 2019 Feb;44(2):224–31.
28. la Rosa S, Bonzini M, Sciarra A, Asioli S, Maragliano R, Arrigo M, et al. Exploring the prognostic role of Ki67 proliferative index in merkel cell carcinoma of the skin: clinico-pathologic snalysis of 84 cases and review of the literature. Endocr Pathol. 2020 Dec 1;31(4):392–400.
29. Toker C. Trabecular carcinoma of the skin. Arch Derm. 1972 Jun 8;105(1):107–10.
30. Sibley RK, Rosai J, Foucar E, Dehner LP, Bosl G. Neuroendocrine (merkel cell) carcinoma of the skin. Am J Surg Pathol. 1980 Jun 1;4(3):211–22.
31. Skelton HG, Smith KJ, Hitchcock CL, McCarthy WF, Lupton GP, Graham JH. Merkel cell carcinoma: analysis of clinical, histologic, and immunohistologic features of 132 cases with relation to survival. J Am Acad Dermatol. 1997 Nov 1;37(5):734–9.

32. Becker JC, Stang A, Decaprio JA, Cerroni L, Lebbé C, Veness M, et al. Merkel cell carcinoma. Nat Rev Dis Primers. 2017 Oct 26;3(1):1–17.
33. Penn I, First MR. Merkel's cell carcinoma in organ recipients. Transplantation. 1999 Dec 1;68(11):1717–21.
34. Eusebi V, Capella C, Cossu A, Rosai J. Neuroendocrine carcinoma within lymph nodes in the absence of a primary tumor, with special reference to merkel cell carcinoma. Am J Surg Pathol. 1992 Jan 1;16(7):658–66.
35. Foote M, Veness M, Zarate D, Poulsen M. Merkel cell carcinoma: the prognostic implications of an occult primary in stage IIIB (nodal) disease. J Am Acad Dermatol. 2012 Sep 1;67(3):395–9.
36. Broida SE, Chen XT, Baum CL, Brewer JD, Block MS, Jakub JW, et al. Merkel cell carcinoma of unknown primary: clinical presentation and outcomes. J Surg Oncol. 2022 Jul 9;126(6):1080–6.
37. Tarantola TI, Vallow LA, Halyard MY, Weenig RH, Warschaw KE, Weaver AL, et al. Unknown primary merkel cell carcinoma: 23 new cases and a review. J Am Acad Dermatol. 2013 Mar 1;68(3):433–40.
38. Kotteas EA, Pavlidis N. Neuroendocrine merkel cell nodal carcinoma of unknown primary site: management and outcomes of a rare entity. Crit Rev Oncol Hematol. 2015 Apr 1;94(1):116–21.
39. Bellizzi AM. Immunohistochemistry in the diagnosis and classification of neuroendocrine neoplasms: what can brown do for you? Hum Pathol. 2020 Feb 1;96(1):8–33.
40. de Biase D, Ragazzi M, Asioli S, Eusebi V. Extracutaneous merkel cell carcinomas harbor polyomavirus DNA. Hum Pathol. 2012 Aug 24;43(7):980–5.
41. Kervarrec T, Zaragoza J, Gaboriaud P, le Gouge A, Beby-Defaux A, le Corre Y, et al. Differentiating merkel cell carcinoma of lymph nodes without a detectable primary skin tumor from other metastatic neuroendocrine carcinomas: the ELECTHIP criteria. J Am Acad Dermatol. 2018 May 1;78(5):964-972.e3.
42. Chen KT, Papavasiliou P, Edwards K, Zhu F, Perlis C, Wu H, et al. A better prognosis for merkel cell carcinoma of unknown primary origin. Am J Surg. 2013 Nov 1;206(5):752–7.
43. Tang C, Toker C. Trabecular carcinoma of the skin: an ultrastructural study. Cancer. 1978 Jan 1;42(5):2311–21.

44. Maricich SM, Wellnitz SA, Nelson AM, Lesniak DR, Gerling GJ, Lumpkin EA, et al. Merkel cells are essential for light-touch responses. Science (1979). 2009 Jun 19;324(5934):1580–2.
45. Breathnach AS, Robins J. Ultrastructural observations on merkel cells in human foetal skin. J anat. 1970 Mar 1;106(2):411–411.
46. Halata Z, Grim M, Bauman KI. Friedrich Sigmund Merkel and his 'Merkel cell', morphology, development, and physiology: review and new results. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2003 Mar 1;271A(1):225–39.
47. van Muijen GNP, Ruiter DJ, Warnaar SO. Intermediate filaments in merkel cell tumors. Hum Pathol. 1985 Jun 1;16(6):590–5.
48. Tilling T, Moll I. Which are the cells of origin in merkel cell carcinoma? J Skin Cancer. 2012 Jan 1;1(1):1–6.
49. Moll I, Zieger W, Schmelz M. Proliferative merkel cells were not detected in human skin. Arch Dermatol Res. 1996 Apr 1;288(4):184–7.
50. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. Nat Rev Cancer. 2003 Dec 1;3(12):895–902.
51. Sellheyer K. Basal cell carcinoma: cell of origin, cancer stem cell hypothesis and stem cell markers. Br J Dermatol. 2011 Apr 1;164(4):696–711.
52. van Keymeulen A, Mascre G, Youseff KK, Harel I, Michaux C, de Geest N, et al. Epidermal progenitors give rise to merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. J Cell Biol. 2009 Oct 5;187(1):91–100.
53. Metallo CM, Azarin SM, Moses LE, Ji L, de Pablo JJ, Palecek SP. Human embryonic stem cell-derived keratinocytes exhibit an epidermal transcription program and undergo epithelial morphogenesis in engineered tissue constructs. Tissue Eng Part A. 2010 Jan 1;16(1):213–23.
54. Larouche D, Lavoie A, Paquet C, Simard-Bisson C, Germain L. Identification of epithelial stem cells In vivo and In vitro using keratin 19 and BrdU. Methods Mol Biol. 2010 Jan 1;585(1):383–400.
55. Lemasson G, Coquart N, Lebonvallet N, Boulais N, Galibert MD, Marcorelles P, et al. Presence of putative stem cells in merkel cell carcinomas. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2012 Jun 1;26(6):789–95.
56. Verhaegen ME, Mangelberger D, Harms PW, Eberl M, Wilbert DM, Meireles J, et al. Merkel cell polyomavirus small T antigen initiates merkel cell carcinoma-like tumor development in mice. Cancer Res. 2017 Jun 15;77(12):3151–7.

