

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ BİLİM DALI**

**SKUAMUZ HÜCRELİ DERİ KANSERİNDE VİTAMİN D
RESEPTÖRÜNÜN, KALSİYUMA DUYARLI RESEPTÖRÜN VE
β-KATENİNİN PROTEİN DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

Sevinç SÖYLEV

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Berrin TUĞRUL**



MANİSA-2018

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ BİLİM DALI**

**SKUAMUZ HÜCRELİ DERİ KANSERİNDE VİTAMİN D
RESEPTÖRÜNÜN, KALSİYUMA DUYARLI RESEPTÖRÜN VE
β-KATENİNİN PROTEİN DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

Sevinç SÖYLEV

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Berrin TUĞRUL**



MANİSA-2018

Sevinç
SÖYLEV

**SKUAMUZ HÜCRELİ DERİ KANSERİNDE VİTAMİN D RESEPTÖRÜNÜN,
KALSİYUMA DUYARLI RESEPTÖRÜN VE β -KATENİNİN PROTEİN DÜZEYİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Manisa
2018

TEZ ONAYI

Sevinç SÖYLEV tarafından hazırlanan " Skuamoz Hücreli Deri Kanserinde Vitamin D Reseptörünün, Kalsiyuma Duyarlı Reseptörün Ve β -Kateninin Protein Düzeyinde Araştırılması "adlı tez çalışması 15/11/2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Berrin TUĞRUL
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Erdal BALCAN
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Remziye DEVECİ
Ege Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Sevinç SÖYLEV



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
TABLO DİZİNİ	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Derinin Embriyolojisi ve Histolojisi	3
2.2. Skuamöz Hücreli Deri Kanseri.....	5
2.2.1. Skuamöz Hücreli Deri Kanseri Epidemiyolojisi	5
2.2.2. Skuamöz Hücreli Deri Kanseri Etiyolojisi	6
2.2.3. Skuamöz Hücreli Deri Kanseri Patogenezi	6
2.3. Vitamin D ve Vitamin D Reseptörü	7
2.3.1. Vitamin D Kaynağı ve Sentezi	7
2.3.2. Vitamin D Reseptörü	9
2.3.3. Vitamin D ve VDR'nin Kanserdeki Rolü.....	9
2.4. Kalsiyuma Duyarlı Reseptör (CaSR)	11
2.5. β -katenin.....	13
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Dokuların Elde Edilmesi.....	15
3.2. Yöntemler	15
3.2.1. Parafine Gömme ve Kesit Alma	15
3.2.2. Histomorfolojik Değerlendirme	15
3.2.3. İmmunohistokimyasal Yöntem.....	16
3.2.3.1. Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması	16
3.2.3.2. İmmunohistokimyasal Yöntem Uygulaması	17
3.2.4. Doku Homojenizasyonu ve Protein Miktarı Tayini.....	19
3.2.4.1. Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması	19
3.2.4.2. Doku Homojenizasyonu	19
3.2.4.3. Protein Miktar Tayini	19
3.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)	20
3.2.5.1. Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması	20
3.2.5.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)	21
Yönteminin Uygulanması	21
3.2.6. Western Blot Yöntemi	23
3.2.6.1. Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması	23
3.2.6.2. Western Blot Yönteminin Uygulanması	23
3.2.7. İstatistiksel Analiz	24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	26
4.1. Araştırma Bulguları	26
4.1.1. Histomorfolojik Bulgular.....	26
4.1.2. İmmunohistokimya (IHC) Yöntemi Bulguları	29

4.1.2.1. Vitamin D Reseptörü Bulguları.....	31
4.1.2.2. Kalsiyuma Duyarlı Reseptör Bulguları	32
4.1.2.3. β -katenin Bulguları.....	33
4.1.3. Western Blot (WB) Yöntemi Bulguları	35
4.1.3.1. Vitamin D Reseptörü Bulguları.....	35
4.1.3.2. Kalsiyuma Duyarlı Reseptör Bulguları	35
4.1.3.3. β -katenin Bulguları.....	36
4.1.4. İstatistiksel Analiz Bulguları	36
4.1.4.1. İmmunohistokimya Bulgularının Bağımsız Örneklem T Testi Değerlendirmesi	37
4.1.4.1.1. Vitamin D Reseptörü Bulguları.....	37
4.1.4.1.2. Kalsiyuma Duyarlı Reseptör Bulguları	37
4.1.4.1.3. β -katenin Bulguları	38
4.1.5. İmmunohistokimya Bulgularının Tek Yönlü ANOVA Tukey Post-Hoc Testi Değerlendirilmesi	38
4.2. Tartışma.....	40
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	51

KISALTMA VE SEMBOLLER DİZİNİ

1,25(OH)₂D₃	1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ (1,25 Dihidroksivitamin D ₃)
25(OH)D₃	25-Hydroxyvitamin D ₃ (25-Hidroksivitamin D ₃)
APC	Adenomatous Polyposis Coli (Adenomatöz Polipozis Koli)
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated Gene (Ataksi Telenjektazi Geni)
BCA	Bicinchoninic Acid Assay (Bikinkoninik Asit Yöntemi)
BHK	Bazal Hücreli Karsinom
Ca²⁺	Calcium (Kalsiyum)
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate (Siklik Adenozin Monofosfat)
CaSR	Calcium Sensing Receptor (Kalsiyuma Duyarlı Reseptör)
CK1	Casein Kinase 1 (Kazein Kinaz 1)
CTNNB1	Catenin Beta-1 (Katenin Beta-1)
CYP27A1	25-hidroksilaz
CYP27B1	1-Alfa-Hydroxylase (1-Alfa-Hidroksilaz)
DAB	3,3'-Diaminobenzidine (3,3'Diaminobenzidin)
DBP	Vitamin D Binding Protein (D Vitamini Bağlama Proteini)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)
DRIP	Vitamin D Receptor Interacting Protein (Vitamin D Reseptörü Etkili Protein)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü)
FGF-23	Fibroblast Growth Factor 23 (Fibroblast Büyüme Faktörü 23)
GPCR	G protein-coupled receptors (G Proteine Bağlı Reseptör)
GSK-3β	Glycogen Synthase Kinase-3 (Glikojen Sentazkinaz-3β)
MAP	Mitogen-Activated Protein Kinase (Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tampon Tuzu)
PI-3K	Phosphoinositide 3-Kinase (Fosfatidilinositol-3 Kinaz)
PKA	Protein kinase A (Protein Kinaz A)
PLC	Phospholipase C (Fosfolipaz C)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride (Fenilmetilsülfonil Florür)

PTH	Paratiroid Hormon
PTHrP	Parathyroid Hormone-Related Protein (Paratiroid Hormon İlişkili Protein)
PVDF	Polyvinylidene Difluoride (Poliviniliden Diflorit)
RAD50	Double Strand Break Repair Protein (Çift İplik Kırığı Tamir Proteini)
RIPA	Radyo İmmünopresipitasyon Deneyi
RXR	Retinoid X Receptor (Retinoid X Reseptör)
SCC	Squamous cell carcinomas (Skvamöz Hücreli Karsinom)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Sodyum Dodesil Sülfat)
SHK	Skvamöz Hücreli Karsinom
Tcf / Lef	T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer-Binding Factor (T-Hücre Faktörü/ Lenfoid Arttırıcı Faktör)
UTR	Untranslated Region (Translasyona Uğramayan Bölge)
UV	Ultraviyole (Ultraviyole)
UVA	Ultraviyole A (Ultraviyole A)
UVB	Ultraviyole B (Ultraviyole B)
VDR	Vitamin D Receptor (D Vitamini Reseptörü)
VDRE	Vitamin D Response Element (Vitamin D Cevap Elementi)
VDS	Vitamin D System (Vitamin D Sistemi)

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Epidermal ve Dermal Tabakalaşma.....	4
Şekil 2.2. Vitamin D Sentezi.....	8
Şekil 2.3. Vitamin D Reseptörü (VDR) geni	9
Şekil 2.4. VDR ve antineoplastik etkileri yoluyla kalsitriolün genomik mekanizması	10
Şekil 2.5. Kalsiyum duyarlı reseptör (CaSR) gen yapısı, promotör yeri.....	12
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait HE boyama.....	26
Şekil 4.2. Hematoksilen-eozin boyamada kıl folikülleri	27
Şekil 4.3. Hasta grubuna ait Epidermal kalınlaşma ve dermis tabakası	27
Şekil 4.4. Bazal katmanda nükleer pleomorfizm	28
Şekil 4.5. Keratinosit adaları ve keratin inciler.....	28
Şekil 4.6. Keratin inciler	29
Şekil 4.7. Kontrol grubu ve hasta grubunda VDR, CaSR, β -katenin ekspresyonu	30
Şekil 4.8. Kontrol Grubu örneklerinde epidermis ve dermis VDR ekspresyonu..	31
Şekil 4.9. SHK' da epidermis ve dermis tabakasında VDR ekspresyonu	32
Şekil 4.10. Kontrol grubu örneklerinde epidermiste CaSR ekspresyonu	32
Şekil 4.11. SHK'da düşük CaSR ekspresyonu	33
Şekil 4.12. Kontrol grubu örneklerinde immunohistokimyasal yöntem ile β -katenin boyanması	34
Şekil 4.13. Hasta grubu örneklerinde epidermis ve dermiste artan β -katenin ekspresyonu.....	34
Şekil 4.14. A Hasta grubu örneklerinde keratinosit adalarında merkezi bölgelerde zayıf β -katenin ekspresyonu.....	35
Şekil 4.15. Western blot yönteminde kontrol grubu ve hasta grubuna ait VDR ve β -katenin bantları.	36

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Hemotoksilen-eozin Boyama Prosedürü.....	16
Tablo 3.2. İmmunohistokimyasal Yöntemde Kullanılan Primer Antikorlar	17
Tablo 3.3. VDR, CaSR, β -katenin İmmunohistokimya Protokolü.....	18
Tablo 3.4. Lizatların Konsantrasyon ve Seyreltme Miktarları.	20
Tablo 3.5. Hazırlanan Jellerin Bileşimleri.....	22
Tablo 3.6. İmmunoblotting Yönteminde Kullanılan Primer Antikorlar	24
Tablo 4.1. Image J analiz programına göre örnek doku kesitlerinde immunohistokimya çalışmasından elde edilen antijen-antikor etkileşim oranları	37
Tablo 4.2. VDR, CaSR, β -katenin proteinlerinin western blot bulguları	37
Tablo 4.3. Bağımsız örnekleme T test sonuçları	38
Tablo 4.4. VDR hasta, VDR kontrol, CaSR hasta, CaSR kontrol, β -katenin hasta ve β -katenin kontrol arasındaki ekspresyon farklılığının one-way ANOVA Tukey Post-Hoc testi ile istatistiki olarak değerlendirilmesi.....	39

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve yardımlarıyla beni yönlendiren, bilimsel çalışmanın gereklerini üstün hoşgörü anlayışıyla bana öğreten, desteğini eksik etmeyen değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Berrin TUĞRUL'a;

Bilimsel bilgi, beceri ve tecrübeleri ile desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Erdal BALCAN'a;

Deneyisel çalışmalarımnda bilgi, beceri ve manevi desteklerini esirgemeyen Araş. Gör. M. Burak BATIR'a ve doktora öğrencisi Fatih ÇÖLLÜ'ye;

Bu tez çalışması için gerekli finansal desteği 2017-043 numaralı proje ile sağlayan Manisa Celal Bayar Üniversitesi (MCBÜ) Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)'ne;

Deneyisel uygulamaların gerçekleştirilmesi için, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvar olanaklarını kullanmamıza izin veren MCBÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanlığına;

Elde edilen dokuların patolojik muayenesi ve tanısı konusunda yardımları için MCBÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Peyker TEMİZ'e;

Hasta ve kontrol grubu dokularının elde edilmesindeki katkıları için MCBÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Dermatoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Gülsüm GENÇOĞLAN'a;

Bu günlere gelmemi sağlayan, maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Sevinç SÖYLEV

Manisa, 2018

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Skuamöz Hücreli Deri Kanserinde Vitamin D Reseptörünün, Kalsiyuma Duyarlı Reseptörün ve β -kateninin Protein Düzeyinde Araştırılması

Sevinç SÖYLEV

**Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Berrin TUĞRUL

Skuamöz hücreli deri kanseri (SHK), melanom dışı deri kanserleri arasında görülme sıklığı artan, epidermisten köken alan malign, invaziv bir tümördür. Bu tümörler güneşten zarar görmüş ciltteki keratinositlerin proliferasyonu ve farklılaşmasının bozulması sonucu oluşmaktadır. Keratinosit proliferasyonu ve farklılaşması vitamin D, Wnt/ β -katenin sinyal yolunun dahil olduğu birkaç faktör tarafından düzenlenmektedir. Bu çalışmada vitamin D reseptörü (VDR), kalsiyuma duyarlı reseptör (CaSR) ve β -katenin (CTNNB1) protein seviyelerinin skuamöz hücreli deri kanseri üzerinde etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hasta ve kontrol grubu doku örneklerindeki VDR, CaSR ve β -katenin protein seviyeleri immünohistokimya (IHC), floresan-immunohistokimya (FIHC) ve western blot (WB) yöntemi ile analiz edilmiştir. Hasta ve kontrol grubunda VDR ve β -katenin protein ekspresyonları arasında Bağımsız Örneklem T Testine göre istatistiksel olarak anlamlı fark (sırasıyla; $p=0,006$, $p=0,012$) olduğu, CaSR için ise anlamlı fark ($p=0,326$) olmadığı belirlenmiştir. İmmünohistokimya çalışmasından elde edilen bulguların Tek Yönlü ANOVA Testine göre analizleri şu şekildedir. Hasta dokuları kendi içinde değerlendirildiğinde VDR ve β -katenin ekspresyon oranları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p=0,980$). Hasta örneklerindeki VDR ekspresyon oranları ile kontrol VDR, kontrol CaSR, kontrol β -katenin ve hasta CaSR oranları karşılaştırıldığında aralarındaki farkın (sırasıyla; $p=0,016$, $p=0,002$, $p=0,005$, $p=0,003$) anlamlı olduğu bulunmuştur. β -kateninin hasta grubundaki ekspresyonu ile kontrol VDR, kontrol CaSR, kontrol β -katenin ve hasta CaSR oranları arasındaki farkın (sırasıyla; $p=0,003$, $p=0,0001$, $p=0,001$, $p=0,001$) anlamlı olduğu belirlenmiştir. IHC yöntemi ile elde edilen VDR ve β -katenin ekspresyon oranları WB sonuçları ile desteklenebilirken, CaSR için WB bantları gösterilememiştir. Elde edilen bulgular, SHK'de VDR ve β -kateninin ekspresyon oranlarının hastalık üzerinde etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: CaSR, β -katenin, Skuamöz hücreli deri kanseri, VDR

2018, 65 sayfa.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Investigation of the Protein Level of Vitamin D Receptor, Calcium-Sensing Receptor and β -Catenin in Skin Squamous Cell Carcinoma

Sevinç SÖYLEV

Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Berrin TUĞRUL

Squamous cell skin cancer (SCC) is a malignant and invasive tumor which is originated from epidermis with a high incidence among non-melanoma skin cancers. These tumors is formed from sun damaged skin keratinocytes due to impaired proliferation and differentiation function of keratinocytes. Keratinocyte proliferation and differentiation is regulated by a number of factors including vitamin D, Wnt / β -catenin signaling pathway. In this study, we aimed to determine whether vitamin D receptor (VDR), calcium-sensing receptor (CaSR) and β -catenin (CTNNB1) protein levels have an effect on squamous cell skin cancer. For this purpose, VDR, CaSR and β -catenin protein levels in tissue samples of patient and control group were analyzed by immunohistochemistry (IHC), fluorescence-immunohistochemistry (FIHC) and western blot (WB) method. It was determined that the difference between VDR and β -catenin protein expression levels in the patient and the control groups were statistically significant ($p= 0.006$, $p= 0.012$, respectively), but not for CaSR ($p= 0.3326$) according to Independent Sampling T Test analysis. The results obtained from the immunohistochemistry study are as follows according to One-Way ANOVA Test analysis. There was no significant difference between VDR and β -catenin expression rates in patient tissues ($p=0.980$). When VDR expression rates in the patient samples were compared with control VDR, control CaSR, control β -catenin and patient CaSR ratios, the difference were found to be significant ($p =0.016$, $p =0.002$, $p =0.005$, $p =0.003$, respectively). It was determined that the difference between β -catenin expression in the patient group and control VDR, control CaSR, control β -catenin and patient CaSR ratios were a significant ($p= 0.003$, $p= 0.0001$, $p= 0.001$, $p= 0.001$, respectively). While the VDR and β -catenin expression rates obtained by the IHC method could be supported by WB results, the WB bands for CaSR could not be shown. The findings suggest that expression rates of VDR and β -catenin in SCC may have an effect on the disease.

Key Words: CaSR, β -katenin, Skin Squamous Cell Carcinoma, VDR

2018, 65 page.

1. GİRİŞ

Deri kanseri melanom ve melanom dışı (non-melanoma) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Skuamöz hücreli deri kanseri (SHK) melanom dışı grubuna girmektedir. Bu tümörler güneşten zarar görmüş ciltte ortaya çıkan keratinosit neoplazmlarını tanımlamaktadır. SHK'ler, prekanseröz lezyonlara ilerleyen bozulmuş keratinositlerle başlar. Bu lezyonların bazıları dokuyla sınırlı SHK'lere, bazıları ise yayılıcı SHK'lere dönüşürler [1].

Keratinosit proliferasyonu ve farklılaşması vitamin D, Wnt/ β -katenin sinyal yolunun dahil olduğu birkaç faktör tarafından düzenlenir. Vitamin D'nin aktif metaboliti olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, VDR aracılığıyla keratinositlerin farklılaşmasını teşvik ederken, proliferasyonunu baskılar. VDR ve β -katenin arasında etkileşimin varlığı gösterildiği için ikisinin ortak düzenleyici etkisi olduğu öngörülmektedir [2].

