

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
İNCİRALTI/İZMİR

LARİNGSİN PREİNVAZİV EPİTELİYAL LEZYONLARINDA UYGULANAN
DÜNYA SAĞLIK ÖRGÜTÜ (1991) VE LJUBLJANA (1997)
SINIFLANDIRMALARININ İMMUNDOKUKİMYASAL İŞARETLEYİCİLER
(Ki-67, p53, CD34) KULLANILARAK KARŞILAŞTIRILMASI
(54 OLGU)

103477

103477

Uzmanlık Tezi
Dr. Selma ŞENGİZ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İZMİR-2001

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	1
GİRİŞ	3
GEREÇ VE YÖNTEM	24
BULGULAR	29
TARTIŞMA.....	43
SONUÇLAR	52
ÖZET	54
SUMMARY	57
KAYNAKLAR	60

ÖNSÖZ

Skuamöz hücreli karsinom larinksin en sık görülen neoplazmidir. Bu kanser türü, prekanseröz olarak kabul edilen epiteliyal hiperplastik-displastik lezyonlardan kaynaklanır. Dolayısıyla, bu lezyonların invaziv kansere dönüşme potansiyellerinin doğru şekilde belirlenmesi, bu tür lezyonlara sahip hastaların tanı ve tedavisi açısından çok önemlidir. Günümüzde, bu lezyonların derecelendirilmesinde uygulanan standart yöntem histolojik incelemedir. Bu lezyonları sınıflandırmak ve karsinoma dönüşme risklerini belirlemek için mikroskopik anormalliklerin kesin ve tutarlı bir biçimde değerlendirilmesi gerekir. Kaynaklarda epiteliyal hiperplastik-displastik lezyonların derecelendirilmesiyle ilişkili çok sayıda sınıflama yer almaktadır. Bununla birlikte yaygın olarak kullanılan iki sınıflama Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) (1991) ve Ljubljana (1997) sınıflamalarıdır.

Bu çalışmada; 54 laringeal hiperplazi-displazi olgusunda DSÖ ve Ljubljana sınıflandırmaları karşılaştırılmış; bu olgularda anti-Ki-67, p53 ve CD34 immundokimyasal belirleyiciler kullanılarak proliferatif aktivite, genetik değişiklikler ve anjiogenezis hakkında objektif veriler sağlanmıştır. Bu objektif veriler kullanılarak sözkonusu sınıflandırmalardaki histolojik ölçütlerin geçerliliği araştırılmıştır.

Tez çalışmamdaki ve patoloji eğitimim sırasındaki katkılarından dolayı tez danışmanım Prof.Dr. H. Uğur Pabuççuoğlu'na; ilgi ve desteklerinden dolayı Doç.Dr. Sülen Sarioğlu'na; istatistiksel verilerin elde edilmesinde katkı ve önerilerinden dolayı Doç.Dr. Erdener Özer ve Halk Sağlığı Anabilim Dalı'ndan Uzm.Dr. Yücel Demiral'a teşekkür ederim.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim sırasında yetişmemde emeği geçen değerli öğretim üyeleri, Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Emek Özen, Prof.Dr. M. Şerefettin Canda, Prof.Dr. Tülay Canda,

Prof.Dr. A. Ali K peli   , Prof.Dr. H. Aydanur Kargı, Prof.Dr. Kutsal Y r ko  , Doç.Dr. Meral Koyuncuo  , Doç.Dr. S len Sario  , Doç.Dr. Erdener  zer ve Doç.Dr. Özgül Sa ol'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca uzmanlık eğitimim sırasındaki katkılarından dolayı Yrd.Doç.Dr. Banu Lebe, Yrd.Doç.Dr. Sermin  zkal, Uzm.Dr. Esra  zkara, Uzm.Dr. Feza Kırımca, Uzm.Dr. Burçin Tuna, Uzm.Dr. Dilek Ak, Uzm.Dr.  a nur Uluku , Uzm.Dr. Banu Sis ile değerli araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca Patoloji Anabilim Dalı'nın tüm laboratuvar personeline de teşekkürlerimi sunarım.