57. Hausen A zur, Rennspiess D, Winnepenninckx V, Speel EJ, Kurz AK. Early B-cell differentiation in merkel cell carcinomas: clues to cellular ancestry. Cancer Res. 2013 Aug 15;73(16):4982–7.
58. Gross L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. Proc Soc Exp Biol Med. 1953 Jun 1;83(2):414–21.
59. Poulin DL, DeCaprio JA. Is there a role for SV40 in human cancer? J Clin Oncol. 2006 Sep 10;24(26):4356–65.
60. Martini F, Corallini A, Balatti V, Sabbioni S, Pancaldi C, Tognon M. Simian virus 40 in humans. Infect Agent Cancer. 2007 Dec 9;2(1):13.
61. Gjoerup O, Chang Y. Update on Human Polyomaviruses and Cancer. In: Advances in Cancer Research. Academic Press Inc.; 2010. p. 1–51.
62. Padgett BL, Zurhein GM, Walker DL, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. Lancet. 1971 Jun 1;297(7712):1257–60.
63. Gardner SD, Field AM, Coleman D v., Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. Lancet. 1971 Jun 1;297(7712):1253–7.
64. Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MAA, et al. Identification of a third human polyomavirus. J Virol. 2007 Apr 15;81(8):4130–6.
65. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. PLoS Pathog. 2007 May 4;3(5):e64.
66. Schowalter RM, Pastrana D v., Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. Cell Host Microbe. 2010 Jun 1;7(6):509–15.
67. van der Meijden E. Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa–associated polyomavirus. Emerg Infect Dis. 2011 Aug 1;17(8):1355–63.
68. Siebrasse EA, Reyes A, Lim ES, Zhao G, Mkakosya RS, Manary MJ, et al. Identification of MW Polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. J Virol. 2012 Oct 1;86(19):10321–6.
69. Barth H, Solis M, Kack-Kack W, Soulier E, Velay A, Fafi-Kremer S. In vitro and in vivo models for the study of human polyomavirus infection. Viruses. 2016 Oct 1;8(10):1–17.
70. Buck CB, Phan GQ, Raiji MT, Murphy PM, McDermott DH, McBride AA. Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus. J Virol. 2012 Oct 1;86(19):10887–10887.

71. Yu G, Greninger AL, Isa P, Phan TG, Martínez MA, de la Luz Sanchez M, et al. Discovery of a novel polyomavirus in acute diarrheal samples from children. PLoS One. 2012 Nov 14;7(11):e49449.
72. Lim ES, Reyes A, Antonio M, Saha D, Ikumapayi UN, Adeyemi M, et al. Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. Virology. 2013 Feb 1;436(2):295–303.
73. Moens U, Johannessen M. Human polyomaviruses and cancer: expanding repertoire. J Dtsch Dermatol Ges. 2008 Apr 30;6(9):704–8.
74. Decaprio JA, Garcea RL. A cornucopia of human polyomaviruses. Nat Rev Microbiol. 2013 Apr 1;11(4):264–76.
75. Wendzicki JA, Moore PS, Chang Y. Large T and small T antigens of merkel cell polyomavirus. Curr Opin Virol. 2015 Apr 1;11(1):38–43.
76. Houben R, Shuda M, Weinkam R, Schrama D, Feng H, Chang Y, et al. Merkel cell polyomavirus-infected merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens. J Virol. 2010 Jul 15;84(14):7064–72.
77. Yang RCA, Wu R. BK virus DNA: complete nucleotide sequence of a human tumor virus. Science (1979). 1979 Oct 26;206(4417):456–62.
78. Frisque RJ, Bream GL, Cannella MT. Human polyomavirus JC virus genome. J Virol. 1984 Aug 1;51(2):458–69.
79. Johnson EM. Structural evaluation of new human polyomaviruses provides clues to pathobiology. Trends Microbiol. 2010 May 1;18(5):215–23.
80. Takemoto KK, Mullarkey MF. Human papovavirus, BK strain: biological studies including antigenic relationship to Simian Virus 40. J Virol. 1973 Sep 1;12(3):625–31.
81. Chen T, Hedman L, Mattila PS, Jartti T, Ruuskanen O, Söderlund-Venermo M, et al. Serological evidence of merkel cell polyomavirus primary infections in childhood. J Clin Virol. 2011 Feb 1;50(2):125–9.
82. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2015. 266–337 p.
83. Shuda M, Feng H, Kwun HJ, Rosen ST, Gjoerup O, Moore PS, et al. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for merkel cell polyomavirus. Proc Natl Acad Sci. 2008 Oct 21;105(42):16272–7.
84. Shuda M, Kwun HJ, Feng H, Chang Y, Moore PS. Human merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator. J Clin Invest. 2011 Sep 1;121(9):3623–34.