Epidermisteki 7-dehidrokolesterol güneş ışığındaki ultraviyole B (UVB) etkisi ile vitamin D'ye çevrilir. Epidermisin baskın hücresi olan keratinosit, vitamin D'yi onun aktif formu olan $1,25$ -dihidroksivitamin D_3 'e ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) metabolize eder. Keratinositler, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ üretimi için vitamin D reseptörü (VDR) de eksprese eder. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /VDR bazal tabakadaki hücre çoğalmasını düzenleyerek ve ardışık keratinosit hücre farklılaşmasını uyararak deri tabakalarının oluşum işlemini teşvik eder [3]. VDR'den yoksun farelerde bozulmuş kalsiyum emilimi ve hipokalsemi ile paralel olarak keratinosit diferansiyasyonunun bozulduğu gösterilmiştir [4]. Bazal keratinositlerde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'nin anti-proliferatif etkisi, VDR aracılığıyla β -katenin ve hedgehog (HH) sinyal yolunun inhibisyonunu kapsar [5].

CaSR'nin kanser oluşumundaki fonksiyonu kolon, paratiroid, mide, nöroblastom, meme, prostat, yumurtalık, ve böbrek kanserlerinde gösterilmiştir [6]. Yapılan çalışmalar kalsiyum ve vitamin D'nin keratinosit farklılaşması ve proliferasyonu için işbirliği yaptığı fikrini pekiştirmektedir [2]. Keratinosit kültürlerinde hem kalsiyumun hem de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün farklılaşmayı uyardığı ve birlikte sinerjistik bir etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Hayvan çalışmalarında VDR ve CaSR genleri mutant olan farelerde UVB ve kimyasal etki olmadan spontan skuamöz deri kanserinin geliştiği [3]. Deri tümörlerinde kalsiyum anormalileri için kolorektal

kanser iyi bir model olmuştur. Vitamin D ve β -katenin sinyali kolorektal kanser gelişiminde ve insan kolorektal kanser hücre hatlarında gösterilmiştir [7].

Çeşitli kanser tiplerinde VDR, CaSR ve Wnt/ β -kateninin tümör oluşumunda rolü olduğu bilinmektedir. VDR ile aktive edilen yollar ile fonksiyonel bağlantılı olan Ca^{2+} /CaSR sinyal yolağının Wnt/ β -katenin yolağındaki alt kademedeki etkileri hedefleyerek kolorektal kanserde proliferasyonu baskıladığı ve farklılaşmayı teşvik ettiği gösterilmiştir. Ca^{2+} /CaSR ve $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ /VDR, Wnt sinyal yolunu inhibe eder, kolorektal kanser hücrelerinin ve kolonositlerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenlediği belirtilmektedir [7].

Yapılan literatür incelemelerinde deri kanseri tiplerinde VDR, CaSR ve Wnt/ β -kateninin birlikte tümör oluşumu üzerindeki etkilerine yönelik araştırmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın dayanağını oluşturan makalelerin bilgisi ışığında, skuamöz hücreli deri kanserinde VDR, CaSR ve β -katenin protein düzeylerinin hastalıkla bir ilişkisinin olup olmadığı immünohistokimyasal, floresan immünohistokimyasal ve western blot yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

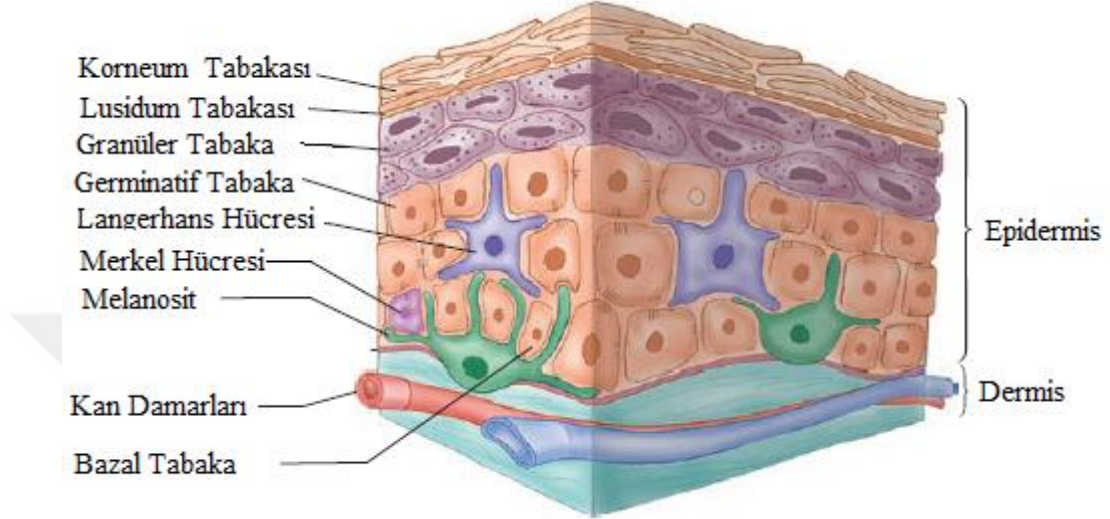
2.1. Derinin Embriyolojisi ve Histolojisi

Deri vücut yüzeyinde bulunan mikrobik enfeksiyonlara, çevresel etkenlere karşı fiziksel bariyer sağlayan ve su kaybını önleyerek homeostazı korumaya yardımcı olan çok katlı yapıya sahip kompleks bir dokudur [4, 8]. Epidermis ve dermis olmak üzere iki tabakadan meydana gelir [9]. Yüzeysel bir tabaka olan epidermis, ektodermden gelişir. Başlangıçta embriyo tek katmanlı ektodermal hücrelerle kaplıdır [10]. Epidermal spesifikasyon embriyonik dönemin 8,5. gününde meydana gelir ve sonraki keratinosit farklılaşması süreci, çeşitli keratin filamanlarının ekspresyonuyla karakterize edilir [8].

Keratinositler, epidermiste primer hücre türüdür ve epiderminin genel yapısının ve fonksiyonunun temel taşı oluştururlar, epidermal katmanlar, keratinositlerin derinden yüzeysel tabakaya doğru olgunlaşmasını temsil eder [11]. İkinci ayda yüzey ektodermi epitel yapısında iki tabaka ayırt edilmeye başlar [12]. Epitel bölünür ve yassılaştırmış hücrelerin bir tabakası olan periderm veya epitrikium yüzeye bırakılır [10]. Tek katlı yassı epitel hücrelerinden oluşan üst periderm tabakası ve altta bazal tabaka meydana gelir. Periderm hücreleri devamlı keratinize olarak amniyon sıvısına dökülür ve bazaldan yenilenir [12]. Bu yenilenme epiderminin bazal katmanlarındaki keratinositlerin hücre bölünmesi ve yüzey tabakaya göç etmesi şeklinde meydana gelen keratinizasyon sürecidir [9]. Dökülen hücreler fetal deriyi örten koruyucu tabaka verniks kaseosa oluşumuna katılır [12].

Epidermis beş katmandan meydana gelmiştir: bu katmanlar tabandan yüzeye doğru; bazal hücre tabakası (stratum bazale) veya germinativum, skuamöz hücre tabakası (stratum spinosum), granüler hücre tabakası (stratum granulosum), lüsidum tabakası (stratum lucidum) ve kornifiye tabaka (stratum corneum) (Şekil 2.1). Bazal hücre tabakası tek sıralı kolumnar hücre tabakasından oluşarak, epidermi dermisten ayıran bir taban olarak membrana bağlanmıştır [9]. Bazal tabaka hücreleri: epiderminin alttaki dermise bazal membrandan yapışmasını sağlar ve hücrelerin proliferasyonu gelişmekte olan dermise uzanan epidermal çıkıntılar oluşturur. Bu epidermal çıkıntılar parmaklar, avuç içleri ve ayak tabanlarında oluklar meydana getirerek parmak izinin oluşmasını sağlar [13, 14]. Skuamöz hücre tabakası yapısal destek sağlayan çok tabakalı

küboid hücrelerden meydana gelmiştir. Granüler hücre tabakası iki veya üç katlı mitotik olmayan düzleşmiş keratinositlerden meydana gelmiştir. Lusidum tabakası ölü cilt hücrelerinin ince bir tabakasıdır. Bu tabakadan sonra bulunan korneum tabaka ise tamamı ölü hücrelerden oluşur [9].



Şekil 2.1. Epidermal ve Dermal Tabakalaşma [15].

Epidermis beş tabakanın yanı sıra ek olarak melanositler, Langerhans hücreleri, Merkel hücrelerini de bulundurur [15]. Melanositler bazal tabakada yer alırlar. Temel işlevleri melanin pigmenti üretmektir. Melanin, hücre çekirdeğini UV (ultraviyole) ışınlarının (UVA (320-400 nm) UVB (280-320 nm)) neden olduğu hasarlara karşı korumaktadır. Langerhans hücreleri, skuamöz hücre tabakası ve granüler hücre tabakasındaki antijen sunan hücrelerdir. Merkel hücreleri bazal tabakada yer alır, basınç sensörleri ve sekresyon granülleri içerirler [9, 11, 16].

Derinin ikinci tabakası epiderminin altında yer alan dermis tabakasıdır. Dermis, yüzey ektoderminin altında bulunan mezodermden üretilen mezenşimden meydana gelmektedir. Dermis bağ dokusuna farklılaşan mezenşimin bir kısmı lateral mezodermin somatik yaprağından köken almaktadır, bir kısmı ise somitlerin dermatomlarından köken alır. 11. haftada mezenşimal hücreler kolajen ve elastik fibrilleri sentezlemeye, epidermal ve dermal çıkıntılar oluşmaya başlar. Dermal çıkıntılarda epidermis beslenmesini sağlamak üzere kapiller halkalar gelişirken, bir

kısımında ise duyu sinir sonlanmaları oluşur. Ekstremitelerin gelişimi ile birlikte spinal sinirlerin deri dağılımları gerçekleşir [14].

Dermis iki katmana ayrılmıştır: yüzeysel papillar dermis ve derin retiküler dermis [17]. Papiller dermis, dermal-epidermal birleşme noktasının altında bulunur ve fibroblast, tip I kolajen, mast hücreleri ve kan damarlarının bulunduğu gevşek bağ dokusundan oluşmuştur. Retiküler dermis, az miktarda fibroblast, kan damarları, yoğun miktarda tip I kolajenden oluşan bir bağ dokusu açısından meydana gelmiştir [9, 11]. Kalınlığı bölgelere göre değişiklik gösterir [9].

İnsan derisinin yedi önemli fonksiyonu vardır. Bariyer, duyu organı, nakliye yeri olarak işlev görür, bağışıklık fonksiyonu, termoregülasyon, UV radyasyona karşı koruma ve feromonların salgılanmasına katılır [9].

2.2. Skuamöz Hücreli Deri Kanseri

Skuamöz hücreli karsinom (SHK), en sık rastlanan ikinci deri kanseri türüdür. mukozal epitel ve adneksiyal yapıların epitelyumunu oluşturan keratin üretiminden sorumlu olan keratinositlerin malign neoplazmidir [9, 18].

Klinik görünümü genellikle sert, eritemli, keratotik bir papül veya plak şeklindedir. İlerlemiş formlarda akıntılı ve kötü kokulu pürülan bir sıvı toplanması oluşabilir. Sınır düzensizliği vardır ve büyüdükçe sertleşip kabarılaşabilir [19]. Farklı cilt tabakalarına, dermise ve organlara metastaz yapabilirler [20].

Çeşitli kanserler, kronik akciğer hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar, akut enfeksiyonlar, pnömoni ve bağışıklık sistemi bozukluğu gibi çeşitli diğer patolojik durumlarla da ilişkili olmasıyla yüksek ölüm oranı göstermektedir [21].

2.2.1. Skuamöz Hücreli Deri Kanseri Epidemiyolojisi

Skuamöz hücreli karsinom, melanom dışı deri kanserleri arasında görülme sıklığı ikinci sırada olan kanser türüdür [22, 23]. UV radyasyona maruz kalma sonucunda meydana gelen melanom dışı deri kanserlerinin %90'ının yaklaşık olarak %16'sını oluşturur [20]. Mayo Clinic tarafından yürütülen Rochester Epidemiyoloji Projesi verilerine göre 1976-1984 ve 2000-2010 yılları arasında SHK görülme

sıklığının %263 oranında arttığı görülmüştür [23]. SHK'nin tam doğrulukla görülme sıklığı bilinmemektedir, ancak yapılan popülasyon meta-analizine göre yalnızca Birleşik Devletlerde 2012 yılında beyaz bireylere 186.157 ila 419.543 arasında SHK tanısı konulduğu tahmin edilmektedir [22]. Avrupa verilerinde yaş standartlarına göre SHK görülme sıklığının 100.000 erkek nüfusunda 9 ila 96, 100.000 kadın nüfusunda ise 5 ila 68 arasında görülme sıklığı bildirilmiştir [2002-2007 tahminlerine göre) [23].

Birçok popülasyon bazlı yapılan çalışmalar, SHK'in patogeneğinde güneşe maruz kalma ve coğrafi enlemin rolünü desteklemektedir. SHK insidansı tropik bölgelerde ılıman iklimlere göre daha yüksektir ve Avustralya'da yıllık insidans 1:100'e yaklaşmaktadır [24].

2.2.2. Skuamoz Hücreli Deri Kanseri Etiyolojisi

SHK'nin gelişimi çoğunlukla multifaktöriyeldir, çevresel etki, mesleki faktörler ve genetik yatkınlık önemli rol oynar [24]. Çevresel ve genetik faktörler birlikte skuamöz kanser gelişimine katkıda bulunur [11]. Geçmişte çeşitli ilaçlarda kullanılan ve kuyu suyunda bulunan arsenik, bitki ve böcek ilaçlamada kullanılan kimyasal ilaçlar, kömür katranı ve zift gibi karbon bileşiklerinin yanması ve damıtılmasından elde edilen polisiklik aromatik hidrokarbonlar da SHK'ye neden olabilir [24].

Kişilerde yaş, cilt pigmentasyonu, immün durumun yanı sıra, UV bu kanser tipi gelişimi için birincil risk faktörüdür. Ayrıca kimyasal karsinojenler, öncül lezyonlar, kronik inflamasyon da SHK'nin etiyolojik risk faktörlerindedir [25, 26]. Solid organ nakli hastalarında SHK riskinin immün baskılayıcılara bağlı olarak 65 ila 250 katı kadar artabileceği gözlenmiştir. Bu durum, organ nakli hastalarının herhangi bir zaman içerisinde aldığı immün baskılayıcı ajanların oranına bağlı olarak değişmektedir [23].

2.2.3. Skuamöz Hücreli Deri Kanseri Patogenezi

Çoğu kanserde olduğu gibi, normal keratinositlerden SHK gelişimi de hücrel deoksiribonükleik asit (DNA)'deki mutasyonlar ile başlar. Bu mutasyonlar sonucunda keratinositler düzgün bir şekilde bölünmez, apoptozis ve bağışıklık ataklarına dirençli hale gelir [20]. Önemli risk oluşturan UV-B, genellikle DNA'da tamir mekanizmaları

ile tamir edilebilecek hasarlara yol açar, ancak bazı DNA hasarları tamir mekanizmalarından kaçır ve mutasyonlar üretir [11].

Ultraviyole radyasyon, p53 tümör baskılayıcı geninde spesifik mutasyonlar (timin dimerlerinin oluşumu) üretir. Pirimidin bölgelerindeki C-T değişimleri ve CC-TT çift-baz değişikliklerinin de dahil olduğu mutasyonlar, UV-B-hasarlı DNA dizilerinde en sık görülen nükleotid baz yer değiştirme biçimidir. Ultraviyole ışınımından sonra p53'te tek mutasyona sahip keratinositler apoptoza uğrar. Aksine, disfonksiyonel p53'e sahip keratinositler ve UV-B maruziyeti sonucunda ek bir p53 mutasyonuna uğrayan hücreler apoptoza giremez ve klonal olarak genişleme gösterirler, bu da anormal hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına, in situ skuamöz hücreli karsinom ve invaziv skuamöz hücreli karsinom gelişmesi olarak kendini gösterir. SHK için bildirilen diğer mutasyonlar *WNT*, *Ras*, *p16INK4*, *NF-κB* ve *c-Myc*'dir [27]. UV-A ise bağışıklık sistemindeki baskılayıcı T hücrelerinin mutasyona uğramış hücrelere saldırma kabiliyetini bozarak bu hücrelerin çoğalmasına neden olur [11].

2.3. Vitamin D ve Vitamin D Reseptörü

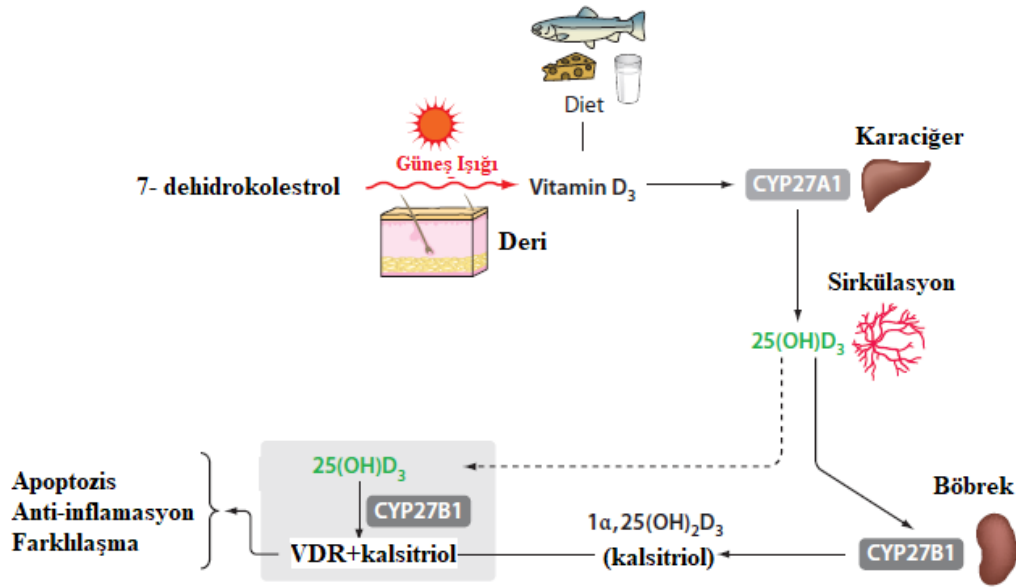
2.3.1. Vitamin D Kaynağı ve Sentezi

Vitamin D yağda eriyen vitaminler grubuna dahil olmasına rağmen farklı organlarca aktif formuna dönüştürülerek kan dolaşıma girmesi ve diğer dokular üzerinde etki göstermesi ve bu etkinin geri bildirim (feedback) mekanizmalarla düzenlenmesi nedeniyle steroid yapılı bir hormon olarak değerlendirilir [28]. Doğada iki ana formu bulunmaktadır; bunlar ergokalsiferol (vitamin D₂) ve kolekalsiferol (vitamin D₃)'dur. Vitamin D₂ bitkilerde fotokimyasal olarak sentezlenir veya süt ürünleri ile takviye edilmiş diyetle alınır. Vitamin D₃ ise güneş ışığına yanıt olarak hayvanların ve insanların derisinde, UV-B ışınları etkisiyle üretilir [29].

