



T. C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI

**LARİNGS PRİMER SKUAMÖZ HÜCRELİ  
KARSİNOMLARINDA HUMAN PAPİLLOMA  
VİRÜS SIKLIĞI, p53 ve Ki-67  
EKSPRESYONLARININ KLİNİKOPATOLOJİK  
KORELASYONU**

UZMANLIK TEZİ

DR. MEVLÜT ÇETİN

DANIŞMAN

Prof.Dr. M. Gökhan ERPEK

**AYDIN-2011**

T. C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI

**LARİNKS PRİMER SKUAMÖZ HÜCRELİ  
KARSİNOMLARINDA HUMAN PAPİLLOMA  
VİRÜS SIKLIĞI, p53 ve Ki-67  
EKSPRESYONLARININ KLİNİKOPATOLOJİK  
KORELASYONU**

UZMANLIK TEZİ

DR. MEVLÜT ÇETİN

DANIŞMAN  
Prof. Dr. M. Gökhan ERPEK

**AYDIN-2011**

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından **TPF-10007** numaralı proje olarak desteklenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tezimin hazırlanmasında büyük emeği geçen başta danışman hocam Prof. Dr. M. Gökhan Erpek'e, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı öğretim üyeleri değerli hocalarım Prof. Dr. Sema Başak'a, Prof. Dr. Onur Odabaşı'na, patoloji çalışmaları için Doç. Dr. İbrahim Meteoğlu'na, mikrobiyoloji çalışmaları için Doç. Dr. Sevin Kırdar'a, şimdiye kadar geldiğim bu meşakkatli yolda desteklerini benden hiç esirgemeyen aileme, eşim Dr. Nesibe Kahraman Çetin'e ve biricik oğlum Yavuzalp'e teşekkür ederim.

Dr.Mevlüt Çetin

## İÇİNDEKİLER

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| TEŞEKKÜR                                                           | i   |
| İÇİNDEKİLER                                                        | ii  |
| TABLO DİZİNİ                                                       | iii |
| ŞEKİL DİZİNİ                                                       | iv  |
| RESİM DİZİNİ                                                       | iv  |
| KISALTMA DİZİNİ                                                    | v   |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ                                                   | 1   |
| 2. GENEL BİLGİLER                                                  | 3   |
| 2.1. Larinks Embriyolojisi , Anatomisi, Histolojisi ve Fizyolojisi | 4   |
| 2.2. Larinks Kanseri                                               | 9   |
| 2.3.Human Papilloma Virüs                                          | 15  |
| 2.4. p53 Geni                                                      | 17  |
| 2.5.Ki-67 Proliferasyon İndeksi                                    | 18  |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM                                                 | 20  |
| 3.1. İmmünohistokimyasal Boyama                                    | 20  |
| 3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu                                   | 26  |
| 4. BULGULAR                                                        | 31  |
| 5. TARTIŞMA                                                        | 42  |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER                                               | 51  |
| 7.ÖZET                                                             | 53  |
| 8.SUMMARY                                                          | 55  |
| 9. KAYNAKLAR                                                       | 57  |

## **TABLO DİZİNİ**

Tablo I. Olguların Sigara İçme Durumuna Göre HPV PZR Dağılımları

Tablo II. Olguların T Evresi Durumuna Göre HPV PZR Dağılımları

Tablo III. Olguların Histolojik Grade Durumuna Göre HPV PZR Dağılımları

Tablo IV. Olguların Tümör Lokalizasyon Durumuna Göre HPV PZR Dağılımları

Tablo V. Olguların Boyun Metastaz Durumuna Göre HPV PZR Dağılımları

Tablo VI. Olguların Sigara İçme Durumuna Göre p53 Dağılımları

Tablo VII. Olguların T Evresi Durumuna Göre p53 Dağılımları

Tablo VIII. Olguların Histolojik Grade Durumuna Göre p53 Dağılımları

Tablo IX. Olguların Tümör Lokalizasyon Durumuna Göre p53 Dağılımları

Tablo X. Olguların Boyun Metastaz Durumuna Göre p53 Dağılımları

Tablo XI. Olguların p53 Durumuna Göre HPV PZR Dağılımları

Tablo XII. Olguların Sigara Kullanma Durumuna Göre Ki-67 Dağılımları

Tablo XIII. Olguların T Evresi Durumuna Göre Ki-67 Dağılımları

Tablo XIV. Olguların Histolojik Grade Durumuna Göre Ki-67 Dağılımları

Tablo XV. Olguların Tümör Lokalizasyon Durumuna Göre Ki-67 Dağılımları

Tablo XVI. Olguların Boyun Metastaz Durumuna Göre Ki-67 Dağılımları

Tablo XVII. Olguların Ki-67 Durumuna Göre HPV PZR Dağılımları

Tablo XVIII. Olguların PanHPV Durumuna Göre HPV PZR Dağılımları

## **ŞEKİL DİZİNİ**

Şekil-1:Larinksin Genel Anatomik Görüntüsü

## **RESİM DİZİNİ**

Resim 1:Glottik Karsinom

Resim 2:PanHPV ile ‘+’ boyanma

Resim 3:PanHPV ile ‘++’ boyanma

Resim 4:HPV 16 ile ‘+’ boyanma

Resim 5:HPV 16 ile ‘++’ boyanma

Resim 6:Ki-67 ile ‘+’ boyanma

Resim 7:Ki-67 ile ‘++’ boyanma

Resim 8:Ki-67 ile ‘+++’ boyanma

Resim 9:p53 ile ‘+’ boyanma

Resim 10:p53 ile ‘++’ boyanma

Resim 11:p53 ile ‘+++’ boyanma

Resim 12:HPV Geno Array Test Kit

Resim 13: HPV Geno Array Test Panel

Resim 14:Hibridizasyon Membran Bölgeleri

Resim 15:Hibridizasyon Membran Pozitif \* ve Negatif Kontrol

Resim 16:Hibridizasyon Membran HPV Tip 16\* ve tip 52

Resim 17:Hibridizasyon Membran HPV Tip 53\* ve Tip 68

Resim 18:Hibridizasyon Membran HPV Tip 31

## **KISALTMALAR DİZİNİ**

**HPV** : Human Papillomavirüs

**SHK**:Skuamoz Hücreli Karsinom

**LN** : Lenf Nodu

**Lig** : Ligamentum

**M** : Muskulus

**A** : Arteria

**V** : Vena

**N** : Nervus

**HE** : Hematoksilen Eozin

**DNA** : Deoksiribo Nükleik Asit

**CIS** : Karsinoma in situ

**T** : Primer tümör

**N** : Bölgesel lenf nodları

**M** : Uzak metastaz

**İHK** : İmmünohistokimya

**PZR** : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**DSÖ**:Dünya Sağlık Örgütü

## GİRİŞ VE AMAÇ

Larinks kanseri baş ve boyun bölgesinin en sık görülen kanseridir ve erişkinlerde tüm kanserlerin %2'sini oluşturur (1-3). Ülkemizde erkekler arasında en sık rastlanan ikinci kanserdir (4). Larinks kanserlerinde prognoz anatomik yayılım, histolojik diferansiyasyon ve tümörün lokalizasyonu ile ilişkilidir.

Larinks kanseri görülme sıklığı ülkelere göre değişiklik göstermekte olup; 3-10/100000 aralığında insidanslar bildirilmiştir (5,6,7). Larinks kanserlerinin % 95'den fazlası skuamöz hücreli karsinomlardır (8). Bu kanserlerin gelişmesinde en önemli risk faktörleri sigara ve alkol alışkanlığıdır (9).

Sigara ve alkol ile larinks kanseri arasındaki ilişki uzun zamandır bilinmektedir. Diyet, oral hijyen vb. faktörlerin hastalığa predispozisyon oluşturduğuna dair görüşler öne sürülmektedir. Larinks kanseri ile hereditenin ilişkisini aydınlatmak amacıyla hayvan deneyleri de yapılmış ve son yıllarda yapılan çalışmalarda diğer faktörlere ek olarak human papilloma virüs (HPV) enfeksiyonları üzerinde durulmaya başlanmıştır. Shope'un (10) 1993 yılında tavşanlarda papillomavirüs enfeksiyonlarının ardından keratinöz lezyonlar oluşturduğunu ve bunların bir kısmının da epitelyal neoplazmlara dönüştüğünü göstermesi sayesinde DNA virüslerinin memelilerde tümör oluşturabileceği anlaşılmıştır.

HPV Papova viridea ailesinden DNA grubu bir virüstür. İki yüz farklı tipi tanımlanmıştır. Moleküler biyolojik çalışmalar HPV'a bağlı karsinogenezi spesifik mekanizmaların rol oynadığını göstermekte ve HPV enfeksiyonu ile baş ve boyun kanserleri arasında bir bağlantı olabileceği düşünülmektedir.

Çeşitli araştırmalar göstermiştir ki bazı sfesifik HPV tipleri serviks uteri, vulva, penis, konjonktiva ve üst solunum-sindirim sisteminin premalign ve malign bir çok lezyonu ile ilişkilidir (11,12). Bu hastalarda karsinoembriyogenik antijen seviyesi yükselmiş olup, böylesi bir selüler immun süpresyonun kansere predispozisyon oluşturabileceği düşünülmektedir. Virüsün tespitinde kullanılan yöntemler elektron mikroskopisi, immünohistokimyasal boyama, hibridizasyon teknikleri (Southern Blot, dot blot ve insitu hibridizasyon) ve "polimeraz zincir reaksiyon" (PZR) tekniğidir. HPV ve skuamöz hücreli kanserler arasında öngörülen bu sebep - sonuç ilişkisi virüsün varlığının yüksek risk göstergesi olabileceğini düşündürmektedir. Brandwein(13) ve arkadaşları, laringeal tümörlerde HPV DNA varlığının kötü prognozun göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. Bir çok araştırmada baş-boyun bölgesindeki kanserlerde HPV sıklığı araştırılmış ve ortalama % 34.5'lik pozitif sonuç tespit edilmiştir. Ancak seçilen tümör grubunun lokalizasyonu,



kullanılan metod ya da hasta özelliklerine göre % 7 ila 59'luk geniş bir yelpaze ortaya çıkmıştır.

Hücre siklusu ile apoptozisin entegrasyonunda anahtar faktör, tümör süpressör gen ürünü bir protein olan p53'dür. p53 tümör süpressör geni 17p13.1 kromozomunda yerleşmiştir. p53'ün görevi, DNA çeşitli nedenler (radyasyon veya bazı ilaçlar etkisiyle) ile hasarlandığı zaman, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu (proliferasyonu) G1 fazında durdurup hücrenin hasarlanmış DNA'sını tamir etmesi için ona zaman kazandırmasıdır. Birçok çalışmada larinks skuamöz hücreli karsinomlarında mutant p53 proteini gösterilmiştir. Ancak kötü prognoz göstergesi olup olmadığı tartışmalıdır. Tümör süpressör gen protein indeksinin kötü prognoz ile ilişkili olduğuna dair çalışmaların (14,15) yanı sıra prognoz ile ilişkisinin olmadığını bildiren yayınlar da mevcuttur (16-23).

Tümör dokusundaki mitoz sayısı ile hücre proliferasyonunu gösteren Ki-67 nükleer immünoaktivitesi arasında iyi bir korelasyon vardır. Bu antikör yardımıyla belirli bir hücre popülasyonunda büyüme fraksiyonunu tespit etmek mümkündür. Proliferasyon indeksi kabaca tümör grade'lemesi ile korelasyon gösterir ve bazı tümörlerin ayırıcı tanısında önemlidir. Tümörlerde Ki-67 ile büyüme fraksiyonlarını göstermenin sadece diagnostik bir önemi yoktur, aynı zamanda birçok kanserde bağımsız bir prognostik değere sahiptir (23-25). Larinks skuamöz hücreli karsinomlarında hücre proliferasyonunun prognozdeki önemi tartışmalıdır. Literatürde larinks skuamöz hücreli karsinomlarında yüksek Ki-67 proliferasyon indeksinin kötü prognostik gösterge olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır (18,26,27). Bazı çalışmalarda ise survi ile ilişkisinin olmadığını işaret edilmektedir (16,19,21).

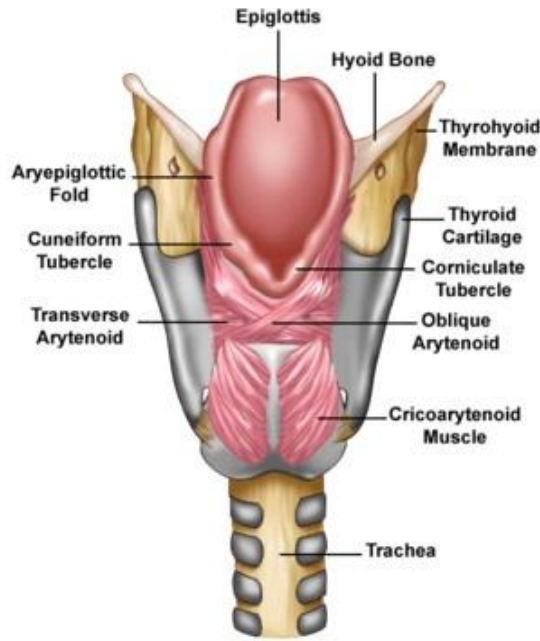
Bu çalışmadaki amacımız daha önceki yapılan çalışmalara ilave olarak larinks karsinomlarında HPV varlığını hem immünohistokimyasal yöntemlerle hem de PZR yöntemiyle araştırmaktır.

Beklenen yararlar HPV'nin larinks skuamöz hücreli karsinomları ile p53 ve Ki-67 markerlarının klinikopatolojik parametrelerle ilişkisinin gösterilmesi, larinks karsinomlarının davranış biçimini önceden belirleyebilmek ve tedavi yöntemlerinin en uygun şekilde kullanılmasının sağlanmasıdır.

## GENEL BİLGİLER

Larinks solunum yollarının bir parçasını oluşturup boynun ön orta bölümünde hiyoid kemiğin altında yer alır. Larinks kıkırdak, kas ve fibroelastik bağlardan oluşur (Şekil 1). Solunum, fonasyon ve alt solunum yollarının korunması gibi görevleri üstlenir. Larinks servikal 3-6 vertebralar arasına yerleşmekle beraber kadınlarda ve çocuklarda biraz daha yukarıdadır.

Larinksin iskeleti üçü tek ve üçü çift olmak üzere dokuz adet kıkırdaktan oluşur. Tek kıkırdaklar; tiroid, krikoid ve epiglot kıkırdaklardır. Çift kıkırdaklar; aritenoid, kuneiform ve kornikulat kıkırdaklardır (28).



Şekil-1: Larinksin Genel Anatomik Görüntüsü

### 2.1. Larinks Embriyolojisi, Anatomisi, Histolojisi ve Fizyolojisi

## **Larinks Embriyolojisi**

Larinks ve trakeobronşiyal ağacın embriyolojik gelişimi 4. haftada median laringotrakeal yarık şeklinde farinks ventral duvarından başlar. Yarık derinleşir ve kenarları bir septum olacak şekilde kaynaşarak laringotrakeal tüpü oluşturur. Oluşan tüp respiratuvar epitelin geliştiği endoderm ile kaplanır. Kranial uçtan larinks ve trakea gelişirken, kaudal uçtan iki lateral çıkıntı oluşarak bronşlar , sağ ve sol akciğer lobları gelişir (29).

Larinks döşeyen epitel endoderm kökenli olmasına karşılık, kıkırdak ve kasları ile dördüncü ve altıncı faringeal arkus mezenşim kaynaklıdır. Bu mezenşimin hızla proliferasyonu sonucu, laringeal orifisin görünümü, sagittal bir yarıktan T şeklindeki bir açıklığa dönüşür. Daha sonra bu iki arkusun mezenşimi tiroid, krikoid ve aritenoid kıkırdaklara dönüştüğünde laringeal orifisin karakteristik erişkin yapısı tanınabilir hale gelir (30,31). Larinks kıkırdakları dördüncü ve altıncı faringeal arkustan farklılaşır. Kıkırdakların oluşumu sırasında, laringeal epitel de hızla çoğalarak lümenin geçici olarak tıkanmasına neden olur. Larinks rekanalizasyonu onuncu hafta civarında gerçekleşir. Vakuolizasyon ve rekanalizasyonun ardından, laringeal ventrikül adı verilen bir çift lateral çukur oluşur. Bu çukurlar, ileride yalancı ve gerçek vokal kordlara farklılaşacak olan doku katlantılarıyla çevrelenmiştir (30-32). Epiglottis üçüncü ve dördüncü faringeal arkusların proliferasyonu sonucu gelişen hipobrankiyal kabartıdan farklılaşır. Larinks ve epiglottis gelişimlerini doğumdan sonra üç yaşına kadar devam ettirirler. Orjin olarak farklı olan supraglottik kompartman ile glottik ve subglottik kompartman arasında histolojik olarak gösterilen bir bariyer mevcuttur. Bu anatomik bariyer larinks kanserlerinin büyüme ve yayılmasını etkilemektedir.

## **Larinks Anatomisi**

### *Larinks Kıkırdakları*

Tiroid kıkırdak, larinksin üst ve ön parçasını oluşturur. En geniş ve en büyük kıkırdağı olup larinksin yumuşak doku elemanlarını taşır. Hava yolunun açık kalmasını sağlar. Epiglot ince yaprak şeklinde fibroelastik tek kıkırdaktır. Dil kökü ve hyoidin arkasındadır. Larinksin üst ön duvarının bir parçasını yapar. Üst kenarı geniş yuvarlak ince aşağı doğru daralır ve petiolus denilen ince uç şeklini alır. Epiglottisin arka yüzünde muköz bezler içeren çok sayıda küçük çukur ve delikler bulunur. Krikoid kıkırdak larinksin aşağı kısmında yer alır. Tam bir halka şeklinde ve tek kıkırdaktır. Krikoidin ön parçası ark şeklinde ve dardır. Arka kısmı ise geniş bir laminadan oluşur. Aritenoidler üç yüzlü piramide benzeyen küçük bir

Çift kıkırdaktır, krikoid kıkırdak ile eklem yapar. Kornikulat kıkırdak aritenoid kıkırdakların tepesine yerleşen koni şeklinde iki küçük kıkırdaktır. Kuneiform kıkırdak ariepiglottik plika içine yerleşen elastik kıvamda ve silindirik bir kıkırdaktır.

#### *Larinksin membranları*

Tirohyoid membran tiroid kıkırdak ile hyoid kemik arasında uzanır. Bu membranın lateralindeki boşluktan arter, ven ve sinirler geçer. Konus elastikus krikoid kıkırdaktan vokal ligamente uzanan elastik bir membrandır. Glottik ve subglottik alanı paraglottik mesafeden ayırır. Kuadrangüler membran aritenoid kıkırdak ve epiglot arasında uzanan ince submukozal bağ dokusundan oluşur. Krikotiroid membran tiroid kıkırdak alt kenarından krikoid kıkırdak üst kısmına uzanır (33).

#### *Larinks Eklemleri*

Larinks kıkırdakları birbirlerine sinoviyal tipte eklemler ile bağlanırlar. Krikotiroid eklem tiroid ve krikoid kıkırdaklar arasında yer alır. Tiroid kıkırdağın rotasyon ve kayma hareketlerini sağlar. Krikoaritenoid eklemden iki hareket gerçekleşebilir, birincisi aritenoid kıkırdakların vertikal eksen çevresinde yaptıkları rotasyon hareketidir. Böylelikle vokal prosesler içe veya dışa doğru hareket edebilirler. İkincisi kayma hareketidir. Kayma hareketi aritenoid kıkırdakların hafifçe öne-arkaya ya da içe dışa hareketine izin verir (29).

#### *Larinksin Kasları*

Ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki grupta incelenirler. Ekstrinsik kaslar komşu yapılardan larinkse uzanan hyoid altı ve hyoid üstü kaslardır. Larinksin pozisyonunu ayarlarlar. Omohyoid, sternohyoid ve sternotiroid kaslar inspiyum sırasında larinksi aşağı çekerler. Stilohyoid, digastrik, milohyoid, geniohyoid, tirohyoid ve stilofaringeus kasları yutma sırasında larinksi yukarı kaldırır. İntrinsik kaslar larinks kıkırdakları arasında uzanırlar. Bu kasların hareketi sonucunda ses tellerinin durumu değişir. Krikoaritenoid posterior rima glottisi açar. Krikoaritenoid lateralis kası, tiroaritenoid kas, interaritenoid kaslar ise rima glottisi kapatır. Krikotiroid kas plika vokalisi uzatır ve gerginliğini sağlar (33,34).

#### *Cavitas Larinks*

Larinks plika vestibularis ve plika vokalisler ile birbirinden ayrılan üç kompartmandan oluşur: vestibül, ventrikül ve infraglottik kavite. Vestibül, epiglotun uç kısmı ile vestibüler kıvrım arasında kalan kısımdır. Üst bölümü geniş, alt bölümü dardır (33,34).

Ventrikül larinks boşluğunun ortada kalan en küçük bölümüdür. Gerçek ve yalancı vokal kordlar arasındadır. Ventrikülün ön kısmında laringeal sakkül denilen cep şeklinde bir kese bulunur. Laringeal sakkül tiroid kıkırdak ve vestibüler kıvrım arasında yukarıya doğru uzanır. Buraya müköz bezler açılır (33,34). İnfraglottik kavite ise larinks boşluğunun gerçek vokal kordlardan krikoid kıkırdak alt kenarına kadar uzanan bölgedir (33,34).