85. Spurgeon ME, Cheng J, Ward-Shaw E, Dick FA, DeCaprio JA, Lambert PF. Merkel cell polyomavirus large T antigen binding to pRb promotes skin hyperplasia and tumor development. PLoS Pathog. 2022 May 1;18(5):1–23.
86. Busam KJ, Jungbluth AA, Rekthman N, Coit D, Pulitzer M, Bini J, et al. Merkel cell polyomavirus expression in merkel cell carcinomas and its absence in combined tumors and pulmonary neuroendocrine carcinomas. Am J Surg Pathol. 2009 Sep 1;33(9):1378–85.
87. Urso C, Pierucci F, Sollai M, Arvia R, Massi D, Zakrzewska K. Detection of merkel cell polyomavirus and human papillomavirus DNA in porocarcinoma. J Clin Virol. 2016 May 1;78(1):71–3.
88. Becker M, Dominguez M, Greune L, Soria-Martinez L, Pfleiderer MM, Schowalter R, et al. Infectious entry of merkel cell polyomavirus. J Virol. 2019 Mar 15;93(6):1–21.
89. Gonzalez-Vela M del C, Curiel-Olmo S, Derdak S, Beltran S, Santibanez M, Martínez N, et al. Shared oncogenic pathways implicated in both virus-positive and UV-induced merkel cell carcinomas. J Invest Dermatol. 2017 Jan 1;137(1):197–206.
90. Fitzgerald TL, Dennis S, Kachare SD, Vohra NA, Wong JH, Zervos EE. Dramatic increase in the incidence and mortality from merkel cell carcinoma in the United States. Am Surg. 2015 Feb 24;81(1):802–6.
91. Hodgson NC. Merkel cell carcinoma: changing incidence trends. J Surg Oncol. 2005 Jan 1;89(1):1–4.
92. van der Zwan JM, Trama A, Otter R, Larrañaga N, Tavilla A, Marcos-Gragera R, et al. Rare neuroendocrine tumours: Results of the surveillance of rare cancers in Europe project. Eur J Cancer. 2013 Jul;49(11):2565–78.
93. Reichgelt BA, Visser O. Epidemiology and survival of merkel cell carcinoma in the Netherlands a population-based study of 808 cases in 1993–2007. Eur J Cancer. 2011 Mar 1;47(4):579–85.
94. Kaae J, Hansen A v., Biggar RJ, Boyd HA, Moore PS, Wohlfahrt J, et al. Merkel cell carcinoma: incidence, mortality, and risk of other cancers. J Natl Cancer Ins. 2010 Jun 2;102(11):793–801.
95. Stang A, Becker JC, Nghiem P, Ferlay J. The association between geographic location and incidence of merkel cell carcinoma in comparison to melanoma: an international assessment. Eur J Cancer. 2018 May 1;94(1):47–60.

96. Becker JC, Houben R, Ugurel S, Trefzer U, Pföhler C, Schrama D. MC polyomavirus is frequently present in merkel cell carcinoma of european patients. J Invest Dermatol. 2009 Jul 17;129(1):248–50.

97. Garneski KM, Warcola AH, Feng Q, Kiviat NB, Leonard JH, Nghiem P. Merkel cell polyomavirus is more frequently present in north american than australian merkel cell carcinoma tumors. J Invest Dermatol. 2009 Jul 24;129(1):246–8.

98. Youlden DR, Soyer HP, Youl PH, Fritschi L, Baade PD. Incidence and survival for merkel cell carcinoma in Queensland, Australia, 1993-2010. JAMA Dermatol. 2014 Aug 1;150(8):864–72.

99. Woodhouse B, Robb TJ, Hearn JI, Houseman PS, Hayward G, Miller R, et al. Merkel cell polyomavirus is uncommon in New Zealand merkel cell carcinomas. Br J Dermatol. 2018 Nov 1;179(5):1197–8.

100. Paik JY, Hall G, Clarkson A, Lee L, Toon C, Colebatch A, et al. Immunohistochemistry for merkel cell polyomavirus is highly specific but not sensitive for the diagnosis of merkel cell carcinoma in the australian population. Hum Pathol. 2011 Dec 15;42(10):1385–90.

101. Hattori T, Takeuchi Y, Takenouchi T, Hirofuji A, Tsuchida T, Kabumoto T, et al. The prevalence of merkel cell polyomavirus in japanese patients with merkel cell carcinoma. J Dermatol Sci. 2013 Feb 17;70(2):99–107.

102. Arora R, Rekhi B, Chandrani P, Krishna S, Dutt A. Merkel cell polyomavirus is implicated in a subset of merkel cell carcinomas, in the Indian subcontinent. Microb Pathog. 2019 Dec 1;137(7):1–20.

103. Katano H, Ito H, Suzuki Y, Nakamura T, Sato Y, Tsuji T, et al. Detection of merkel cell polyomavirus in merkel cell carcinoma and kaposi's sarcoma. J Med Virol. 2009 Nov 1;81(11):1951–8.

104. Kuwamoto S, Higaki H, Kanai K, Iwasaki T, Sano H, Nagata K, et al. Association of merkel cell polyomavirus infection with morphologic differences in merkel cell carcinoma. Hum Pathol. 2011 Sep 10;42(5):632–40.

105. Paolini F, Donati P, Amantea A, Bucher S, Migliano E, Venuti A. Merkel cell polyomavirus in merkel cell carcinoma of italian patients. Virol J. 2011 Jan 1;8(1):103–5.