Vitamin D'nin biyolojik olarak aktif formu (1α,25 dihidroksivitamin D₃ (1,25 (OH)₂D₃), ciltte güneş etkisi ile (UV-B, 280-315 nm) 7-dehidrokolesterolden fotokimyasal olarak sentezlenir [30]. Güneş ışığının etkisiyle epidermiste bulunan öncü 7-dehidrokolesterol ultraviyole ışınların etkisiyle pre-vitamin D₃'e dönüştürülür. Previtamin D ilk olarak 25-hidroksilaz (CYP27A1) enzimiyle dolaşımdaki prohormon 25-hidroksivitamin D₃ (25(OH)D₃)'ü oluşturmak için karaciğerde hidroksile edilir [3,

29]. Pre-vitamin D₃ karaciğere kandaki D vitamini bağlama proteini (DBP) ile taşınır [31]. İkinci olarak ise 25-hidroksivitamin D₃ (25(OH)D₃) böbrekte 1 α -hidroksilaz enzimi (CYP27B1) ile hidroksile edilerek vitamin D'nin aktif formu olan 1- α -25-dihidroksi vitamin D₃ ((1,25(OH)₂D₃) (kalsitriol))'e dönüşür (Şekil 2.2) [28]. 1 α -hidroksilaz enziminin düzenlenmesinde parathormon (PTH), kalsiyum (Ca²⁺), fosfor ve fibroblast growth faktör 23 (FGF-23) rol oynamaktadır.

1,25(OH)₂D₃ biyolojik aktivitesini, ince barsak, böbrek ve diğer dokularda bulunan vitamin D reseptörleri üzerinden doğrudan olarak nükleer VDR üzerinden gen transkripsiyonunu, apoptozis, anjiyogenez, çoğalma, farklılaşma mekanizmalarını düzenleyerek (genomik etki) ya da daha kısa sürede etki gösteren hücre membranı üzerindeki VDR'ye bağlanarak gerçekleştirmektedir (genomik olmayan etki) [32]. Kalsiyum ve klor trans-membran geçişinin değişmesi veya hücre içi sinyal yollarının (cAMP, PKA, PLC, PI-3 kinaz ve MAP kinaz) aktive edilmesi ise genomik olmayan etki ile gerçekleşir [33].



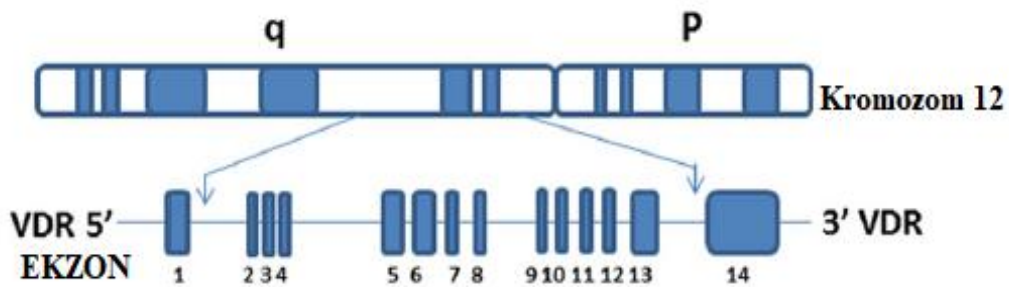
Şekil 2.2. Vitamin D sentezi [28].

2.3.2. Vitamin D Reseptörü

VDR ligandla aktive edilmiş transkripsiyon faktörlerinin steroid-tiroit-retinoid reseptör süper ailesinin bir üyesidir [34].

VDR proteini geni, kromozom 12'nin (12q13-14) uzun kolunda 60 kb DNA'yı kapsayan bir gendir (Şekil 2.3) [34].

İnsan VDR proteini, molekül ağırlığı 48 kDa olan 427 amino asitten oluşan bir peptittir [35]. VDR, DNA bağlanma bölgesi ve ligand bağlanma bölgesi olmak üzere iki önemli domainden oluşur. DNA bağlanma bölgesi iki karakteristik çinko parmak motifinden oluşur ve N-terminal çinko parmak vitamin D yanıt elementi (VDRE)'ne bağlanan DNA'nın özgülüğü için önemlidir. Diğer çinko parmak ise VDR ve retinoid X reseptörü (RXR) için heterodimerizasyon bölgesi sağlar. Ligand bağlanma bölgesi, 1,25(OH)₂D₃ (kalsitriol) bağlandığı alandır ve retinoid X reseptör heterodimerizasyonu için önemlidir [36].



Şekil 2.3. Vitamin D Reseptörü (VDR) geni [37].

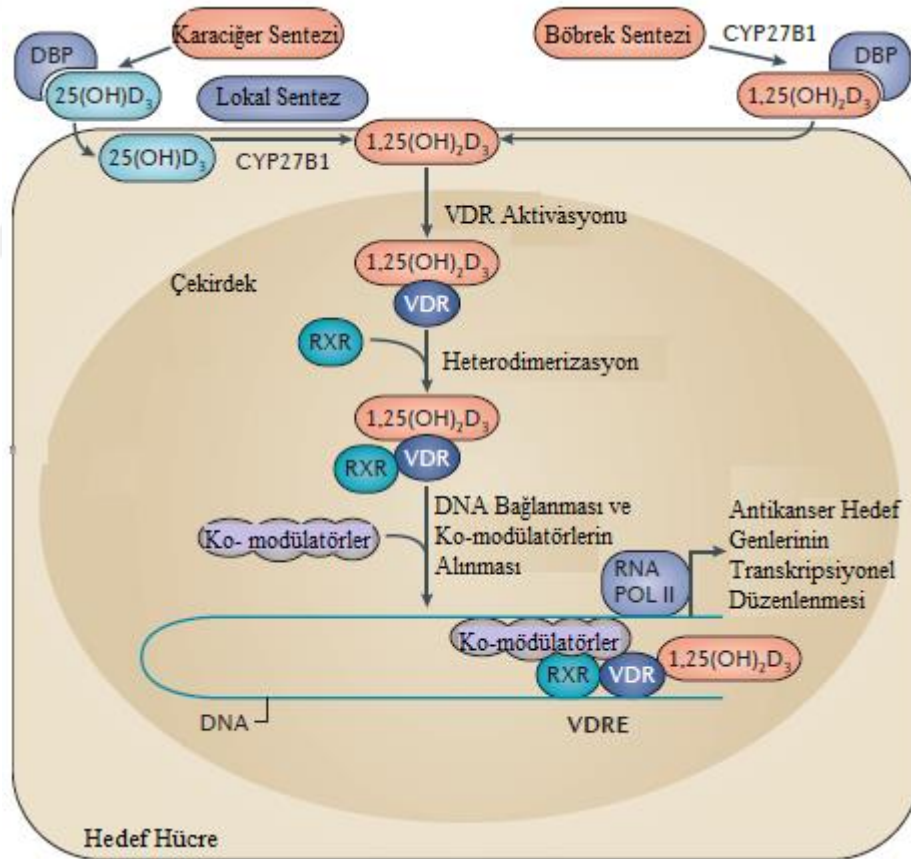
2.3.3. Vitamin D ve VDR'nin Kanserdeki Rolü

25-hidroksivitamin D₃ (25(OH)D₃) ve 1,25(OH)₂D₃, D vitamini bağlama proteinine (DBP) bağlanır. Serbest moleküller, DBP'ye bağlı moleküller ile denge halinde hedef hücrelere girerler; bu hücrelerin bazılarında, 25(OH)D₃ sitokrom P450 enzimi CYP27B1 tarafından bölgesel olarak kalsitriole dönüştürülür. 1,25(OH)₂D₃ VDR'ye bağlanır ve böylece RXR ile dimerizasyonuna ve çekirdeğe translokasyona neden olur. Ligand bağlı VDR-RXR kompleksi, hedef genlerin promotörlerinde veya distal bölgelerde yer alan çoklu düzenleyici bölgelerdeki VDRE'ye bağlanır ve ko-aktivatörlerin veya ko-represörlerin toplanmasına neden olur, böylece gen

ekspresyonunun pozitif veya negatif transkripsiyonel düzenlenmesi sağlanır (Şekil 2.4) [38].

D vitamini ve VDR, keratinositleri, ultraviyole (UV) kaynaklı cilt kanserine karşı epidermal hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını düzenleyerek ve UV kaynaklı DNA hasarlarının önleyerek korur [39].

Gen dizileme çalışmaları, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün DNA tamir genlerinin ekspresyonunu upregüle ettiğini ve $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün DNA onarım yollarında rol oynayabileceğini göstermiştir. Bu çalışmalarda $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün DNA onarım genleri *RAD50* (*Double Strand Break Repair Protein*) ve *ATM* (*ataksi telenjipektazi*) ekspresyonunu arttırdıklarını ve her ikisinin DNA hasarına karşı sinyalleme yanıtlarına aracılık etmek için kritik oldukları bilinmektedir [35].



Şekil 2.4. VDR ve antineoplastik etkileri yoluyla kalsitriolün genomik mekanizması [38].

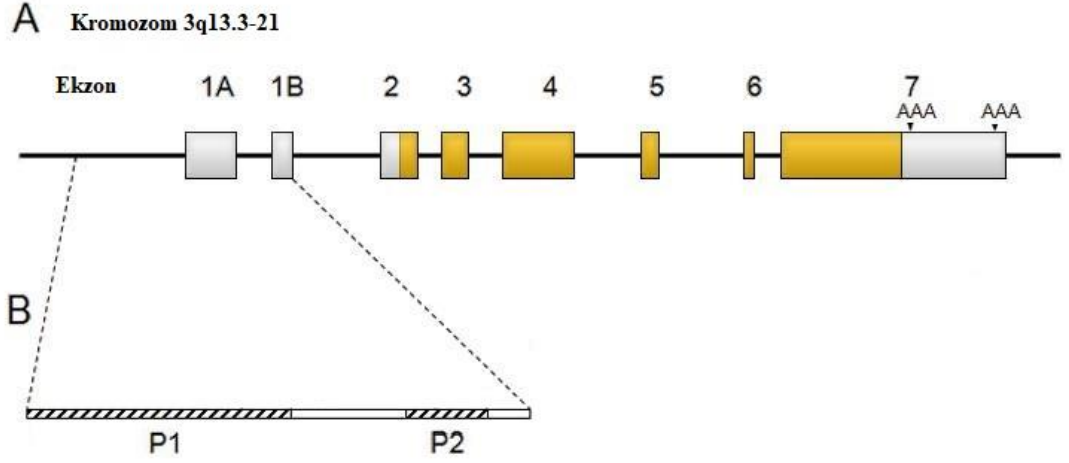
VDR'nin silinmesi, kimyasal maddeler tarafından ya da UV'den kaynaklı olarak indüklenmiş olsa da tümör oluşumuna duyarlılığın artmasına neden olmaktadır [3]. 1,25(OH)₂D₃'nin tümör gelişimini baskılayabileceği mekanizmalar farklı ve çoğu zaman hücreye spesifiktir. Bunlar, hücre döngüsünün elemanlarını bloke edilmesi veya büyüme faktörleri tarafından sinyal iletimi, apoptozun indüklenmesi, DNA hasar onarımının uyarılması, tümör anjiyogenezinin önlenmesi ve metastazın inhibisyonu yoluyla proliferasyonun inhibisyonunu, kanser gelişimini destekleyen kronik inflamasyonun etkisinin azaltılması gibi farklı yollarla gerçekleşebilir [3, 38, 40].

2.4. Kalsiyuma Duyarlı Reseptör (CaSR)

İlk kez Brown ve arkadaşları tarafından sığır paratiroid bezinden izolen edilen kalsiyuma duyarlı reseptör (CaSR)'ün tiroid C-hücreleri, böbrek hücreleri, gastrointestinal yol, iskelet, beyin, hipofiz, deri, lens epitelyumu, meme duktal epitelyumu, vasküler düz kas hücreleri, endotelium ve kardiyomiyositler gibi pek çok doku ve hücrede eksprese edildiği belirlenmiştir. Amino asit sıralanışı benzerliğine dayanılarak CaSR proteini, G Proteine Bağlı Reseptör (GPCR) süper ailesinin, C ailesindeki II. grup reseptörlerinin bir üyesi olarak sınıflandırılmıştır [41].

İnsan *CaSR* geni kromozom 3q13.3-21 üzerinde bulunur ve yaklaşık 103 kb'lık sekiz ekzondan (ekzon 1A ve 1B, ekzon 2-7) oluşur. Sekiz ekzondan altısı [2-7] 1078 amino asitlik CaSR proteinini kodlar. Promotör P1 ve P2, ekzon1A ve 1B'nin transkripsiyonunu gerçekleştirir, 5'- UTR'nin ortak kısmını kodlayan ekzon 2'ye ek olarak alternatif 5'- UTR'leri kodlar (Şekil 2.5). CaSR proteini ekzon 2 ve 7'nin bir kısmından 3,4,5,6. ekzonun tamamından transkribe edilir [42].

İnsan CaSR proteini yaklaşık olarak 120 kDa molekül ağırlığında 4 domainden ve 1078 amino asitten oluşmaktadır [43]. Bu dört domain, büyük ekstraselüler N-terminal domain, ekstraselüler domaini ilk transmembran sarmalına bağlayan sistince zengin domain, yaklaşık 250 rezidüden oluşan transmembran domain, 200 amino asitten meydana gelmiş sitosolik karboksil terminal domainidir [6].



Şekil 2.5. Kalsiyum duyarlı reseptör (CaSR) gen yapısı (A), promotör yeri (B) *AAA: Poliadenilasyon bölgeleri [42].

CaSR farklılaşmayı başlatan ve proliferasyonu durduran moleküler bir anahtar olarak işlev görür. Epidermal keratinositler düşük seviyede (< 0.07 mM) hücre dışı Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_o$) ile kültüre edildiğinde hızla çoğalırlar ve bazal hücrelerin fenotipini yansıtırlar. Artan $[Ca^{2+}]_o$ miktarı, hücre proliferasyonunu inhibe eder ve keratinosit farklılaşmasını teşvik eder. $[Ca^{2+}]_o$ 'un 0.1 mM üzerine yükselmesi, hücre tabakalarında katmanlaşma ve boynuzlaşmayla birlikte desmozom oluşumu ve hücre bağlantılarının olduğu hücre farklılaşmasını teşvik eder. $[Ca^{2+}]_o$ keratinosit farklılaşmasını başlatmak için ve epidermal fonksiyonun korunması için gereklidir. $[Ca^{2+}]_o$ artışı, intraselüler kalsiyum $[Ca^{2+}]_i$ seviyesinin artmasını tetikler ve hücre-hücre adezyonunu indükler. Keratinositlerde $[Ca^{2+}]_i$ yanıtı paratiroid hücrelerinininkine benzer şekildedir, bu yanıt CaSR aracılığıyla gerçekleşir. CaSR'nin inaktivasyonu kalsiyum bağımlı hücre farklılaşmasını bloke eder [44]. Ayrıca CaSR barsakta Ca^{+2} absorpsiyonu, böbrekler tarafından Ca^{+2} atılması ve kemikten Ca^{+2} salınımı arasındaki dengeyi sağlayarak kalsiyum homeostazını ve ekstrasüller Ca^{+2} konsantrasyonuna bağlı olarak Paratiroid Hormon (PTH) ekspresyonunu düzenler, Ca^{+2} seviyeleri serumda yüksek olduğunda reseptör aktive olur ve PTH sentezi ve salgılanmasında azalmaya neden olur. Ca^{+2} seviyesinin serumda düşük olduğu durumlarda CaSR inaktive olur ve PTH salınımı gerçekleşir [43]. Kalsiyum homeostasisindeki merkezi rolü dışında CaSR, hormon salgısı, proliferasyon kontrolü, farklılaşma, apoptoz ve kemotaksis gibi hücre kaderini düzenleyen süreçlere aracılık eder [6].

Kalsiyumun alımının artması bazı kanserlerin riskini azaltır. CaSR'nin kalsiyumun anti-tümörojenik etkilerinin merkezi mediatörlerinden biri olduğuna dair bazı kanıtlar vardır. CaSR, kanser türüne bağlı olarak hem onkojen hem de tümör süpresör geni olarak işlev gören bir yin yang modunda işlev görür. Kanserde CaSR çoğalmayı, farklılaşmayı, hücre ölümünü, anjiyogenezi ve hücre göçünü düzenler [6].

CaSR prostat, testiküler, yumurtalık ve göğüs kanseri gibi çeşitli kanserlerde, çoğunlukla proliferasyonu teşvik ederek ve apoptozu inhibe ederek bir onkogen gibi davranır [43].

2.5. β -katenin

β -katenin (CTNNB1), 3. kromozomun p22.1 bölgesinde yer alan, DNA'nın 23.2 kb'lık bir bölgesini kaplayan ve 16 ekzondan oluşan bir gen tarafından eksprese edilir. N-terminal bölge, Armadillo tekrar bölgesi ve C terminal bölgesi olmak üzere temel olarak üç bölgeden oluşur [45]. β -katenin birincil yapısı, 150 amino asitlik bir N-terminal bölgeden oluşmaktadır devamında armadillo tekrar alanı ve yaklaşık 100 amino asitlik bir C-terminal bölgesi bulunmaktadır [46]. N-terminal bölge fosforilasyon bölgelerini içerirken, C- terminal bölgesi hedef genlerin aktivasyonu için gerekli transaktivasyon bölgesini içermektedir [47].