GİRİŞ

1.KISA ANATOMİ VE HİSTOLOJİ

1.1. Anatomi

Larinks bir ses organı ve hava için geçiş yoludur. Aynı zamanda hava yolları girişinde koruyucu sfinkter sağlayan özelleşmiş bir organdır. Önde deri, fasya ve infrahyoid kaslar ile örtülüdür. Yukarıda pars laringea farinkse açılır. Aşağıda trakea ile devam eder. Larinks iskeleti kıkırdaklardan oluşur. Kıkırdaklar membran ve ligamentler ile birbirine bağlanmıştır. Ek olarak bu kıkırdakların hareketini sağlayan kaslar bulunur. İç yüzünü örten mukoza yukarıda ve arkada farinks, aşağıda trakea mukozası ile devam eder (1).

Larinks kıkırdakları üçü çift ve üçü tek olmak üzere 9 tanedir. Çift olanlar cartilago arytenoidea, cartilago corniculata, cartilago cuneiformis; tek olanlar cartilago thyroidea, cartilago cricoidea ve cartilago epiglottidis'dir. Cartilago thyroidea, cricoidea ve arytenoidea'nın büyük bir kısmı hyalin türde olup, diğer kıkırdaklar elastik türdedir. Hyalin kıkırdaklarda yaşla paralel giden kalsifikasyon izlenebilir (1,2).

Larinks mukozası lümeneye doğru iki çift kıvrım yapar. Üstte yer alan birinci çift plikaya plica vestibularis (bant ventrikül), altta yer alan diğer çift plikaya ise plica vokalis (kord vokal) adı verilir. Bu iki çift mukoza kıvrımı arasında kalan yarık biçimli derin girinti ventriculus laryngis (ventrikül) adını alır (2).

Tanımlanan anatomik oluşumlar gözönüne alınarak larinks boşluğu supraglottis, glottis ve subglottis olarak üç bölümde incelenir (1,3):

Supraglottis: Epiglotun üst ucundan başlayan ve ventrikülü içeren bölümdür. Burada yer alan yapılar epiglot, ariepiglottik kıvrımlar, aritenoid kıkırdaklar, bant ventriküller ve ventriküllerdir.

Glottis: Ventrikülden kord vokalin altına kadar uzanan bölümdür. Anterior ve posterior komissürler ile kord vokalleri içerir.

Subglottis: Kord vokallerin 5-10 mm altından krikoid kıkırdağın alt kenarına kadar uzanan bölümdür.

1.2. Histoloji

Epiglotun lingual ve laringeal yüzü vardır. Tüm lingual yüz ve laringeal tarafın apikal bölümü stratifiye skuamöz epitel ile döşelidir. Laringeal yüzde epiglotun tabanına doğru epitel silyalı respiratuvar tür epitele değişir. Epitel altında serömüköz bezler vardır (2).

Bant ventriküller ve ventriküller silyalı respiratuvar epitel ile döşelidir. Kord vokal mukozası stratifiye skuamöz epitel ile döşelidir. Sigara içmeyenlerde larinksin supraglottik ve infraglottik kısımları irregüler odaklar şeklinde skuamöz epitel ile örtülü iken, sigara içenlerde larinksin büyük kısmı skuamöz epitel ile örtülüdür (4,5).