106. Mangana J, Dziunycz P, Kerl K, Dummer R, Cozzio A. Prevalence of merkel cell polyomavirus among swiss merkel cell carcinoma patients. Dermatology. 2010 Jul 30;221(2):184–8.

107. Horváth KB, Pankovics P, Kálmán E, Kádár Z, Battyáni Z, Lengyel Z, et al. Epidemiological, clinicopathological and virological features of merkel cell carcinomas in medical center of university of Pecs, Hungary (2007–2012). Pathol Oncol Res. 2016 Jan 1;22(1):71–7.
108. Leblebici C, Yeni B, Savli TC, Aydın O, Gunes P, Cinel L, et al. A new immunohistochemical marker, insulinoma-associated protein 1 (INSM1), for merkel cell carcinoma: evaluation of 24 cases. Ann Diagn Pathol. 2019 Jun 1;40(1):53–8.
109. Yildiz F, Demirci U, Küçükarda A, Büyüksimsek M, Sakalar T, Topcu T, et al. Merkel cell carcinoma in Turkey: a multicentric study. J Cancer Res Ther. 2021 Jul 17;17(6):1525.
110. Acikalin A, Bagir E, Paydas S. Prognostic and predictive value of ezh2 expression and the tumor immune microenvironment in merkel cell carcinoma. Pol J Pathol. 2021 Oct 1;72(2):140–7.
111. Agelli M, Clegg LX. Epidemiology of primary merkel cell carcinoma in the United States. J Am Acad Dermatol. 2003 Nov 1;49(5):832–41.
112. Katerji R, Yigit N, Lozeau D, Liu Y, Tam W, Crane GM. Merkel cell carcinoma in the setting of hematologic disease is associated with unique features and potential pitfalls. Ann Diagn Pathol. 2022 Feb 1;56(1):1–8.
113. Brewer JD, Shanafelt TD, Otley CC, Roenigk RK, Cerhan JR, Kay NE, et al. Chronic lymphocytic leukemia is associated with decreased survival of patients with malignant melanoma and merkel cell carcinoma in a SEER population-based study. J Clin Oncol. 2012 Mar 10;30(8):843–9.
114. Engels EA, Frisch M, Goedert JJ, Biggar RJ, Miller RW. Merkel cell carcinoma and HIV infection. The Lancet. 2002 Feb 1;359(9305):497–8.
115. Schwartz JL, Bichakjian CK, Lowe L, Griffith KA, Frohm ML, Fullen DR, et al. Clinicopathologic features of primary merkel cell carcinoma: a detailed descriptive analysis of a large contemporary cohort. Dermatol Surg. 2013 Jul 1;39(7):1009–16.
116. Jalles C, Lepelley M, Mouret S, Charles J, Leccia MT, Trabelsi S. Skin cancers under janus kinase inhibitors: a world health organization drug safety database analysis. Therapies. 2022 May 1;5957(22):40–92.
117. Harrison A, Brahs A, Fardos M, Siddiqui F, Walker A, Miller R, et al. Merkel cell carcinoma in a young female on infliximab. JAAD Case Rep. 2022 Sep 1;27(1):38–40.

118. Sargen MR, Cahoon EK, Yu KJ, Madeleine MM, Zeng Y, Rees JR, et al. Spectrum of nonkeratinocyte skin cancer risk among solid organ transplant recipients in the US. JAMA Dermatol. 2022 Apr 1;158(4):414.
119. Miller RW, Rabkin CS. Merkel cell carcinoma and melanoma: etiological similarities and differences. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1999 Feb 1;8(2):153–8.
120. Paulson KG, Iyer JG, Blom A, Warton EM, Sokil M, Yelistratova L, et al. Systemic immune suppression predicts diminished merkel cell carcinoma–specific survival independent of stage. J Invest Dermat. 2013 Mar 1;133(3):642–6.
121. Heath M, Jaimes N, Lemos B, Mostaghimi A, Wang LC, Peñas PF, et al. Clinical characteristics of merkel cell carcinoma at diagnosis in 195 patients: the AEIOU features. J Am Acad Dermatol. 2008 Nov 27;58(3):375–81.
122. Albores-Saavedra J, Batich K, Chable-Montero F, Sagy N, Schwartz AM, Henson DE. Merkel cell carcinoma demographics, morphology, and survival based on 3870 cases: a population based study. J Cutan Pathol. 2010 May 27;37(1):20–7.
123. Agbai ON, Buster K, Sanchez M, Hernandez C, Kundu R v., Chiu M, et al. Skin cancer and photoprotection in people of color: a review and recommendations for physicians and the public. J Am Acad Dermatol. 2014 Apr 1;70(4):748–62.
124. Nardi V, Song Y, Santamaria-Barria JA, Cosper AK, Lam Q, Faber AC, et al. Activation of PI3K signaling in merkel cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2012 Mar 1;18(5):1227–36.
125. Haneke E, Erlangen MD. Electron microscopy of Merkel cell carcinoma from formalin-fixed tissue. J Am Acad Dermatol. 1985 Mar 1;12(3):487-92.
126. Walsh NMG. Primary neuroendocrine (merkel cell) carcinoma of the skin: morphologic diversity and implications thereof. Hum Pathol. 2001 Apr 11;32(7):680–9.
127. Gould E, Albores-Saavedra J, Dubner B, Smith W, Payne CM. Eccrine and squamous differentiation in merkel cell carcinoma. Am J Surg Pathol. 1988 Jan 1;12(10):768–72.
128. Iwasaki T, Matsushita M, Kuwamoto S, Kato M, Murakami I, Higaki-Mori H, et al. Usefulness of significant morphologic characteristics in distinguishing between merkel cell polyomavirus-positive and merkel cell polyomavirus-negative merkel cell carcinomas. Hum Pathol. 2013 Sep 1;44(9):1912–7.
129. Martin B, Poblet E, Rios JJ, Kazakov D, Kutzner H, Brenn T, et al. Merkel cell carcinoma with divergent differentiation: histopathological and immunohistochemical study of 15 cases with PCR analysis for merkel cell polyomavirus. Histopathology. 2013 Apr 1;62(5):711–22.