Vokal kordlar ses oluşumu ile ilişkilidirler. Aritenoid vokal proçesi ile ön komissür arasında bulunur. Vokal kıvrımlar arasındaki açıklık rima glottis olarak adlandırılır (33,34). Vestibüler kıvrımlar tiroid ve aritenoid kıvrımlar arasında bulunur. Ses oluşumunda rolleri az veya yoktur. Yalancı vokal kord olarak da adlandırılırlar. Bu kıvrımlar arasındaki açıklık rima vestibuli olarak adlandırılır. Yutma sırasında larinksin kapanarak yiyeceklerin solunum yollarına kaçmamasına katkıda bulunur (33,34).

#### *Larinksin Damar ve Lenfatikleri*

Larinks besleyen arterler A. laringea superior (A. tiroidea superior'un dalı) ve A. laringea inferior'dur (A. tiroidea inferior'un dalı) (34). Venleri arterler ile birlikte uzanır. V. laringea superior, V. tiroidea superior'a bu da V. jugularis internaya açılır. V. laringea inferior ise V. Tiroidea inferior'a, bu da V. brakiosefalika'ya açılır (33).

Larinksin lenfatikleri derin ve yüzeyel olmak üzere iki gruba ayrılır. Yüzeyel lenfatikler tüm mukoza yüzey ağını oluşturur. Derin lenfatikler ise submukoza ve altındaki dokuları kapsar. Gerçek vokal kordlar birkaç lenfatik kanal içerir bu nedenle glottik karsinomlar nadiren bölgesel metastaz yaparlar. Kordlardan servikal lenfatiklere drenaj krikoid membran boyunca olur. Subglottik lenfatikler Delphian nodu ya da prelaringeal nod içine direne olur ve pretrakeal, paratrakeal ve supraklavikuler lenf nodlarına dökülür. Supraglottik larinks bukko-farengeal tomurcuktan gelişir, glottik ve subglottik larinks ise trakeobronşiyal tomurcuktan gelişir. Supraglottik alan lenfatiklerden zengindir ve bu drenaj tirohyoid membran boyunca üst servikal lenf nodlarına ve anterosuperior lenf grupları içinedir. Priiform sinüs lenfatiklerden zengin bir bölgedir. Drenajı lateral olarak derin servikal lenf nodlarına ve bazı durumlarda paratrakeal lenf nodlarına olur (35).

#### *Larinksin innervasyonu*

Larinks, X. kafa çifti Nervus (n.) vagus'un dalları olan n.laringeus superior ve n.laringeus inferior (n. rekürrens) tarafından innerve edilir. Plika vokalislerin üzerinde kalan larinks mukozasının innervasyonu n. laringeus superior'un internal dalı tarafından gerçekleştirilir. Plika vokalislerin altında kalan mukoza bölümü ise n. Laringeus rekürrens

tarafından innerve edilir. M.krikotiroideus hariç bütün larinks kaslarının motor siniri n. laringeus inferiordur. M. krikotiroideus ise n. laringeus superior'un r.eksternus'u tarafından innerve edilir (28).

### **Larinksin Histolojisi**

Larinksin epiteli lokalizasyona göre stratifiye skuamöz epitel ile psödostratifiye silialı silindirik epitel arasında değişiklik gösterir. Epiglotun lingual (anterior) kısmı stratifiye skuamöz epitle örtülüdür. Laringeal (posterior) kısmının üst kısmında stratifiye skuamöz epitel izlenirken alt kısmında solunum yolu epiteli izlenir. Histolojik olarak supraglottik bölge üst solunum yolunun büyük bir bölümüne benzer şekilde psödostratifiye silialı silindirik epitel ile döşelidir. Glottik bölgede, vokal kordlar stratifiye skuamöz epitel ile döşeli iken, subglottik bölgede vokal kordların kenarlarından aşağıya doğru psödostratifiye epitele dönüşmektedir (35,37). Reinke boşluğu, skuamöz epitelin tabanı ile vokal ligament arasında sınırlı olan gerçek vokal kordun yüzeyel lamina propriasına verilen addır (36,37). Reinke boşluğunda kapillerler ve serömüsinöz glandlar seyrek ve lenfatikler bulunmaz. Bu bölgedeki sınırlı damar yapısından dolayı, gerçek vokal kord yerleşimli tümörler lokalize kalma eğilimindedir ve radyoterapi, cerrahi tedaviye yanıt verirler (36).

Ön komissür gerçek kordların aksine belirgin kapillerler, lenfatikler ve serömüsinöz glandlar içerir. Gerçek kordlarda serömüsinöz glandlar daha belirgindir. Epiglotun elastik kıkırdaki fenestrasyonlar belirgin glandlarla doludur. Bu glandlar tamamı ile kıkırdak içine penetre olur ve supraglottik karsinomun yayılımı için hazır bir yol sağlar.

### **Larinks Fiziyojisi**

#### *Sfinkter(Koruma Görevi)*

Solunum ve sindirim yolları farinkste çapraz yapar. Bu da aşağı solunum yollarının korunmasını gerektirir. Yutma sırasında larinksin kapanması sıvı ve katı gıdaların akciğerlere kaçışına engel olarak en hayati görevini yapar. Larinksin kapanması ise rima glottisin kapanması, larinks vestibülünün kapanması ve epiglotun larinks lümenine eğilmesi olmak üzere üç aşamada olur. Ancak çeşitli nedenlerle epiglotu çıkarılan hastaların bir süre sonra yutmayı sorunsuz bir şekilde gerçekleştirebilmeleri epiglotun çok önemli bir rolü olmadığını göstermiştir.

### *Solunum fonksiyonu*

Larinks solunum yollarının bir parçası olarak görev yapar. Solunum sırasında gereksinime göre, larinks girişinin çapı değişir. İnspiryumda kordlar ayrılır. İnspirasyonun derinliğine göre rima glottis açıklığı genişler. Diafragma hareketi ile larinks açılır. Ekspiryumda larinks parsiyel olarak kapanır.

### *Fonasyon Görevi ve Konuşmadaki Rolü*

Larinksin en ileri fonksiyonu olarak kabul edilir. Konuşma fonksiyonu jeneratör sistem, vibratör sistem ve rezonatör sistemin kombine olarak çalışması ile oluşur. Ses oluşumu için değişik yorumlar yapılmıştır. Ewald'ın miyoelastik-aerodinamik teorisine göre kord vokallerdeki titreşim pasif olup sesin özelliği infraglottik basınca ve kordların gerilimine bağlıdır.

### *Yutmaya Yardımcı Rolü*

Yutma esnasında kasların sfinkter etkisi ile larinks girişi kapanır. Epiglotun yanlarından lokmanın özefagusa kayması sağlanır. Ayrıca yutma sırasında larinksin yükselmesi lokmanın özefagusa girişine yardımcı olur. Larinks girişinin dil kökü altında kalması ile lokma özefagusa gider.

### *Öksürük ve ekspektoratif fonksiyon*

Larinks öksürük ve balgamın dışarı atılmasına yardımcı bir rol üstlenir. Öksürük istemli veya refleks olarak istemsiz meydana gelebilir. Derin inspiyumla glottis kapanır. Ekspiryum kasları kasılarak intrapulmoner basınç artar. Glottis aniden açılır açılmaz hızla çıkan hava ile birlikte aşağı solunum yollarındaki sekresyonu veya yabancı partikülleri dışarı atar. Bu nedenle öksürük solunum yolları ve organları için koruyucu fonksiyon görür.

### *Emosyonel fonksiyonu*

Larinks kişinin ruhsal durumuna göre ( heyecan, üzüntü, ağlama, esneme hallerinde) ses değişiklikleri meydana getirir. Ses ve konuşmadaki değişiklikler kişinin emosyonel durumu hakkında fikir verebilir.

### *Dolaşıma yardımcı fonksiyon*

Trakeobronşiyal sistemde ve akciğer parankimindeki basınç değişikliklerinin etkisi ile kan dolaşımına etki yapar.

### *Fiksatif fonksiyon*

Rima glottisin kapanması ile toraks içine hava hapsedilir. İstemli olarak yapılan bu işlem ağır kaldırma ıkınma veya zorlanma hareketine yardım eder.

## **2.2.Larinks Kanserleri**

Sigara ve alkol kullanımı larinks kanserinde en önemli etiyolojik faktörlerdir (38-40) Sigara hem başlatıcı hem de ilerletici olarak etkili olan en yaygın çevresel etkindir (41). Kadınlarda sigara içenlerin oranı erkeklere oranla daha düşüktür (40). Pasif içicilerin de aynı riski taşıdığı düşünülmekte ise de henüz tam olarak kanıtlanmamıştır (40,42). Mesleki olarak asbest, ağır metaller, kömür tozu ve talaşa maruz kalma da larinks kanseri riskini artırmaktadır (41,43,44). Sebze ve meyvelerde bulunan vitamin C, folat ve flavonoidler gibi antioksidanların larinks kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir (41,43,44) Larinks kanserinde androjenlerin karsinojenik etkili, östrojenlerin koruyucu etkili olduğu ileri sürülse de bu görüşü destekleyen yeterli kanıt yoktur (36). Düşük sosyoekonomik durum, laringeal papillomatozis ve aile öyküsü varlığı diğer etiyolojik faktörler arasındadır (43,38). Gastroözefagial reflüye bağlı larinkste ortaya çıkan kronik inflamasyon kronik larenjit ve kanser için etiyolojik faktör olarak ileri sürülmüştür (40). Baş ve boyun SHK'de HPV 16, 18, 31, 33 gibi serotiplerin varlığı saptanmıştır. Bu serotipler p53 ve retinoblastom tümör supresör genlerini inaktive ederek karsinogeneze katılan E6 ve E7 viral onkoproteinlerini üretirler. Larinks kanserinde HPV enfeksiyonunun etkisi hala tam anlaşılamamıştır (40).

### *Larinksin Benign Tümörleri*

Papillomlar çocuklarda (juvenil tip) ve adölesanlarda (adult tip) görülen soliter veya multipl, papiller, benign tümörlerdir (45,46). Benign larinks tümörlerinin %80'ini oluştururlar (47). Özellikle juvenil tipin tedavisi çok güç ve sıkıntılıdır. Genellikle vokal kordları tutmakla beraber yalancı korda, epiglottise, supraglottik ve subglottik bölgeye, çok nadiren de trakea ve bronşlara yayılabilir (48). Çok süratle gelişerek larinks obstrüksiyonuna neden olabilirler. Önceleri enfeksiyona bağlı olduğu düşünülmüştür. Daha sonra yapılan çeşitli İHK ve diğer ileri araştırma yöntemleriyle papilloma virüs gösterilmiştir. Laringeal papilloma eşlik eden HPV tipleri düşük riskli HPV tipleri olan HPV 6 ve HPV 11'dir



(45,46,8). Nadiren HPV 16, 18, 31, 33, 35 ve 39 ile de papillom görülebilir. Skuamöz mukozada parmak benzeri papiller veya akantotik büyüme paterninden oluşan mikroskopik görünüm mevcuttur. Fibrovasküler bir merkez içerir (49). Mitotik aktivite, değişik derecelerde koilositoz ve nükleer atipi görülür (50-52). Bu tümörlerde uzun periyotta tekrarlama oranı yüksektir (51). Rekürrensler nadiren trakeostomi ağzı ve yumuşak dokuya yayılabilir, karotid arterin etrafını sarabilirler. Bu tür proses “invazif papillomatozis” olarak adlandırılır (50-53). Laringeal papillomatozisli olgularda özellikle yüksek riskli HPV varlığında malign transformasyon görülebilir ve ilgi çekici olarak bu olgular papillom nedeniyle önceden radyoterapi almıştır (48). Bir çalışmada laringeal papillomatozisli olgularda malign transformasyon görülme oranı % 3-7 olarak bildirilmiştir (8). Juvenil başlangıçlı respiratuar papillomatozisli vakalarda pulmoner skuamöz hücreli karsinom gelişiyorsa bu vakalarda malign tümörle birlikte HPV 11 de gösterilmiştir (50,51,53).

Erişkin laringeal papillomlar erkeklerde daha fazla görülür, 20-40 yaşları arasında pik yapar. Genellikle soliter, yüksek derecede inflamatuvar reaksiyon gösteren, yayılma eğilimi göstermeyen, juvenil forma göre daha az görülen lezyonlardır. Juvenil formlarda olduğu gibi HPV 6 ve 11 içerirler. Keratozis: “Basit hiperplazi, epitelyal hiperplazi, skuamöz hiperplazi, lökoplaki” olarak da adlandırılır. En sık gerçek kordları ve interaritenoid bölgeyi tutar.

Displazi farklı derecelerde hücrel atipi, normal epitelde matürasyon kaybı ve stratifikasyon kaybı ile karakterizedir. Displazi hafif, orta veya şiddetli olarak derecelendirilir. Karsinoma in situ skuamöz epitelin tam kat tutulduğu lezyonlardır. Stromaya invazyon görülmez. DSÖ’nün yeni sınıflamasında şiddetli displazi ile karsinoma in situ (CIS) ayrı kategorilere alınmıştır. Ancak diğer birçok sınıflamada bu iki durum aynı gruba alınmıştır. Çünkü birbirinden ayırım oldukça zordur.

### *Larinks Tümörleri*

Larinks kanseri organizmadaki tüm malign tümörlerin % 2-3’ünü oluşturur. Baş boyun bölgesinde en sık görülen malign tümörler laringeal karsinomlardır ve yaklaşık olarak % 25 oranında görülür (46). Larinks kanserlerinin % 95’den fazlası skuamöz hücreli karsinomlardır (48). En önemli risk faktörleri sigara, alkol ve HPV enfeksiyonudur (46). Genellikle hayatın 5. dekadında veya daha sonra görülür ancak genç hastalar da bildirilmiştir. Hastaların % 96’sı erkektir. Glottik bölgedeki tümörlerde en önemli belirti ses kısıklığıdır. Laringeal karsinomlu hastalarda ikinci bir tümör (özellikle üst gastrointestinal sistem ve akciğer) gelişme riski artar (49).

Klasik tip skuamöz hücreli karsinom, keratin oluşumu ve/veya interselüler köprülerin varlığı ile karakterize, skuamöz diferansiyasyon gösteren bir malign epitelyal tümördür. Histolojik derecelendirme; iyi, orta ve kötü diferansiye olmak üzere üç grupta yapılır. Çoğu supraglottik ve glottik yerleşimli olup, iyi ve orta derecede diferansiyedir. Subglottik bölgedeki karsinomlar ise orta ve kötü diferansiyedir. Genel olarak tümör boyutu küçükse diferansiyasyon daha iyi olmaktadır (51).

Mikroinvaziv skuamöz hücreli karsinom bazal membranın hemen altındaki alanda seyrek olarak dağılmış hücrelerden veya küçük tümör odaklarından oluşur.

Papiller tip skuamöz hücreli karsinom: Egzofitik büyüme paterni sergileyen, fokal invazyon odağı içeren, skuamöz hücreli karsinom varyantıdır. Verrüköz karsinomdan sitolojik atipisi ile ayrılır. Klasik SHK vakalarına göre belirgin derecede HPV ile birliktelik söz konusudur. Prognozu iyidir (51).

Verrüköz karsinom: ÜSY'nin nadir görülen bir tümörüdür. Larinks kanserlerinin yaklaşık %1-3'ünü oluştururlar. Papillomatöz görünümü yavaş büyümesi, lokal invazyonu metastazının olmaması gibi özellikleri mevcuttur. Papillom virüsünün etyolojik faktör olabileceği koilositlerin varlığı nedeniyle düşünülmüştür (47).

Larinksin diğer tümörlerinden küçük hücreli (nöroendokrin) karsinom nadir olup tüm vakaların % 0,5'inden daha azını oluşturur. Bazaloid karsinom oldukça agresif bir tümördür. Ağır sigara içicilerde daha sık görülür (51). Lenfoepitelyoma-benzeri karsinom, adenokarsinom, sarkomatoid karsinom (iğsi hücreli karsinom, karsinosarkom) laringeal polibe benzeyen bir yapısı vardır. Çoğu supraglottik yerleşimlidir (51).

Larinksin tükrük bezi tümörlerinden en sık görülen tipi adenoid kistik karsinomdur. Paraganglioma genellikle supraglottik bölgede lokalize olup aynı taraf ariepiglottik folda yayılım gösterir.

Larinksin az görülen tümörleri ise hemanjiyom, anjiyosarkom, granüler hücreli tümör, myofibromatozis, rabdomyom, rabdomyosarkom, leiomyom, kıkırdak tümörleri, osteosarkom, liposarkom, malign fibröz histiyositom, malign melanom, lenfoid tümörlerdir (51).

#### *Larinks Tümörlerinin Lokalizasyonlarına Göre Tipi, Yayılımı ve Tedavisi*

Lokalizasyonlarına göre 4 gruba ayrılır:

Glottik bölge vokal kordlar, ön ve arka kommissurdan oluşur (Şekil 2). Bu bölge tümörleri tüm vakaların yaklaşık % 60'ını oluşturur (54). En sık lokalizasyon glottisin ön 1/3'üdür. Etrafını çevreleyen kıkırdak duvar ve lenfatik damarların azlığı nedeniyle bu lokalizasyondaki tümörler uzun süre lokalize kalırlar. Zamanla; ön komissürden karşı korda,

posteriordan aritenoide, superiordan supraglottik bölgeye, inferiordan subglottik alana, anteriordan tiroid kıkırdağa penetrasyon gerçekleşebilir. Profilaktik lenf nodu diseksiyonu gerekmez. Erken lezyonlarda radyasyon tedavisi ile oldukça başarılı sonuçlar alınmaktadır. Radyasyon tedavisinin başarılı olmadığı durumlarda cerrahi tedavi uygulanır. Gerçek kordun yüzeysel invazif skuamöz epitel hücreli karsinomları endoskopik veya laringofissür yolla kordektomi ile tedavi edilebilir. İleri evrelerde tedavi larenjektomidir.

### **Resim 1: Glottik Karsinom**

Supraglottik bölge ventriküler bandlar, aritenoid bölge, suprahoid ve infrahyoid bölge, epiglot, ariepiglottik fold ve preepiglottik boşluktan oluşur. Bu bölge tümörleri tüm vakaların yaklaşık % 40'ını oluşturur (54). Bu tümörlerde preepiglottik mesafeye yayılma eğilimi belirgindir. Ancak orofarinks kalın hyoepiglottik ligament tarafından korunmuştur. Supraglottik tümörlerin sadece % 1'i glottisi invaze eder. Kıkırdak invazyonu da nadirdir. Supraglottik bölge lenfatik ağdan zengindir ve bu nedenle lenf nodu metastazları fazladır. Ortalama lenf nodu metastazı %40'tır. Tedavisi supraglottik larenjektomi ve radyoterapidir.

Subglottik bölgenin üst sınırı gerçek vokal kordların serbest kenarının 0,5 cm aşağısından başlar. Bu bölge tümörlerinin sıklığı % 1'den azdır (54). Bu bölge de lenfatiklerden zengindir. Krikoid kıkırdağa lateral yayılım kuraldır. Zayıf intertirokrikoid membranın tümörle destrüksiyonu, prelaringeal duvarın invazyonu ve tiroid glandın invazyonu sık görülür. Trakeaya yayılım sık olduğu için, mümkün olduğunca distalden rezeke edilmelidir. Servikal lenf nodu metastazı % 15-20, paratrakeal lenf nodu metastazı % 50'dir. Bu nedenle radikal lenf nodu diseksiyonu uygulanmalıdır (51).

Transglottik tümörler vakaların % 5'inden daha azını oluşturur (54). Laringeal ventrikülü dikey olarak tutan tümörlerdir. Lenf nodu metastazı insidansının (% 52) en yüksek olduğu gruptur. Diğer bölgelere göre daha agresif seyreder. Total larenjektominin yanında elektif lenf nodu diseksiyonu da yapılmalıdır.

### *Larinks Tümörlerinde Evreleme*

Tümörün yerleşimini, uzanımını ve metastaz yaptığı alanları tam tarif edebilmek için anatomik yayılımı baz alan, kanserin klinik ve biyolojik özelliklerini içermeyen American Joint Committee on Cancer'ın 2002 yılında modifiye etmiş olduğu evreleme kullanılmaktadır (49).

#### **Primer tümör (T)**

Tx: Tümör değerlendirilemedi

To: Primer tümör yok (klinik, radyolojik ve patolojik tetkikler yapılmış ve tümör bulunamamış)

Tis: Karsinoma in situ

#### **Supraglottik tümör**

T1: Tümör supraglottisin bir alt bölgesine sınırlıdır, vokal kord hareketleri normaldir.

T2: Tümör supraglottisin birden fazla alt bölgesinin mukozasını veya glottisi veya supraglottis dışındaki bir bölgeyi (örneğin dil kökü mukozası, vallekula, piriform sinüs medial duvarı) tutmuştur, kord hareketleri kısıtlıdır.

T3: Tümör larinks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır ve/veya post-krikoid bölge, preepiglottik dokular, paraglottik alan invazedir ve/veya minör tiroid kıkırdak invazyonu vardır.

T4a: Tümör tiroid kıkırdağı tam kat invaze etmiştir ve/veya larinks dışı dokulara taşmıştır (örneğin trakea, dilin derin ekstrasik kasları, prelarengeal kaslar, tiroid veya özefagus gibi boyun yumuşak dokuları).

T4b: Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir.