β -katenin, hücre adezyon sisteminin yapısal bir bileşeni olarak işlev gören, epitel hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen çok fonksiyonlu bir proteindir. Hücre büyümesini ve hücreler arasındaki yapışmayı düzenleyerek epitel stabilitesinin korunmasında önemli bir role sahiptir [48, 49]. Embriyonik gelişim sırasında morfogenetik olayları ve hücre kaderini kontrol eden Wnt sinyal yolağının downstream efektörüdür [46, 50].

β -katenin Wnt yolağı tarafından aktive edildiğinde hücre adezyonuna ve gen transkripsiyonuna ilişkin iki fonksiyona sahiptir. Fonksiyonel olmayan β -katenin seviyeleri Wnt büyüme faktörü stimülasyonunun varlığı veya yokluğu ile belirlenir. Wnt sinyalinin yokluğunda β -kateninin fosforillenmesinden sorumlu, aksin ve adenomatöz polipozis koli (APC) proteini içeren bir multiprotein kompleksi tarafından bozular. Aksin-APC multiprotein kompleksine β - kazein kinaz 1 (CK1) ve glikojen sentazkinaz-3 (GSK-3)'de eklenerek β -katenin fosforile edilir. Wnt sinyalinin

varlığında ise multiprotein kompleks tarafından gerçekleştirilen β -katenin fosforilasyonu inhibe edilir. Korunmuş β -katenin hücre çekirdeğine translokasyon yaparak T hücre faktörü/lenfoid arttırıcı faktör (Tcf / Lef) transkripsiyon faktörlerine bağlanır. β -katenin-Tcf kompleksi, transkripsiyon faktörlerini toplayarak Wnt hedef genlerini aktive eden bir kompleksin oluşmasını sağlar [46].

β -katenin'in ekspresyonundaki değişiklikler, birtakım farklı kanserlerde farklılaşma kaybı, daha agresif fenotip, tümör invazyonunun artması ve kötü prognoz ile ilişkilidir [50]. Wnt/ β -katenin protein aktivasyonu ve β -katenin mutasyonları tümör gelişimi ve kanser hücrelerinin göçü ya da metastaz ile ilişkilendirilen en yaygın değişikliklerdir. β -katenin düzenlemesinin kaybı aşırı nükleer birikim ve hedef genlerin uyarılması ile sonuçlanır. [51].

Wnt/ β -katenin protein aktivasyonu ve β -katenin mutasyonları tümör gelişimi ve kanser hücrelerinin göçü ya da metastaz ile ilişkilendirilen en yaygın değişikliklerdir. β -katenin düzenlemesinin kaybı aşırı nükleer birikim ve hedef genlerin uyarılması ile sonuçlanır [51].

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Dokuların Elde Edilmesi

Hasta Grubu: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Dermatoloji Anabilim Dalı'na başvuran skuamoz hücreli deri kanseri tanısı almış 4 hasta birey çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalığın tanısı için deri dokusundan 6 mm kalınlığında punch biyopsi ile alınan örneklerden deri materyali temin edilmiştir.

Kontrol Grubu: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'na meme estetiği için başvuran sağlıklı kişilerin ameliyat materyallerinden deri dokusu elde edilmiştir.

Hasta ve kontrol grubundaki kişilerden gönüllü onam formu izni alınmıştır. Histomorfolojik değerlendirmeler, immunohistokimya, immonu-florasans yöntemlerin uygulaması için örneklerin bir kısmı %10'luk nötral formaline alınmıştır. Western blot yönteminin uygulanabilmesi için de bir kısmı -80°C'de stoklanmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Parafine Gömme ve Kesit Alma

%10'luk formalin solüsyonunda tespit edilen örnekler artan alkol serilerinden (%50, %60, %70, %80, %90 ve %96) geçirilerek dehidrate edildi ve ksilen ile şeffaflaştırılarak parafinden geçirilerek bloklar elde edildi. Tüm örnekler için hazırlanan parafin bloklardan mikrotom (Thermo Scientific, USA, Microm HM-325) kullanılarak polilizinli lamlara 3,5 µm kalınlığında kesitler alınarak preparatlar hazırlandı.

3.2.2. Histomorfolojik Değerlendirme

Örneklere ait hazırlanan kesitler standart histolojik yöntemler kullanılarak ksilol ile deparafinize edildi ve azalan alkol serilerinden (%100, %96, %80, %70) geçilerek rehidrate edildi. Dokulardaki genel histomorfolojik yapıyı görmek için

kesitler hematoksilen-eozin ile boyanarak lam kapatıcı (Entellan®) ile kapatılıp ışık mikroskobu (Olympus BX43) ile incelendi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Hemotoksilen-eozin Boyama Prosedürü.

İŞLEMLER	SÜRE
İnkübasyon (60°C)	1 gece
Ksilen	30 dk.
Ksilen	30 dk.
%95 alkol	2 dk.
%80 alkol	2 dk.
%70 alkol	2 dk.
%60 alkol	2 dk.
Akar su	5 dk.
Hematoksilen	5 dk.
Akar su	5 dk.
Asit alkol	2-3 sn.
Eosin	1 dk.
Akar su	5 dk.
%80 alkol	1 dk.
%96 alkol	1 dk.
Ksilen çıkış	1 sa.
Entellan	

3.2.3. İmmunohistokimyasal Yöntem

3.2.3.1. Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması

- **%3'lük Hidrojen Peroksit (H₂O₂)**
 - 7 ml (H₂O₂)
 - 63 ml metanol
- **Fosfat Tampon Tuzu (PBS)**
 - 8 gr NaCl (Sodyum Klorür)
 - 0,2 gr KCl (Potasyum Klorür)
 - 1,44 gr Na₂HPO₄ (Disodyum Fosfat)
 - 0,24 gr KH₂PO₄ (Mono Potasyum Fosfat)
 - 1000 ml bidistile su
 - pH: 7.4
- **Sitrat Tamponu**
 - 10 ml Sitrat tampon

- 90 ml distile su
- 50 µl Tween 20
- pH: 6.00

3.2.3.2. İmmunohistokimyasal Yöntem Uygulaması

Deney ve kontrol grubuna ait hazırlanan preparatlar 1 saat ksilolde bekletildikten sonra absölü alkolde 2 kez 15’şer dakika, azalan alkol serilerinde (%96, %80, %75) 12’şer dakika bekletilerek rehidratasyon işlemi gerçekleştirildi ve distile su ile iki kez 3’er dakika yıkandı. Kesitler endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için %3’lük hidrojen peroksit (H₂O₂) solüsyonu ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Fosfat tampon tuzu (PBS) ile 2 kez 5’şer dakika yıkama yapıldı. Dokuların fiksasyonu sırasında formalinin proteinler arasında oluşturduğu çapraz bağların kırılmasını sağlamak için 30 dakika 96°C’de sitrat buffer uygulandı. PBS ile 3 kez 5’er dakika yıkanan kesitlere antijenik alanların dışında kalan bölgelerin kapatılmasını sağlamak için oda sıcaklığında 30 dakika blocking solüsyonu (EMD Millipore Corporation IHC Select® Blocking Reagent Lot: 2838287) uygulandı. Bu aşamadan sonra PBS ile 3 kez 5’er dakika yıkama yapıldı. Kesitler avidin (Vector Labs, USA, Cat# SP-2001) ile 20 dakika inkübe edilerek PBS ile 5 dk. yıkandı. Biotin (Vector Labs, USA, Cat# SP-2001) ile 20 dakika inkübe edilerek PBS ile 5 dakika yıkandı. Kesitlere primer antikorlar (Tablo 3.2) uygulandı ve +4°C’de 1 gece inkübe edildi.

Tablo 3.2. İmmunohistokimyasal Yöntemde Kullanılan Primer Antikorlar

Primer antikor	Tip; Klon	Dilüsyon Oranı	Antijen açığa çıkarma işlemi	Katalog Numarası
β- katenin	Anti-β-katenin, Fare Monoklonal [12F7]	1:100	Sitrat Tampon (pH: 6.0) Sıcak Su Banyosu 30"	Abcam (ab22656)
VDR	Anti Vitamin D Reseptör, Fare Monoklonal [D-6]	1:100	Sitrat Tampon (pH: 6.0) Sıcak Su Banyosu 30"	Santa Cruz (sc-13133)
CaSR	Anti-Kalsiyuma Duyarlı Reseptör, Fare monoklonal [5C10, ADD]	1:100	Sitrat Tampon (pH: 6.0) Sıcak Su Banyosu 30"	Abcam (ab19347)

İnkübasyondan sonra kesitlere PBS ile 5 dakika yıkama yapıldı ve sekonder antikor olarak Biotinli Chicken Anti-Mouse IgG H&L (Abcam, USA, Cat# ab6813) PBS ile 1:200 oranında seyreltilerek 1 saat 45 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

PBS ile yıkama işlemi tekrarlanarak 1:200 oranında PBS ile seyreltilerek hazırlanan HRP-streptavidin (Vector Labs, USA, Cat# SA-5004) ile 1 saat 30 dakika muamele edilen kesitler yıkama işleminin ardından immün reaktivitelerin görünür hale getirilmesi için diaminobenzidin solüsyonu (DAB) ile 2 dakika boyandı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. VDR, CaSR, β -katenin İmmünohistokimya Protokolü.

MADDE	SÜRE
Ksilol	60dk.
Absolu	2 x 15 dk.
%96 alkol	12 dk.
%80 alkol	12 dk.
%75 alkol	12 dk.
Distile su	2 x 3 dk.
Hidrojen peroksit	15 dk.
PBS	5 dk.
Sitrat Tampon	30 dk.
Soğutma	20 dk.
PBS	3 x 5 dk.
IHC Blocking solüsyonu	30 dk.
PBS	3 x 5 dk.
Avidin	20 dk.
PBS	5 dk.
Biyotin	20 dk.
PBS	5 dk.
VDR, CaSR, β -katenin	1 gece, +4°C'de
PBS	5 dk.
Sekonder antikor	1 saat 30 dk.
PBS	5 dk.
Peroksidaz (HRP)	1 saat 30 dk.
PBS	5 dk.
DAB	5 dk.
Distile su	3 x 5 dk.
Harris H&E	4 dk.
Absolü alkol	5 dk.
Ksilen	10 dk.
Entellan	

Distile su ile 3 kez 5'şer dakika yıkama yapıldı. Karşıt boyama olarak Harris hematoksilen eozin (Facepath, Cat#0231) ile 4 dakika boyandı ve çeşme suyu ile 2'şer kez 5 dakika yıkama yapıldı. Absolu alkolde 5 dakika bekletilerek sonraki aşamada ksilende 10 dakika bekletildi. Uygun lam kapatıcı (Entellan®) kullanarak preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus BX43) incelendi (Tablo 3.3).

3.2.4. Doku Homojenizasyonu ve Protein Miktarı Tayini

3.2.4.1. Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması

Fenilmetilsulfonil Florid (PMSF)

- 0,01 gr PMSF (Sigma, USA)
- 1 ml izopropanol

3.2.4.2. Doku Homojenizasyonu

Kontrol ve hasta grubuna ait dokular tartılarak ağırlıkları belirlendi. Her bir doku için 3ml/gr olacak şekilde RIPA tamponu (Sigma-Aldrich Cat # R0278) eklendi. Boncuklu homojenizatör (Mini Bead Beater-16, Biospec, USA) ile homojenize edildi. Homojenizasyon sonrasında proteolitik enzimlerin bloke edilmesini sağlamak için her bir gram dokuya 30 µl olacak şekilde 10mg/ml fenilmetilsulfonil florid (PMSF) (Sigma, USA) ve 30 µl proteaz inhibitör kokteyli (Sigma, Cat # 8340) eklenerek buz içerisinde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüpler 8.000 g' de +4°C'de 20 dakika santrifüj edildi. Tüplerde pellet ve süpernatant olarak iki farklı faz meydana geldi. Süpernatantlar mikropipet yardımıyla farklı bir ependorfa alınarak ikinci kez aynı hız ve sıcaklıkta 20 dakika santrifüj edilerek oluşan süpernatant 15 µl'lik hacimlerde alikotlanarak -80°C de saklandı.

3.2.4.3. Protein Miktar Tayini

Dokulardan elde edilen, -80°C'de saklanan doku lizatlarının total protein konsantrasyonunu belirlemek için bikinkoninik (BCA) asit yöntemi kullanıldı. Bu yöntem alkali çözeltideki proteinlerin biüre reaktifi ile Cu^{+2} 'den Cu^{+1} 'e indirgenmesi ve daha sonra Cu^{+1} 'in BCA ile verdiği renkli kompleksin 562 nm'deki spektrofotometrik ölçümüne dayanır. BCA kiti (Thermo Scientific, USA, Cat#23225) içerisinde yer al 2mg/ml konsantrasyona sahip dana serumu albümini (BSA) ile RIPA kullanılarak konsantrasyonları bilinen dokuz adet (0, 25, 125, 250, 500, 1000, 1500,

2000 µg/ml konsantrasyonda) standart çözelti hazırlandı. Standart çözeltiler ve doku lizatları 1:20 oranında çalışma çözeltisi ile seyreltildi. 37 °C'deki etüvde 30 dakika inkübe edilerek BCA reaksiyonu gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda standart çözeltiler ve doku lizatları Nanodrop® 2000c (Thermo Scientific) spektrofotometre'de 562 nm dalga boyunda 3 kez tekrar edilerek ölçüldü. Standart çözelti ölçümlerinden elde edilen standart eğri kullanılarak lizatların absorban değerleri konsantrasyona dönüştürüldü (Tablo 3.5).

Tablo 3.4. Lizatların Konsantrasyon ve Seyreltme Miktarları.

Grup	Konsantrasyon (µg/µl)	Örnek (µl)	RIPA (µl)	Örnek Tampon (µl)
Kontrol 1	2,00	5,80	9,20	15
Kontrol 2	1,10	10,50	4,50	15
Kontrol 3	1,50	7,70	7,30	15
Kontrol 4	2,50	4,62	10,40	15
SHK 1	2,70	4,30	10,70	15
SHK 2	2,50	4,62	10,40	15
SHK 3	0,77	15	-	15
SHK 4	2,70	4,30	10,70	15

*SHK: Skuamöz Hücreli Karsinom

3.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)

3.2.5.1. Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması

- **%10 SDS Tamponu**

- 10 gr Sodyum dodesil sülfat (Fluka, USA)
- 100 ml distile su ile çözdürülür.

- **0.5 M Tris-HCl**

- 6 gr Tris Base (Sigma, USA)
- 60 ml Distile su
- 6N HCl ile pH: 6.8 olacak şekilde ayarlanarak, 100 ml'ye tamamlanır.

+4 °C'de saklanır.

- **1.5 M Tris HCl**

- 27.23 gr Tris Base (Sigma, USA)
- 80 ml Distile su

- 6N HCl ile pH'sı 8.8 olacak şekilde ayarlanarak, distile su ile hacmi 150 ml'ye tamamlanır ve +4°C'de saklanır.

- **%30 Akrilamid/ Bis**

- 29.2 gr akrilamid (Sigma, USA)
- 0.8 gr N N'bis-metilen-akrilamid (Sigma, USA)
- 100 ml distile su

Karışım filtre edilerek +4°C de karanlıkta saklandı.

- **Örnek Tampon Bileşimi**

- 3.55 ml Bidistile su
- 1.25 ml 0.5 M Tris HCl, pH:6.8
- 2.5 ml Gliserol (Riedel De Haen, USA)
- 2.0 ml %10 SDS
- 0.2 ml %0,5 Bromfenol blue (Sigma, USA)

Kullanmadan önce 950 µl örnek tampona 50 µl β-merkaptotanol (Sigma, USA) eklenerek, örnekler 1:2 oranında örnek tamponu ile dilüe edilip 99.9 °C' deki sıcak su banyosunda 10 dakika ısıtılır.

- **10X Elektrod (Running) Tamponu**

- 30.3 gr Tris base (Sigma, USA)
- 144.0 gr glisin (Sigma,USA)
- 10 gr sodyum dodesil sülfat (Fluka, USA)
- 1000 ml Bidistile su ile çözülerek +4 °C de saklanır.

Kullanmadan önce 50ml 10X elektrod stok solüsyon 450 ml distile su ile dilüe edilir.

- **Coomassie Brilliant Blue G**

- 50ml metanol (Merck, Germany)
- 10 ml asetik asit
- 40 ml distile su
- 0,1 gr Coomassie Brilliant blue (Sigma, USA)

3.2.5.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) Yönteminin Uygulanması

SDS-PAGE yöntemi proteinlerin saflığının, molekül ağırlıklarının saptanması ve konsantrasyon çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır.

SDS denatüre olmuş proteinleri yüksek miktarda negatif yükle yükler. Bu yük normalde proteinler üzerinde bulunan yükleri maskeler ve proteinler jel üzerinde yüklerine göre değil molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar. Protein alt üniteleri disulfat bağları bir arada tutulduğundan, bu bağlar elektroforezden önce beta-merkaptetanol ve ısı aracılığı ile kırılır.

SDS-PAGE yöntemi, Mini-Protean III elektroforez sistemi (Bio-Rad Labs, USA, Cat#165-3301) ile Laemmli yöntemi kullanılarak yapıldı [52]. Proteinleri yürütme işlemi için alt (resolving-separating) jel %12, üst (stacking) jel %4 oranında olacak şekilde hazırlandı (Tablo 3.6). Alt jel kasete dökülmeden önce taze hazırlanmış 50 µl % 10 Amonyum Persülfat (APS) (Sigma, USA) ve 5 µl *N,N,N',N'*-Tetrametiletilendiamin (TEMED) (Fluka, USA) eklenerek kasete [10.1 cm (G) x 7,3 cm (Y)] döküldü. Alt jel polimerize olması için 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Üst jel hazırlanarak kasete dökülmeden önce 50 µl APS ve 10 µl TEMED eklenerek donan üst jelin üzerine döküldü ve 1 mm'lik tarak ile oda sıcaklığında jelleşmeye bırakıldı. İlk kuyuya protein marker (Thermo Scientific, USA, Cat# 10747012) eklenerek sonraki her bir kuyuya ise daha önce konsantrasyonu belirlenmiş ve gerekli dilüsyonları yapılmış örnekler, örnek tampon ile 1:2 oranında dilüe edilerek 99.9°C'lik sıcak su banyosunda 10 dakika kaynatıldıktan sonra 20 µl hacimlerde konuldu. Bu işlemin ardından jel, içinde %10 (hacim/hacim) elektrod (running) tampon bulunan yürütme tankına alınarak 90 V – 15 mA'da 2 saat 15 dakika yürütüldü.