Kord vokalin üst ve alt kısmında kalan silyalı respiratuvar epitel ile kordun skuamöz epiteli arasındaki geçiş keskin bir biçimde olabileceği gibi 2 mm'ye kadar ulaşabilen 'geçiş bölgesi' bulunabilir. Bu bölge serviks uterideki portio-endoserviks geçişinde rastlanılan değişikliklere benzer. Bu geçiş epiteli displazi ya da in situ karsinom ile karıştırılmamalıdır. Bu tür alanların disorganize görünümde olmasına karşın dikkatli bir inceleme ile hücrelerin uniform nükleusu oldukları ve mitozların bazal tabakaya sınırlı olduğu izlenir. (4)

Skuamöz epitel dar sitoplazmalı ve ovoid nükleuslu hücrelerden oluşan bir bazal tabaka içerir. Mitozlar normalde bu tabakaya sınırlıdır. Laringeal mukozanın matürasyonunda skuamöz hücreler yüzeye doğru migrasyon gösterirler. Bu hücreler poligonal biçimli olup normokromatik nükleus vardır ve nükleolusları izlenebilir. Eozinofilik sitoplazma geniştir ve fiksasyon sırasında hafif hücre büzülmesi nedeniyle komşu hücrelere doğru uzanan çok sayıda ince sitoplazmik uzantılar ortaya çıkar. Bu ince sitoplazmik uzantılar nedeniyle bu zona dikenli-prickle hücre tabakası (malpighi tabakası) adı verilmektedir. Bu tabaka skuamöz epitelin en geniş bölümüdür. Superfisiyel tabaka küçük kondanse nükleuslu, bir-üç sıralı, düzleşmiş hücrelerden oluşmaktadır (5).

Matür skuamöz epitelin kalınlığı değişken olup, total kalınlığı beş ile yirmibeş hücre arasında değişir. Normalde parakeratotik ya da ortokeratotik yüzey hücre tabakası yoktur. İrritanlarla devamlı karşılaşma parakeratozis odaklarına yolaçabilir (4-6).

2. LARİNKİN PREKANSERÖZ LEZYONLARI

Larinks mukoza epitelinde ortaya çıkan değişiklikler, hiperplastik ve displastik değişiklikler olarak iki grupta incelenebilir. Hiperplastik epiteliyal değişiklikler bir uyarana karşı ya da bir incinme sonucu ortaya çıkarlar ve reaktif bir değişiklik olarak nitelenirler. Displastik değişiklikler ise, hücrelerin morfolojik görünümünün malignite yönünde değişimi yani atipi ile karakterlidir.

2.1. Terminoloji (3,4,7)

Larinkste görülebilen reaktif ve prekanseröz epiteliyal değişiklikleri tanımlayan terimler başlıca şunlardır:

Hiperplazi: Hücre sayısının artması ile paralel giden mukoza epiteli kalınlaşmasıdır. Sitolojik atipi eşlik etmez. Enfeksiyonlarda, reaktif olaylarda izlenebilir.

Psödoepitelyomatöz hiperplazi: Maligniteye ilişkin sitolojik bulgu içermeyen, skuamöz epitelin aşırı derecede reaktif ve reparatif büyümesidir.

Keratozis: Mukoza epiteli yüzeyinde keratin tabakasının varlığıdır. Bu keratin tabakasının içinde nukleuslar da varsa 'parakeratozis' adını alır. Larinkste hiperkeratoz sigara içimiyle ilişkilidir ve kord vokallerde izlenir. Klinik olarak, alttaki stromada artmış belirgin vaskülerite ile birlikte mukoza beyaz, kalınlaşmış görünümündedir.

Diskeratozis: Epitel hücrelerin anormal keratinizasyonudur. Displastik lezyonlarda ve karsinomlarda izlenir.

Koilositozis: Skuamöz hücrelerdeki sitoplazmik vakuolizasyonu tanımlar. Hücreler köşeli, pleomorfik ve hiperkromatik nükleusludur. Bu hücreler genellikle süperfisiyel epiteliyal tabakada izlenir. Human papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonunu tanımlayıcı bir bulgudur.

Displazi: Hücre morfolojisinde malignite yönünde değişimi yansıtan görünüm (atipi) ve anormal hücre maturasyonunu yansıtır.