130. Bellizzi AM. Assigning site of origin in metastatic neuroendocrine neoplasms: a clinically significant application of diagnostic immunohistochemistry. Adv Anat Pathol. 2013 Sep 1;20(5):285–314.
131. Miner AG, Patel RM, Wilson DA, Procop GW, Minca EC, Fullen DR, et al. Cytokeratin 20-negative merkel cell carcinoma is infrequently associated with the merkel cell polyomavirus. Mod Pathol. 2015 Apr 8;28(4):498–504.
132. Beer TW. Merkel cell carcinomas with CK20 negative and CK7 positive immunostaining. J Cutan Pathol. 2009 Jan 1;36(1):385–6.
133. Calder KB, Coplowitz S, Schlauder S, Morgan MB. A case series and immunophenotypic analysis of CK20-/CK7+ primary neuroendocrine carcinoma of the skin. J Cutan Pathol. 2007 Feb 15;34(12):918–23.
134. Harms PW, Verhaegen ME, Hu K, Hrycaj SM, Chan MP, Liu CJ, et al. Genomic evidence suggests that cutaneous neuroendocrine carcinomas can arise from squamous dysplastic precursors. Mod Pathol. 2022 Apr 1;35(4):506–14.
135. Mechtersheimer G, Staudter M, Möller P. Expression of the natural killer cell-associated antigens CD56 and CD57 in human neural and striated muscle cells and in their tumors. Cancer Res. 1991 Feb 15;51(4):1300–7.
136. Miettinen M, Cupo W. Neural cell adhesion molecule distribution in soft tissue tumors. Hum Pathol. 1993 Jan 1;24(1):62–6.
137. Lilo MT, Chen Y, Leblanc RE. INSM1 is more sensitive and interpretable than conventional immunohistochemical stains used to diagnose merkel cell carcinoma. Am J Surg Pathol. 2018 Jan 1;42(11):1541–8.
138. Kervarrec T, Tallet A, Miquelestorena-Standley E, Houben R, Schrama D, Gambichler T, et al. Morphologic and immunophenotypical features distinguishing merkel cell polyomavirus-positive and negative merkel cell carcinoma. Mod Pathol. 2019 Nov 1;32(11):1605–16.
139. López-Ríos F, Illei PB, Rusch V, Ladanyi M. Evidence against a role for SV40 infection in human mesotheliomas and high risk of false-positive PCR results owing to presence of SV40 sequences in common laboratory plasmids. The Lancet. 2004 Sep 1;364(9440):1157–66.
140. Pelletier DJ, Czeczok TW, Bellizzi AM. A monoclonal antibody against SV40 large T antigen (PAb416) does not label merkel cell carcinoma. Histopathology. 2018 Jul 1;73(1):162–6.

141. DeCoste RC, Walsh NM, Gaston D, Ly TY, Pasternak S, Cutler S, et al. RB1-deficient squamous cell carcinoma: the proposed source of combined merkel cell carcinoma. Mod Pathol. 2022 Sep 8;22(11):51–2.
142. Lai JH, Fleming KE, Ly TY, Pasternak S, Godlewski M, Doucette S, et al. Pure versus combined merkel cell carcinomas: immunohistochemical evaluation of cellular proteins (p53, Bcl-2, and c-kit) reveals significant overexpression of p53 in combined tumors. Hum Pathol. 2015 Sep 1;46(9):1290–6.
143. Dragomir A, de Wit M, Johansson C, Uhlen M, Ponteń F. The role of SATB2 as a diagnostic marker for tumors of colorectal origin: results of a pathology-based clinical prospective study. Am J Clin Pathol. 2014 May 1;141(5):630–8.
144. Bellizzi AM. SATB2 in neuroendocrine neoplasms: strong expression is restricted to well-differentiated tumours of lower gastrointestinal tract origin and is most frequent in Merkel cell carcinoma among poorly differentiated carcinomas. Histopathology. 2020 Jan 1;76(2):251–64.
145. Kervarrec T, Tallet A, Miquelestorena-Standley E, Houben R, Schrama D, Gambichler T, et al. Diagnostic accuracy of a panel of immunohistochemical and molecular markers to distinguish merkel cell carcinoma from other neuroendocrine carcinomas. Mod Pathol. 2019 Apr 1;32(4):499–510.
146. Fukuhara M, Agnarsdóttir M, Edqvist PH, Coter A, Ponten F. SATB2 is expressed in merkel cell carcinoma. Arch Dermatol Res. 2016 Aug 1;308(6):449–54.
147. Asioli S, Righi A, Volante M, Eusebi V, Bussolati G. p63 expression as a new prognostic marker in merkel cell carcinoma. Cancer. 2007 Aug 1;110(3):640–7.
148. Dabner M, McClure RJ, Harvey NT, Budgeon CA, Beer TW, Amanuel B, et al. Merkel cell polyomavirus and p63 status in merkel cell carcinoma by immunohistochemistry: merkel cell polyomavirus positivity is inversely correlated with sun damage, but neither is correlated with outcome. Pathology. 2014 Sep 8;46(3):205–10.
149. Fleming KE, Ly TY, Pasternak S, Godlewski M, Doucette S, Walsh NM. Support for p63 expression as an adverse prognostic marker in merkel cell carcinoma: report on a canadian cohort. Hum Pathol. 2014 Dec 18;45(5):952–60.
150. Harms PW, Harms KL, Moore PS, DeCaprio JA, Nghiem P, Wong MKK, et al. The biology and treatment of Merkel cell carcinoma: current understanding and research priorities. Nat Rev Clin Oncol. 2018 Dec 4;15(12):763–76.
151. Harms PW, Collie AMB, Hovelson DH, Cani AK, Verhaegen ME, Patel RM, et al. Next generation sequencing of cytokeratin 20-negative merkel cell carcinoma reveals