#### **Glottik tümör**

T1: Tümör vokal kordlara sınırlıdır ve kord hareketleri normaldir (anterior veya posterior komissür invazyonu olabilir).

T1a: Tümör tek bir vokal korddadır.

T1b: Her iki vokal kordda da tümör mevcuttur.

T2: Tümör supraglottis ve/veya subglottise uzanmakta ve/veya kord hareketleri kısıtlanmaktadır.

T3: Tümör larinks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır ve/veya paraglottik alan invazyonu vardır.

T4a: Tümör tiroid kıkırdağı tam kat invaze etmiştir ve/veya larinks dışı dokulara taşmıştır

(örneğin trakea, dilin derin ekstrinsik kasları, prelarengeal kaslar, tiroid veya özefagus gibi boyun yumuşak dokuları).

T4b: Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir.

### **Subglottik tümör**

T1: Tümör subglottise sınırlıdır.

T2: Tümör vokal kordlara uzanmakla birlikte kord hareketleri normal veya kısıtlanmıştır.

T3: Tümör larinks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır.

T4a: Tümör tiroid kıkırdağı tam kat invaze etmiştir ve/veya larinks dışı dokulara taşmıştır. (örneğin trakea, dilin derin ekstrinsik kasları, prelarengeal kaslar, tiroid veya özefagus gibi boyun yumuşak dokuları).

T4b: Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir.

### **Bölgesel lenf nodları (N)**

Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilememektedir.

No: Bölgesel lenf nodu metastazı yoktur.

N1: En büyük çapı 3 cm'yi geçmeyen tek bir ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır.

N2a: En büyük çapı 3-6 cm. arasında tek ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır.

N2b: Hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen multipl ipsilateral lenf nodlarında metastaz vardır.

N2c: Hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen bilateral veya kontralateral lenf nodlarında metastaz vardır.

N3: Bir lenf nodunda 6 cm'den büyük metastaz vardır.

### **Uzak metastazlar (M)**

Mx: Uzak metastazlar değerlendirilememektedir.

Mo: Uzak metastaz yoktur.

M1: Uzak metastaz vardır

### **Evreleme**

Evre 0: Tis N0 M0

Evre 1: T1 N0 M0

Evre 2: T2 N0 M0

Evre 3: T3 N0 Mo / T1,2,3 N1 M0

Evre 4a: T4a N0 M0 / T4a N1 Mo / T1,2,3,4a N2 M0

Evre 4b: T4b Herhangi N M0 / Herhangi T N3 M0

Evre 4c: Herhangi T / Herhangi N M1

Larinks karsinomlarında 5 yıllık yaşam oranı; glottik tümörlerde % 80-85, supraglottik tümörlerde % 65-75, subglottik tümörlerde % 40 ve transglottik tümörlerde % 50'dir (49).

### **Human Papilloma Virüs**

Human papilloma virüs (HPV) Papova viridea ailesinden DNA grubu bir virüstür. 200'ü aşkın tipi olduğu bilinmektedir (55). Moleküler biyolojik çalışmalar HPV'a bağlı karsinogeneze spesifik mekanizmaların rol oynadığını göstermekte ve HPV enfeksiyonu ile baş ve boyun kanserleri arasında bir bağlantı olabileceği düşünülmektedir (11,56).

Uzun zamandan beri sigara ve alkol ile larinks kanseri arasındaki ilişki bilinmektedir. Ayrıca diyet, oral hijyen vb faktörlerin hastalığa predispozisyon oluşturduğuna dair görüşler ortaya atılmaktadır. Larinks kanseri ile hereditenin ilişkisini aydınlatmak amacıyla hayvan deneyleri de yapılmış ve son yıllarda yapılan çalışmalarda diğer faktörlere ek olarak HPV enfeksiyonları üzerinde durulmaya başlanmıştır. 1993 yılında Shope'un (10) tavşanlarda papillomavirüs enfeksiyonlarının ardından keratinöz lezyonların oluşturduğunu ve bunların bir kısmının da epitelial neoplazmlara dönüştüğünü göstermesi sayesinde DNA virüslerinin memelilerde tümör oluşturabileceği anlaşılmıştır.

İleri araştırmalar göstermiştir ki bazı sfesifik HPV tipleri serviks uteri, vulva, penis, konjonktiva ve üst solunum-sindirim sisteminin premalign ve malign bir çok lezyonu ile ilişkilidir (11,12). Virüsün tespitinde kullanılan yöntemler elektron mikroskopisi, immünhistokimyasal boyama, hibridizasyon teknikleri (Southern Blot, dot blot ve insitu hibridizasyon) ve 'Polimeraz Zincir Reaksiyonu' (PZR) tekniğidir.

HPV ve skuamöz hücreli kanserler arasında öngörülen bu sebep - sonuç ilişkisi virüsün varlığının yüksek risk göstergesi olabileceğini düşündürmektedir. Brandwein ve ark. (13) laringeal tümörlerde HPV DNA'sının kötü prognozun göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. Literatürde buna benzer pek çok araştırmada baş-boyun bölgesindeki kanserlerde HPV sıklığı araştırılmış ve ortalama % 34.5'lik pozitif sonuç tespit edilmiştir. Ancak seçilen tümör grubunun lokalizasyonu, kullanılan metod ya da hasta özelliklerine göre % 7 ila 59'lik geniş bir yelpaze ortaya çıkmıştır.

HPV; papova virüs ailesinden küçük, zarfsız, ikozahedral DNA virüsüdür (57). Skuamöz epitelial hücrelerin nükleusunda çoğalır. Çift zincirli DNA'ya sahiptir (58). HPV genomu 6.500-8.000 baz çiftinden oluşmakta ve sekiz adet açık okuma çerçevesi (open

reading frame) içermektedir. Bunlar E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1, L2'dir. E grubu erken (early), L grubu ise geç (late) fonksiyonları yansıtmaktadır (59,60).

HPV ler yaptıkları hastalıklarla ilişkilendirildiğinde yüksek riskli olanlar; 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68, 73, 82 düşük riskli olanlar; 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 62 ve olası yüksek riskli olanlar; 26, 53, 66 olarak 3 gruba ayrılabilir.

### **p53 Geni**

p53 geni, 53 kDa ağırlığında, 17. kromozomun kısa kolunda (17p13.1) yerleşen tümör supresör gendir (61). İlk tanımlandığı yıllarda sadece bir onkogen olarak görev yaptığı düşünülen p53 geninin daha sonraki çalışmalarda birçok tümörde mutasyona uğrayan bir tümör baskılayıcı gen olduğu kanıtlanmıştır (62). G1 fazında hücre büyümesini frenlemek, apoptozis yoluyla hücre ölümünü sağlamak, hücre diferansiyasyonunu indüklemek gibi hücre siklusunda önemli fonksiyonları vardır (63,64).

p53 geni, DNA replikasyonu, hücre proliferasyonu ve hücre ölümünü kontrol eder. Normal p53 geni (wild tip) genetik hasar taşıyan hücrelerin çoğalmasını önleyen nükleer bir fosfoproteini kodlar. Fizyolojik koşullarda p53 proteininin 6–20 dakika gibi kısa bir yarı ömrü vardır ve normal hücre bölünmesi için gerekli değildir. Hücre kimyasal madde, radyasyon gibi mutajenik ajanlarla karşılaştığında DNA'da bir zedelenme olursa, p53 proteininde değişiklikler olur ve normalde çok kısa yarı ömürlü olan p53 stabilize olarak hücre nukleusunda birikir. Biriken normal p53 DNA'da spesifik bölgelere bağlanır ve hücre siklusunun G1 fazında duraklamasını sağlayarak DNA'nın onarılması için hücreye zaman tanımış olur. Eğer bu süre içinde DNA onarımı yapılamazsa p53 DNA hasarı içeren bu hücrelerin proliferasyonunu engelleyerek hücre ölümüne neden olur ve bu şekilde genetik hasarın yeni nesil hücrelere aktarılmasını engeller (65,66). DNA'da spesifik bölgelere bağlanan p53 transkripsiyon (kopyalama) faktörü şeklinde etki eder (64). p53'ün hücre siklus regülasyonu, apoptozis, gelişim, farklılaşma, gen amplifikasyonu, DNA rekombinasyonu, kromozomal ayrışma ve hücre yaşlanma gibi olaylarda rolü olduğu gösterilmiştir (67,68). p53 genindeki fonksiyon kaybı nokta mutasyonu, delesyon, viral veya hücre onkogenler aracılığı ile olabilir. Nokta mutasyon sonucunda konformasyon değişikliği olan ve stabilitesi artan p53 proteininin yarı ömrü 3–6 saate kadar uzar. Bu nedenle normal p53'ten farklı olarak immunhistokimyasal yöntemle saptanabilir. Mutant p53 DNA'ya bağlanamaz ve DNA hasarını takiben hücre siklusunun G1 fazında duraklamaya neden olamaz (64,69,70).

Delesyon ise p53 ekspresyonu ve protein fonksiyonunda azalmaya veya kayba neden olur (70).

p53 gen mutasyonları insan kanserlerinde izlenen en sık genetik değişikliktir (71,63,69,72,73,74). Kolon, meme, akciğer, mesane, beyin, uterus gibi pek çok organa ait tümörde p53 geninde mutasyon bildirilmektedir (75-79). p53 mutasyonu varlığında kolon, mide, meme, beyin, akciğer ve endometrium kanserlerinde hastalarda tedaviye yanıt ve sağkalım anlamlı şekilde kötü bulunmuştur (80). Meme, kolorektal, gastrik, endometrial karsinomlar, lenfomalar, lösemiler gibi kanser türlerinde p53'n aşıırı ekspresyonunun prognostik önemi olduğu gösterilmiştir (75,73,76,81). Yapılan çalışmalarda hücre kültürlerinde normal ve mutant p53 aşıırı ekspresyonunun kas, sinir ve lenfoid diferansiasyonda bozukluklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (82).

Baş ve boyun SHK'lerinde %39–80 oranında p53 mutasyonu bildirilmektedir (71,83,35,64). Premalign larinks lezyonlarında %40–80 oranında p53 ile boyanma izlenmiştir (64). p53 aşıırı ekspresyonunun prekanseröz ve malign larinks lezyonlarında proliferatif aktivite ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte larinksin prekanseröz lezyonlarında rölatif olarak yüksek frekansta p53 proteini saptayan gruplar da bildirilmiştir (84). Hirai ve ark. (85) p53 ekspresyonu ile histopatolojik bulgular arasında korelasyon saptayamamıştır. Bu sonuçlar larinksin prekanseröz lezyonlarında p53'n önemini belirtmede uyuşmazlıklar olduğunu göstermektedir. Antikanser ajanlara maruz bırakılmadan sonra tümör hücrelerinde p53 ekspresyonunun artması bu ilaçlara karşı hcreesel yanıtları tetiklemede p53'n rolü olduğunu destekler. Tümör hücrelerinde p53 fonksiyon kaybı kemoterapiye direnç ile ilişkilidir ve mutant p53, hücrelerin sitotoksik ajanlarla indüklenen apoptozise gidişini engeller (87).

### **Ki-67 Proliferasyon İndeksi**

İlk kez 1983'de Gerdes ve arkadaşları (86) tarafından, hücre siklus bağımlı nükleer proliferasyon belirleyicisi olarak tanımlanmıştır ve kortikal folliküllerin germinal merkez hücrelerinde, kortikal timositlerde, gastrointestinal mukozadaki boyun hücrelerinde, epidermisin bazal hücreleri gibi proliferatif hücrelerde eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu orjinal antikor sadece taze frozen kesitlerde çalışılmıştır, fakat ilk tanımlanmasından yaklaşık 10 yıl sonra formaline dirençli epitoplara tespit eden monoklonal antikorlar (MIB-1, MIB-3) geliştirilmiştir (86).

Ki-67, 345 ve 395 kilodalton ağırlığında iki molekülden oluşan, 10. kromozom üzerinde yerleşmiş, nonhiston nükleer bir proteindir. Hücre siklusunun G0 dışında kalan G1,



G2, M ve S fazlarında eksprese edilir. Hücre proliferasyonunu gösteren Ki-67 nükleer immünoaktivitesi ile tümör dokusundaki mitoz sayısı arasında iyi bir korelasyon vardır. Bu antikor yardımıyla belirli bir hücre popülasyonunda büyüme fraksiyonunu tespit etmek mümkündür. Proliferasyon indeksi kabaca tümör grade'lemesi ile korelasyon gösterir ve bazı tümörlerin ayırıcı tanısında önemlidir.

Tümörlerde Ki-67 ile büyüme fraksiyonlarını göstermenin sadece diagnostik bir önemi yoktur, aynı zamanda birçok kanserde bağımsız bir prognostik değere sahiptir (85-87). Larinks skuamöz hücreli karsinomlarında hücre proliferasyonunun prognozadaki önemi tartışmalıdır, çünkü yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Literatürde larinks SHK'ında, yüksek Ki-67 proliferasyon indeksinin kötü prognostik gösterge olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır (26,18,88,89,90). Bazı çalışmalarda ise survi ile ilişkisinin olmadığına işaret edilmektedir (16,19,21).

## **GEREÇ YÖNTEM**

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Kliniği'nde 1998-2010 yılları arasında larinks SHK nedeniyle opere edilen 47 hasta çalışmaya alınmıştır. Patoloji Anabilim Dalı arşivinden parafin bloklar seçilerek çıkarıldı. Bu parafin bloklardan elde edilen dokular ile İHK ve PZR çalışmaları yapıldı. Hastaların genel hastane dosyaları ve Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı tümör takip kartları taranarak klinik bilgiler kaydedildi.

Patolojik incelemede; %10'luk nötral tamponlu formalinde tespit edilerek, rutin doku takibi sonrası parafin bloklara gömülü bloklardan hazırlanan 4µm kalınlığında ve hematoxilen eozin boyalı preparatlar tekrar incelendi. Olgulara ait nekrozun olmadığı veya en az olduğu tümör içeren bloklar seçildi. İmmunhistokimyasal boyama Avidin-Biyotin kompleks sistemi (ABC) kullanılarak yapıldı. Bu yöntem için bloklardan hazırlanan 4µm kalınlığındaki kesitler poli-L-lysin (MicroSlides Snowcoat X-tra, Surgipath, Richmond, IL, USA) kaplı lamlara alınarak oda ısısında bekletildi. Tüm örneklerle primer antikorlar olan; panHPV, HPV-16, HPV-18, p53 ve Ki-67 immunhistokimyasal boyaları uygulandı.

### **İmmunhistokimyasal Boyama**

- 1- Poly-L-lysin kaplı lama alınan kesitler bir gece 37 derecelik etüvde bekletildi.
- 2- 30 dakika 56 derecelik etüvde bulan ksilolde, 15 dakika oda sıcaklığındaki ksilolde deparafinize edildi.
- 3-Azalan oranlarda alkol serilerinde rehidrate edildi.
- 4-Kesitler önceden hazırlanmış olan pH:7.2 olan phosphate-bufferd-saline(PBS) solüsyonunda beş dakika bekletildi.
- 5-Endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilebilmesi için, kesitlere %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatılarak beş dakika bekletildi.
- 6-Kesitler beş dakika PBS solüsyonunda yıkandı.
- 7-Sitrat Buffer (ph:6.0) solüsyon dolu kaplara yerleştirilerek mikrodalga fırında 750 watt'da beş dakika, 500 watt'da 2x5 dakika süre ile inkübasyon işlemi yapıldı. Böylece antijenin açığa çıkarılması sağlandı.
- 8-Kaynatmadan sonra kesitler oda ısısında soğumaya bırakıldı.
- 9-Kesitler beş dakika PBS solüsyonunda yıkandı ve kurulandı.
- 10-Her bir kesitin üzerine primer antikor solüsyonu dokuyu tamamen örtecek şekilde damlatıldı ve bir saat bekletildi.
- 11-Kesitler beş dakika PBS solüsyonunda yıkanarak bağlanmış antikorlar uzaklaştırıldı.
- 12-Biyotine bağlayıcı sekonder antikor eklendi ve 10 dakika bekletildi.

13-Kesitler beş dakika PBS solüsyonunda yıkandı ve kurulandı.

14-Kesitlere Streptavidin Peroksidaz solüsyonu damlatılarak 10 dakika beklendi.

15-Kesitler beş dakika PBS solüsyonunda yıkandı.

16-Renk verecek görüntüyü sağlamak amacı ile Diaminobenzidin tetraklorid, (DAB) damlatıldı ve kahverenk gözlenene kadar bekletildi.

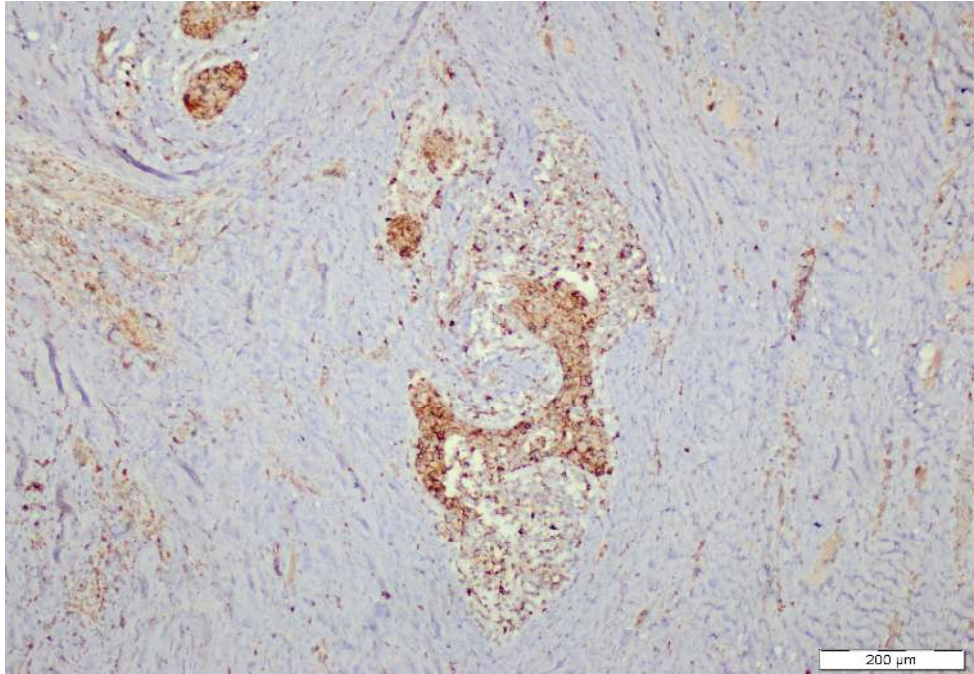
17-Çeşme suyunda beş dakika yıkandı.

18-Zemin boyanması için kesitlere hematoksilin ile zıt boyama yapıldı.

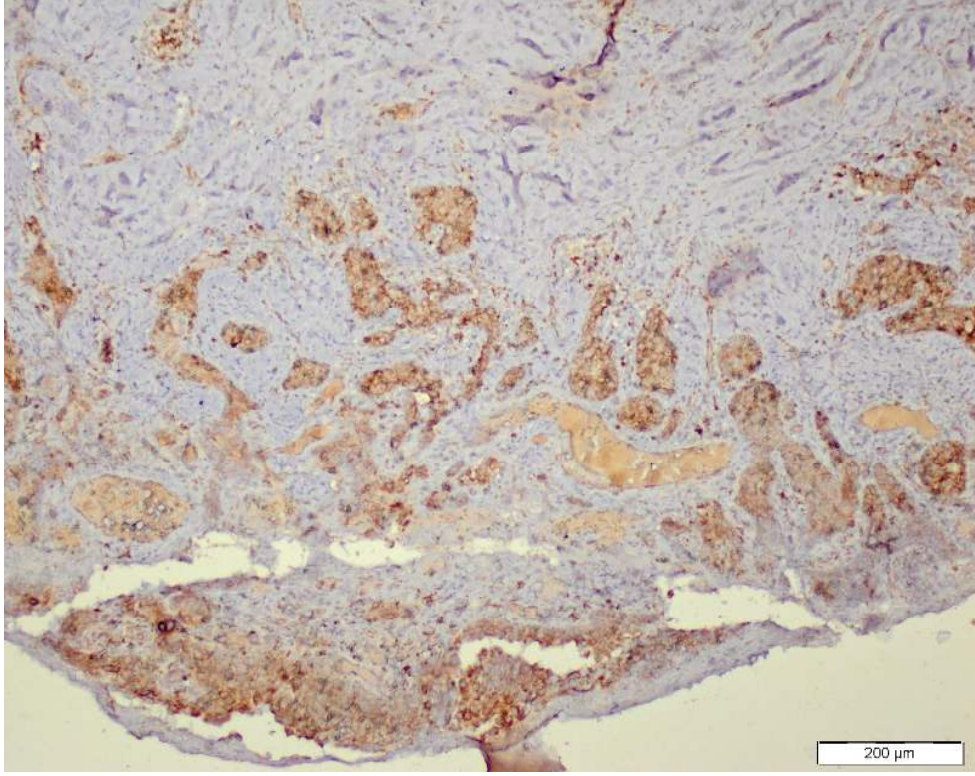
19-Çeşme suyunda beş dakika yıkandı.

20-Dehidratasyon için kesitler sırası ile yükselen oranlarda alkol serilerinden geçirildi ve ksilolde saydamlaştırma sonrası balsam ile kaplandı.