Müköz membranlardaki beyaz lezyonları tanımlayan "lökoplaki" ve kırmızı lezyonları belirleyen "eritroplaki" terimleri klinik terimler olup, yukarıda tanımlanan mikroskopik terimlerle hiçbir şekilde paralellik taşımamaktadır. Klinik olarak

eritroplaki olarak değerlendirilen lezyonların altında bir malign tümörün yatma olasılığı daha yüksek ise de tanı için mikroskopik inceleme temeldir.

2.2. Epiteliyal hiperplastik-displastik lezyonlar

Larinksin invaziv karsinoma ilerleyebilen epiteliyal hiperplastik-displastik lezyonları, en sık olarak kord vokal ve interaritenoid alanda izlenir (8). Bu lezyonlar daha çok orta-yaşlı sigara içen erkeklerde görülür. Bu hastalarda genellikle kızarıklık, kalınlaşma, ödem, keratinizasyon ya da ülserasyon gibi laringoskopik bulgular içeren kronik larinjitis semptomları vardır (9).

Laringeal patolojide, displazi terimi sıkça kullanılmaktadır. Histomorfolojik olarak epitelin hücresel ve yapısal değişikliklerini yansıtır (8). Bunlar; damla biçimli reteler, bazal hücre hiperplazisi, bazal hücre polaritesinin kaybı, hücresel pleomorfizm, mitotik figürlerde artış, diskeratoz, hücresel kohezyonun azalması ve epiteliyal stratifikasyonun kaybıdır (10). Premalign ile eş tutulan displazi terimi 1949 yılında Papanicolaou tarafından serviks uteri patolojisinde kullanılmıştır (8).

Laringolojide displazi terimi ise; 1974 yılında Toronto'da yapılan Laringeal Kanserin Yüzyıl Konferansı'nda (Centennial Conference on Laryngeal Cancer) kullanılmaya başlanmıştır. Aynı zamanda laringolojide, displazi terimi yerine kullanılmak üzere skuamöz intraepiteliyal neoplazi (SIN) ve laringeal intraepiteliyal neoplazi (LIN) terimleri için öneriler de vardır (8).

Değişik derecelerde displazi içeren olgularda, displazi ile daha sonra gelişmesi olası invaziv karsinom arasındaki ilişki ilk kez 1930 yılında tanımlanmıştır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmalarla displastik değişikliğin derecesi ile gelişebilecek olası karsinom sıklığı arasındaki genel korelasyonu gözlemlemişlerdir. Oral kavitedeki lezyonlar için bu oran % 7-36 iken, laringeal lezyonlarda % 8-29'dur (4).

3. LARİNGEAL EPİTELİYAL HİPERPLASTİK-DİSPLASTİK LEZYONLARDA ETYOPATOGENEZ (11-13)

3.1. Biyolojik faktörler

Cinsiyet: Genelde erkeklerde insidans kadınlara göre 10 kat yüksektir. Siyahlarda beyazlara göre daha yaygındır. Yetişkinlerde daha sıktır.

Diyet: Vitamin A yetmezliği laringeal mukozanın skuamöz epitelyal metaplazisine neden olabilir. Vitamin C, E, beta karoten, riboflavin, demir, çinko, selenyum yetmezliği epitelyal hiperplastik lezyon ve olası karsinom gelişim riskini artırır. Ayrıca, karsinogenezisin değişik evrelerinin antioksidanlar ile inhibe edilebileceği ileri sürülmektedir. Yapılan çalışmalarda; laringeal kanserli hastalarda meyve, yeşillik ve günlük süt tüketiminin az olduğu gözlemlenmiştir.

Lokal irritasyon faktörleri: Nazal solumanın baskılanması, laringeal mukozanın irritasyonuna neden olan soğuk hava, toz ve mikroorganizmaların girişine neden olur. Burun, rinofarinks sinüsleri ve faringotonsilin kronik enfeksiyonu reaktif olarak larinkse yayılır.