ultraviolet-signature mutations and recurrent TP53 and RB1 inactivation. Mod Pathol. 2016 Mar 1;29(3):240–8.

152. Hill NT, Kim D, Busam KJ, Chu EY, Green C, Brownell I. Distinct signatures of genomic copy number variants define subgroups of merkel cell carcinoma tumors. Cancers (Basel). 2021 Mar 1;13(5):1–12.
153. Bichakjian CK, Nhgiem P, Johnson T, Wright CL, Sober AJ. AJCC cancer staging manual. 8th ed. Amin M, Edge S, Greene F, Byrd D, Brookland R, Washington MK, et al., editors. New York: Springer International Publishing; 2017. 549–563 p.
154. Iyer JG, Storer BE, Paulson KG, Lemos B, Phillips JL, Bichakjian CK, et al. Relationships among primary tumor size, number of involved nodes, and survival for 8044 cases of merkel cell carcinoma. J Am Acad Dermatol. 2014 Apr 1;70(4):637–43.
155. Lim CS, Whalley D, Haydu LE, Murali R, Tippett J, Thompson JF, et al. Increasing tumor thickness is associated with recurrence and poorer survival in patients with merkel cell carcinoma. Ann Surg Oncol. 2012 Jul 21;19(11):3325–34.
156. Fields RC, Busam KJ, Chou JF, Panageas KS, Pulitzer MP, Allen PJ, et al. Five hundred patients with merkel cell carcinoma evaluated at a single institution. Ann Surg. 2011 Sep 1;254(3):465–75.
157. Smith FO, Yue B, Marzban SS, Walls BL, Carr M, Jackson RS, et al. Both tumor depth and diameter are predictive of sentinel lymph node status and survival in merkel cell carcinoma. Cancer. 2015 Sep 15;121(18):3252–60.
158. Mott RT, Smoller BR, Morgan MB. Merkel cell carcinoma: a clinicopathologic study with prognostic implications. J Cutan Pathol. 2004 Mar 1;31(3):217–23.
159. Andea AA, Coit DG, Amin B, Busam KJ. Merkel cell carcinoma: Histologic features and prognosis. Cancer. 2008 Nov 1;113(9):2549–58.
160. Goldberg SR, Neifeld JP, Frable WJ. Prognostic value of tumor thickness in patients with merkel cell carcinoma. J Surg Oncol. 2007 Jun 15;95(8):618–22.
161. Walsh NM, Castonguay M, Carter M, Pasternak S, Ly T, Doucette S, et al. Global PD-L1 signals and tumor-infiltrating lymphocytes: markers of immunogenicity in different subsets of merkel cell carcinoma and potential therapeutic implications. Am J Dermatopathol. 2019 Nov 1;41(11):819–25.
162. Tai P. A practical update of surgical management of merkel cell carcinoma of the skin. ISRN Surg. 2013 Jan 30;1(1):1–17.
163. Rush Z, Fields RC, Lee N, Brownell I. Radiation therapy in the management of merkel cell carcinoma: current perspectives. Expert Rev Dermatol. 2011 Aug 10;6(4):395–404.

164. Lewis KG, Weinstock MA, Weaver AL, Otley CC. Adjuvant local Irradiation for merkel cell carcinoma. Arch Dermatol. 2006 Jun 1;142(6):693–700.
165. Bhatia S, Storer BE, Iyer JG, Moshiri A, Parvathaneni U, Byrd D, et al. Adjuvant radiation therapy and chemotherapy in merkel cell carcinoma: survival analyses of 6908 cases from the national cancer data base. J Natl Cancer Inst. 2016 Sep 31;108(9):djw042.
166. Samimi M. Immune checkpoint inhibitors and beyond: an overview of immune-based therapies in merkel cell carcinoma. Am J Clin Dermatol. 2019 Jun 19;20(3):391–407.
167. Lipson EJ, Vincent JG, Loyo M, Kagohara LT, Luber BS, Wang H, et al. PD-L1 Expression in the merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, merkel cell polyomavirus, and overall survival. Cancer Immunol Res. 2013 Jul 1;1(1):54–63.
168. Vanella V, Festino L, Vitale MG, Alfano B, Ascierto PA. Emerging PD-1/PD-L1 antagonists for the treatment of malignant melanoma. Expert Opin Emerg Drugs. 2021 Apr 3;26(2):79–92.
169. Vikas P, Borcherding N, Zhang W. The clinical promise of immunotherapy in triple-negative breast cancer. Cancer Manag Res. 2018 Dec 1;10(1):6823–33.
170. Colunga A, Pulliam T, Nghiem P. Merkel cell carcinoma in the age of immunotherapy: facts and hopes. Clin Cancer Res. 2018 May 1;24(9):2035–43.
171. D'Angelo SP, Russell J, Lebbé C, Chmielowski B, Gambichler T, Grob JJ, et al. Efficacy and safety of first-line avelumab treatment in patients with stage IV metastatic merkel cell carcinoma. JAMA Oncol. 2018 Sep 13;4(9):e180077.
172. Garza-Davila VF, Valdespino-Valdes J, Barrera FJ, Ocampo-Candiani J, Garza-Rodríguez V. Clinical impact of immunotherapy in merkel cell carcinoma patients: a systematic review and meta-analysis. J Am Acad Dermatol. 2022 Jul 1;87(1):121–30.
173. Marchand A, Kervarrec T, Bhatia S, Samimi M. Pembrolizumab and other immune checkpoint inhibitors in locally advanced or metastatic merkel cell carcinoma: safety and efficacy. Expert Rev Anticancer Ther. 2020 Dec 1;20(12):1093–106.
174. Nghiem PT, Bhatia S, Lipson EJ, Kudchadkar RR, Miller NJ, Annamalai L, et al. PD-1 blockade with pembrolizumab in advanced merkel-cell carcinoma. N Eng J Med. 2016 Jun 30;374(26):2542–52.
175. Allen PJ, Bowne WB, Jaques DP, Brennan MF, Busam K, Coit DG. Merkel cell carcinoma: prognosis and treatment of patients from a single institution. J Clin Oncol. 2005 Apr 1;23(10):2300–9.