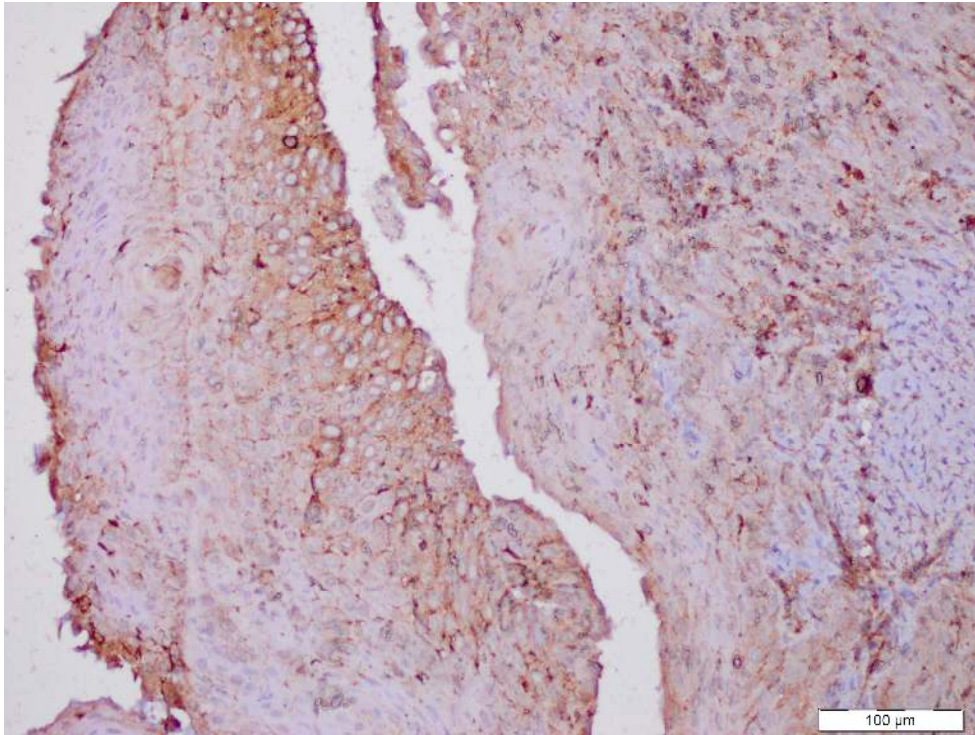
Pozitif kontrol için önceden pozitifliği bilinen dokular kullanıldı. Boyanma aşamasından sonra kesitler ışık mikroskobu (Olympus BX51, Tokyo, Japan) altında 4, 10, 20 ve 40'lık büyütmelemlerde incelendi. Tüm immunhistokimyasal boyalar için nükleer boyanma değerlendirildi. En yoğun boyanma gözlenen alanda en az 200 hücre sayıldı. Ki-67 ve p53 için %5'in altında boyanma: 0, %5-10 boyanma: "+", %11-20 boyanma: "++", %20 üstü boyanma: "+++" olarak skorlandı. PanHPV, HPV-16 ve HPV-18 için boyanma yok "0", fokal boyanma "+", yaygın boyanma "++" olarak semikantitatif olarak skorlandı. (Resim 2-11)



**Resim 2: PanHPV ile '+' boyanma x200**

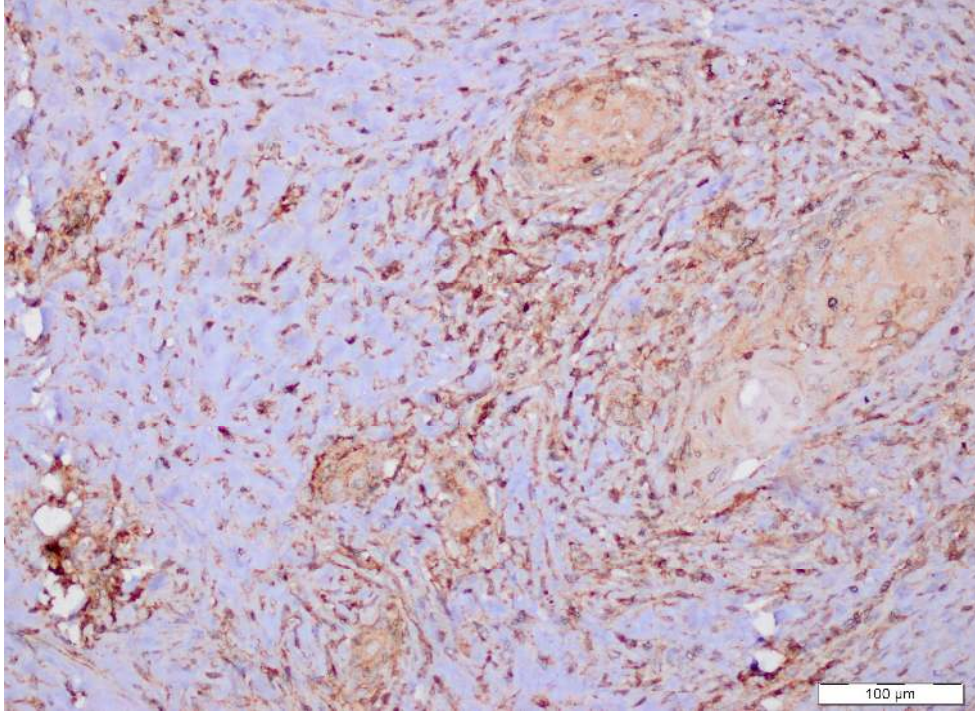


**Resim 3: PanHPV ile ‘++’ boyanma x200**

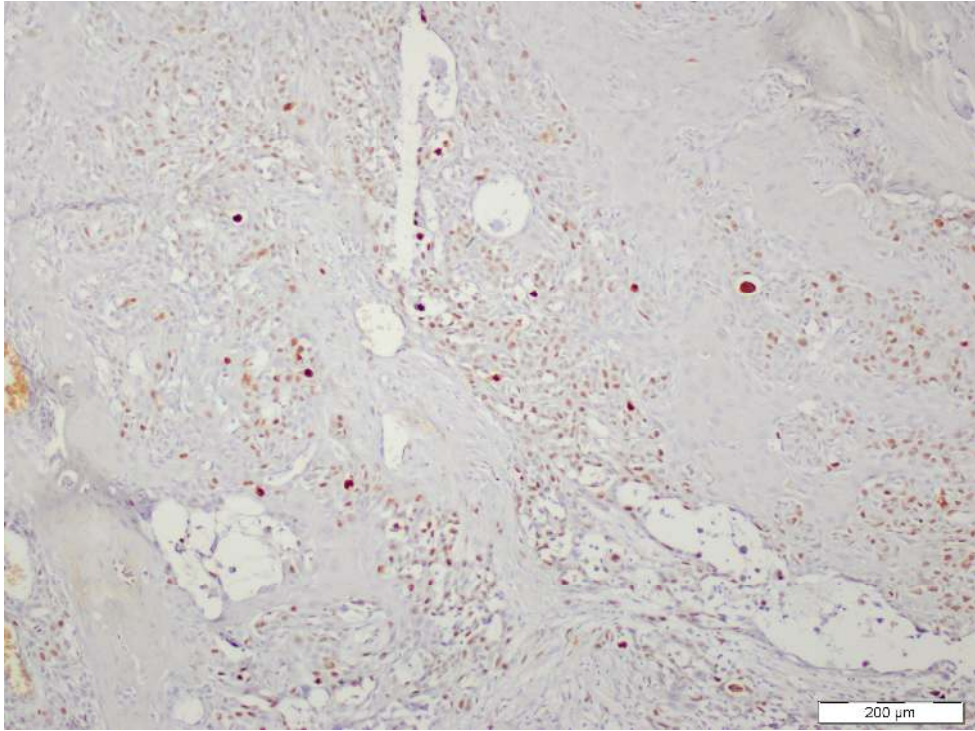


**Resim 4: HPV 16 ile ‘+’ boyanma x100**



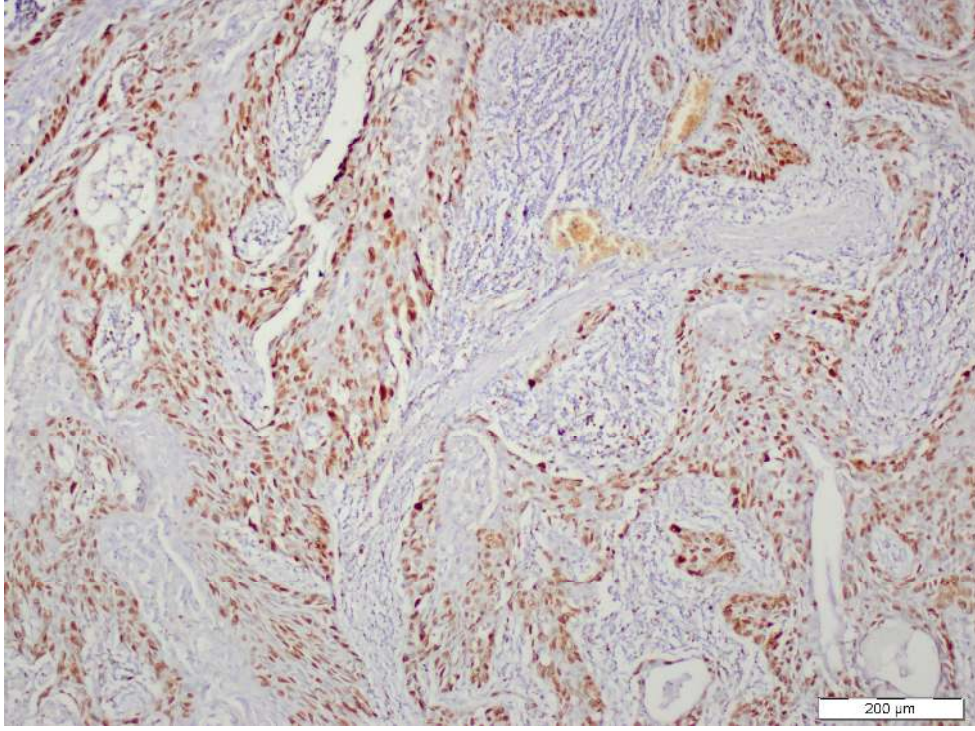


**Resim 5: HPV 16 ile ‘++’ boyanma x100**

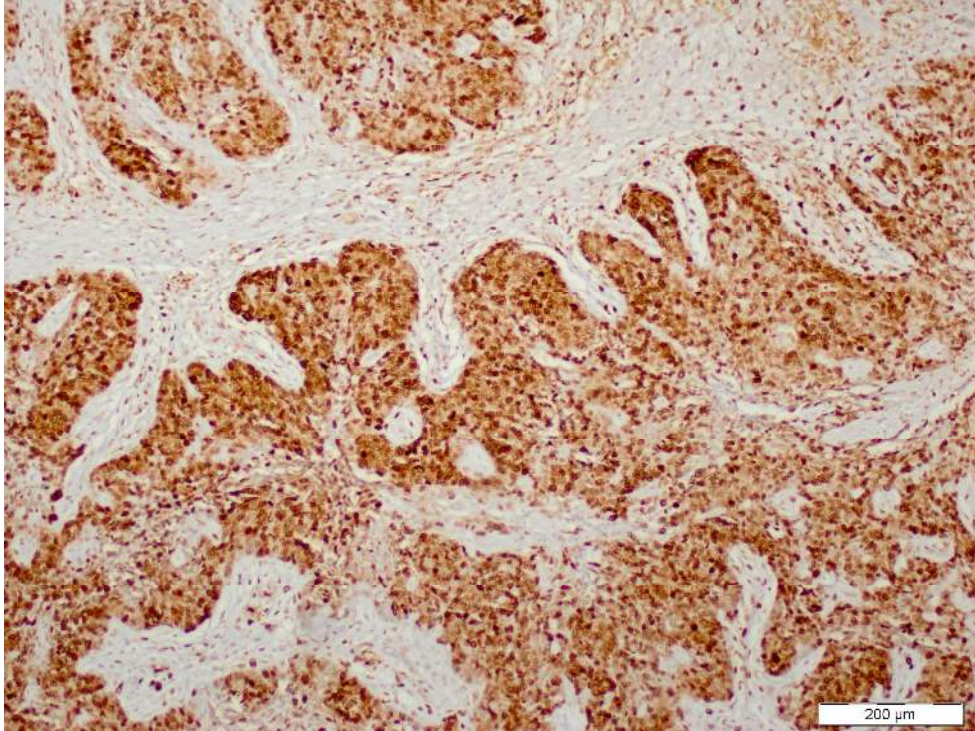


**Resim 6: Ki-67 ile ‘+’ boyanma x200**



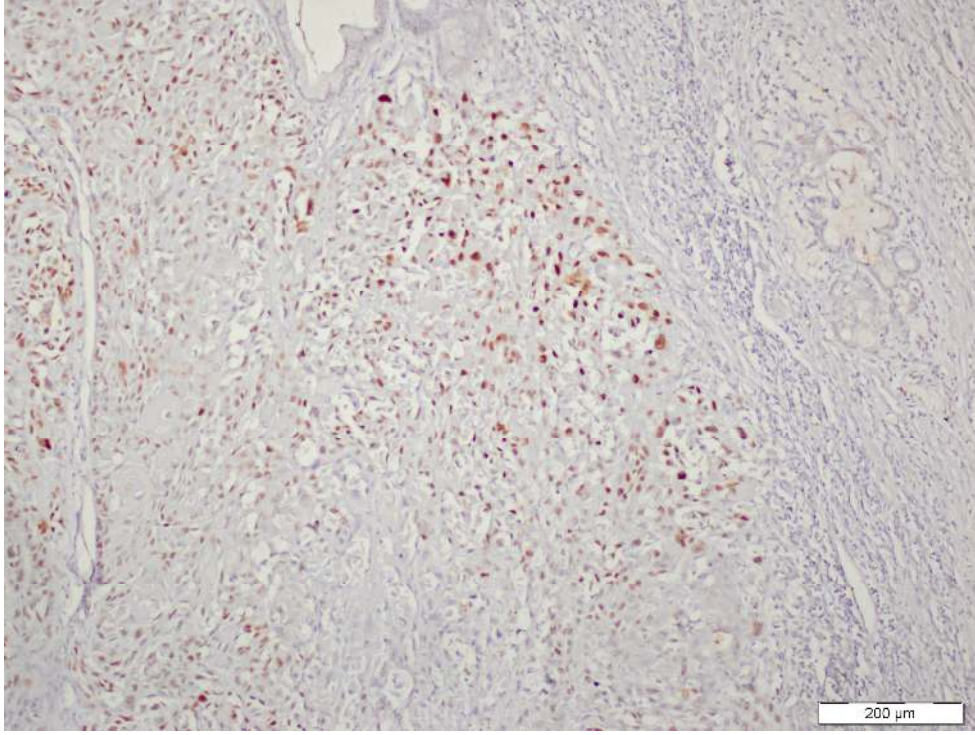


**Resim 7: Ki-67 ile ‘++’ boyanma x200**

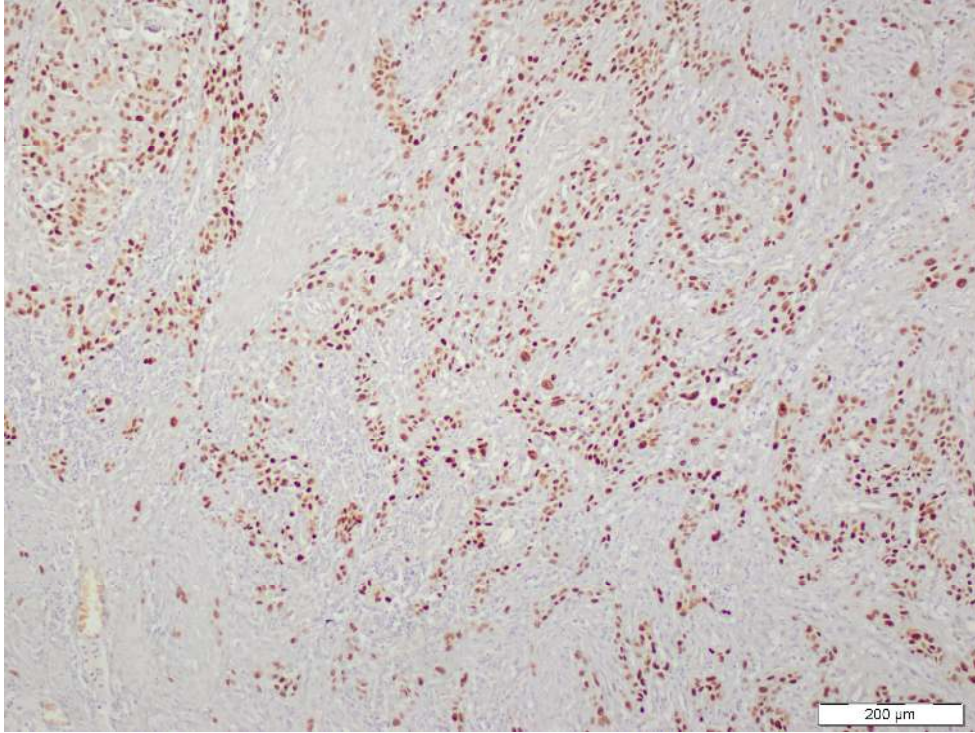


**Resim 8: Ki-67 ile ‘+++’ boyanma x200**

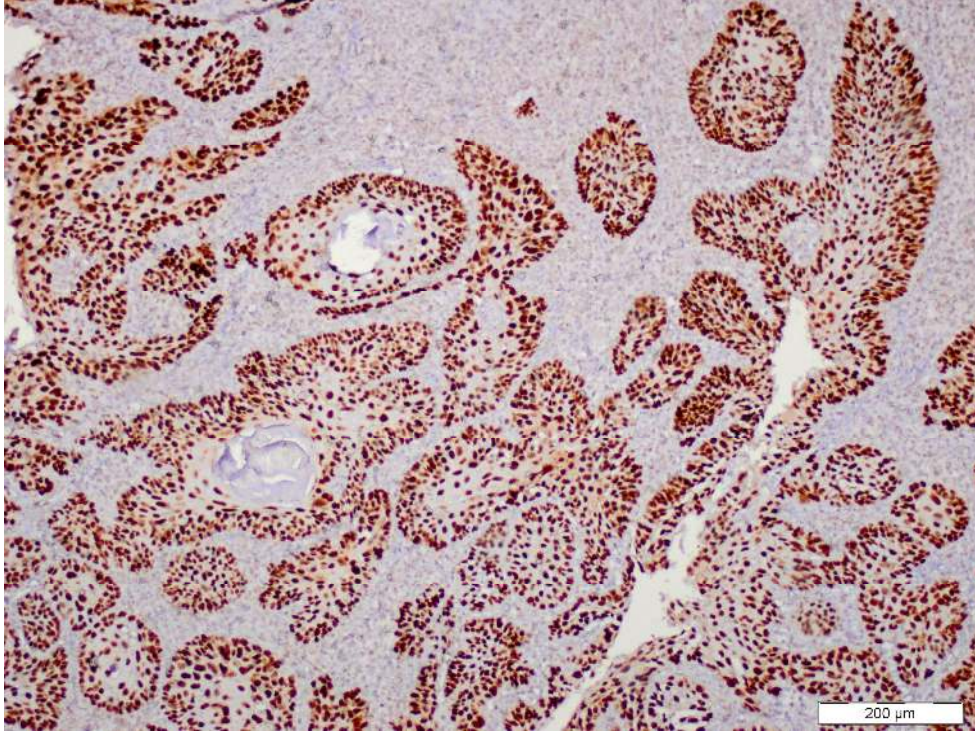




**Resim 9: p53 ile ‘+’ boyanma x200**



**Resim 10: p53 ile ‘++’ boyanma x200**



**Resim 11:p53 ile ‘+++’ boyanma x200**

### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

#### *HybriBio HPV GenoArray test*

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve genotiplendirme için olguların parafin bloklarından hazırlanan 5-10 mikronluk 10-20 yaprak kesitler HybriBio HPV GenoArray test kiti ile çalışıldı. Test kiti PZR ve hibridizasyon yöntemlerinin karışımı olup örnekte bulunan 21 HPV tipini kalitatif olarak belirleyebilmektedir.

#### *DNA İzolasyonu*

Dokudan parafinin uzaklaştırılması ve DNA izolasyonu için ticari NucleoSpin Tissue mini column (Macherey-Nagel, Duren, Germany) izolasyon kiti kullanıldı.

#### *DNA İzolasyon İşlemi*

1-25 mg. formalinle fikse edilmiş parafin bloğa gömülmüş doku örnekleri mikrotomla 10-20 yaprak kesildi.

2-Kesitler üzerine 1ml. ksilen konuldu ve vortekslendi. Parafini uzaklaştırmak için oda ısısında 30 dk beklendi, süre bitiminde 3 dk. 11.000 x g ‘ de santrifüj yapıldı ve üstteki sıvı dökülerek uzaklaştırıldı.



3-Her tübe 1ml. % 96'lık etanol konuldu ve 10 sn. vortekslenip 3 dk. 11.000 x g ' de santrifüj yapıldı, daha sonra üstteki sıvı dökülerek uzaklaştırıldı.

4-% 96'lık Etanol ile yıkama bir kez daha tekrarlandı. Dokuların içlerinde bulunduğu ependorf tüplerinin ağzı açık olarak 37°C'de 15dk. bekletilerek etanolun uzaklaşması sağlandı.