3.2. Kötü alışkanlıklar

Sigara: Tek başına ya da alkol ile birlikte, karsinom ve sigara tüketimi arasındaki ilişki iyi bilinmektedir. Otopsi çalışmaları sigara tüketimi ile displazi arasındaki güçlü ilişkiyi göstermiştir. Günde yirmiden çok sigara içenlerin % 47.2'sinde laringeal mukozada displazi izlenmiştir. Günde ondan az sigara içenlerde ise % 12.4 oranında bir risk bulunmaktadır (14). Sugar ve ark (15) p53 anormalliklerinin Human papilloma virüsden (HPV) çok, sigara içimiyle indüklenen mutajenlerle ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Sigara ilişkili kanser riski, sigaranın polisiklik aromatik hidrokarbon gibi 30 değişik karsinogenik yapıyı içermesiyle açıklanmaktadır. Ayrıca filtresiz sigara içimi daha yüksek oranda tümörojenik etkilerle karşılaşmaya ve sonuçta kanser gelişiminde artan bir riske neden olmaktadır.

Alkol: Larinksin displastik lezyonları ile alkol arasındaki ilk ilişki 1921 yılında Garel tarafından tanımlanmıştır. Alkol vasküler sistemde direkt ve indirekt etkiye

sahiptir. Alkol bağımlılarında, larinksin posterior ve superior bölümlerinde kronik konjesyon gözlenmiştir. Klinik olarak, kronik alkol tüketimi ve laringeal kanser riski arasındaki ilişki uzun yıllar boyunca gözlemlenmiş ve bu gözlemler çok sayıdaki epidemiyolojik çalışmalarla desteklenmiştir. Geçmişte laringeal kanser gelişiminde, alkolün sigara içenlerde arttırıcı bir risk faktör olduğu belirtilirken, yakın zamanda yapılan çalışmalarda alkolün kanser gelişiminde bağımsız risk faktörü olduğunu gösterir kanıtlar elde edilmiştir. Ayrıca, kronik alkol tüketimi, sıklıkla malnutrisyon ve tümör koruyucu vitamin ve minerallerin kaybı ile ilişkilidir.

Sesin kötü kullanılması: Çeşitli araştırmacılar displazi nedenleri arasında sesin kötü kullanılmasının patogenetik önemini tanımlamışlarsa da bu konu açıklık kazanmamıştır.

3.3. Çevresel faktörler

Toksik gaz, mineral ve hayvansal tozlar displaziye neden olabilecek başlıca çevresel faktörlerdir.

3.4. Sosyal durum:

Çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda sosyoekonomik durum ile laringeal kanser arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışmalar sonucunda düşük eğitim düzeyinde olanlarda sağlıklı ortamlar yanı sıra, sigara ve alkol tüketiminin de daha çok olmasından dolayı kanser gelişim riskinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

3.5. Meslek:

Organik-inorganik kimyasal etkenler, asbestozis, iyonize radyasyon, çeşitli metal tuzlarıyla karşılaşma laringeal karsinomla ilişkili olarak bulunmuştur.

3.6. Human papillomavirus (HPV):

Çok sayıdaki deneysel ve klinik çalışmalar, human papilloma virüs tiplerinin malignite gelişiminde etyolojik role sahip olduklarını göstermiştir. Human papilloma virüs laringeal papillom ve karsinom ile ilişkilidir. Virusun 80'den fazla tipi tanımlanmıştır. Elde edilen veriler Human papilloma virüs antijen ekspresyonunun immundokimyasal olarak gösterilmesine ve DNA hibridizasyon çalışmalarına

dayanmaktadır. Laringeal verrüköz karsinom gelişiminde HPV-16 sorumlu tutulurken, nonverrüköz karsinomlarda HPV 6, 11 ve 16 sorumlu tutulmaktadır (14-16). Sarioğlu ve ark. nın (17) çalışmasında laringeal skuamöz hücreli karsinom olgularında tümöre komşu mukozada immundokukimyasal yöntemle human papilloma virüsü gösterilmiştir.