176. Paulson KG, Lewis CW, Redman MW, Simonson WT, Lisberg A, Ritter D, et al. Viral oncoprotein antibodies as a marker for recurrence of merkel cell carcinoma: a prospective validation study. Cancer. 2017 Apr 15;123(8):1464–74.
177. Leroux-Kozal V, Lévêque N, Brodard V, Lesage C, Dudez O, Makeieff M, et al. Merkel cell carcinoma: Histopathologic and prognostic features according to the immunohistochemical expression of Merkel cell polyomavirus large T antigen correlated with viral load. Hum Pathol. 2015 Mar 1;46(3):443–53.
178. Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas a new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. Am J Pathol. 1992 Feb 1;140(2):427–47.
179. Chu P, Wu E, Weiss LM. Cytokeratin 7 and Cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. Mod Pathol. 2000 Sep 1;13(9):962–72.
180. Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, Pinhasi-Kimhi O, Oren M. Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. Proc Natl Acad Sci. 1989 Nov 1;86(22):8763–7.
181. Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, et al. p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. Nature. 1998 Sep 10;395(6698):124–5.
182. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci. 1971 Apr 1;68(4):820–3.
183. Burkhart DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. Nat Rev Cancer. 2008 Sep 24;8(9):671–82.
184. Cagle PT, El-Naggar AK, Xu HJ, Hu SX, Benedict WF. Differential retinoblastoma protein expression in neuroendocrine tumors of the lung. Am J Pathol. 1997 Oct 4;150(2):393–400.
185. Fukuda K, Monden T, Yamamoto H, Ohue M, Fukunaga M, Tomita N, et al. Immunohistochemical study of retinoblastoma gene expression in colorectal carcinomas. Int J Oncol. 1994 Nov 15;4:117–21.
186. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. Oncogene. 2006 Aug 28;25(38):5220–7.
187. George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretia L, Kong G, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. Nature. 2015 Aug 6;524(7563):47–53.
188. Ali AA, Marcus JN, Harvey JP, Roll R, Hodgson CP, Wildrick DM, et al. RB1 protein in normal and malignant human colorectal tissue and colon cancer cell lines. FASEB J. 1993 Jul 1;7(10):931–7.

189. Lambert PF. The interwoven story of the small DNA tumor viruses. Virology. 2009 Feb 1;384(2):255.
190. Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA, et al. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. Nature. 1988 Jul 1;334(6178):124–9.
191. Kalderon D, Smith AE. In vitro mutagenesis of a putative DNA binding domain of SV40 large-T. Virology. 1984 Nov 1;139(1):109–37.
192. Decaprio J. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. Cell. 1988 Jul 1;54(2):275–83.
193. Sobecki M, Mrouj K, Colinge J, Gerbe F, Jay P, Krasinska L, et al. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. Cancer Res. 2017 May 15;77(10):2722–34.
194. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer. 1983 Jan 15;31(1):13–20.
195. Kreipe H, Heidebrecht HJ, Hansen S, Röhlk W, Kubbies M, Wacker HH, et al. A new proliferation-associated nuclear antigen detectable in paraffin-embedded tissues by the monoclonal antibody Ki-S1. Am J Pathol. 1993 Jan 1;142(1):3–9.
196. Klöppel G, la Rosa S. Ki67 labeling index: assessment and prognostic role in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. Virchows Archiv. 2018 Mar 13;472(3):341–9.
197. Adsay V. Ki67 labeling index in neuroendocrine tumors of the gastrointestinal and pancreatobiliary tract: to count or not to count is not the question, but rather how to count. Am J Surg Pathol. 2012 Dec;36(12):1743–6.
198. Reid MD, Bagci P, Ohike N, Saka B, Seven IE, Dursun N, et al. Calculation of the Ki67 index in pancreatic neuroendocrine tumors: a comparative analysis of four counting methodologies. Mod Pathol. 2015 May 5;28(5):686–94.
199. Sastre-Garau X, Peter M, Avril MF, Laude H, Couturier J, Rozenberg F, et al. Merkel cell carcinoma of the skin: pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis. J Pathol. 2009 May 1;218(1):48–56.
200. Venturi M, Pilloni L. Non-specific labeling of macrophages with anti-cytokeratin 20 (SP33) in the evaluation of nodal micrometastasis from merkel cell carcinoma: A pitfall for metastasis. J Cutan Pathol. 2019 Jan 1;46(1):88–90.