5-Kuruyan dokular üzerine 180 µl T1 tamponu ve 25 µl proteinaz K solusyonundan eklendi ve iyice karışması için vortekslendi. Ependorf tüpleri 56 °C'de bir gece bekletildi.

7-Ertesi sabah örnekler vortekslendi ve üzerlerine 200 µl B3 tamponundan eklenip vortekslendi ve karışım 70°C'de 10 dk. bekletildi. Süre sonunda kısa bir süre vortekslendi ve üzerine 210 µl % 96'lık etanol konulup tekrar vortekslendi.

8-Bu karışım içerilerinde filtreli tüp bulunan toplama tüplerine aktararak 1 dk. süreyle 11.000 x g ' de santrifüjlendi ve tübün alt kısmındaki sıvı dökülerek uzaklaştırıldı.

9-Birinci yıkama aşamasında filtreli tüpler üzerine 500 µl. BW tampondan eklenerek 1 dk. süreyle 11.000 x g ' de santrifüjlendi ve tübün alt kısmındaki sıvı dökülerek uzaklaştırıldı.

10-İkinci yıkama aşamasında ise filtreli tüpler üzerine 600 µl. B5 tampondan eklenerek 1 dk. süreyle 11.000 x g ' de santrifüjlendi ve tübün alt kısmındaki sıvı dökülerek uzaklaştırıldı. Filtreli tüpler tekrar 1 dk. süreyle 11.000 x g ' de santrifüjlendi ve tübün alt kısmındaki sıvı dökülerek uzaklaştırıldı.

11- Filtreli tüpler 1.5 ml.'lik ependorf tüplerine konulup 100 µl. önceden 70°C'de ısıtılmış olan elüsyon tamponu ile oda sıcaklığında 1 dk. bekletilerek 1 dk. süreyle 11.000 x g ' de santrifüjlendi ve filtreli tüpler uzaklaştırılarak ependorf tüpler içerisinde 100 µl. DNA 'lar elde edildi.

#### *HPV GenoArray testi*

Human papillomavirus tiplendirilmesi, DNA izolasyonu sonrasında test işlemi PZR ile DNA'nın çoğaltılması, hibridizasyon ve sonuçların yorumlanması olmak üzere 3 basamakta gerçekleştirildi.

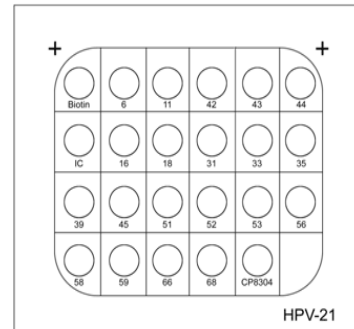
#### *HPV DNA'sının PZR ile Çoğaltılması*

Polimeraz zincir reaksiyonu ile DNA'nın çoğaltılması için üretici firmanın talimatları doğrultusunda PZR tüplerine tek bir örnek için total volüm 25 µl olacak şekilde 23.25 µl PZR karışımı, 0.75 µl DNA Taq polimeraz ve 1 µl. İzole edilmiş DNA'dan eklendi.

48 örnek için hazırlanan PZR tüpleri Ependorf marka termal cycler cihazına yerleştirilerek amplifikasyon basamağı gerçekleştirildi. Çoğaltma işlemi için termal cycler cihazında 95°C’de 9 dk. ilk denatürasyon sonrası, 95°C’de 20 sn., 55°C’de 30 sn. ve 72°C’de 30 sn. den oluşan 40 siklus sonrasında 72°C’de 5dk. son uzatmadan oluşan program kullanıldı.

### *Hibridizasyon İşlemi*

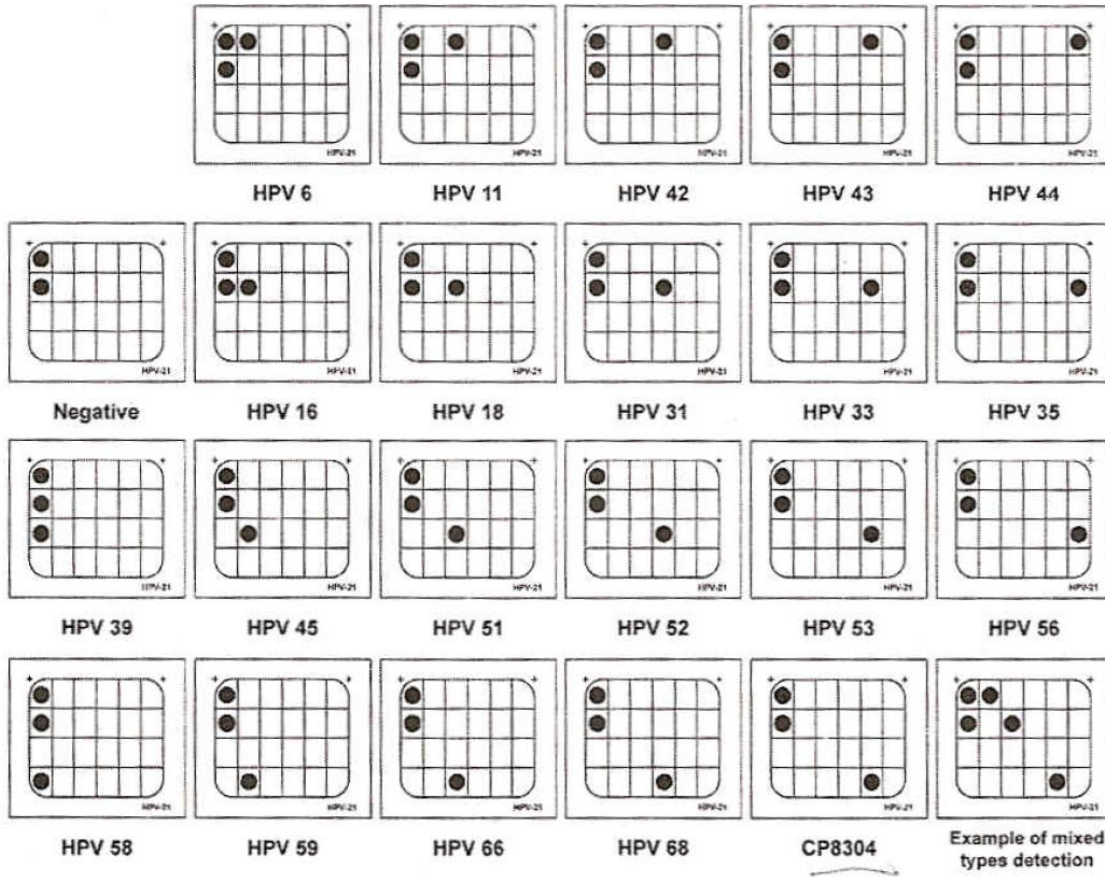
İşlem HybriMax cihazında gerçekleştirildi. Kare şeklindeki hibridizasyon membranları HybriMax cihazına yerleştirildi. Su banyosunda 45°C’de ısıtılan hibridizasyon tamponundan örnek başına 1ml olacak şekilde hesaplanarak membranlar üzerine uygulanıp 2 dk. üzeri cihazın kapağı kapatılarak bekledi. Her örnek için 20 µl PZR ürünü ve 0.5 µl ısıtılmış hibridizasyon tamponundan eklenerek hazırlanan karışımlar membranlar üzerine uygulandı. Cihazın kapağı kapatılarak 45 °C’de 10 dk. bekledi. Süre sonunda solüsyon uzaklaştırılıp membranlar 2 kez hibridizasyon tamponu ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Cihazın ısısı 25°C’ye ayarlandıktan sonra 0.5 ml. Blocking solüsyonundan koyulup cihazın pompası açıldı ve tüm içerik atılncaya kadar beklenip pompa kapatıldı. Tekrar 0.5 ml. Blocking solüsyonundan koyulup 5 dk. bekledi. Süre bitince pompa açıldı tüm içeriğin atılması sağlandı. Membranlar üzerine 25°C’de 0.5 ml enzim konjugat eklenerek 5 dk. bekletildi ve tüm içerik pompa ile dışarıya uzaklaştırıldı. Daha sonra cihaz ısısı 36°C’ye ayarlandı ve 0.8 ml A solüsyonu ile 3 kez yıkama yapıldı. Yıkama sonrası 0.5 ml. NBT/BCIP substrat olarak eklendi ve 5dk bekleme sonrasında tekrar solüsyon uzaklaştırıldı. Son olarak 1 ml. B solüsyonu ile 3 kez ve 1ml. distile su ile bir kez yıkamadan sonra hibridizasyon işlemi sonlandırıldı. Islak olan membranların kuruması beklenip membranlar üzerinde oluşan mor renkte noktaların yerleri göz ile değerlendirildi (Resim 12-13).



**Resim 12:HPV Geno Array Test Kiti****Resim 13: HPV Geno Array Test Paneli**

### *Sonuçların Yorumlanması*

HybriBio HPV GenoArray testinin analitik duyarlılığında saptanabilirlik limiti test edilen HPV tipine bağlı olarak  $\mu\text{l.}$ 'de 4-80 kopya HPV DNA olup 21 özgül HPV tipi belirlenebilmektedir. Testin doğruluğu, her örneğe ait membranda birinci kuyucukta amplifikasyon noktası ile bunun altındaki kuyucukta hibridizasyon işleminin gerçekleştiğini gösteren noktanın oluşumunun varlığı ile test edildi. Negatif sonuç, amplifikasyon ve hibridizasyon noktalarının varlığının gözlenmesi ve membran üzerindeki hiçbir kuyucukta noktaların bulunmaması ile belirlendi. Pozitif sonuç ise amplifikasyon ve hibridizasyon noktalarının varlığı ile birlikte 21 HPV(Kit içeriğinde bulunan 21 HPV tipinin dağılımında yüksek risk grubundan HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, düşük risk grubundan HPV 6, 11, 42, 43, 44 , 53 ve CP8304 bulunmaktadır.) tipinin lokalizasyonuna göre oluşan nokta ya da noktaların varlığının gözlenmesi ile değerlendirildi (Resim 14).

**Resim 14:Hibridizasyon sonrası 21 HPV tipinin membranlar üzerindeki dağılımı**

### *İstatistiksel Değerlendirmeler*

İstatistiksel analiz “SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 14.0 for Windows” programı kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistiklerde sayı ve yüzde, gruplar arası karşılaştırmalarda Ki kare ve Fisher’in kesin testi, bağımlı gruplar arası karşılaştırmalarda ise Mc Nemar testi kullanılmıştır,  $p<0.05$  anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Olguların 46'sı (% 97,9) erkek, 1'i (% 2,1) kadın idi. Olgulardan 20'si (% 42,6) iyi diferansiye, 22'si (% 46,8) orta derecede diferansiye ve 5'i (% 10,6) az diferansiye idi. Tümörlerin 7'si (% 14,9) supraglottik, 20'si (% 42,6) transglottik, 20'si (% 42,6) glottik yerleşimli idi. T1 15 olgu (% 31,9), T2 11 olgu (%23,4), T3 5 olgu (%10,6), T4 16 olguda (% 34,0) izlendi. Lenf nodu metastazı 12 (% 25,5) hastada saptandı. Sigara içen hasta sayısı 43 (% 91,5), içmeyen hasta sayısı 4 (% 8,5) idi.

İmmünohistokimyasal yöntemle uygulanan panHPV boyamasında fokal ve diffüz boyamalar pozitif grup olarak kabul edildiğinde 25 (%53,2) olguda pozitif boyanma, 22 (%46,8) olguda negatif boyanma tespit edildi. HPV 16 boyamasında fokal ve diffüz boyamalar pozitif grup olarak kabul edildiğinde 27 (%57,4) olguda pozitif boyanma, 20 (%42,6) olguda negatif boyanma tespit edildi.

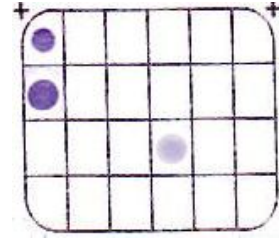
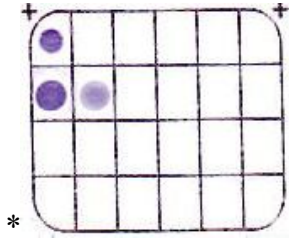
İHK yöntemle çalışılan p53 ve Ki-67 boylarıyla yapılan incelemede 0 ile %10 arası boyanma düşük dereceli boyanma %10 üzeri boyanma ise yüksek derecede boyanma kabul edildi. Buna göre yapılan p53 değerlendirmesinde olguların 22'si (%46,8) düşük, 25'i (% 53,2) yüksek dereceli boyandığı tespit edildi. Ki-67 değerlendirmesinde olguların 19'si (%40,4) düşük, 28'i (% 59,6) yüksek dereceli boyandığı tespit edildi.

Hastaların hiçbirinde İHK yöntemle yapılan HPV 18 boyasında pozitiflik tespit edilmedi.

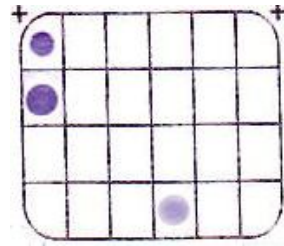
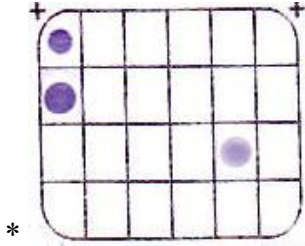
Olguların 15'inde (% 31,9) PZR yöntemi ile poliklonal HPV pozitifliği saptandı. Bu olgulardan 5'sinde (% 10,6) HPV 16 (Resim 16\*), 1'inde (% 2,1) HPV 31 (Resim 18) pozitif, 1'inde (% 2,1) HPV 52 (Resim 16), 5'inde (%10,6) HPV 53 (Resim 17\*), 1'inde(% 2,1) hem HPV 16 hem de HPV 52, 2'sinde(% 4,3) hem HPV 16 hem de HPV 68 (Resim 18) saptandı.



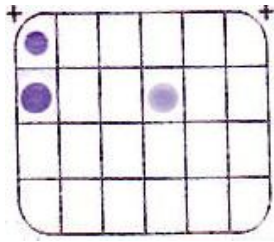
**Resim 15: HybriBio HPV GenoArray testi ile Pozitif \* ve Negatif Kontrol'ler**



**Resim 16: Hibridizasyon Membran HPV Tip 16\* ve tip 52**



**Resim 17: Hibridizasyon Membran HPV Tip 53\* ve Tip 68**



**Resim 18: Hibridizasyon Membran HPV Tip 31**

HPV PZR pozitifliği ile sigara alışkanlığı, T evresi, grade, tümör lokalizasyonu, boyun metastazı, p53 ve Ki-67 ekspresyonları arasındaki ilişki incelendiğinde p değerleri sırasıyla  $p=1.000$ (Tablo I),  $p=0.414$ (Tablo II),  $p=0.453$ (Tablo III),  $p=0.318$  (Tablo IV),  $p=0.725$  (TabloV) bulunmuştur.

**Tablo I. Olguların Sigara İçme Durumuna Göre HPV PZR Dağılımları n(%)**

| SİGARA  | HPV(PZR)  |           | p *   |
|---------|-----------|-----------|-------|
|         | Negatif   | Pozitif   |       |
| İçiyor  | 29 (67,4) | 14 (32,6) | 1.000 |
| İçmiyor | 3 (75,0)  | 1 (25,0)  |       |
| Toplam  | 32 (68,1) | 15 (31,9) |       |

\* Fisher'in kesin testi

**Tablo II. Olguların T Evresi Durumuna Göre HPV PZR Dağılımları n(%)**

| T Evresi   | HPV(PZR)  |           | p     | $\chi^2$ |
|------------|-----------|-----------|-------|----------|
|            | Negatif   | Pozitif   |       |          |
| Erken Evre | 19 (73)   | 7 (26,9)  | 0,414 | 0,667    |
| Geç Evre   | 13 (61,9) | 8 (38,1)  |       |          |
| Toplam     | 32 (68,1) | 15 (38,1) |       |          |



**Tablo III. Olguların Histolojik Grade Durumuna Göre HPV PZR Dağılımları n(%)**

| Grade            | HPV(PZR)  |           | p     | $\chi^2$ |
|------------------|-----------|-----------|-------|----------|
|                  | Negatif   | Pozitif   |       |          |
| İyi Diferansiye  | 15 (75,0) | 5 (25,0)  | 0.453 | 1.586    |
| Orta Diferansiye | 13 (59,1) | 9 (40,9)  |       |          |
| Az Diferansiye   | 4 (80,0)  | 1 (20,0)  |       |          |
| Toplam           | 32 (68,1) | 15 (31,9) |       |          |

**Tablo IV. Olguların Tümör Lokalizasyon Durumuna Göre HPV PZR Dağılımları n(%)**

| Tümör<br>Lokalizasyonu | HPV(PZR)  |           | p     | $\chi^2$ |
|------------------------|-----------|-----------|-------|----------|
|                        | Negatif   | Pozitif   |       |          |
| Glottik                | 16 (80,0) | 4 (20,0)  | 0,318 | 2,294    |
| Supraglottik           | 4 (57,1)  | 3 (42,9)  |       |          |
| Transglottik           | 12 (60,0) | 8(40,0)   |       |          |
| Toplam                 | 32 (68,1) | 15 (31,9) |       |          |

**Tablo V. Olguların Boyun Metastaz Durumuna Göre HPV PZR Dağılımları n(%)**

| Boyun Metastazı | HPV(PZR)  |           | p*    |
|-----------------|-----------|-----------|-------|
|                 | Negatif   | Pozitif   |       |
| Var             | 9 (75,0)  | 3 (25,0)  | 0,725 |
| Yok             | 23 (65,7) | 12 (34,3) |       |
| Toplam          | 32 (68,1) | 15 (31,9) |       |

\* Fisher'in kesin testi

p53 ile sigara alışkanlığı, T evresi, grade, tümör lokalizasyonu, boyun metastazı ve HPV pozitifliğiyle arasındaki ilişki incelendiğinde p değerleri sırasıyla p=0.611(Tablo VI), p=0.381 (Tablo VII), p=0.041 (Tablo VIII), p=0.927 (Tablo IX), p=0.79 (Tablo X), p=0.989 (Tablo XI) dur.

**Tablo VI. Olguların Sigara İçme Durumuna Göre p53 Dağılımları n(%)**

| SİGARA  | p53                    |                         | p*    |
|---------|------------------------|-------------------------|-------|
|         | Düşük Dereceli Boyanma | Yüksek Dereceli Boyanma |       |
| İçiyor  | 21(48,8)               | 22(51,2)                | 0,611 |
| İçmiyor | 1(25,0)                | 3(75,0)                 |       |
| Toplam  | 22(46,8)               | 25(53,2)                |       |

\* Fisher'in kesin testi

**Tablo VII. Olguların T Evresi Durumuna Göre p53 Dağılımları n(%)**

| T Evresi   | p53                    |                         | p     | $\chi^2$ |
|------------|------------------------|-------------------------|-------|----------|
|            | Düşük Dereceli Boyanma | Yüksek Dereceli Boyanma |       |          |
| Erken Evre | 14<br>(53,8)           | 12<br>(46,2)            | 0,381 | 0,282    |
| Geç Evre   | 8<br>(38,1)            | 13<br>(61,9)            |       |          |
| Toplam     | 22<br>(46,8)           | 25<br>(53,2)            |       |          |

**Tablo VIII. Olguların Histolojik Grade Durumuna Göre p53 Dağılımları n(%)**

| Grade            | p53                    |                         | p     | $\chi^2$ |
|------------------|------------------------|-------------------------|-------|----------|
|                  | Düşük Dereceli Boyanma | Yüksek Dereceli Boyanma |       |          |
| İyi Diferansiye  | 13<br>65,0%            | 7<br>35,0%              | 0,041 | 6,380    |
| Orta Diferansiye | 6<br>27,3%             | 16<br>72,7%             |       |          |
| Az Diferansiye   | 3<br>60,0%             | 2<br>40,0%              |       |          |
| Toplam           | 22<br>46,8%            | 25<br>53,2%             |       |          |

**Tablo IX. Olguların Tümör Lokalizasyon Durumuna Göre p53 Dağılımları n(%)**

| <b>Tümör<br/>Lokalizasyonu</b> | <b>P53</b>                   |                               | <b>p</b> | <b><math>\chi^2</math></b> |
|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|----------|----------------------------|
|                                | Düşük<br>Dereceli<br>Boyanma | Yüksek<br>Dereceli<br>Boyanma |          |                            |
| Glottik                        | 10 (50,0)                    | 10 (50,0)                     | 0.927    | 0.152                      |
| Supraglottik                   | 3 (42,9)                     | 4 (57,1)                      |          |                            |
| Transglottik                   | 9 (45,0)                     | 11 (55,0)                     |          |                            |
| Toplam                         | 22 (46,8)                    | 25 (53,2)                     |          |                            |

**Tablo X. Olguların Boyun Metastaz Durumuna Göre p53 Dağılımları n(%)**

| <b>Boyun Metastazı</b> | <b>p53</b>                   |                               | <b>p</b> | <b><math>\chi^2</math></b> |
|------------------------|------------------------------|-------------------------------|----------|----------------------------|
|                        | Düşük<br>Dereceli<br>Boyanma | Yüksek<br>Dereceli<br>Boyanma |          |                            |
| Var                    | 3<br>(25,0)                  | 9<br>(75,0)                   | 0.79     | 3.078                      |
| Yok                    | 19<br>(54,3)                 | 16<br>(45,7)                  |          |                            |
| Toplam                 | 22<br>(46,8)                 | 25<br>(53,2)                  |          |                            |

**Tablo XI. Olguların p53 Durumuna Göre HPV PZR Dağılımları n(%)**

| <b>P53</b>              | <b>HPV PZR</b> |          | <b>p</b> | <b><math>\chi^2</math></b> |
|-------------------------|----------------|----------|----------|----------------------------|
|                         | Negatif        | Pozitif  |          |                            |
| Düşük Dereceli Boyanma  | 15(68,2)       | 7(31,8)  | 0.989    | 0.000                      |
| Yüksek Dereceli Boyanma | 17(68,0)       | 8(32,0)  |          |                            |
| Toplam                  | 32(68,1)       | 15(31,9) |          |                            |

Ki-67 ile sigara alışkanlığı, T evresi, grade, tümör lokalizasyonu, boyun metastazı ve HPV pozitifliğiyle arasındaki ilişki incelendiğinde p değerleri sırasıyla p=0.317 (Tablo XII), p=1.000 (Tablo XIII), p=0.439 (Tablo XIV), p=0.990 (Tablo XV), p=1.000 (Tablo XVI), p=0.010 (Tablo XVII) dir.