4. LARİNGEAL EPIYELİYAL HİPERPLASTİK-DİSPLASTİK LEZYONLARIN SINIFLANDIRMASI VE TARİHÇESİ

Laringeal epiteliyal hiperplastik-displastik lezyonlar değişik risk gruplarına göre derecelendirilmesine karşın, bu lezyonların histolojik özellikleri ve biyolojik davranışları arasındaki ilişkinin her zaman uyumlu olmamasına bağlı olarak güçlükler ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, kaynaklarda laringeal epiteliyal hiperplastik lezyonlarla ilişkili 20'den çok sınıflandırma olması doğaldır (8). Çeşitli araştırmacılar değişik histomorfolojik kriterleri kullanarak bu lezyonları sınıflandırmışlardır (8,18):

Bir grupta yer alan araştırmacılar kalınlaşmış keratinize tabakayı ele almaktadır.

Diğer bir grupta ise keratinize tabakanın varlığı ya da kalınlığının yanısıra, hücrel atipi derecesinin değerlendirilmesini de ele alan araştırmacılar bulunmaktadır.

Diğer bir grup ise epiteliyal hiperplazi ve hücrel atipi derecesini birlikte ele almayı yeğlemektedir.

Bir grup araştırmacı (19) keratozu, atipisiz ve atipili keratoz olarak sınıflandırırken, örneğin Crissman (20) keratozu 3 dereceye ayırmıştır (Tablo I).

Tablo I. Crissman'ın keratoz derecelendirme ölçütleri (20)

1. Hafif keratozis (derece I)

Hiperkeratozis

Akantozis

Hafif psödoepitelyomatöz hiperplazi

Tek hücre atipisi yok

2. Orta derecede keratozis (derece II)

Hafif keratozdaki değişikliklere ek olarak;

Parakeratozun eşlik ettiği ya da etmediği hiperkeratoz

Belirgin psödoepitelyomatöz hiperplazi

Hafif tek hücre atipisi

3. Şiddetli keratozis (derece III)

Hafif ve orta derecede keratozdaki değişikliklere ek olarak;

İmmatür hücrelerin proliferasyonu

Belirgin diskeratoz

Belirgin sellüler atipi, mitoz

Epitelde matürasyon kaybı

Bozulmuş mozaik patern

1963 yılında Kleinsasser tarafından yapılan sınıflandırmada displastik lezyonlar üç farklı şekilde derecelendirilmiştir (11) (Tablo II):

Tablo II. Kleinsasser'in displazi derecelendirme ölçütleri

Derece I: displazi, mitoz ve hücrel atipi yokluğunda, farklı derecelerde keratozun eşlik ettiği basit hiperplazi.

Derece II: displazi ve hücrel atipi ile birlikte keratozun eşlik ettiği ya da keratozun eşlik etmediği hiperplazi. Hücrelerde polarite kaybı izlenir; hücreler hiperkromazi gösteren geniş nükleus içerir.

Derece III: kanserizasyon. Hücrel atipi tüm epitel tabakalarında izlenir (karsinoma in situ).

1971-1982 yılları arasında ise bir grup araştırmacı Kambic-Lenart sınıflandırmasını kullanmıştır. Bu sınıflandırmaya göre epitelial hiperplastik-displastik lezyonlar dört gruba ayrılmaktadır (18,21) (Tablo III):

Tablo III. Kambic-Lenart sınıflandırmasına göre epitelial hiperplastik lezyonların derecelendirme ölçütleri.

Basit hiperplazi: Malpighian hücrelerin çoğalmasına bağlı olarak kalınlaşmış epitel ile karakterlidir. Bazal tabaka düzgün ve 1-2 bazal hücre sırası içermektedir.

Anormal hiperplazi: Çoğalmış olan bazal hücre benzeri hücreler epitel kalınlığının yarısını geçmiştir. Belirgin nükleer ve hücrel atipi izlenmez. Ender olarak diskeratotik hücreler izlenir.