Tablo 3.5. Hazırlanan Jellerin Bileşimleri.

Kimyasallar	Alt (Resolving) Jel (%12)	Üst (Stacking) Jel (%4)
%30 Akrilamid/Bis	4.0 ml	1.3ml
Alt Jel Buffer	2.5 ml	-
Üst Jel Buffer	-	2.5 ml
Distile Su	3.4 ml	6.1 ml
%10 SDS	100 µl	100 µl

3.2.6. Western Blot (WB) Yöntemi

3.2.6.1. Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması

- **Tris Tampon Tuzu Çözeltisi**
 - 6.05 gr Tris (Sigma, USA)
 - 8.76 gr NaCl (Merck, Germany)
 - 1000 ml Bidistile su
 - 6N HCl ile pH: 7.5 olacak şekilde ayarlanır.
- **Tris Tampon Tuzu - Tween (TBST)**
 - 6.05 gr Tris
 - 8.76 gr NaCl
 - 1000 ml Bidistile su
 - 1 ml Tween 20 (Thermo Scientific, USA)
 - 6N HCl ile pH: 7.5 olacak şekilde ayarlanır.
- **1X Kazein solüsyonu (Kapatma Solüsyonu)**
 - 1 ml 10X Kazein Solüsyonu (Vector Lab, Cat# sp-5020)
 - 9 ml Distile Su
- **Transfer Tamponu**
 - 3.03 gr 25 mM Tris (Sigma, USA)
 - 14.4 gr 192 mM Glisin (Sigma, USA)
 - 200 ml %20 metanol (Merck, USA)
 - Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

3.2.6.2. Western Blot Yöntemi

Jel elektroforezi sonunda jel 30 dakika transfer tamponunda bekletilerek eşitlendi. 0.2 µm'lik poliviniliden diflorid (PVDF) membranlara (Immun-Blot®, Bio-Rad Labs, USA, Cat# 1620174) blotting ünitesi (Mini Trans-Blot Elektrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Labs, USA, Cat # 170-3930) kullanılarak 100 V 350 mA'de 2 saat transfer gerçekleştirildi.

Transfer işleminden sonra tris tampon tuz-tween 20 (TBST) ile dilüe edilmiş 1X kazein solüsyonunda 30 dakika oda sıcaklığında bloklandı. Bloklama işleminin

ardından 3 kez 10'ar dakika TBST ile yıkama yapıldı. 1:1000 oranında TBST ile dilüe edilen primer antikor (Tablo 3.7) ile +4 °C'de gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından TBST ile 3 kez 10'ar dk yıkama yapıldı. TBST ile 1:1000 oranında dilüe edilen Chicken Anti-Mouse IgG H&L (Biotin) (Abcam, USA, Cat# ab6813) sekonder antikor uygulanarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. TBST ile 3 kez 10'ar dakika yıkandı ve ardından membranlar 1:500 oranında TBST ile dilüe edilen streptavidin peroksidaz (Vector, Cat # SA-5004) ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. TBST ile 2 kez 10'ar dakika yıkandı. DAB substrat (Roche Applied Science, Cat # 11718096001) ile 15 dakika inkübe edilerek gerçekleşen reaksiyonlar görünür hale getirildi. Oluşan bantlar gözlemlendikten sonra saf su ile reaksiyon durduruldu ve membranlar tarayıcı ile tarandı.

Tablo 3.6. İmmunoblotting Yönteminde Kullanılan Primer Antikorlar.

Primer antikor	Tip; Klon	Dilüsyon Oranı	Firma
β- katenin	Anti-β-katenin, Fare Monoklonal [12F7]	1:1000	Abcam (ab22656)
VDR	Anti Vitamin D Reseptör, Fare Monoklonal [D-6]	1:1000	Santa Cruz (sc-13133)
CaSR	Anti-Kalsiyuma Duyarlı Reseptör, Fare Monoklonal [5C10, ADD]	1:1000	Abcam (ab19347)

3.2.7. İstatistiksel Analiz

İmmunohistokimya yöntemi ile boyaması yapılan, kontrol ve hasta grupları arasında protein ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel fark olup olmadığını belirlemek amacıyla ImageJ programı (versiyon 1.46c, NIH, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) kullanılarak kantitatif verilere dönüştürüldü. Kontrol ve hasta grubuna ait aynı ölçekteki ışık mikroskobu görüntüleri ImageJ programına aktarıldı. Araç çubuğunda yer alan “Plugins” sekmesi açılarak “IHC Profiler” seçilir.

Açılan pencereden “Select Model” Sekmesinden “H-DAB” seçilir. Bu adımdan sonra “color” sekmesi seçilerek DAB ile boyanmamış bölgelerin elemine edildiği yeni bir görüntü açılır. Siyah-beyaz formu elde edilen görüntü için araç çubuğundan “Analyze> Set> Measurements” seçildikten sonra “Area, Min&Max Gray Value, Mean Gray Value, Area Fraction” seçilerek gruplara ait analiz sonuçları elde edilir.

ImageJ programı ile elde edilen sayısal veriler Statistical Package for Social Science (SPSS) programına aktarılarak Bağımsız Örneklem T-test ve Tek Yönlü ANOVA Tukey Post-Hoc analizleri yapılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı değer $p<0.05$ 'dir.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

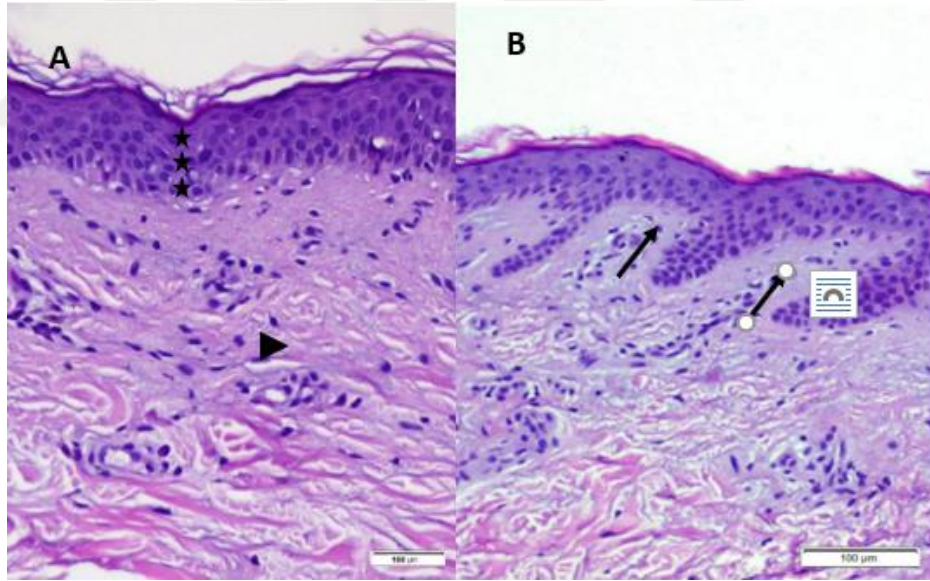
4.1. Araştırma Bulguları

4.1.1. Histomorfolojik Bulgular

Kontrol Grubu Bulguları

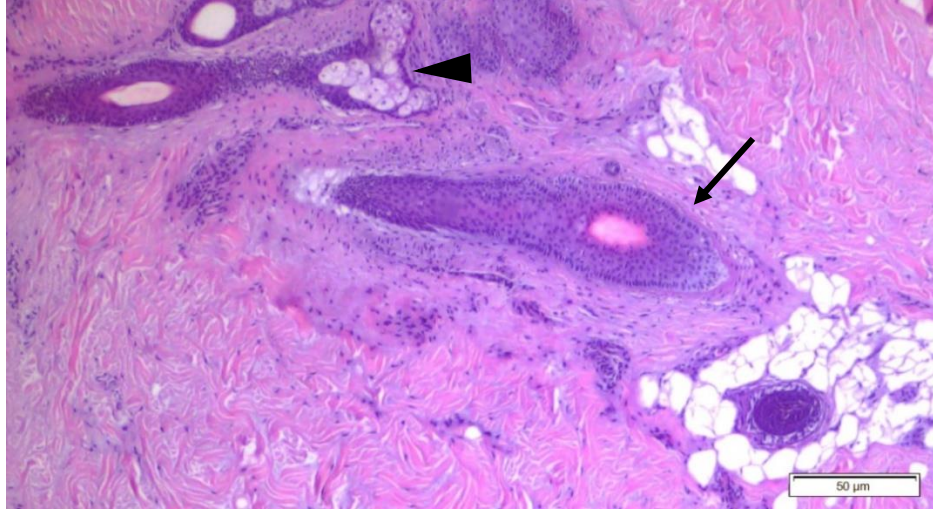
Hematoksilen eozin (HE) boyama yapılan kontrol grubuna ait örneklerde epidermis tabakalaşması düzenlidir. Bazal hücre tabaka tek sıralı ve küboid hücrelerden meydana gelmiştir. Bu hücreler koyu boyanmış ve oval nükleuslara sahiptir (Şekil 4.1A).

Dermis tabakası epidermis tabakasına göre daha kalındır. Papillar dermis ve retiküler dermis olarak iki tabakalaşma meydana gelmiştir. Papiller dermis, dermal-epidermal bağlantının altında yer almaktadır ve gevşek bağ dokudan meydana gelmiştir. Retiküler dermis ise daha kalın bağ dokudan meydana gelmektedir (Şekil 4.1A ve Şekil 4.1B).



Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait HE boyama. Epidermis (yıldız) (A), dermis (ok ucu) (A), papillar dermis (ok) (B) (A: x20, B: x10). (DAB boyama)

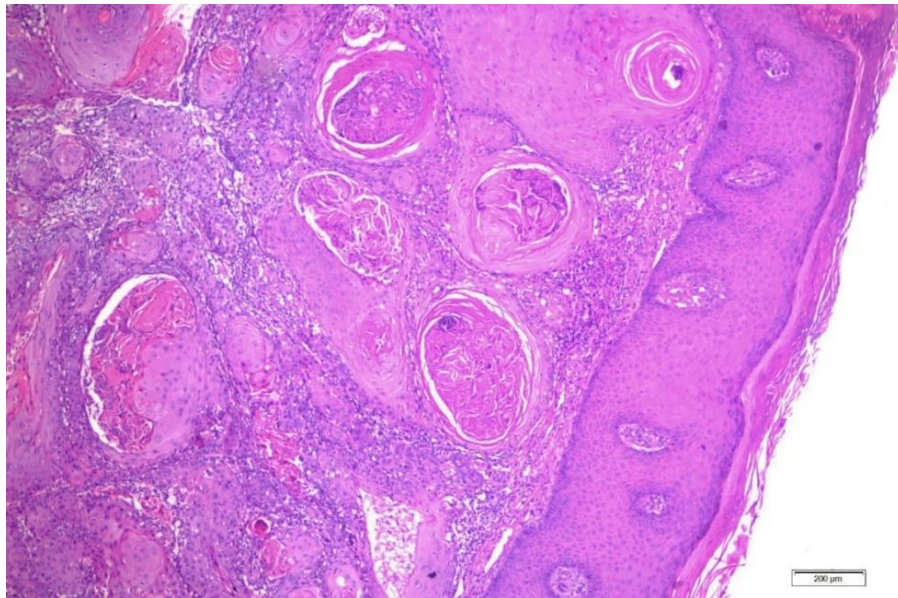
Kesitlerde ayrıca yağ bezleri ve kıl folikülleri de gözlenmiştir (Şekil 4.2).



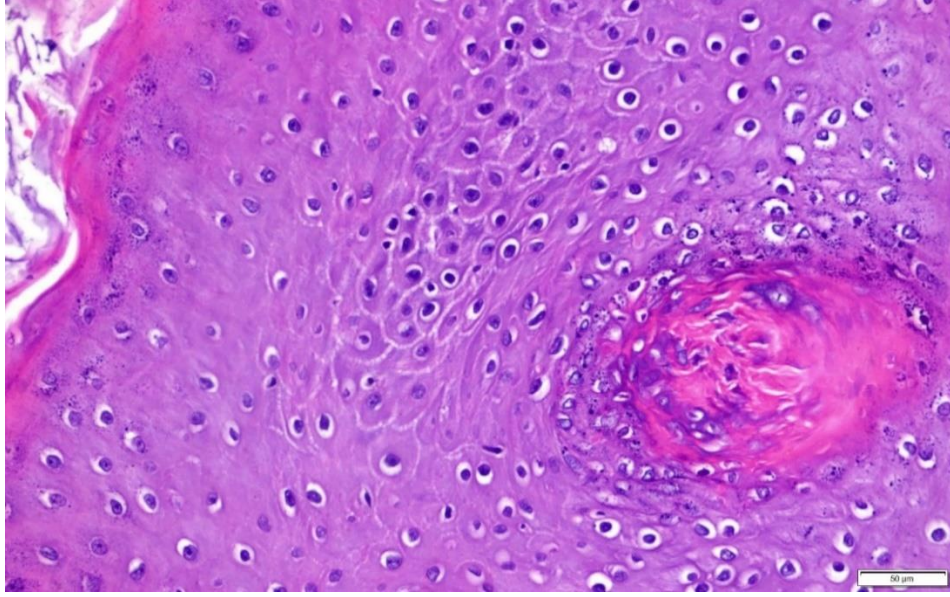
Şekil 4.2. Hematoksilen-eozin boyamada kıl folikülleri (ok) ve yağ bezleri (ok ucu) (x20).

Hasta Grubu Bulguları

SHK tanısı konmuş hastalara ait örneklerden elde edilen kesitlerin hemotoksilen-eozin boyama ile elde edilen görüntülerinde epidermis ve dermis tabakasında kalınlaşma ve hücresel dizilimde bozulmalar meydana geldiği görülmüştür (Şekil 4.3). Bazal tabakada nükleer polimorfizm gösteren atipik keratinositlerin bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4).

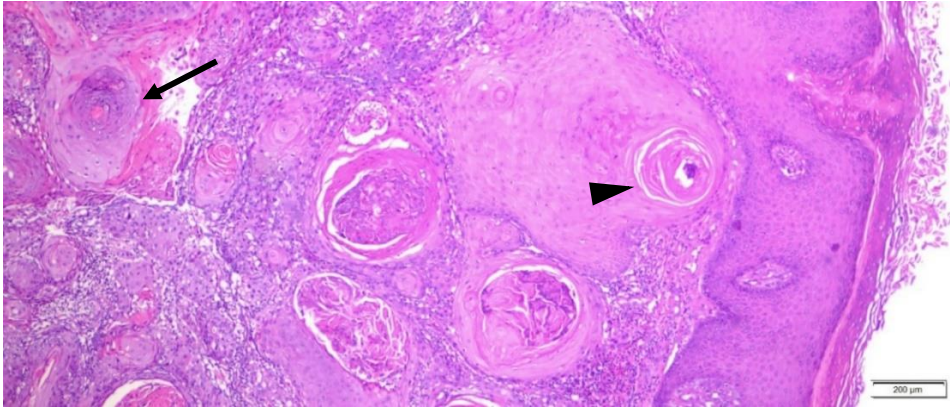


Şekil 4.3. Hasta grubuna ait epidermal kalınlaşma ve dermis tabakasındaki düzensizlikler (x4).

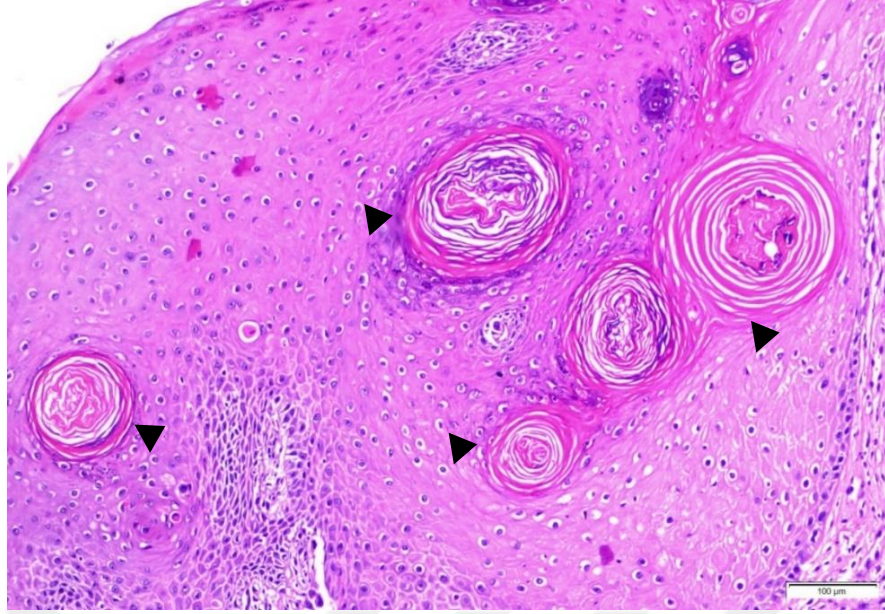


Şekil 4.4. Bazal katmanda nükleer pleomorfizm gösteren çoklu atipik keratinositlerden gelişen yüzeysel SHK (x20).

Belirgin farklılaşmış SHK olgularında neoplastik keratinosit adaları (Şekil 4.5) ve keratin incileri gözlenmiştir (Şekil 4.6).