**Tablo XII. Olguların Sigara Kullanma Durumuna Göre Ki-67 Dağılımları n(%)**

| <b>SİGARA</b> | <b>Ki-67</b>   |                 | <b>P*</b> |
|---------------|----------------|-----------------|-----------|
|               | Düşük Dereceli | Yüksek Dereceli |           |
|               | Boyanma        | Boyanma         |           |
| İçiyor        | 19(44,2)       | 24(55,8)        | 0,137     |
| İçmiyor       | 0 (0)          | 4(100,0)        |           |
| Toplam        | 19(40,4)       | 28(59,6)        |           |

\* Fisher'in kesin testi

**Tablo XIII. Olguların T Evresi Durumuna Göre Ki-67 Dağılımları n(%)**

| T Evresi   | Ki-67                  |                         | p     | $\chi^2$ |
|------------|------------------------|-------------------------|-------|----------|
|            | Düşük Dereceli Boyanma | Yüksek Dereceli Boyanma |       |          |
| Erken Evre | 11 (42,3)              | 15 (57,7)               | 1,000 | 0,770    |
| Geç Evre   | 8 (38,1)               | 13 (61,9)               |       |          |
| Toplam     | 19 (40,4)              | 28 (59,6)               |       |          |

**Tablo XIV. Olguların Histolojik Grade Durumuna Göre Ki-67 Dağılımları n(%)**

| Grade            | Ki-67                  |                         | p     | $\chi^2$ |
|------------------|------------------------|-------------------------|-------|----------|
|                  | Düşük Dereceli Boyanma | Yüksek Dereceli Boyanma |       |          |
| İyi Diferansiye  | 9 (45,0)               | 11 (55,0)               | 0,439 | 1,646    |
| Orta Diferansiye | 7 (31,8)               | 15 (68,2)               |       |          |
| Az Diferansiye   | 3 (60,0)               | 2 (40,0)                |       |          |
| Toplam           | 19 (40,4)              | 28 (59,6)               |       |          |

**Tablo XV. Olguların Tümör Lokalizasyon Durumuna Göre Ki-67 Dağılımları n(%)**

| Tümör Lokalizasyonu | Ki-67                  |                         | p     | $\chi^2$ |
|---------------------|------------------------|-------------------------|-------|----------|
|                     | Düşük Dereceli Boyanma | Yüksek Dereceli Boyanma |       |          |
| Glottik             | 8 (40,0)               | 12 (60,0)               | 0,990 | 0,20     |
| Supraglottik        | 3 (42,9)               | 4 (57,1)                |       |          |
| Transglottik        | 8 (40,0)               | 12 (60,0)               |       |          |
| Toplam              | 19 (40,4)              | 28 (59,6)               |       |          |

**Tablo XVI. Olguların Boyun Metastaz Durumuna Göre Ki-67 Dağılımları n(%)**

| Boyun Metastazı | Ki-67                  |                         | p*    |
|-----------------|------------------------|-------------------------|-------|
|                 | Düşük Dereceli Boyanma | Yüksek Dereceli Boyanma |       |
| Var             | 5(41,7)                | 7(58,3)                 | 1,000 |
| Yok             | 14(40,0)               | 21(60,0)                |       |
| Toplam          | 19(40,4)               | 28(59,6)                |       |

\* Fisher'in kesin testi

**Tablo XVII. Olguların Ki-67 Durumuna Göre HPV PZR Dağılımları n(%)**

| Ki-67                   | HPV PZR   |           | p     | $\chi^2$ |
|-------------------------|-----------|-----------|-------|----------|
|                         | Negatif   | Pozitif   |       |          |
| Düşük Dereceli Boyanma  | 17 (89,5) | 2 (10,5)  | 0,010 | 6,714    |
| Yüksek Dereceli Boyanma | 15(53,6)  | 13 (46,4) |       |          |
| Toplam                  | 32(68,1)  | 15(31,9)  |       |          |

HPV (PZR) sonuçları ile İHK olarak uygulanan PANHPV sonuçları karşılaştırıldığında iki yöntem arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır (p=0.143) (Tablo XVIII).

**Tablo XVIII. Olguların panHPV Durumuna Göre HPV PZR Dağılımları**

| panHPV                  | HPV(PZR) |         | p *   |
|-------------------------|----------|---------|-------|
|                         | Negatif  | Pozitif |       |
| Düşük Dereceli Boyanma  | 20       | 5       | 0.143 |
| Yüksek Dereceli Boyanma | 12       | 10      |       |
| Toplam                  | 32       | 15      |       |

\*Mc

Nemar

Testi



## TARTIŞMA

Larinks kanseri baş ve boyun bölgesinin en sık görülen kanseridir ve erişkinlerde tüm kanserlerin %2'sini oluşturur (1–3). Ülkemizde erkekler arasında en sık rastlanan ikinci kanserdir (4). Larinks kanserlerinde prognoz anatomik yayılım, histolojik diferansiyasyon ve tümörün lokalizasyonu ile ilişkilidir.

Larinks kanseri görülme sıklığı ülkelere göre değişiklik göstermekte olup; 3-10/100000 aralığında insidanslar bildirilmiştir (5,6,7). Larinks kanserlerinin % 95'den fazlası skuamöz hücreli karsinomlardır (8). Bu kanserlerin gelişmesinde en önemli risk faktörleri sigara ve alkol alışkanlığıdır (9). Bizim çalışmamızda da sigara içme oranı %91,5'ti. Larinks SHK erkeklerde daha fazla görülmektedir. Bizim çalışmamızda da erkek olgular daha fazladır (%97,9).

Larinkste skuamöz hücreli karsinom dışında malign tükrük bezi kökenli tümörler, nöroendokrin karsinom, yumuşak doku tümörleri, lenfo-hematoid tümörler, kemik ve kartilaj tümörleri, mukozal malign melanoma gibi tümörler de görülebilir.

Glottik tümörler genel olarak en sık görülen lokalizasyon olarak bilinmektedir. Literatürde larinks kanserlerinin %60'ının glottik, yaklaşık %40'ının supraglottik ve sadece %1'i ya da daha azının subglottik yerleşimli olduğu belirtilmektedir (54). Bazı çalışmalar glottik yerleşimli kanserlerin daha genç hastalarda görüldüğünü ve daha yaygın olduğunu ileri sürmektedir (90). Bizim çalışmamızda da glottik tümörler (%42,6) en sık görülen tümör lokalizasyonu olarak bulunmuştur.

Genel olarak tedavi planlamada ve prognoz belirlemede en güvenilir parametrelerin TNM sınıflaması ile saptanabileceği düşünülmektedir. Bunlar içinde lenf nodu metastazı kabul edilen en önemli parametredir. Bizim çalışmamızda da T1 15 olgu (% 31,9), T2 11 olgu (%23,4), T3 5 olgu (%10,6), T4 16 olguda (% 34,0) izlenmiştir. Lenf nodu metastazı 12 (% 25,5) hastada saptanmıştır. Prognoz belirlemede diğer önemli parametreler ise tümör evresi, tümör lokalizasyonu, ülserasyon ve histolojik diferansiyasyon derecesidir (90-95).

Fakat bütün bu özellikler göz önüne alınarak ve aynı tedavi yöntemleri uygulandığında bile hastalar arasında tedaviye cevap, rekürrensler, tümör davranışı ve genel prognoz açısından önemli farklılıklar olabilmektedir. Bu farklılıklar larinks kanseri tedavi sonuçlarını etkileyen başka faktörlerin bulunduğu düşüncesini ortaya çıkarmaktadır. Son zamanlarda bazı araştırmacılar hücre siklusu, proliferasyon ve apoptozu inceleyen genetik moleküler faktörler üzerinde durmaktadırlar.

HPV ile üst hava yolu patolojileri arasındaki ilişki yaklaşık yüz yıldır bilinmektedir (96). Fakat son üç dekatta viral onkojenik etkileri literatürde daha iyi bir şekilde ortaya koyulmuştur (97-99). HPV'nin baş boyun kanserleri içinde özellikle tonsil kanserleri olmak üzere orofarengeal kanserlerle ilişkili olduğu bulunmuştur. HPV pozitif olguların yaşam sürelerinin ve terapötik cevabının HPV negatif hastalara göre daha iyi olduğu düşünülmüştür (100,101).

Human papilloma virüs Papova Viridea ailesinde 200'ü aşkın tipi tanımlanmış bir DNA virüsüdür. Papillomavirüs; küçük, zarfsız, ikozahedral DNA virüsüdür. Skuamöz epitelyal hücrelerin nükleusunda çoğalır. Çift zincirli DNA'ya sahiptir (102).

Human papillomavirüs enfeksiyonu, insan genital keratinositlerinde, oral ve tonsiller epitel hücrelerinde apoptozisi engeller ve bu hücreleri ölümsüzleştirir. Ölümsüzleşen hücre serilerinden köken alan doku kültürleri sonucunda transforme bir fenotip gelişir. Bu bilgiler HPV'nin maligniteye dönüşümde başlatıcı olarak önemli rol oynadığını göstermektedir.

Virüsün tespitinde kullanılan yöntemler elektron mikroskopisi, immünohistokimyasal boyama, hibridizasyon teknikleri (Southern Blot, dot blot ve insitu hibridizasyon) ve polimeraz zincir reaksiyon (PZR) tekniğidir. Ancak altın standart tanı yöntemi taze dokuda PZR tekniğidir.

Morshed ve arkadaşlarının (103) 54 larinks SHK olgusu ile yaptıkları araştırmada PZR ile hem parafine gömülü dokuda hem de taze donmuş dokuda HPV DNA araştırılmıştır. Karşılaştırmalı analizde yeterlilik %92,6, sensitivite %90,5, spesifite %93,6 olarak bulunmuştur. Böylece retrospektif çalışmalarda parafine gömülü dokuların HPV DNA saptanması için kullanılabileceği değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamız da parafine gömülü dokularla yapılmıştır.

HPV ve skuamöz hücreli kanserler arasında öngörülen bu sebep - sonuç ilişkisi virüsün varlığının yüksek risk göstergesi olabileceğini düşündürmektedir. Brandwein ve arkadaşları (13), laringeal tümörlerde HPV DNA'sının kötü prognozun göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. HPV'nin esas olarak yüksek riskli alt tipleri HPV 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, 58, ve 69dur. Bu tipler servikal ve diğer anogenital kanserlerde rol oynarlar. HPV 6 ve 11 "düşük riskli" tipler olup, malign lezyonlarda çok nadiren bulunurlar. Esas olarak "genital wart" lar da ve malign olmayan lezyonlarda görülürler. Laringeal papillomatozisli olgularda özellikle yüksek riskli HPV varlığında zaman içinde malignite gelişimi görülebilir. Deilson ve arkadaşlarının (8) bir araştırmasında laringeal papillomatozisli olgularda malignite gelişme oranı % 3-7 olarak bulunmuştur.

HPV'nin dokuyu enfekte edebilmesi için epidermal veya mukozal epitelyal hücrelerin proliferere olabilmesi, yani bazal tabakalarının bulunması gerekir. Öncelikle HPV'nin "early" viral genleri eksprese edilir (E5, E6, E7 gibi). Böylelikle enfekte hücrelerde proliferasyon ve lateral yayılma meydana gelir. Suprabazal tabakaya girişi takiben "late" viral gen ekspresyonu başlar. Daha sonra sirküler viral genom çoğalır ve yapısal proteinler oluşur. Epidermis veya mukozanın üst tabakalarında komplet viral partiküller toplanır ve açığa çıkar (102). Yüksek riskli HPV tiplerinin E6 ve E7 proteinleri malignite gelişimine yardım ederler, bu nedenle serviks kanserleri için geliştirilen aşılar bu proteinler için hazırlanmıştır.

Bazı çalışmalarda baş-boyun bölgesindeki görülen HPV enfeksiyonlarında virüs geçişinin nedenleri olarak oral-genital temas, birden fazla cinsel partner olması, doğum sırasında anneden bebeğe bulaş ve hijyenik davranış farklılıkları olarak bildirilmektedir (104).

HIV pozitif homoseksüel erkeklerde dirençli HPV enfeksiyonları çok sık görülmekte ve bu hastalarda HPV ilişkili anal, penil ve oral lezyonlara daha fazla rastlanmaktadır (105).

Literatürde pek çok araştırmada baş-boyun bölgesindeki kanserlerde HPV sıklığı araştırılmış ve ortalama % 34.5'lik pozitif sonuç tespit edilmiştir. Ancak seçilen tümör grubunun lokalizasyonu, kullanılan metod ya da hasta özelliklerine göre % 7 ila 59'luk geniş bir yelpaze ortaya çıkmıştır. Morshed ve arkadaşlarının (106) 2008 yılında yaptıkları araştırmada %35.5, Güngör ve arkadaşlarının (107) 2007 yılında yaptıkları araştırmada % 7.4, Oliviera ve arkadaşlarının (108) 2006 yılında yaptıkları araştırmada % 37.3, Ma ve arkadaşlarının (109) 1999 yılında yaptıkları araştırmada %58.8 pozitiflik saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da olguların 15'inde (% 31.9) PZR yöntemi ile poliklonal HPV pozitifliği saptanmıştır.

Gelecekte HPV ile ilişkili baş boyun kanserlerinin tedavisinde direk HPV ile enfekte hücreyi hedef alan tedaviler geliştirilebilir. Yani seçilmiş hastalarda özel kemoterapötikler kullanılabilir (110,111).

Clayman ve arkadaşları (112) larinks ve hipofarinks tümörlü 65 olguyu içeren serilerinde 30 vakada HPV DNA pozitifliği saptayarak % 46'lık bir oran elde etmişlerdir. Olgular ortalama 42 ay takip edilmişlerdir. HPV pozitifliği standart patolojik evreleme sistemleri ile ilgili bulunmamıştır. HPV enfeksiyonu varlığı yaşam süresi tayininde; evre, ekstralaringeal yayılım, vasküler invazyon, subglottik yayılım ve pozitif lenf nodu gibi parametreler kadar önemli bir faktör olarak bulunmuştur. HPV varlığının lokal veya bölgesel nüks için 2.4 katlık rölatif bir risk oluşturduğu düşünülmektedir.

Gallo ve arkadaşlarının (113) 68 adet larinks patolojisi bulunan olguların taze donmuş dokularında yaptıkları PZR çalışmasında HPV nin sadece beningn laringeal papillomatozise yol açtığı değerlendirilmiştir.

Deilson ve arkadaşları (8) 110 adet larinks SHK olgusu ile yaptıkları araştırmada % 37,3 oranında yüksek riskli HPV saptamışlardır. % 37 olguda HPV 16, % 44 olguda HPV 18 görülmüştür. Yine aynı çalışmada olguların % 78,2'sinde ise p53 pozitifliği bulunmuş ve bu olguların aynı zamanda yüksek gradeli oldukları ve yüksek Ki-67 indeksine sahip oldukları dikkati çekmiştir. Bu araştırmada supraglottik tümörlerin yüksek gradeli glottik tümörlerin ise düşük gradeli, olduğu bildirilmiş ve supraglottik tümörlerde lenf nodu metastazına daha sık rastlanmıştır. Ek olarak glottik tümörlerde HPV pozitifliği daha yüksek oranda bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da olguların 15'inde (% 31,9) PZR yöntemi ile poliklonal HPV pozitifliği saptandı. Bu olgulardan 5'sinde (% 10,6) HPV 16, 1'inde (% 2,1) HPV 31 pozitif, 1'inde (% 2,1) HPV 52, 5'inde (%10,6) HPV 53,1'inde(% 2,1) hem HPV 16 hem de HPV 52, 2'sinde(% 4,3) hem HPV 16 hem de HPV 68 saptanmıştır.

Miller ve arkadaşlarının (114) çalışmasında normal oral mukozada HPV % 10,0 lökoplakide % 22,2 intraepitelyal neoplazilerde % 26,2 verrüköz karsinomda % 29,9 ve oral skuamöz hücreli karsinomda % 46,5 olarak bulunmuştur.

Gorgoulis ve arkadaşlarının (115) çalışmasında 154 larinks SHK olgusunun 20 tanesinde (% 13) HPV pozitifliği saptamıştır. HPV pozitifliği saptanan olgulardan 19'u larinks karsinomu iken, biri hafif displazili olgudur. Bir olguda HPV 6 (% 1,1), 12 olguda HPV 16 (% 13,2), iki olguda HPV 18 (% 2,2) ve bir olguda da HPV 33 (% 1,1) saptanmıştır.

Güvenç ve arkadaşlarının (116) çalışmasında total ya da parsiyel larenjektomi uygulanmış 40 tane laringeal SHK olgusunun 5'inde (% 12,5) ve verrüköz karsinomlu iki olgunun her ikisinde PZR yöntemiyle HPV pozitifliği saptanmıştır.

SahebJamee ve arkadaşlarının (117) çalışmasında oral skuamöz hücreli karsinom olguları ve sağlıklı insanlardan oluşan kontrol grubu olgularının tükürüklerinde PZR yöntemiyle HPV varlığı araştırılmıştır. SHK olgularının %40,9'unda ve kontrol grubunun % 25'inde HPV pozitif bulunmuştur. Olgularının% 27,3'ünde ve kontrol grubunun % 20'sinde HPV 16 pozitif saptanmıştır. Bu çalışmada hasta grup ve kontrol grubu arasındaki HPV görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Jacob ve arkadaşlarının (118) yaptığı çalışmada larinks SHK 'larında HPV enfeksiyonu ile artmış p53 ekspresyonu arasında karşılıklı ilişki olduğu bildirilmiştir.

Lindel ve arkadaşları (119) orofarinksin HPV pozitif skuamöz hücreli karsinomlarının diğerlerine göre radyoterapiye daha duyarlı ve dolayısıyla daha iyi prognozlu

olduklarını bildirmişlerdir. Wittekindt' in (120) çalışması da tonsiller karsinomlarda benzer bulguları sunmaktadır.

Morshed'in bir çalışmasında (121) 93 laringeal SHK olgusunda PZR ile HPV DNA araştırılmış %35,5 oranında pozitiflik saptanmıştır. Ayrıca İHK ile 130 vakada % 27,7 olguda pozitiflik bulunmuştur. HPV ile epidemiyolojik, klinikopatolojik ve rekürrens arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Yine aynı çalışmada PZR ile HPV saptanmasıyla İHK olarak HPV saptanması arasında korelasyon bulunmuştur. Bizim çalışmamızda böyle bir korelasyon saptanmamıştır.

Malignite gelişiminin temelinde öldürücü olmayan genetik hasar vardır. Bu gibi genetik hasar (veya mutasyon) kimyasal madde, radyasyon gibi çevresel ajanların veya virusların etkisiyle ortaya çıkabilir. Genetik kanser hipotezi, bir tümöral oluşumun genetik hasara uğrayan tek bir öncü hücrenin klonal büyümesi ile oluştuğunu ileri sürer (122).

Genetik hasarının oluştuğu üç çeşit normal gen vardır. Bunlar; büyümeyi uyarıcı protoonkogenler, büyümeyi inhibe eden tümör baskılayıcı genler ve programlı hücre ölümü veya apoptozu düzenleyen genlerdir. Protoonkogenlerin mutant allellerinin dominant olduğu kabul edilir. Çünkü normal karıştları bulunmasına rağmen, hücreleri değiştirebilir. Malign transformasyonun gerçekleşebilmesi için de tümör baskılayıcı genin normal allellerinin hasara uğraması gerekir (122).

p53 geni, 53 kDa ağırlığında, 17. kromozomun kısa kolunda (17p13.1) yerleşen tümör supresör gendir (61). G1 fazında hücre büyümesini frenlemek, apoptozis yoluyla hücre ölümünü sağlamak, hücre diferansiyasyonunu indüklemek gibi hücre siklusunda önemli fonksiyonları vardır (63,64). Baş ve boyun SHK'lerinde %39–80 oranında p53 mutasyonu bildirilmektedir (71,83,35,64). Premalign larinks lezyonlarında %40–80 oranında p53 ile boyanma izlenmiştir (64). p53 aşırı ekspresyonunun prekanseröz ve malign larinks lezyonlarında proliferatif aktivite ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte larinksin prekanseröz lezyonlarında rölatif olarak yüksek frekansta p53 proteini saptayan gruplar da bildirilmiştir (67).