Atipik hiperplazi (riskli epitel): Tüm hiperplastik epitel hücreleri bazal hücre benzeri özelliktedir. Nükleus / sitoplazma oranı artmıştır ve hücreler belirgin nükleol içeren hafif hiperkromatik nükleusa sahiptir. Seyrek mitoz ve diskeratotik hücreler, tüm epitel kalınlığı boyunca gözlenir.

Karsinom (intraepitelial ve invaziv).

Hellquist ve ark. displazi derecelendirilmesini şu şekilde sınıflandırmışlardır (19,22,23):

- hafif displazinin eşlik ettiği ya da eşlik etmediği hiperplazi ve/ veya keratoz
- orta derecede displazi

■ şiddetli displazi ve in situ karsinoma.

1982-1987 yılları arasında ise; çeşitli araştırmacılar jinekolojik patolojideki analoglarına benzer sınıflandırma yapmışlardır (11):

Birinci grup kansere ilerleme riski olmayan lezyonlardır. Bazal hücrelerin hiperplazisi, basit keratinizasyon ve akantoz ile nitelenen lezyonları içerir.

İkinci grup ise laringeal intraepitelial neoplazi (LIN) adı altında gruplandırılan displazi ve in situ karsinomu içerir. Laringeal intraepitelial neoplazi LIN I-hafif displazi; LIN II- orta derecede displazi; LIN III-şiddetli displazi ve in situ karsinoma olarak ayrılmıştır (11). Bu sınıflandırma doğru bir yorumlamayla uygulanabilir, ancak tanı için histomorfolojik ölçütler tam olarak kesin değildir ve öznelidir. Nükleer atipi LIN I'de 'minimal' olarak, LIN II'de 'belirgin' olarak, LIN III'de 'daha belirgin' olarak tanımlanmıştır (24).

Larinksin skuamöz hücre displazisi, hafif ve orta dereceli displazilerin potansiyel olarak reversibl lezyonlar olduğuna inanıldığından, ilk Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırmasında (Shanmugaratnam,1978) tümör benzeri lezyonlar arasında sınıflandırılmıştır. Oysa displazi; artan derecesiyle potansiyel olarak malign olan prekanseröz bir lezyondur. Bu nedenle DSÖ'nün son sınıflandırmasında epitelial tümör ve prekanseröz lezyonlar grubuna alınmıştır (25).

DSÖ 1991 sınıflandırmasına göre laringeal epitelial displastik lezyonlar şu şekilde gruplandırılmıştır (26,27):

Displazi Derece I (hafif displazi): Nükleer anormallikler hafiftir ve epitelin bazal tabakasında belirgindir. Hücrelerin matürasyon ve stratifikasyon gösterdiği üst tabakalarda bu anormallikler minimaldir. Çok az mitoz parabazal tabakada izlenir. Anormal mitoz yoktur. Keratoz ve kronik enflamasyon genellikle vardır.

Displazi Derece II (orta derecede displazi): Nükleer anormallikler hafif displaziye göre daha belirgindir. Nükleolus belirgin olmaya başlar. Bu değişiklikler 2/3 alt epitel kalınlığında belirgindir. Orta derecede nükleer anormallikler yüzeye doğru ilerler. Ancak hücre matürasyonu ve stratifikasyon üst tabakalarda vardır. Mitoz parabazal ve intermedier tabakada izlenir. Anormal mitoz yoktur. Lezyon keratozla birlikte olabilir.

Displazi Derece III (şiddetli displazi): Epitelde belirgin nükleer anormallikler ve epitel kalınlığının 2/3'ünden fazlasını tutan matürasyon kaybı izlenir. Nükleer pleomorfizm yaygındır ve hücrelerin bazılarında nükleus garip biçimler gösterir. Bazı alanlarda nükleolus oldukça belirgin olabilir. Nükleuslar hiperkromatiktir. Mitoz epitelin üst kısımlarında da bulunur. Anormal mitoz izlenebilir. Süperfisyel tabakadaki hücrelerin bazılarında matürasyon ve stratifikasyon varlığı lezyonun karsinoma in situdan ayırmada yardımcı olur ve sıklıkla keratozla birlikte dir.