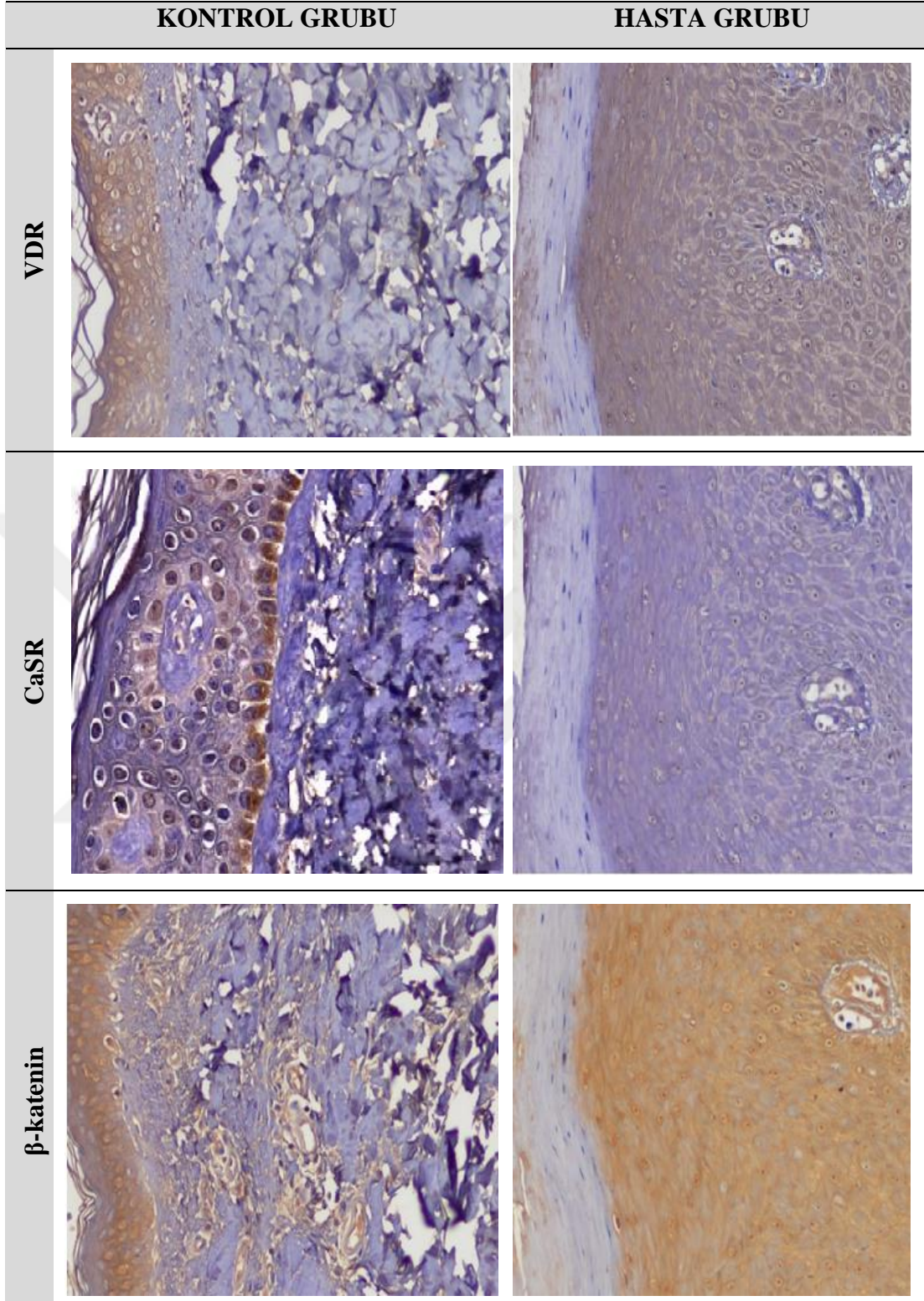
Şekil 4.5. Keratinosit adaları (ok) ve keratin inciler (ok ucu) (x4).



Şekil 4.6. Keratin inciler (ok ucu) (x10).

4.1.2. İmmunohistokimya (IHC) Yöntemi Bulguları

Araştırılan VDR, CaSR ve β -katenin ile ilgili hasta ve kontrol grubundan elde edilen IHC işaretleme görüntüleri karşılaştırmalı olarak Şekil 4.7.'de verilmektedir.



Şekil 4.7. A) Kontrol grubunda VDR ekspresyonu (x20), B) SHK'de VDR ekspresyonu (x20), C) Kontrol grubunda CaSR ekspresyonu (x20), D) SHK'de CaSR ekspresyonu (x20), E) Kontrol grubunda β -katenin ekspresyonu (x20), F) SHK'de β -katenin ekspresyonu (x20).

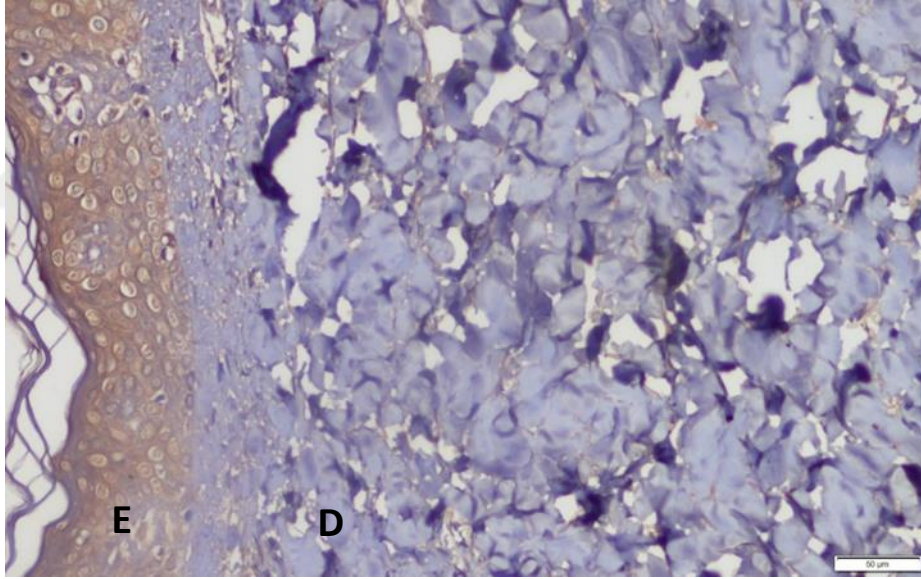
4.1.2.1. Vitamin D Reseptörü Bulguları

Kontrol Grubu Bulguları

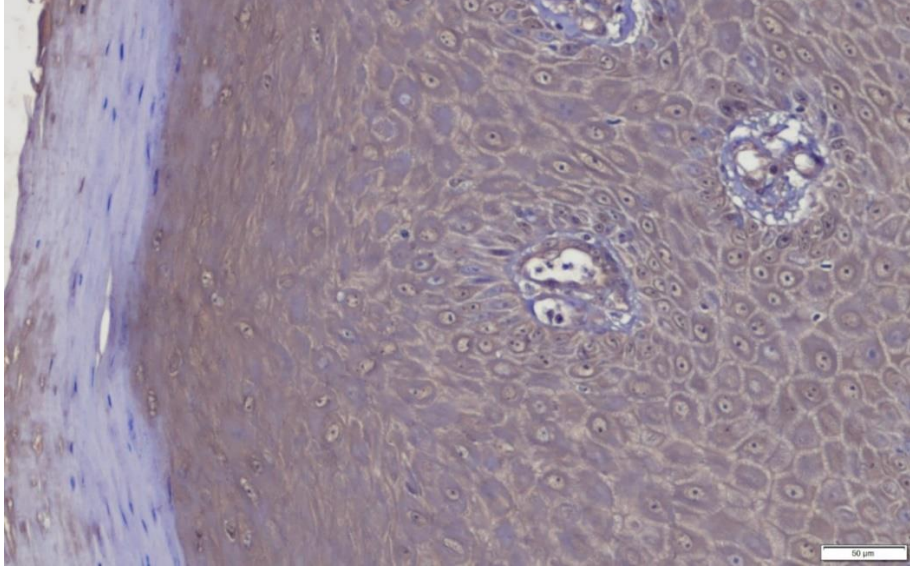
Kontrol grubu örneklerine ait doku kesitlerinde VDR antikoru varlığında 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) ile işaretlenmesi sonucunda VDR ekspresyonunun epidermis boyunca yüksek oranda olduğu görülmüştür. Dermis tabakasının bazı bölgelerinde ise ekspresyon oranı çok düşükde olsa gözlenmiştir (Şekil 4.8).

Hasta Grubu Bulguları

SHK tanısı almış örneklere ait doku kesitlerinde VDR antikoru varlığında DAB işaretleme sonucunda kalınlaşmış keratin tabakada VDR ekspresyonu gözlenmezken; epidermis, dermide ve tümör hücrelerinde ekspresyon yüksek oranda gözlenmiştir (Şekil 4.9). Epidermis ve dermis tabakaları arasındaki bütünlük SHK hasta örneklerinin doku kesitlerinde kaybolmuştur.



Şekil 4.8. Kontrol grubu örneklerinde epidermis (E) ve dermiş (D) tabakalarında VDR ekspresyonu (x20). (DAB boyama)

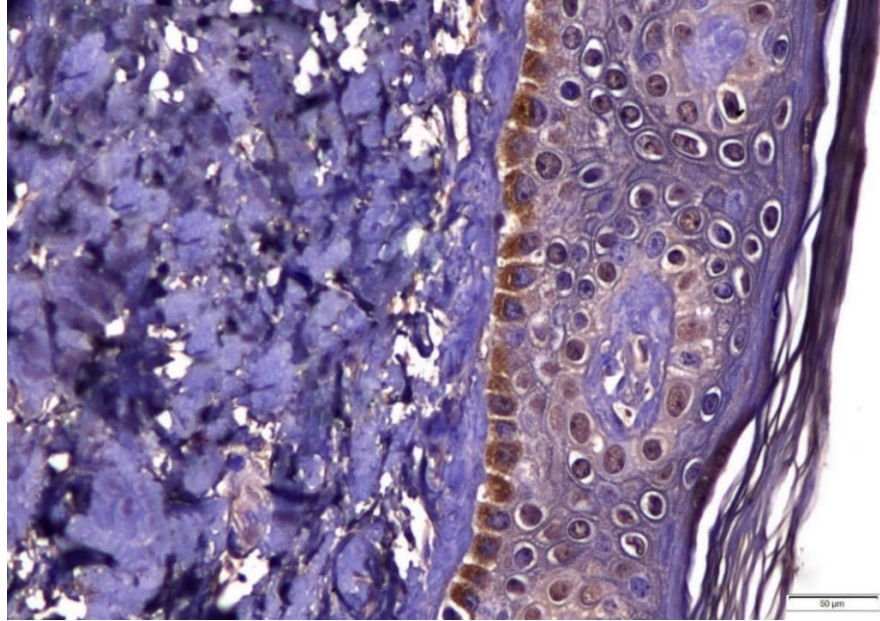


Şekil 4.9. SHK'da epidermis ve dermis tabakasında VDR ekspresyonu (x20). (DAB boyama)

4.1.2.2. Kalsiyuma Duyarlı Reseptör Bulguları

Kontrol Grubu Bulguları

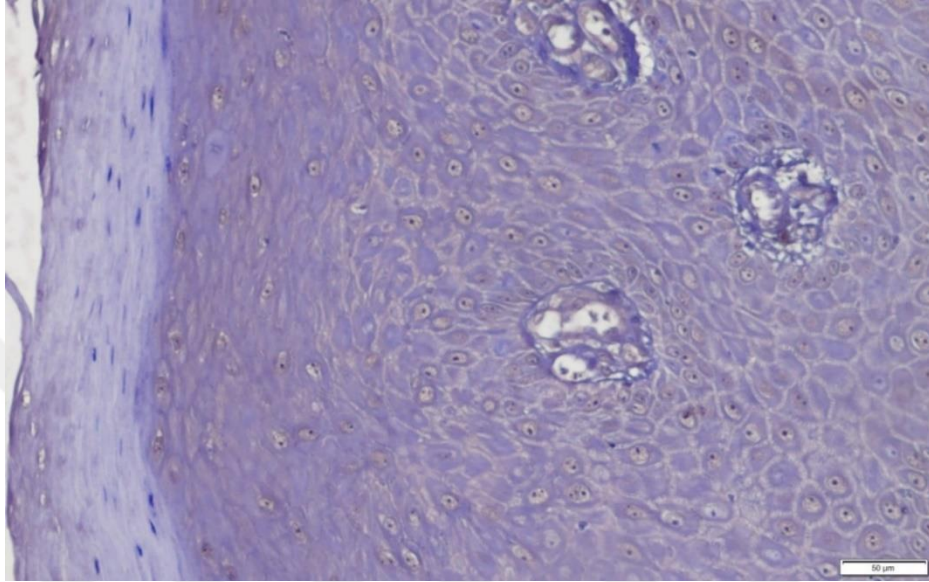
Kontrol grubuna ait örneklerde CaSR ekspresyonu CaSR antikoruna varlığında DAB ile işaretleme sonucunda epidermiste yer alan hücrelerde gözlenmiştir (Şekil 4.10). Dermis tabakasının bazı bölgelerinde ise ekspresyon oranı çok düşükde olsa gözlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Kontrol grubu örneklerinde epidermiste CaSR ekspresyonu (x20). (DAB boyama)

Hasta Grubu Bulguları

SHK tanısı almış örneklerde ise CaSR ekspresyonu CaSR antikoruna varlığında DAB ile işaretleme sonucunda hem epidermis hem de dermis tabakasında çok düşük oranda gözlenmiştir (Şekil 4.11). Epidermis ve dermis tabakaları arasındaki bütünlük SHK hasta örneklerinin doku kesitlerinde kaybolmuştur.



Şekil 4.11. SHK’da düşük CaSR ekspresyonu (x20). (DAB boyama)

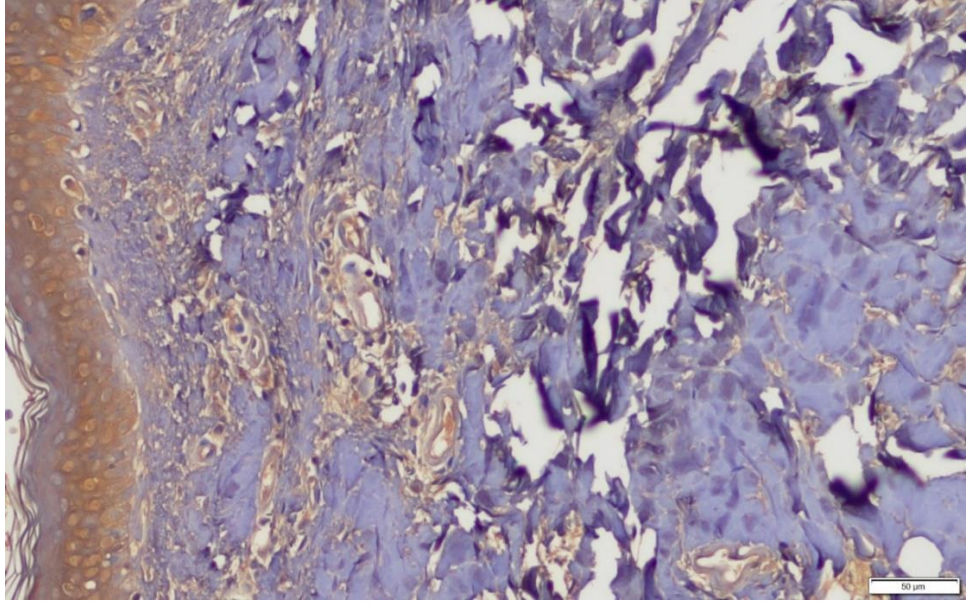
4.1.2.3. β -katenin Bulguları

Kontrol Grubu Bulguları

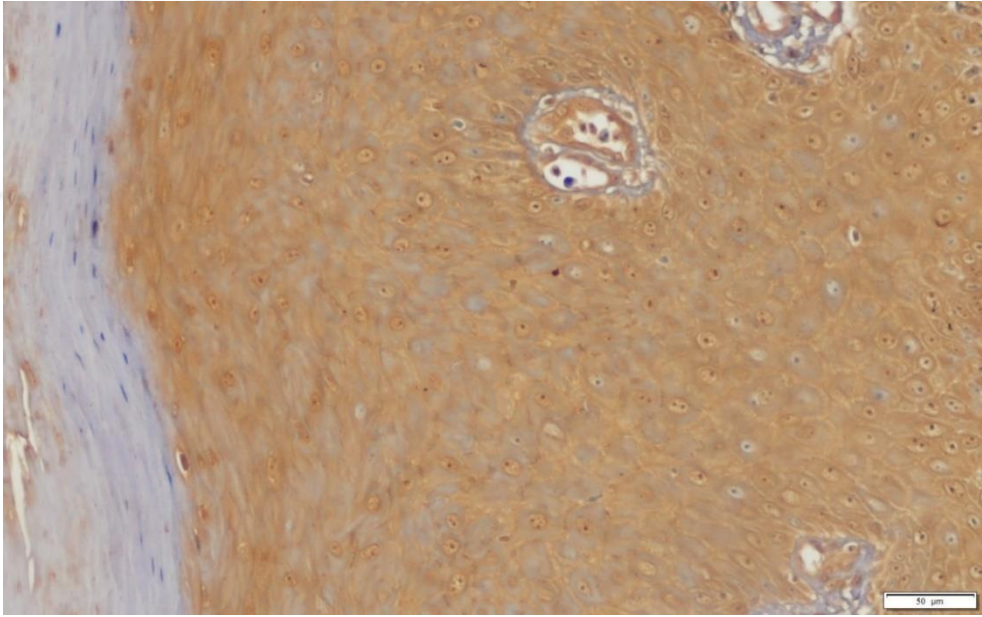
Kontrol grubu örneklerine ait doku kesitlerinde β -katenin antikoruna varlığında DAB ile işaretlenmesi sonucunda β -katenin ekspresyonunun epidermis ile sınırlı olduğu dermis tabakasında ekspresyon oranının ise çok düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.12).