Hirai ve ark. (85) p53 ekspresyonu ile histopatolojik bulgular arasında korelasyon saptayamamıştır. Bu sonuçlar larinksin prekanseröz lezyonlarında p53'ün önemini belirtmede uyumsuzluklar olduğunu göstermektedir. Antikanser ajanlara maruz bırakılmadan sonra tümör hücrelerinde p53 ekspresyonunun artması bu ilaçlara karşı hücresel yanıtları tetiklemede p53'ün rolü olduğunu destekler. Tümör hücrelerinde p53 fonksiyon kaybı kemoterapiye direnç ile ilişkilidir ve mutant p53, hücrelerin sitotoksik ajanlarla indüklenen apoptozise gidişini engeller (84).

Literatürde bazı çalışmalarda premalign lezyonlar, displaziler ve normal ve komşu inflame mukozada p53 gen değişiklikleri saptanmıştır. Buna bağlı olarak p53 gen değişikliklerinin larinks SHK gelişiminin erken döneminde rol oynayabileceği düşünülmüştür. Bu bulgular ile bu tür tümörlerde p53 değişikliklerinin neoplastik gelişimin erken basamaklarında meydana geldiği anlaşılmıştır. Premalign larinks lezyonlarında p53 ekspresyonu %40-80'dir (64).

Nakashima ve ark. nın (64) yaptığı bir çalışmada laringeal hiperkeratozda %42 oranında p53 ekspresyonu tespit edilmiştir. Bu bulgular ile laringeal karsinogeneizde erken dönemde mutasyon varlığı ileri sürülmüştür. Aynı çalışmada larinks kanserli hastalarda p53 aşırı ekspresyonu ve prognoz arasında korelasyon saptanmamıştır. Ayrıca p53'ün karsinogeneizde rol alırken, tümör agresifliğine katkıda bulunmadığı belirtilmiştir.

Khademi ve ark.(39) ile Morawski ve ark'nın (123) yaptıkları birbirinden farklı çalışmalarda larinks SHK'larında p53 ekspresyonu ile grade arasında korelasyon tespit edilememiştir. Benzer şekilde Wood ve ark (124) baş ve boyun bölgesinde skuamöz hücreli karsinomlu olgularda yaptıkları çalışmada p53 mutasyonu ile tümör diferansiyasyonu arasında anlamlı bir ilişki tespit edememişlerdir.

Kazkayası ve ark'nın (80) çalışmasında p53 ekspresyonu ile hasta yaşı, tümör yeri, klinik evre, tümörün histopatolojik gradelemesi, alkol kullanımı ve klinik gidiş arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamazken, p53 aşırı ekspresyonu lenf nodu metastazı varlığı ile anlamlı şekilde ilişkili bulunmuştur. Bizim çalışmamızda yapılan p53 değerlendirmesinde olguların 22'si (%46,8) düşük, 25'i ( % 53,2) yüksek dereceli boyandığı ve bunların yüksek grade ile ilişkili olduğu saptanmıştır (p=0.041).

Spafford ve arkadaşlarının (125) çalışmasında düşük p53 ekspresyonlarının uzun sürvi ile ilişkili olduğunu ve ileri evre tümörlerde ekspresyonunun arttığını saptamışlardır.

Büyükbayram ve arkadaşlarının çalışmasında (7) 60 olgu incelenmiş p53 ile histolojik grade arasında korelasyon bulunduğu bildirilmiştir.

Ying-Tai ve arkadaşlarının (126) çalışmasında 83 adet skuamöz hücreli karsinom olgusu incelenmiştir. Bu çalışmada p53'ün tümör hücrelerinde %75'den fazla pozitif olması, lenf nodu metastazının varlığı, tümör boyutunun 3 cm'den büyük olması, ektranodal yayılım ve evre 4 hastalığı olanlarda prognozun daha kötü seyirli olduğu bildirilmiştir.

Ki-67, 345 ve 395 kilodalton ağırlığında iki molekülden oluşan, 10. kromozom üzerinde yerleşmiş, nonhiston nükleer bir proteindir. Hücre siklusunun G0 dışında kalan G1,

G2, M ve S fazlarında eksprese edilir. Hücre proliferasyonunu gösteren Ki-67 nükleer immünoreaktivitesi ile tümör dokusundaki mitoz sayısı arasında iyi bir korelasyon vardır. Larinks skuamöz hücreli karsinomlarında hücre proliferasyonunun prognozdeki önemi tartışmalıdır, çünkü yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir.

Literatürde larinks SHK'ında, yüksek Ki-67 proliferasyon indeksinin kötü prognostik gösterge olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır (26,18.88.89). Bazı çalışmalarda ise survi ile ilişkisinin olmadığına işaret edilmektedir (16,19,92). Bizim çalışmamızda yapılan Ki-67 değerlendirmesinde olguların 19'u (%40,4) düşük, 28'i (% 59,6) yüksek dereceli boyandığı tespit edildi. HPV pozitifliği bulunan olgularda yüksek derecede Ki-67 boyanması elde edilmiştir (p=0.010).

Rodrigues ve arkadaşlarının (127) otuz tane larinks SHK olgusu ile yaptığı çalışmada yaş, cinsiyet, lenf nodu tutulumu, histolojik grade ve hastalık evresi gibi prognostik faktörler karşılaştırılmıştır. Ki-67 indeksi önemli ölçüde daha yüksek olan 50 yaş üzeri olgular dışında p53 ve Ki-67 indeksi arasında önemli bir farklılık bulunamamıştır. Diğer prognostik faktörler için daha çok vaka ile mutasyon varlığını göstermeye yönelik DNA sekansına dayalı çalışmaların yapılması gerektiği vurgulanmıştır.

Açıkalin ve arkadaşlarının (26) 67 adet larinks SHK olgusu ile yaptıkları çalışma ile Ki-67 ekspresyonunun klinik faktörler, histopatolojik derece ve prognozla ilişkisini araştırmışlar ve yüksek Ki-67 indeksi ile yaş, T evresi, lenf nodu metastazı, rekürrens artışı ve kısa sağ kalım süresi arasında anlamlı korelasyon olduğunu bulmuşlardır. Aynı çalışmada tümör lokalizasyonu ve histopatolojik derece ile Ki-67 arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir .

Fumic-Dunkic ve arkadaşları (128), larinks SHK nedeni ile tedavi edilen 48 olguyu içeren çalışmalarında yüksek Ki-67 indeksi ile TNM evrelemesi arasında bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir .

Liu ve arkadaşlarının (88) larinks ve hipofarenks SHK'lu olgular üzerinde yaptıkları araştırmada Ki-67 lenf nodu metastazı gösteren lezyonlarda daha yüksek oranda bulunmuş, yüksek Ki-67 indeksinin T evresi ve tümör diferansiasyonu ile korele, hastalısız sağ kalım ile ters orantılı olduğunu göstermişlerdir. Yine bu çalışmada p53 ekspresyonu ile klinikopatolojik veriler arasında anlamlı bir ilişki saptanmamış ve prognostik değeri olmadığı belirtilmiştir .

Sittel ve arkadaşları (18) transoral lazer cerrahisi ile tedavi edilen ve rekürrens gelişen hastalarda Ki-67 indeks yüksekliğini anlamlı bulmuşlar ancak p53 ekspresyonu ile rekürrens arasında bir ilişki olmadığını öne sürmüşlerdir .Narayana ve arkadaşları (15), sadece

radyoterapi ile tedavi edilmiş T1 glottik karsinomlu hastalarda yaptıkları araştırmada p53 ekspresyonu gösteren olgularda lokal rekürrens oranının daha fazla olduğunu göstermişlerdir .

Bazı çalışmalarda ise Ki-67 ile p53 ekspresyonlarının prognostik önemi olmadığı belirtilmiştir. Teppo ve arkadaşlarının (21) 100 larinks SHK olgusunda yaptıkları çalışmada ileri evre tümör, supraglottik lokalizasyon ve yüksek apoptotik indeksin sağ kalım süresini olumsuz etkilediğini göstermişler ancak Ki-67 ile p53 ekspresyonlarının surviyi olumsuz etkilemediğini belirtmişlerdir .

Çallı ve arkadaşları (16) , 37 larinks SHK olgusunda yaptıkları çalışmada Ki-67 ile p53 ekspresyonları ile klinikopatolojik parametreler ve survi arasında anlamlı ilişki bulamamışlardır.

Lera ve arkadaşları (20) ise larinks SHK ogularında klinikopatolojik özellikler ile Ki-67 ve p53 ekspresyonları arasında ilişki bulamamışlar ancak yüksek Ki-67 indeksine sahip olgularda survinin daha kısa olduğunu belirtmişlerdir. p53'ün surviyi etkilemediğini bildirmişlerdir. Hirvikoski ve arkadaşları (19) da benzer şekilde Ki-67 ve p53 ile survi arasında anlamlı bir korelasyon ortaya koymamışlardır.

Görüldüğü gibi geçmişte yapılan bir çok çalışmada çok farklı oranda HPV pozitifliği saptanmıştır. Bu durum HPV araştırmasında kullanılan çok çeşitli yöntemlere ve bu yöntemlerin hassasiyetlerinin farklı olmasından kaynaklanabilmektedir. Ayrıca HPV prevelansı çeşitli coğrafi bölgelere göre de değişiklik gösterebilmektedir. Buradan yola çıkarak ileride büyük vaka serilerinde standart yöntemlerle yapılacak HPV araştırmasının daha kesin sonuçlar vereceği umulmaktadır.

Literatür incelendiğinde p53 ve Ki-67 ekspresyonlarının prognozu nasıl etkiledikleri kesin olarak ortaya koyulamamıştır. Bizim çalışmamızda saptanan yüksek grade ile yüksek p53 ekspersyonu ilişkisi p53 ekspresyonunun kötü prognoz göstergesi olabileceğini düşündürmektedir.



## SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1- Çalışmaya alınan olguların 46'sı (% 97,9) erkek, 1'i (% 2,1) kadındır.
- 2-Olgulardan 20'si (% 42,6) iyi diferansiye, 22'si (% 46,8) orta derecede diferansiye ve 5'i (% 10,6) az diferansiyedir.
- 3- Tümörlerin 7'si (% 14,9) supraglottik, 20'si (% 42,6) transglottik, 20'si (% 42,6) glottik yerleşimlidir.
- 4- AJCC TNM evreleme sistemine göre T1 15 olgu (% 31,9), T2 11 olgu (%23,4), T3 5 olgu (%10,6), T4 16 olgu (% 34,0) izlenmiştir.
- 5- Boyunda lenf nodu metastazı 12 (% 25,5) hastada saptanmıştır. Uzak metastaz izlenmemiştir.
- 6- Sigara içen olgu sayısı 43 (% 91,5), içmeyen olgu sayısı 4 (% 8,5) tür.
- 7- İHK yöntemle uygulanan panHPV boyasında 25 (%53,2) olguda pozitif boyanma, 22 (%46,8) olguda negatif boyanma tespit edildi.
- 8- İHK yöntemle uygulanan HPV 16 boyasında 27 (%57,4) olguda pozitif boyanma, 20 (%42,6) olguda negatif boyanma tespit edildi.
- 9- Hiçbir hastada İHK yöntemle yapılan HPV 18 boyasında pozitiflik tespit edilmedi.
- 10 Yapılan p53 değerlendirmesinde olguların 22'si (%46,8) düşük, 25'i ( % 53,2) yüksek dereceli boyandığı tespit edildi.
- 11- Ki-67 değerlendirmesinde olguların 19'u (%40,4) düşük, 28'i ( % 59,6) yüksek dereceli boyandığı tespit edildi.
- 12- Olguların 15'inde (% 31,9) PZR yöntemi ile poliklonal HPV pozitifliği saptandı. Bu olgulardan 5'sinde (% 10,6) HPV 16, 1'inde (% 2,1) HPV 31 pozitif, 1'inde (% 2,1) HPV 52, 5'inde (%10,6) HPV 53, 1'inde(% 2,1) hem HPV 16 hem de HPV 52, 2'sinde (% 4,3) hem HPV 16 hem de HPV 68 saptandı.
- 13- HPV pozitifliği bulunan olgularda yüksek derecede Ki-67 boyanması elde edilmiştir.
- 14- İki olguda HPV 68 bulundu. Literatür araştırıldığında şimdiye kadar bu tipte bir HPV virüsünün larinks SHK'larında saptanmadığı görüldü.
- 15- p53 ile sigara alışkanlığı, T evresi, grade, tümör lokalizasyonu ve boyun metastazı arasındaki ilişki incelendiğinde diferansiyasyon azaldıkça p53 ekspresyonunun arttığı

görülmektedir. Buda yüksek p53 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olabileceğini göstermektedir.

**16-** Ki-67 ile sigara alışkanlığı, T evresi, grade, tümör lokalizasyonu ve boyun metastazı arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır.

**17-** HPV enfeksiyonlarının büyük bir kısmının geçici olması, enfeksiyonun yamalı tarzda tutulum yapması ve parafindeki dokulardan örnek çalışmak HPV tanısını ve tiplendirilmesini güçleştirmektedir. HPV tanısı için altın standart yöntem taze dokuda PZR ile HPV DNA çalışılmasıdır. İleride yapılacak daha geniş çaplı araştırmalar ile HPV tayini daha hızlı ve ucuz yapılabilecek belki de son yıllarda serviks kanserini engellemek için yapılan aşılardan benzerleri baş-boyun kanserleri için de uygulanabilecektir.

**18-** Ki-67 ve p53 overekspresyonları larinks SHK'larında iyi veya kötü prognoz açısından yol gösterici olabilir. İleri araştırmalar ile larinks SHK'larının tedavisi ve takibinde bu parametrelerin önemi daha iyi anlaşılabilecektir.

## ÖZET

### LARİNKS PRİMER SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMLARINDA HUMAN PAPİLLOMA VİRÜS SIKLIĞI, p53 ve Ki-67 EKSPRESYONLARININ KLİNİKOPATOLOJİK KORELASYONU

**Amaç:** Son yıllarda yapılan araştırmalar ile larinks kanserlerinde de human papilloma virüs enfeksiyonlarının rolü olabileceği düşünülmektedir. p53 geni mutasyona uğradığında tümör gelişimi daha kolaylıkla meydana gelir. Hücre proliferasyonunu gösteren Ki-67 nükleer immünoreaktivitesi ile tümör dokusundaki mitoz sayısı arasında iyi bir korelasyon vardır. Bu çalışmada 47 larinks skuamöz hücreli karsinom olgusunun patoloji preparatlarından kesitler alındı. Bu örnekler ile immünhistokimyasal boyamalar ve polimeraz zincir reaksiyonu ile human papilloma virüs araştırmaları yapılırken, bunların klinik parametreler ile korelasyonu incelendi.

**Gereç-Yöntem:** PanHPV, HPV 16, HPV 18, p53 ve Ki-67 boyaları yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu ile poliklonal human papilloma virüs varlığı araştırıldı.

**Bulgular:** İmmünhistokimyasal yöntemle uygulanan PanHPV boyasında 25 (%53,2) olguda pozitif boyanma, 22(%46,8) olguda negatif boyanma tespit edildi. İmmünhistokimyasal yöntemle uygulanan HPV 16 boyasında 27 (%57,4) olguda pozitif boyanma, 20(%42,6) olguda negatif boyanma tespit edildi. Yapılan p53 değerlendirmesinde olguların 22'si (%46,8) düşük, 25'i ( % 53,2) yüksek dereceli boyandığı tespit edildi. Ki-67 değerlendirmesinde olguların 19'si (%40,4) düşük, 28'i ( % 59,6) yüksek dereceli boyandığı tespit edildi. p53 ile grade arasındaki ilişki incelendiğinde diferansiyasyon azaldıkça p53 ekspresyonunun arttığı görülmektedir.

**Sonuç:** Human papilloma virüs enfeksiyonlarının büyük bir kısmının geçici olması, enfeksiyonun yamalı tarzda tutulum yapması ve parafindeki dokulardan örnek çalışmak human papilloma virüs tanısını ve tiplendirilmesini güçleştirmektedir. İleride yapılacak daha geniş çaplı araştırmalar ile human papilloma virüs tayini daha hızlı ve ucuz yapılabilecek belki de son yıllarda serviks kanserini engellemek için yapılan aşılardan benzerleri baş-boyun kanserleri için de uygulanabilecektir. Ki-67 ve p53 overekspresyonlarının larinks skuamöz hücreli karsinomlarında prognozu açısından olumsuz parametreler olabileceği düşünülmüştür. İleri araştırmalar ile larinks skuamöz hücreli karsinomlarının tedavisi ve takibinde bu parametrelerin önemi daha iyi anlaşılacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Human papilloma virüs, larinks, p53, Ki-67.

İletişim Adresi:ADÜ Tıp Fakóltesi  
KBB AD Aytepe Mevkii  
AYDIN

E-mail: drmcetin68@hotmail.com

## SUMMARY

### **Human Papilloma Virus Prevalence and Clinicopathological Correlation of p53 and Ki-67 Expressions in Primary Squamous Cell Carcinoma of Larynx**

**Objective:** Recent studies showed that human papilloma virus infections may play a role in developing cancer in the larynx. A mutation in p53 gene increases the risk of tumorigenesis. There is a significant correlation between mitosis and Ki-67 nuclear immunoreactivity which shows the cell proliferation.

We studied samples taken from patients of 47 squamous cell carcinoma of larynx. These samples are assessed with immunohistochemical staining and analyzed with polymerase chain reaction for human papilloma virus. The results were analysed if there is a correlation between clinical parameters or not.

**Material and Methods:** In addition to hematoxylin-eosin stain we treated the samples with PanHPV, HPV16, HPV18, p53 and Ki-67 stains. Polyclonal human papilloma virus existence was studied with polymerase chain reaction.

**Findings:** 25 samples (53.2%) were resulted as positive and 22 samples(46.8%) were resulted negative in immunohistochemical staining with PanHPV. 27 samples (57.4%) were resulted as positive and 20 samples(42.6%) were resulted negative in immunohistochemical staining with HPV 16. In p53 examination 22 of samples (46.8%) were dyed low leveled and 25 of samples (53.2%) were dyed high leveled. In Ki-67 examination 19 of samples (40.4%) were dyed low leveled and 28 of samples (59.6) were dyed high leveled. Association with human papilloma virus positiveness and high leveled Ki-67 staining was observed. Relationship between p53 and grade also studied. It has been found that decreasing in differentiation is associated with increasing in p53 expression.

**Result:** Temporariness of most of human papilloma virus infections, patchy involvement and studying with samples embed into paraffin makes it difficult to diagnose human papilloma virus infections and classifying. Future studies will provide fast and cheap diagnostic methods and maybe vaccination will take a place in clinical practice for head-neck carcinomas like vaccines using for preventing cervical cancer. Ki-67 and p53 overexpression considered as a prognostic factor for squamous cell carcinoma of larynx. Further studies will provide a better understanding for role of these parameters in treatment and follow-up of squamous cell carcinoma of larynx.

Key words: Human papiloma virus, larynx, p53, Ki-67

Communication Address: ADÜ Medicine Faculty  
ORL Department Aytepe Mevkii

AYDIN

E-mail: drmcetin68@hotmail.com

## KAYNAKLAR

1. Lazaris AC, Lendari I, Kavantzias N, Kandiloros D, Adamopoulos G, Davaris P. Correlation of tumor markers p53, bcl-2 and cathepsin-D with clinicopathologic features and disease-free survival in laryngeal squamous cell carcinoma. *Pathology International* 2000; 50: 717-724.
2. Mendenhall WM, Million RR, Stringer SP, Cassisi NJ. Squamous cell carcinoma of the glottic larynx: a review emphasizing the university of Florida Philosophy. *Southern Medical Journal* 1999; 92: 385-393.
3. Narayana A, Vaughan ATM, Fisher SG, Reddy SP. Second primary tumors in laryngeal cancer: results of long-term follow-up. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1998; 42: 557-562.
4. Elçi OC, Akpınar M, Blair A, Dosemeci M. Risk of laryngeal cancer by occupational chemical exposure in Turkey. *J Occup Environ Med* 2003; 45(10): 1100-1106.
5. Tumours of the hypopharynx, larynx and trachea, in: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, (eds.) *World Health Organization Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Pres: 108-162, Lyon 2005.
6. Berrino , Elci OC, Elci MA: Occupational exposures, anatomic location and geographic distribution of laryngeal cancer; letter to the editor. *Cancer causes and control* 2004; 15: 429-30.
7. Büyükbayram H, Cüreoğlu S, Arslan A, Işıkkakdoğan R: Prognostic value of PCNA and mutant p53 expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Investigation* 2004; vol22 No: 2: 195-202.
8. Deilson Elgui de Oliveira, Maura M. Bacchi, Ricardo S.S. Macarenco, José Vicente Tagliarini, Ricardo C. Cordeiro, and Carlos E. Bacchi. Human Papillomavirus and Epstein-Barr Virus Infection, p53 Expression, and Cellular Proliferation in Laryngeal Carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2006; 126:284-293.
9. Manjarrez ME, Ocadiz R, Valle L, Pacheco C, Marroquin A, De la Torre C, Selman M, Gariglio P. Detection of human papillomavirus and relevant tumor suppressors and oncoproteins in laryngeal tumors. *Clin Cancer Re* 2006; Dec 1;12(23): 6946-51.
10. Shope RE, Hurst EW Infectious papillomatosis of rabbits. *J exp med* 1933; 58: 607-23.
11. Snijders PJ, van den Brule AJ, Meijer CJ, et al Papillomaviruses and cancer of the upper digestiven and respiratory tracts. (Review.) *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 186: 177-198
12. Walboormers JMM, Humsan AM, van den Brule AVC, et al. Detection of genital human papillomavirus infections: critical review of methods and prevalence studies in relation to

cervical cancer. Stern PL, Stanley MA, eds. Human papillomaviruses and cervical cancer: biology and immunology. New York. Oxford University Press, 1994: 40-71.