201. Köbel M, Piskorz AM, Lee S, Lui S, LePage C, Marass F, et al. Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma. J Pathol Clin Res. 2016 Oct 1;2(4):247–58.
202. Singh N, Piskorz AM, Bosse T, Jimenez-Linan M, Rous B, Brenton JD, et al. p53 immunohistochemistry is an accurate surrogate for TP53 mutational analysis in endometrial carcinoma biopsies. J Pathol. 2020 Mar 29;250(3):336–45.
203. Borchert S, Czech-Sioli M, Neumann F, Schmidt C, Wimmer P, Dobner T, et al. High-affinity Rb binding, p53 inhibition, subcellular localization, and transformation by wild-type or tumor-derived shortened merkel cell polyomavirus large T antigens. J Virol. 2014 Mar 15;88(6):3144–60.
204. Muto Y, Ryo E, Namikawa K, Takahashi A, Ogata D, Fujimura T, et al. RB1 gene mutations are a distinct predictive factor in Merkel cell carcinoma. Pathol Int. 2021 May 1;71(5):337–47.
205. Howard RA, Dores GM, Curtis RE, Anderson WF, Travis LB. Merkel cell carcinoma and multiple primary cancers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006 Aug 1;15(8):1545–9.
206. Brenner B, Sulkes A, Rakowsky E, Feinmesser M, Yukelson A, Bar-Haim E, et al. Second neoplasms in patients with merkel cell carcinoma. Cancer. 2001 Apr 1;91(7):1358–62.
207. Leitz M, Stieler K, Grundhoff A, Moll I, Brandner JM, Fischer N. Merkel cell polyomavirus detection in merkel cell cancer tumors in Northern Germany using PCR and protein expression. J Med Virol. 2014 Oct 1;86(10):1813–9.
208. Harms PW, Patel RM, Verhaegen ME, Giordano TJ, Nash KT, Johnson CN, et al. Distinct gene expression profiles of viral- and nonviral-associated merkel cell carcinoma revealed by transcriptome analysis. J Invest Dermatol. 2013 Dec 6;133(4):936–45.
209. Andea AA, Patel R, Ponnazhagan S, Isayeva T, Kumar S, Siegal GP. Detection of merkel cell polyomavirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue of merkel cell carcinoma and correlation with prognosis. Rom J Morphol Embryol. 2014 Nov 15;55(3):1057–62.
210. Schrama D, Peitsch WK, Zapatka M, Kneitz H, Houben R, Eib S, et al. Merkel cell polyomavirus status is not associated with clinical course of merkel cell carcinoma. J Invest Dermatol. 2011 May 12;131(8):1631–8.
211. Pan Z, Chen YY, Wu X, Trisal V, Wilczynski SP, Weiss LM, et al. Merkel cell carcinoma of lymph node with unknown primary has a significantly lower association

with merkel cell polyomavirus than its cutaneous counterpart. Mod Pathol. 2014 Sep 1;27(9):1182–92.

212. Swarts DRA, Ramaekers FCS, Speel EJM. Molecular and cellular biology of neuroendocrine lung tumors: evidence for separate biological entities. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2012 May 10;1826(2):255–71.
213. Cimino PJ, Robirds DH, Tripp SR, Pfeifer JD, Abel HJ, Duncavage EJ. Retinoblastoma gene mutations detected by whole exome sequencing of merkel cell carcinoma. Mod Pathol. 2014 Jan 10;27(8):1073–87.
214. Tang LH, Untch BR, Reidy DL, O'Reilly E, Dhall D, Jih L, et al. Well-differentiated neuroendocrine tumors with a morphologically apparent high-grade component: a pathway distinct from poorly differentiated neuroendocrine carcinomas. Clin Cancer Res. 2016 Feb 15;22(4):1011–7.
215. Yachida S, Vakiani E, White CM, Zhong Y, Saunders T, Morgan R, et al. Small cell and large cell neuroendocrine carcinomas of the pancreas are genetically similar and distinct from well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors. Am J Surg Pathol. 2012 Feb 1;36(2):173–84.
216. Bhatia K, Goedert JJ, Modali R, Preiss L, Ayers LW. Merkel cell carcinoma subgroups by merkel cell polyomavirus DNA relative abundance and oncogene expression. Int J Cancer. 2010 May 1;126(9):2240–6.
217. Houben R, Schrama D, Alb M, Pföhler C, Trefzer U, Ugurel S, et al. Comparable expression and phosphorylation of the retinoblastoma protein in merkel cell polyoma virus positive and negative merkel cell carcinoma. Int J Cancer. 2010 Feb 1;126(3):796–8.
218. Silk AW, Barker CA, Bhatia S, Bollin KB, Chandra S, Eroglu Z, et al. Society for immunotherapy of cancer (SITC) clinical practice guideline on immunotherapy for the treatment of nonmelanoma skin cancer. J Immunother Cancer. 2022 Jul 28;10(7):43-4.
219. Sorbye H, Welin S, Langer SW, Vestermark LW, Holt N, Osterlund P, et al. Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study. Ann Oncol. 2013 Jan 1;24(1):152–60.
220. Ricci C, Righi A, Ambrosi F, Gibertoni D, Maletta F, Uccella S, et al. Prognostic impact of MCPyV and TIL subtyping in merkel cell carcinoma: evidence from a large european cohort of 95 patients. Endocr Pathol. 2020 Mar 5;31(1):21–32.