Hasta Grubu Bulguları

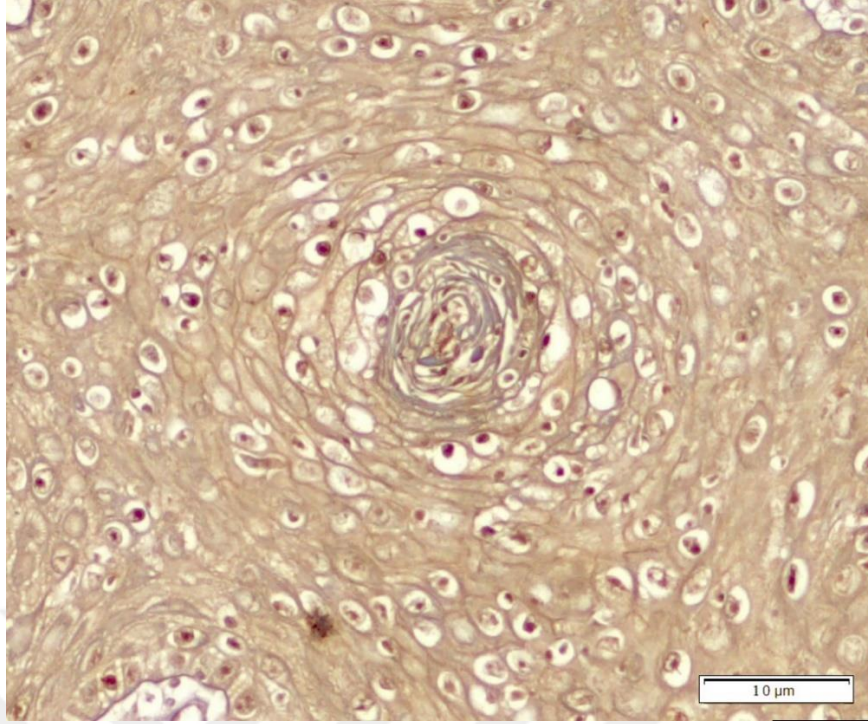
SHK tanısı almış hastalara ait doku örneklerinde β -katenin ekspresyonunun β -katenin antikoruna varlığında DAB ile işaretlenmesi sonucunda hem epidermis hemde epidermiste belirgin bir şekilde yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.13). Epidermis ve dermis tabakaları arasındaki bütünlük SHK hasta örneklerinin doku kesitlerinde kaybolmuştur. Keratinosit adalarında periferik bölgeler üzerinde daha yoğun sitoplazmatik boyanma gözlenirken merkezi bölgelerde zayıf ekspresyon görülmüştür (Şekil 4.14)



Şekil 4.12. Kontrol grubu örneklerinde immunohistokimyasal yöntem ile β -katenin boyanması (x20). (DAB boyama)



Şekil 4.13. Hasta grubu örneklerinde epidermis ve dermiste artan β -katenin ekspresyonu (x20). (DAB boyama)



Şekil 4.14. Hasta grubu örneklerinde keratinosit adalarında merkezi bölgelerde zayıf β -katenin ekspresyonu (x40). (DAB boyama)

4.1.3. Western Blot (WB) Yöntemi Bulguları

4.1.3.1. Vitamin D Reseptörü Bulguları

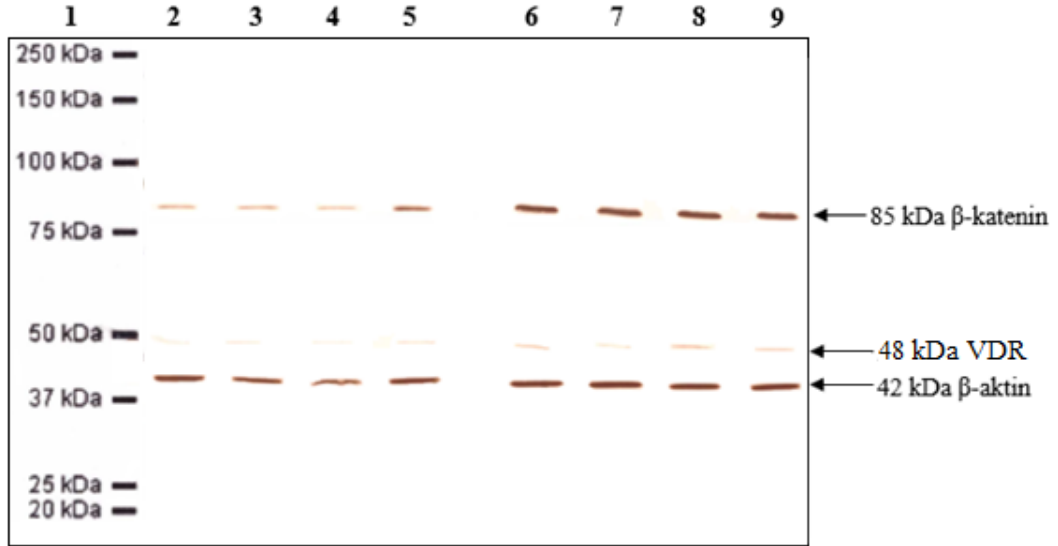
Anti vitamin D reseptör fare monoklonal (SantaCruz, USA, Cat# sc13133) antikor kullanılarak yapılan western blot çalışmasında kontrol ve hasta grubuna ait örneklerde 55 kDa molekül ağırlığına denk gelen bant oluşumu elde edilmiştir (Şekil 4.15).

4.1.3.2. Kalsiyuma Duyarlı Reseptör Bulguları

Anti- kalsiyuma duyarlı reseptör fare monoklonal (Abcam, USA, Cat# ab19347) antikor kullanılarak yapılan western blot çalışmasında kontrol ve hasta grubuna ait örneklerde 120,6 kDa molekül ağırlığına denk gelen bant oluşumu elde edilememiştir (Şekil 4.15).

4.1.3.3. β -katenin Bulguları

Anti- β -katenin fare monoklonal (Abcam, USA, Cat# ab22656) antikor kullanılarak yapılan western blot çalışmasında kontrol ve hasta grubuna ait örneklerde 85 kDa hizasına denk gelen bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Western blot yönteminde kontrol grubu ve hasta grubuna ait VDR ve β -katenin bantları (sırasıyla 48kDa, 85kDa). (1: Protein ladder, 2-5: Kontrol Grubu, 6-9: Hasta Grubu).

4.1.4. İstatiksel Analiz Bulguları

SHK hasta grubu ve kontrol grubunda VDR, CaSR, β -katenin proteinlerinin ekspresyon oranlarının yüzdesel değerlerinin eldesi için ilgili antikorların örnek doku kesitlerinde hedef proteinlere bağlanmaları sağlanmıştır. Bu bağlanmaların 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) boyanmasıyla çekilen doku kesit resimleri Image J analiz programıyla değerlendirilmiş ve antijen-antikor etkileşimine bağlı olarak ortaya çıkan renk yoğunluğunu hedef proteinin örneğe ait ilgili resim alanında protein ekspresyon oranı yüzdesel olarak elde edilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Image J analiz programına göre örnek doku kesitlerinde immunohistokimya çalışmasından elde edilen antijen-antikor etkileşim oranları.

GRUP	VDR	CaSR	β -Katenin
Kontrol	%21.2	%5.4	%12.46
Hasta	%62	%4.3	%72

Western blot (WB) yönteminden elde edilen bulgularda, SHK hasta grubu ve kontrol grupları arasında VDR ve β -katenin ekspresyonlarında farklılık gözlemlenmiştir. CaSR bantları ise WB çalışmasında gözlemlenememiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. VDR, CaSR, β -katenin proteinlerinin western blot bulguları.

GRUP	WB		
	VDR	CaSR	β - katenin
Kontrol	+	x	+
Hasta	++	x	++

x :Sonuç alınamadı.

+ :Ekspresyon var,

++ :Ekspresyon seviyesi yüksek

4.1.4.1. İmmunohistokimya Bulgularının Bağımsız Örneklem T Testi Değerlendirmesi

4.1.4.1.1. Vitamin D Reseptörü Bulguları

Her iki gruba ait örneklerin VDR ekspresyonu açısından istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucunda bu gruplar arasında anlamlı fark olduğu saptanmıştır (Tablo 4. 3) (p=0,006)

4.1.4.1.2. Kalsiyuma Duyarlı Reseptör Bulguları

Kontrol ve hasta grubuna ait CaSR immunohistokimya bulgularının istatistiksel değerlendirilmesinde iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 4.3) (p=0,326)

4.1.4.1.3. β -katenin Bulguları

Kontrol grubu ve hasta grubuna ait örneklerin değerlendirilmesinde, β -katenin ekspresyonu bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu saptanmıştır (Tablo 4.1) ($p=0,012$).

Tablo 4.3. Bağımsız örnekleme T test sonuçları.

Test Grubu	P Değeri
VDR Hasta - VDR Kontrol	P= 0,006
CaSR Hasta - CaSR Kontrol	P= 0,326
β -katenin - β -katenin Kontrol	P= 0,012

4.1.5. İmmünohistokimya Bulgularının Tek Yönlü ANOVA Tukey Post-Hoc Testi Değerlendirilmesi

İmmünohistokimya çalışmasından elde edilen bulguların Tek Yönlü ANOVA Testine göre analizleri şu şekildedir. Hasta dokuları kendi içinde değerlendirildiğinde VDR ve β -katenin ekspresyon oranları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,980$). Hasta örneklerindeki VDR ekspresyon oranları ile kontrol VDR, kontrol CaSR, kontrol β -katenin ve hasta CaSR oranları karşılaştırıldığında aralarındaki farkın (sırasıyla; $p=0,016$, $p=0,002$, $p=0,005$, $p=0,003$) anlamlı olduğu bulunmuştur. β -kateninin hasta grubundaki ekspresyonu ile kontrol VDR, kontrol CaSR, kontrol β -katenin ve hasta CaSR oranları arasındaki farkın (sırasıyla; $p=0,003$, $p=0,0001$, $p=0,001$, $p=0,001$) anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bulgular Tablo 4.4’de verilmektedir.

Tablo 4.4. VDR hasta, VDR kontrol, CaSR hasta, CaSR kontrol, β -katenin hasta ve β -katenin kontrol arasındaki ekspresyon farklılığının tek yönlü ANOVA Tukey Post-Hoc testi analiz sonuçları.

	Grup	Standart Sapma	Anlamlılık
VDR Hasta	β -katenin hasta	,1010344	,980
	β -katenin kontrol	,0958497	,005
	VDR kontrol	,0958497	,016
	CaSR hasta	,1010344	,003
	CaSR kontrol	,0958497	,002
VDR Kontrol	β -katenin hasta	,0958497	,003
	β -katenin kontrol	,0903679	,995
	VDR hasta	,0958497	,016
	CaSR hasta	,0958497	,935
	CaSR kontrol	,0903679	,945
CaSR Hasta	β -katenin hasta	,1010344	,001
	β -katenin kontrol	,0958497	,997
	VDR hasta	,1010344	,003
	VDR kontrol	,0958497	,935
	CaSR kontrol	,0958497	1,000
CaSR Kontrol	β -katenin hasta	,0958497	,000
	β -katenin kontrol	,0903679	,999
	VDR hasta	,0958497	,002
	VDR kontrol	,0903679	,945
	CaSR hasta	,0958497	1,000
β -katenin Hasta	β -katenin kontrol	,0958497	,001
	VDR hasta	,1010344	,980
	VDR kontrol	,0958497	,003
	CaSR hasta	,1010344	,001
	CaSR kontrol	,0958497	,0001
β -katenin Kontrol	β -katenin hasta	,0958497	,001
	VDR hasta	,0958497	,005
	VDR kontrol	,0903679	,995
	CaSR hasta	,0958497	,997
	CaSR kontrol	,0903679	,999

4.2. Tartışma

Skvamoz hücreli deri kanseri (SHK), epidermisdeki farklılaşma mekanizması bozulmuş keratinositlerin aşırı çoğalması sonucu meydana gelen, dünyada son yıllarda görülme sıklığı artan melanom dışı deri kanseridir. Keratinosit çoğalması ve farklılaşması birkaç faktör tarafından düzenlenmektedir. Keratinositlerin epidermisdeki bazal tabakadan spinos tabaka, granüler tabaka ve son olarak kornifiye tabakaya doğru hareket ederek farklılaşması, spesifik genler tarafından düzenlenmektedir [53]. VDR ve β -katenin arasında moleküler etkileşimin olduğu açığa çıkarıldığından beri bu sinyallemler arasında ortak bir düzenlenme olduğu ileri sürülmektedir [2]. Ayrıca farklı kanser türlerinde CaSR'nin Wnt/ β -katenin sinyalleme baskıladığı ve aralarında ters bir ilişkinin olduğu belirtilmiştir [54, 55]. CaSR aracılığıyla olan kalsiyum sinyalleminin VDR'nin fonksiyonunu etkileyebileceği, ancak bu mekanizmaların tam olarak netlik kazanmadığı da raporlanmıştır [56].

Çalışmamızda SHK hastalarının kanser dokularında VDR, CaSR ve β -katenin proteinlerinin düzeylerinin ve bu proteinlerin aralarında ilişkinin olup olmadığını araştırdık. Hasta ve kontrol dokularında VDR ve β -katenin protein ekspresyonu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark (sırasıyla $p= 0,006$, $p= 0.012$) olduğu bulunmuştur. Hasta dokularında CaSR ekspresyonu IHC boyamada daha yüksek bulunmasına rağmen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p= 0,326$). Hem β -katenin hem de VDR için elde edilen immunohistokimya sonuçları ile benzer şekilde western blot analiz bulguları elde edilmiştir. IHC'de boyanma yoğunluğuna bakıldığında, sadece kontrol grubunda belirlenen CaSR ekspresyonu diğer proteinlere göre deride düşük düzeyde bulunmuştur, bu nedenle western blot ile görüntülenemediği düşünülmektedir.

Çalışmamızda kontrol ve hasta grubuna ait parafin bloklardan elde edilen hematoksilen eosin boyama özellikleri literatürle uyumludur.

VDR, farklı dokularda kalsiyum/fosfat homeostazı, hücresel proliferasyon ve farklılaşma ve immün cevaba katılan çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenler [57]. VDR, anti-proliferatif ve pro-diferansiyasyon için sinyalleminin oluşmasında, kaybı

durumunda ise çeşitli tümörlerin oluşumunda rol oynamaktadır [58]. Epidermisde keratinositlerin bazal tabakadan yukarı tabakalara doğru farklılaşmasının düzenlenmesinde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR}$ etkileşimi rol almaktadır. Keratinositler; $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ üretimine yanıt olarak VDR eksprese eder [3]. VDR'nin fonksiyonunun bozulması keratinositlerde proliferasyonunun artması ve farklılaşmanın azalması yoluyla epidermal kanser oluşumuna yatkınlık yaratır [59]. VDR eksik farelerin epidermis ve kıl foliküllerinde, ilk katagen sırasında başlayan proliferasyonun ve farklılaşmanın bozulmasının arttığı gösterilmiştir [60].

Reichrath ve arkadaşlarının [61] melanom dışı deri kanserinin bir diğer tipi olan bazal hücreli kanserde (BHK) VDR'nin mRNA ve protein düzeyinin yüksek olduğunu raporlamışlardır. Meme kanseri ile yapılmış bazı çalışmalarda da tümör dokusunda VDR seviyesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir [62]. Çalışmamızda immünohistokimyasal elde edilen sonuçlarımıza göre, VDR immünoaktivitesi skuamoz hücreli deri kanseri hastalarında daha yüksek düzeyde bulunmuştur. İstatistiksel olarak da kontrol ve hasta grubu arasındaki fark ($p=0,006$) anlamlıdır. WB sonuçları da IHC verilerini desteklemektedir. Bulgularımız BHK ve meme kanseri ile yapılmış çalışma sonuçları ile uyumludur.

Evans ve arkadaşları [63] kolon kanserinin farklı safhalarında VDR ekspresyonu ile ilgili araştırmalarında, ilerlemiş lezyonlarda VDR ekspresyonunun olmadığını raporlamışlardır. Benzer bulgu prostat kanseri içinde bildirilmiştir [64]. Çalışmamızdan elde ettiğimiz hasta grubunda VDR ekspresyonunun daha yüksek bulunması, kolon ve prostat kanseri için belirtilen bulgudan farklıdır. Bu da çeşitli kanser tiplerinde VDR ekspresyonunun hücre tipine özgü bir farklılık gösterebileceğini düşündürmektedir.

Kanserde CaSR'nin ying-yang şeklinde bir rolü görülmektedir. CaSR kanserde proliferasyon, farklılaşma, hücre ölümü, anjiyogenez ve migrasyonu düzenler. Kolon, paratroid, mide ve nöroblastomada bir tümör baskılayıcı olarak, meme, prostat, yumurtalık ve böbrek kanserlerinde ise onkogen gibi davranmaktadır [6].

CaSR ekspresyonu kolorektal kanser ilerlemesi sırasında artar ve mekanizma tam olarak anlaşılammıştır [65]. Prostat kanserinde CaSR; yüksek seviyedeki

kalsiyuma proliferasyon artışı ile yanıt verir. Paratiroid tümörleri ve diğer tümörlerde CaSR'nin kaybı, tümör hücresi çoğalmasını desteklemekte ve tümör hücrelerinin farklılaşmamış halde tutulmasına katkıda bulunmaktadır [7].

Çalışmamızda immünohistokimyasal işaretlemede CaSR ekspresyonunun kontrol grubunda hasta grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p= 0,326$).

Wnt/ β -katenin protein aktivasyonu ve β -katenin mutasyonları tümör gelişimi ve kanser hücrelerinin göçü ya da metastaz ile ilişkilendirilen en yaygın değişikliklerdir [51]. β -katenin'in ekspresyonundaki değişiklikler, birtakım farklı kanserlerde farklılaşma kaybı, daha agresif fenotip, tümör invazyonunun artması ve kötü prognoz ile ilişkilidir [50]. Çeşitli epiteliyal kanserlerde yüksek oranda eksprese edilmektedir [66]. β -katenin düzenlemesinin kaybı aşırı nükleer birikim ve hedef genlerin uyarılması ile sonuçlanır [51]. Deri kanserinde yapılmış çalışmalarda β -katenin ekspresyon düzeyinin melanom dışı deri kanseri tiplerinden BHK'de oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir [67, 68]. Çalışmamızda SHK ve kontrol grubu β -katenin immünohistokimya işaretleme yoğunluğu karşılaştırıldığında hasta grubunda çok yüksek eksprese edildiği ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunduğu saptanmıştır ($p= 0.012$). Daha önce yapılmış çalışmalarla uyumlu sonuç elde edilmiştir. Hasta grubunda SHK gelişmesi üzerinde β -kateninin hücre proliferasyonunun ve hücre farklılaşmasının bozulmasında etkisi olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda, hasta ve kontrol gruplarında VDR, CaSR ve β -katenin antikolarıyla yapılan IHC ekspresyon bulgularının One-Way ANOVA istatistik analizine göre; **hasta örneklerinde** VDR ve β -katenin ekspresyon oranları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p= 0,980$). Yani, hasta örneklerinde VDR ve β -katenin ekspresyon oranlarının birbirine yakın olduğu görülmüştür. Hasta örneklerindeki VDR ve β -katenin ekspresyon oranlarının ise kontrol VDR, CaSR, β -katenin ve hasta CaSR oranlarından farklı olduğu görülmüştür. Yapılan bir çalışmada farelerde saç folikül farklılaşmasında D vitamini ve VDR'nin birlikte β -katenin sinyalleme üzerinde resiprokal etkisinin olduğu ve VDR'den yoksun farelerde saç kıran (alopesi) meydana geldiği raporlanmıştır [2]. β -katenin ile VDR arasındaki

etkileşimin, bazı cilt kanseri türlerine katkıda bulunduğu da gösterilmiştir. VDR'nin silindiği veya mutasyona uğratıldığı bir çalışmada, β -kateninin aşırı eksprese edildiği ve saç kökü tümörlerine neden olan kıl foliküllerinin aşırı çoğalmasına neden olduğu belirtilmektedir [69].