13. Brandwein MS, Nurowo GJ, Biller H. Analysis of prevalence of human papillomavirus in laryngeal carcinomas. *Ann Otorhinolaryngol* 1993; 102: 309-13.

14. Rodriguez Tojo MJ, Garcia Cano FJ, Infante Sanchez JC, et al. Immunoexpression of p53, Ki-67 and E-cadherin in basaloid squamous cell carcinoma of the larynx. *Clin Transl Oncol*. 2005 Apr;7(3):110-4.

15. Narayana A, Vaughan AT, Gunaratne S, et al. Is p53 an independent prognostic factor in patients with laryngeal carcinoma? *Cancer*. 1998 Jan 15;82(2):286-91.

16. Calli C, Calli A, Pinar E, et al. Expression of Ki-67 and p53 in laryngeal squamous cell carcinomas. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg*. 2005 Jul-Aug;15(1-2):9-13.

17. Liu M, Lawson G, Delos M, et al. Prognostic value of cell proliferation markers, carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2003 Jan;260(1):28-34

18. Sittel C, Eckel HE, Damm M, et al. Ki-67 (MIB1), p53, and Lewis-X (LeuM1) as prognostic factors of recurrence in T1 and T2 laryngeal carcinoma. *Laryngoscope*. 2000 Jun;110(6):1012-7.

19. Hirvikoski P, Kumpulainen E, Virtaniemi J, et al. Enhanced apoptosis correlates with poor survival in patients with laryngeal cancer but not with cell proliferation, bcl-2 or p53 expression. *Eur J Cancer*. 1999 Feb;35(2):231-7.

20. Lera J, Lara PC, Perez S, et al. Tumor proliferation, p53 expression, and apoptosis in laryngeal carcinoma: relation to the results of radiotherapy. *Cancer*. 1998 Dec 15;83(12):2493-501.

21. Teppo H, Soini Y, Melkko J, et al. Prognostic factors in laryngeal carcinoma: the role of apoptosis, p53, proliferation (Ki-67) and angiogenesis. *APMIS*. 2003 Apr;111(4):451-7.

22. Motamed M, Banerjee AR, Bradley PJ, et al. MIB-1 and p53 expression in radiotherapy-resistant T1aN0M0 glottic squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 2001 Jun;26(3):227-30.

23. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th ed. Toronto: Mosby Inc, 2004:335-48.

24. Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2002.

25. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol*. 1990 Jun;1(3):199-206.

26. Acikalin MF, Oner U, Tel N, et al. Prognostic significance of Ki-67 expression for patients with laryngeal squamous cell carcinoma primarily treated by total laryngectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2004 Aug;261(7):376-80.



27. Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol.* 2004 Sep;15(9):1319-29.
28. <http://anatomi.uludag.edu.tr/hakan1.htm>. Erisim Tarihi: 02.04.2011
29. Weir N: Anatomy of the Larynx and Tracheobronchial tree. In: Scott-Brown's Otolaryngology. Ed. Alan GK, Michael G. 6nd ed. Butterworth-Heinemann Int 1997; Vol 1: 12/1-12/27.
30. Respiratory tract. In: Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO, editors. 2005 Basic Histology. 8th ed.
31. Kozuma S, Nemoto A, Okai T, Mizuno M. Maturation sequence of fetal breathing movements. *Biol Neonate* 60(suppl 1)\_ 36 1991.
32. Mills SE, Fechner RE. Larynx and pharynx. In: Sternber SS, ed. Histology for Pathology. Second edition. Philadelphia, Newyork: Lipincott-Raven; 1997.p:391-409.
33. Moore KL. Clinically Oriented Anatomy Baltimore USA, Williams & Wilkins, 1992
34. Arıncı K, Elhan A. Anatomi, 3. baskı. İstanbul, Güneş Kitabevi, Cilt 1,2001 290-297.
35. Sternberg SS. Pathology of the larynx, In: Diagnostic Surgical Pathology. third edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins Publishers,1999, 925-947.
36. Sternberg SS. Larynx and pharynx, In: Histology for Pathologists. 2nd ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers,1997, 391-398.
37. Rosai J. Larynx and trachea, In: Ackerman's Surgical Pathology. 8th ed. New York, Mosby,1996, 314-337.
38. Korczynska B,Korzeniowski S, Skolyszewski J. Cancer of the larynx in females. *Cancer Radiotherapie* 2003, 7: 380-385.
39. Khademi B, Shirazi FM, Vasei M, Doroudchi M, Gandomi B, Modjtahedi H, Pezeshki AM, Ghaderi A. The expression of p53, c-erbB-1 and c-erbB-2 molecules and their correlation with prognostic markers in patients with head and neck tumors. *Cancer Letters* 2002; 184: 223-230.
40. Leon X, Rinaldo A, Saffiotti U, Ferlito A. Laryngeal cancer in non-smoking and nondrinking patients. *Acta Otolaryngol* 2004; 124: 1-6.
41. Kaufman JA, Burke AJ. The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am* 1997 ; 30: 1-19.
42. Sinard RJ, Netterville JL, Garrett CG, Ossoff RH, D.M.D. Cancer of the larynx. *Cancer of the head and neck. Third Edition.* Philadelphia, Pennsylvania 1996; 381-421.
43. Mendenhall WM, Million RR, Stringer SP, Cassisi NJ. Squamous cell carcinoma of the glottic larynx:a review emphasizing the university of Florida Philosophy. *Southern Medical Journal* 1999; 92: 385-393.

44. Taxy JB. Upper respiratory tract. Anderson's pathology. Tenth edition. 1996, 1460-1469.
45. Charles E. Moore, Brian J. Wiatrak, Kenneth D. McClatchey, Charles F. Koopmann, Giovanna R. Thomas, Carol R. Bradford, Thomas E. Carey. High-risk human papillomavirus types and squamous cell carcinoma in patients with respiratory papillomas. Otolaryngology–Head and Neck Surgery 1999, 120; 5: 698-705.
46. Manjarrez ME, Ocadiz R, Valle L, Pacheco C, Marroquin A, De la Torre C, Selman M, Gariglio P. Detection of human papillomavirus and relevant tumor suppressors and oncoproteins in laryngeal tumors. Clin Cancer Re 2006, Dec 1;12(23):6946-51.
47. Kaya S, Verrüköz karsinom, Larenks hastalıkları, Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2002, 504-505
48. Fouret P, Martin F, Flahault A, Saint-Guily JL. Human papillomavirus infection in the malignant and premalignant head and neck epithelium. Diagn. Mol. Pathol 1995;4:122-127.
49. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumours. IARC Pres Lyon 2005: 109-145.
50. Kirchner J A, Carter D, : Pathology of the Larynx, Chapter 22: In Diagnostic Surgical Pathology. 3rd ed. Editor Sternberg S S. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, Baltimore, New York. 1999. p: 925-948.
51. Larynx and trachea. In: Rosai J, editor. Surgical Pathology. 9th ed. Edinburgh London New York; 2004. p. 305-358.
52. Syrjönen KJ. HPV infections in benign and malignant sinonasal lesions. J Clin Pathol 2003;56: 174-181.
53. Fregonesi PAG, Teresa DB, Duarte RA. P16INK4A immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. The journal of histochemistry and cytochemistry 2003; 51(10): 1291-1297.
54. Vielba R, Bilbao J, Ispizua A, Zabalza I, Alfaro J, Rezola R, Moreno E, Elorriaga J, Alonso I, Baroja A, Hoz C. p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. Laryngoscope 2003; 113: 167-172.
55. Münger K, Baldwin A, Edwards EM, Hayakawa H. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. J Virol 2004;78:11451–60.
56. [Pannone G](#), [Santoro A](#), [Papagerakis S](#), [Lo Muzio L](#), [De Rosa G](#), [Bufo P](#). The role of human papillomavirus in the pathogenesis of head & neck squamous cell carcinoma: an overview. Infect Agent Cancer 2011; Mar 29;6:4.
57. <http://sciencenotes.wordpress.com/2008/09/24/hpv-innoculation-protects-against-three-cancers/> Erisim tarihi: 06/01/2011.

58. Heilmann V, Kreienberg R. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Current Science Inc* 2002; 2: 27-33.
59. Kubar A. Papillomavirusların genel özellikleri. XXXII.Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı S:231-233.
60. Gerald L.Mandell, John E.Bennat, Raphael Dolin. Principles and Practice of İnfection Disease . Fifth Edition, Volume 2, S:1160-71.
61. Ribeiro-Silva A, Ramalho LNZ, Garcia SB, Zucoloto S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 336-340.
62. Sheikh MS, Fornace AJ. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* 200; 182: 171-181.
63. Mostafapour SM, Hockenbery DM, Rubel EW. Life and death in otolaryngology. Mechanisms of apoptosis and its role in the pathology and treatment of disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;125: 729-737.
64. Nakashima T, Wang XF, Masuda M, Inokuchi A, Komiyama S. Overexpression of p53 nuclear protein in premalignant and malignant laryngeal lesions. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999; 256: 56-59.
65. Merritt AJ, Potten CS, Kemp CJ, Hickman JA, Balmain A, Lane DP. The role of p53 inspontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Res* 1994; 54(3): 614-617.
66. WaldmanT, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 1995; 55(22): 5187-5190.
67. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25(4): 177-181.
68. Saint F, Le Frere Belda MA, Quintela R, Hoznek A, Patard JJ, Bellot J, Popov Z, Zafrani ES, Abbou CC, Chopin DK. Pretreatment p53 nuclear overexpression as a prognostic marker in superficial bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Eur Urol* 2004; 45(4): 475-482.
69. Shin DM, Lee JS, Lippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G, Heyne K, Shin HJC, Ro JY, Goepfert H, Hong WK, Hittelman WN. p53 expression:predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 519-529.
70. Dowell SP, Hall PA. The p53 tumour suppressor gene and tumour prognosis:is there a relationship. *Journal of pathology* 1995; 177: 221-224.
71. Tannapfel A, Weber A. Tumor markers in squamous cell carcinoma of the head and

neck:clinical effectiveness and prognostic value. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001; 258: 83-88.

72. Bando N, Hayashi T, Kishibe K, Takahara M, Imada M, Nonaka S, Harabuchi Y. Prognostic value of p53 mutations, bax and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 1968-1980.

73. Sung CJ, Zheng Y, Quddus MR, Kang X, Zhangs ZF, Lauchlan SC, Zhongs W. p53 as a significant prognostic marker in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2000; 10:119-127.

74. Saunders ME, Mackenzie R, Shipman R, Fransen E, Gilbert R, Jordan RCK. Patterns of p53 gene mutations in head and neck cancer: full-length gene sequencing and results of primary radiotherapy. *Clinical Cancer Research* 1999; 5: 2455-2463

75. Ribeiro-Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, Zucoloto S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 336-340.

76. Martinazzi M, Crivelli F, Zampatti C, Martinazzi S. Relationship between p53 expression and other prognostic factors in human breast carcinoma. An Immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 213-217.

77. Porter PL, Gown AM, Kramp SG, Coltrera MD. Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. An immunohistochemical study using methacarn-fixed, embedded tissue. *Am J Pathol* 1992; 140: 145-153.

78. Chang K, Ding I, Kern FG, Willingham MC. Immunohistochemical analysis of p53 and HER-2/neu proteins in human tumors. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 1281-1287.

79. Hensel CH, Xiang RH, Sakaguchi AY, Naylor SL. Use of the single strand conformation polymorphism technique and PCR to detect p53 gene mutations in small cell lung cancer. *Science* 1990; 249: 912-915.

80. Kazkayasi M, Hücümenoğlu S, Siriner Gİ, Hücümenoğlu M. Over-expression of p53 and c-erbB-2 oncoproteins in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001; 258: 329-335.

81. Rogriguez MA, Ford RJ, Goodacre A, Selvanayagam P, Cabanillas F, Deisseroth AB, Chromosome 17p and p53 changes in lymphoma. *British Journal of Haematology* 1991; 79: 575-582.

82. Hall PA, Campbell SJ, O'Neill M, Royston DJ, Nylander K, Carey FA, Kernohan NM. Expression of the p53 homologue p63 $\alpha$  and  $\Delta$ Np63 $\alpha$  in normal and neoplastic cells. *Carcinogenesis* 2000; 21(2): 153-160

83. Chomchai JS, Du W, Sarkar FH, Li YW, Jacobs JR, Ensley JF, Sakr W, Yoo GH. Prognostic significance of p53 gene mutations in laryngeal cancer. *The American Laryngological Rhinological Otological Society* 1999; 109(3): 455-459.

84. Cabelguenne A, Blons H, Waziers I, Carnot F, Houllier A, Soussi T, Brasnu D, Beaune P, Laccourreye O, Puig PL. p53 alterations predict tumor response o neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1465-1473.
85. Hirai T, Hayashi K, Takumida M, Ueda T, Hirakawa K, Yajin K. Reduced expression of p27 is correlated with progression in precancerous lesions of the larynx. *Auris Nasus Larynx* 2003; 30: 163-168.
86. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al. 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.
87. Cattoretti G, Becker MH, Key G, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*. 1992 Dec;168(4):357-63.
88. Liu M, Lawson G, Delos M, et al. Prognostic value of cell proliferation markers, tumour suppressor proteins and cell adhesion molecules in primary squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2003 Jan;260(1):28-34.
89. Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol*. 2004 Sep;15(9):1319-29.
90. Stell PM. Prognosis in laryngeal carcinoma: host factors. *Clin Otolaryngol* 1990; 15: 111-119.
- 91- Berrino , Elci OC, Elci MA: Occupational exposures, anatomic location and geographic distribution of laryngeal cancer; letter to the editor. *Cancer causes and control* 2004; 15: 429-30.
- 92- Gutierrez MI, Cherney B, Hussain A, et al.: Bax is frequently compromised in Burkitt's lymphomas with irreversible resistance to Fas-inducedapoptosis: *Cancer Res* 1999; 59: 696-703.
- 93- Hamann KJ, Dorcheid DR, Ko FD, et al.: Expression of Fas (CD95) and Fas ligand (CD95L) in human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 537-42.
- 94- Hellquist HB: Apoptosis in epithelial hyperplastic laryngeal lesions. *Acta Otolaryngol* 1997; 527: 25-9.
- 95- Hug H : Fas-mediated apoptosis in tumor formation and defense. *Biol Chem* 1997; 378: 1405-12.
96. Ullman EV. On the aetiology of the laryngeal papilloma. *Acta Otolaryngol* 1923;5:317–334.

97. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 1984;3:1151–1157.
98. Loëning T, Meichsner M, Milde-Langosch K, et al. HPV DNA detection in tumours of the head and neck: a comparative light microscopy and DNA hybridization study. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1987;49:259–269.
99. Adelstein DJ, Ridge JA, Gillison ML, et al. Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: summary of a National Cancer Institute State of the Science Meeting, November 9–10, 2008, Washington, D.C. *Head Neck* 2009;31:1393–1422.
100. Fakhry C, Westra WH, Li S, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:261–269.
101. Ragin CCR, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2007;121:1813–1820.
102. Heilmann V, Kreienberg R. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Current Science Inc* 2002; 2: 27-33.
103. [Morshed K](#), [Polz-Dacewicz M](#), [Szymański M](#), [Smoleń A](#). Usefulness and efficiency of formalin-fixed paraffin-embedded specimens from laryngeal squamous cell carcinoma in HPV detection by IHC and PCR/DEIA. *Folia Histochem Cytobiol* 2010; 48(3): 398-402.
104. Morshed K, Polz-Dacewicz M, Rajtar B, Szymanski M, Ziaja-Sołtys M, Gołabek W. The prevalence of E6/E7 HPV type 16 in laryngeal cancer and in normal mucosa. *Pol Merkur Lekarski* 2005;Sep;19(111):291-3.
105. Kreuter A, Wieland U. Human papillomavirus-associated diseases in HIV-infected men who have sex with men. *Curr Opin Infect Dis* 2009; Apr;22(2):109-14.
106. Morshed K, Polz-Dacewicz M, Szymanski M, Polz D. Short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of human papillomaviruses in laryngeal squamous cell carcinoma and normal mucosa: clinico-pathological evaluation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008;265(Suppl 1):S89–S96.
107. Gungor A, Cincik H, Baloglu H, Cekin E, Dogru S, Dursun E. Human papilloma virus prevalence in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol* 2007;121:772–774
108. de Oliveira DE, Bacchi MM, Macarenco RS, Tagliarini JV, Cordeiro RC, Bacchi CE. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection, p53 expression, and cellular proliferation in laryngeal carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2006;126:284–293.
109. Ma XL, Ueno K, Pan ZM, Hi SZ, Ohyama M, Eizuru Y. Human papillomavirus DNA sequences and p53 over-expression in laryngeal squamous cell carcinomas in Northeast China. *J Med Virol* 1998;54:186–191.

110. Holsinger FC, Kies MS, Diaz EM Jr, et al. Durable long-term remission with chemotherapy alone for stage II to IV laryngeal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:1976–1982.
111. Holsinger FC, Lin HY, Bassot V, Laccourreye O. Platin-based exclusive chemotherapy for selected patients with squamous cell carcinoma of the larynx and pharynx. *Cancer* 2009;115:3909–3918.
112. Clayman GL, Stewart MG, Weber RS, el-Naggar AK, Grimm EA. Human papillomaviruses in laryngeal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 1990; 46:8-11
113. [Gallo A](#), [Degener AM](#), [Pagliuca G](#), [Pierangeli A](#), [Bizzoni F](#), [Greco A](#), [de Vincentiis M](#). Detection of human papillomavirus and adenovirus in benign and malignant lesions of the larynx. [Otolaryngol Head Neck Surg](#). 2009; 141(2):276-81.
114. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:622–35.
115. Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, Kyroudi A, Rassidakis AN, Ikononopoulos JA, Barbatis C, Herrington CS, Kittas C. Human papilloma virus (HPV) is possibly involved in laryngeal but not in lung carcinogenesis. *Hum Pathol* 1999 Mar;30(3):274-83.
116. Güvenç MG, Midilli K, \_nci E, Ergin S, Sar M, Özergil E, Kuskucu M, Öz B, Özdoğan A, Altas K. Larenksin primer karsinomlarında human papillomavirüs (HPV) varlığının ve larenks karsinomu ile HPV ilişkisinin araştırılması .XXVII. Türk Ulusal Otolarengoloji ve Bas Boyun Cerrahisi Kongresi, Kongre Kitabı. 506.
117. Saheb Jamee M, Boorghani M, Ghaffari SR, Atarbashi Moghadam F, Keyhani A. Human papillomavirus in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009 Oct 1;14(10):525-8.
118. Jacob SE, Sreevidya S, Chacko E, Pillai MR. Cellular manifestations of human papillomavirus infection in laryngeal tissues. *J Surg Oncol* 2002;79:142-150.
119. Lindel K, Beer KT, Laissue J, et al. Human Papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: A radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 805-813.
120. Wittekindt C, Gültekin E, Weissenborn SJ, et al. Expression of p16 protein is associated with human papillomavirus status in tonsillar carcinomas and has implications on survival. *Adv otorhinolaryngol* 2005; 62: 72-80.
121. [Morshed K](#). Association between human papillomavirus infection and laryngeal squamous cell carcinoma. [J Med Virol](#). 2010; 82(6); 1017-23.
122. Ha PK, Califano JA. The molecular biology of laryngeal cancer. *Otolaryngol Clin N Am* 2002; 35: 993-1012.
123. Morawski K, Gabriel A, Namyslowski G, Ziolkowski A, Pietrawska V, Steplewska K. Clinical application of proliferating cell nuclear antigen, oncoprotein p53 and tumor front

grading analysis in patients operated on for laryngeal cancer. Eur Arch Otorhinolaryngol 1999; 256: 378-383.

124. Wood NB, Kotelnikov V, Caldarelli DD, Hutchinson J, Panje WR, Hedge P. Mutation of p53 in squamous cell cancer of the head and neck; Relationship to tumor cell proliferation. The Laryngoscope 1997; 107: 827-833.

125. Spafford MF, Koeppe J, Pan Z, Archer PG, Meyers AD, Franklin WA. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44v6 and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1996; 122: 627-32.

126. Jin YT, Kayser S, Kemp BL, Ordonez NG, Tucker SL, Clayman GL, Goepfert H, Luna MA, Batsakis JG, Elnaggar AK. The prognostic significance of the biomarkers p21WAF1/CIP1, p53, and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. Cancer 1998; 82:2159- 2165.

127. [Rodrigues RB](#), [Motta Rda R](#), [Machado SM](#), [Cambruzzi E](#), [Zettler EW](#), [Zettler CG](#), [Jotz GP](#). Prognostic value of the immunohistochemistry correlation of Ki-67 and p53 in squamous cell carcinomas of the larynx. Braz J Otorhinolaryngol 2008; 74(6): 855-9.

128. Fumic-Dunkic L, Katic V, Janjanin S, et al. Retrospective analysis of Ki-67 antigen expression in paraffin tissue blocks of laryngeal squamous cell carcinoma. Am J Otolaryngol. 2003; Mar-Apr;24(2):106-10.