Ultraviyole B ile indüklenen deri kanseri oluşturulmuş farelerde $1,25(OH)_2D_3/VDR$ 'nin direkt olarak β -katenin/TCF sinyalleme düzenlediği, ancak fotokarsinogenez için koruyucu majör bir etkiye sahipmiş gibi görünmediği belirtilmektedir [69].

Çalışmamızda VDR ve β -katenin ekspresyon oranlarının hasta grubu içinde birbirine yakın olması ve aralarında istatistiksel farkın bulunmayışı, her iki proteinin hasta ve kontrol gruplarındaki oranlarının karşılaştırılmasında farkın anlamlı olması SHK ile ilişkili olabileceklerini düşündürmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması insanlarda skuamoz hücreli deri kanserinde VDR, CaSR ve β -katenin arasındaki ilişki açısından araştırılan ilk çalışma olması bakımından bilimsel değere sahiptir. Çalışma bulgularının değerlendirilmesi sonucunda, SHK ile araştırılan proteinlerden β -katenin ve VDR arasında ilişkinin ve hastalık gelişimi üzerinde etkisinin olabileceğini göstermektedir. Hasta ve kontrol grubu örneklerinde, CaSR ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucunda iki grup arasındaki farkın anlamlı olmadığı belirlenmiştir. CaSR ile SHK gelişimi ve diğer araştırılan moleküllerle etkileşimlerine ilişkin bulgu elde edilememiştir. Kolon, paratroid, mide ve nöroblastoma gibi kanserlerde tümör gelişimi üzerine CaSR'nin etkisi gösterilmişse de farklı bir kanser tipi olan SHK'de farklı sinyal yollarının etkili olabileceğini göstermektedir. Araştırmadan elde edilen veriler hücrel sinyal yolları ağı arasındaki karşılıklı ilişkinin anlaşılması ve patolojik koşulların moleküler temelinin ortaya konmasını sağlayacak ileri araştırmalara zemin oluşturması bakımından da önemlidir. Ayrıca yaygın bir hastalık olan skuamoz hücreli deri kanseri riskinin önlenmesi ve tedavisine katkı sağlayacak yeni stratejilerin geliştirilmesi için yapılacak ileri araştırmalara yön verecek bulgular elde edildiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Hussein, M.R., Ultraviolet Radiation and Skin Cancer: Molecular Mechanisms. *J Cutan Pathol.* 2005, 32(3), 191-205.
2. Hu, L., Bikle, D.D., Oda, Y., Reciprocal Role of Vitamin D Receptor on B-Catenin Regulated Keratinocyte Proliferation and Differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014, 144, 237-41.
3. Bikle, D. D., Oda, Y., Tu, C., Jiang, Y. Novel Mechanism For The Vitamin D Receptor (VDR) in The Skin and in Skin Cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 2015, 148, 47-51.
4. Kırdır, M. D Vitamininin İmmün Sistem, Deri ve Kanser ile İlişkisi. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2013, 20(4), 158-61.
5. Caini, S., Boniol, M., Tosti, G., Magi, S., Medri, M., Stanganelli, I., Palli, D., Assedi, M., Marmol, D., Gandini, S. Vitamin D and Melanoma and Non-Melanoma Skin Cancer Risk and Prognosis: A Comprehensive Review and Meta-Analysis. *Eur J Cancer.* 2014, 50(15), 2649-58.
6. Tennakoon, S., Aggarwal, A., Kállay, E. The Calcium-Sensing Receptor and The Hallmarks of Cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2016, 1863(6), 1398-407.
7. Peterlik, M., Kállay, E., Cross, H. Calcium Nutrition and Extracellular Calcium Sensing: Relevance for the Pathogenesis of Osteoporosis, Cancer and Cardiovascular Diseases. *Nutrients.* 2013, 5, 302-27.
8. Lee, J., Lee, P., Wu, X. Molecular and cytoskeletal regulations in epidermal development. *Semin Cell Dev Biol.* 2017 Sep; 69: 18-25,
9. Anadolu, R., Amin, S., Irani, K., Singh, A., Nouri, K. *Skin Cancer.* Ed: Keyvan Nouri, McGraw-Hill Medical, New York, USA, 2008, 1-16.
10. Sadler, T.W. *Langman's medical embryology. Medical embryology.* 12th T.W. Sadler. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2012., 427- 9.
11. Losquadro, W.D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2017 Aug;25(3):283-9.
12. Uysal, A., Oltulu, F., Kocatürk, D., Özdil, B. Deri ve Deri Eklerinin Embriyolojik Gelişimi. *Güncel Dermatoloji Dergisi.* 2016, 6(1), 1-10.
13. Forni, M.F., Trombetta-Lima, M., Sogayar, M.C. Stem cells in embryonic skin development. *Biol Res.* 2012;45(3):215-22.

14. Moore, K., Persaud, T.V.N., Torchia, M. The Developing Human Clinically Oriented Embryology. Elsevier, Philadelphia, ABD, 2016, 437-54.
15. Gartner, L., Hiatt, J. Color Atlas and Text of Histology. Ed: Crystal Taylor, Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, Philadelphia, ABD, 2014, 255-68.
16. Young, A.R., Claveau, J., Rossi, A.B. Ultraviolet Radiation and the Skin:Photobiology and Sunscreen Photoprotection. J Am Acad Dermatol. 2017 Mar;76(3S1): 100-09.).
17. Gantwerker, E.A., Hom D.B. Skin: histology and physiology of wound healing. Clin Plast Surg. 2012 Jan;39(1):85-97.
18. Angus, J., Diagnosis and management of nonmelanoma skin cancer. The Journal of Prescribing and Medicine Management, Volume 28, Issue 5 May (2017), 33–40.
19. Timurkaynak, Ö., Demirkesen. C., Skuamöz Hücreli Karsinom: Klinik Ve Patolojik Spektrum. Kanser Gündemi Dergisi, Ekim 2015, 3/4, 29-34.
20. Block, R.M. Nonmelanoma Skin Cancers Diagnosis and Management. Physician Assistant Clinics, 2016, Volume 1, Issue 2, 233 – 53.
21. Silva, A.P., Neves, C.L., Dos Anjos Silva, E., Portela, T.C.L., Iunes, R.S., Cogliati, B., Severino, D., da Silva Baptista, M., Dagli, M.L.Z., Blazquez, F.J.H., da Silva, J.R.M.C. Effects of Methylene Blue-mediated Photodynamic Therapy on a Mouse Model of Squamous Cell Carcinoma and Normal Skin. Photodiagnosis Photodyn Ther. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2018 Sep;23:154-64.
22. Parekh, V., Seykora, J.T., Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. Clin Lab Med. 2017 Sep;37(3):503-25.
23. Que, S.K.T., Zwald, F.O., Schmults, C.D. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Incidence, Risk Factors, Diagnosis, and Staging. J Am Acad Dermatol. 2018 Feb;78(2):237-47.
24. Garcia-Zuazaga, J., Olbricht, S.M. Cutaneous squamous cell carcinoma. Adv Dermatol. 2008;24:33-57.
25. Kwa, R.E., Campana, K., Moy, R.L. Biology of cutaneous squamous cell carcinoma. J Am Acad Dermatol. 1992 Jan;26(1):1-26.

26. Stockfleth, E., Rosen, T., Shumack, S., *Managing Skin Cancer*. Ed: Stephen Shumack Springer is part of Springer Science+Business Media, New York, 2010, 79-110.
27. Samarasinghe, V., Madan, V. Nonmelanoma skin cancer. *J Cutan Aesthet Surg*. 2012 Jan;5(1):3-10.
28. Krishnan, A.V., Feldman, D. Mechanisms Of The Anti-cancer And Anti-inflammatory Actions Of Vitamin D. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011;51:311-36.
29. Çelen, İ., Ross, .KE., Arighi, C.N., Wu, C.H. Bioinformatics Knowledge Map for Analysis of Beta-Catenin Function in Cancer. *PLoS One*. 2015 Oct 28;10(10):e0141773.
30. Reichrath, J., Saternus, R., Vogt, T. Endocrine actions of vitamin D in skin: Relevance for photocarcinogenesis of non-melanoma skin cancer, and beyond. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Sep 15;453:96-102.
31. Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L., Carmeliet, G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev*. 2016 Jan;96(1):365-408.
32. Buğrul, F. Süt Çocukluğu Dönemindeki Bebeklerin Annelerine Verilen D Vitamininin Çocuklardaki D Vitamin Düzeyine Etkisi. İstanbul Üniversitesi, çocuk Sağlığı Enstitüsü, İstanbul, 2011, 77.
33. Fidan, F., Alkan, B.M., Tosun, A., Çağın Pandemisi: D Vitamini Eksikliği ve Yetersizliği. *Turk J Osteoporos* 2014;20:71-4.
34. Khan, M.I., Bielecka, Z.F., Najm, M.Z., Bartnik, E., Czarnecki, J.S., Czarnecka, A.M., Szczylik, C. Vitamin D receptor gene polymorphisms in breast and renal cancer: current state and future approaches. *Int J Oncol*. 2014 Feb;44(2):349-63.
35. Chiang, K.C., Chen, Tai, The Anti-cancer Actions of Vitamin D. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents)*, Volume 13, Number 1, January 2013, pp. 126-39.
36. Burns, E.M., Elmets, C.A., Yusuf, N. Vitamin D and skin cancer. *Photochem Photobiol*. 2015 Jan-Feb;91(1):201-9.
37. Chandel, N., Malhotra, A., Singhal, P.C. Vitamin D receptor and epigenetics in HIV infection and drug abuse. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:788.

38. Feldman, D., Krishnan, A.V., Swami, S., Giovannucci, E., Feldman, B.J. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer*. 2014 May;14(5):342-57.
39. Welsh, J. Cellular and molecular effects of vitamin D on carcinogenesis, In *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 523, Issue 1, 2012, 107-14.
40. Bandera Merchan, B., Morcillo, S., Martin-Nuñez, G., Tinahones, F.J., Macías-González, M. The role of vitamin D and VDR in carcinogenesis: Through epidemiology and basic sciences. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017 Mar;167:203-18.
41. Díaz-Soto, G., Rocher, A., García-Rodríguez, C., Núñez, L., Villalobos, C. The Calcium-Sensing Receptor in Health and Disease. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2016;327:321-69.
42. Hendy, G.N., Canaff, L., Cole, D.E. The CASR gene: alternative splicing and transcriptional control, and calcium-sensing receptor (CaSR) protein: structure and ligand binding sites. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013 Jun;27(3):285-301.
43. Aggarwal, A., Kállay, E. Cross Talk between the Calcium-Sensing Receptor and the Vitamin D System in Prevention of Cancer. *Front Physiol*. 2016 Oct 18;7:451.
44. Tu, C. L., Bikle, D. D. Role of The Calcium-Sensing Receptor in Calcium Regulation of Epidermal Differentiation and Function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013, 27(3), 415-27.
45. Yu, W., Li, L., Zheng, F., Yang, W., Zhao, S., Tian, C., Yin, W., Chen, Y., Guo, W., Zou, L., Deng, W. β -Catenin Cooperates with CREB Binding Protein to Promote the Growth of Tumor Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(2):467-78.
46. Choi, H.J., Huber, A.H., Weis, W.I. Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. *J Biol Chem*. 2006 Jan 13;281(2):1027-38.
47. Tanır, H., Demirezen, Ş., Beksaç S., WNT/Beta-katenin Sinyal Yolunda Görev Alan Hedef Hücre Zarı Biyomolekülleri. *Marmara Medical Journal*, 2012, 25, 53-57.
48. Nollet, F., Berx, G., Molemans, F., van Roy, F. Genomic organization of the human beta-catenin gene (CTNNB1). *Genomics*. 1996 Mar 15;32(3):413-24.

49. Santoro, A., Pannone, G., Papagerakis, S., McGuff, H.S., Cafarelli, B., Lepore, S., De Maria, S., Rubini, C., Mattoni, M., Staibano, S., Mezza, E., De Rosa, G., Aquino, G., Losito, S., Loreto, C., Crimi, S., Bufo, P., Lo Muzio, L. Beta-catenin and epithelial tumors: a study based on 374 oropharyngeal cancers. *Biomed Res Int.* 2014;2014:948264.
50. Schussel, J.L., Pinto Ddos, S. Jr., Martins, M.T. Altered β -catenin Expression Related to Cancer Progression on Actinic Cheilitis and Squamous Cell Carcinoma of the Lip. *Ann Diagn Pathol.* 2011 Feb;15(1):1-5.
51. Prasad, R., Katiyar, S.K. Ultraviolet radiation-induced inflammation activates β -catenin signaling in mouse skin and skin tumors. *Int J Oncol.* 2014 Apr;44(4):1199-206.
52. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
53. Hawker, N.P., Pennypacker, S.D., Chang, S.M., Bikle, D.D. Regulation of human epidermal keratinocyte differentiation by the vitamin D receptor and its coactivators DRIP205, SRC2, and SRC3. *J Invest Dermatol.* 2007 Apr;127(4):874-80.
54. MacLeod, R.J. Extracellular calcium-sensing receptor/PTH knockout mice colons have increased Wnt/ β -catenin signaling, reduced non-canonical Wnt signaling, and increased susceptibility to azoxymethane-induced aberrant crypt foci. *Lab Invest.* 2013 May;93(5):520-7.
55. Tang, B., Chow, J.Y., Dong, T.X., Yang, S.M., Lu, D.S., Carethers, J.M., Dong, H. Calcium sensing receptor suppresses human pancreatic tumorigenesis through a novel NCX1/Ca(2+)/ β -catenin signaling pathway. *Cancer Lett.* 2016 Jul 10;377(1):44-54.
56. Bikle, D.D. Vitamin D receptor, a tumor suppressor in skin. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015 May;93(5):349-54.
57. Wang, Y., Zhu., J, DeLuca, H.F. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys.* 2012 Jul 1;523(1):123-33.
58. Zinser. G.M., Suckow. M., Welsh. J. Vitamin D receptor (VDR) ablation alters carcinogen-induced tumorigenesis in mammary gland, epidermis and lymphoid tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005 Oct;97(1-2):153-64.
59. Bikle, D.D., Jiang, Y. The protective role of vitamin d signaling in non-melanoma skin cancer. *Cancers (Basel).* 2013 Nov 5;5(4):1426-38.

60. Wu, X., Zhou, T., Cao, N., Ni, J., Wang, X. Role of Vitamin D Metabolism and Activity on Carcinogenesis. *Oncol Res.* 2014;22(3):129-37.
61. Reichrath, J., Kamradt, J., Zhu, X.H., Kong, X.F., Tilgen, W., Holick, M.F. Analysis of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptors (VDR) in basal cell carcinomas. *Am J Pathol.* 1999 Aug;155(2):583-9.
62. McCarthy, K., Laban, C., Bustin, S.A., Ogunkolade, W., Khalaf, S., Carpenter, R., Jenkins, P.J. Expression of 25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase, and vitamin D receptor mRNA in normal and malignant breast tissue. *Anticancer Res.* 2009 Jan;29(1):155-7.
63. Evans, S.R., Nolla, J., Hanfelt, J., Shabahang, M., Nauta, R.J., Shchepotin, I.B. Vitamin D receptor expression as a predictive marker of biological behavior in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 1998 Jul;4(7):1591-5.
64. Ahn, J., Park, S., Zuniga, B., Bera, A., Song, C.S., Chatterjee, B. Vitamin D in Prostate Cancer. *Vitam Horm.* 2016;100:321-55.
65. Fetahu, I.S., Hummel, D.M., Manhardt, T., Aggarwal, A., Baumgartner-Parzer, S., Kállay, E. Regulation of the calcium-sensing receptor expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃, interleukin-6, and tumor necrosis factor alpha in colon cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014 Oct;144 Pt A:228-31.
66. Agaimy, A., Halle, F. CTNNB1 (β -Catenin)-altered Neoplasia: A Review Focusing on Soft Tissue Neoplasms and Parenchymal Lesions of Uncertain Histogenesis. *Adv Anat Pathol.* 2016 Jan;23(1):1-12.
67. Papadavid, E., Pignatelli, M., Zakyntinos, S., Krausz, T., Chu, A.C. Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin/catenin (alpha-, beta-, and gamma-) complex in premalignant and malignant non-melanocytic skin tumours. *J Pathol.* 2002 Feb;196(2):154-62.
68. El-Bahrawy, M., El-Masry, N., Alison, M., Poulsom, R., Fallowfield, M. Expression of beta-catenin in basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2003 May;148(5):964-70
69. Jiang, Y.J., Teichert, A.E., Fong, F., Oda, Y., Bikle, D.D. 1 α ,25(OH)₂-Dihydroxyvitamin D₃/VDR protects the skin from UVB-induced tumor formation by interacting with the β -catenin pathway. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2013;136:229-32.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sevinç SÖYLEV

Doğum Yeri ve Yılı : İzmir, 1992

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : sevincsoylev@ogr.cbu.edu.tr

Eğitim Durumu

Lise : Şehit Erkan Özcan Lisesi, 2011

Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2015

Yüksek Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Moleküler Biyoloji Bölümü,
2018