In situ karsinoma: Mikroskopik ölçütler serviks uteride uygulananlara benzerdir. Yüzey matürasyonu olmaksızın tüm epitel boyunca atipik değişikliklerin saptanması gerekmektedir. Tanı için gerekli olan ölçütleri açmak gerekirse; tüm epitel boyunca normal hücresel stratifikasyonun kaybı, koyu nükleuslu küçük yuvarlak-oval ya da içi biçimli immatür hücrelerin varlığı, epitelin üst kısımlarında da mitoz ve anormal mitozun izlenmesi ve bu intraepitelyal proliferasyona karşın alttaki bazal membranın sağlam olması yani invazyonun izlenmemesi gerekmektedir (28).

Basit skuamöz hücre hiperplazisinde ise epitel, hücre artışı sonucu kalınlaşmıştır. Matürasyonda herhangi bir değişiklik izlenmez. Bu terim DSÖ 1991 sınıflandırmasında ayrı olarak tümör benzeri lezyonlar arasında tanımlanmıştır.

Bu sınıflandırma servikal skuamöz intraepitelyal lezyonlar (CIN) için kullanılan sınıflandırmaya benzerlik göstermektedir. Hafif displazi (CIN I), orta derecede displazi (CIN II), şiddetli displazi (CIN III) ve karsinoma in situ (CIN III). Ancak servikal prekanseröz lezyonların sınıflandırma sisteminin laringeal prekanseröz lezyonlar için uygun olmadığını savunan araştırmacılar vardır. Laringeal mukoza gözetim ve biyopsi için serviks uteriden daha az ulaşılabilir lokalizasyondadır. Ek olarak, kanseröz değişiklik taşıyan alanların uzaklaştırılmasını sağlayan ve böylece invaziv ve preinvaziv karsinom arasında ayırım gereksinimini azaltan (servikal 'cone' benzeri) operasyonlar laringeal mukozaya uygulanamaz. Yukarıdaki bilgiler doğrultusunda araştırmacılar 1997 yılında Ljubljana'da larinksin epitelyal hiperplastik-displastik lezyonları için yeni bir sınıflandırma önermişlerdir (26). Bu sınıflandırmada tanımlanan lezyonlar ve tanı ölçütleri şunlardır:

Basit hiperplazi: Laringeal epitelin normal paterninin korunduğu benign hiperplastik lezyondur.

Ölçütler: Malpighi tabakasının artışına bağlı olarak epitel kalınlaşmıştır. Bazal ve parabazal alandaki hücresel komponent değişmemiştir. Hücresel atipi izlenmez.

Anormal hiperplazi: Bazal ya da parabazal tabakanın benign kalınlaşmasıdır. Bunlar normalde bazal tabaka üzerinde bir-iki hücre tabakasından oluşurlar. Bazal tabakadaki hücrelerden daha fazla sitoplazmaya sahiptirler.

Ölçütler: Stratifikasyon normal skuamöz epitelin bir özelliğidir. Üst kısımdaki keratozun varlığı ya da yokluğu stratifikasyonla ilişki göstermemektedir. Keratoz normal epitel, basit, anormal, atipik hiperplazi ve karşinoma in situda da bulunabilir. Burada önemli olan stratifikasyonun anormal hiperplazide tümüyle korunmuş olmasıdır.

Bazal ve parabazal hücreler total epitel kalınlığının yarısını içerecek derecede çoğalmıştır. Nadir vakalarda epitelin belirgin nükleer değişiklik içermeyen hiperplastik hücrelerden oluştuğu izlenebilir. Çoğalan bazal ve parabazal tabakadaki hücrelerin nükleusları orta derecede genişlemiştir. Ancak nükleer kromatin uniform dağılımını korumaktadır.

Nadiren mitoz bulunur; her zaman tipik olup bazal tabakaya yakın izlenirler. Çok az olguda epitelial hücrelerin % 5'inden azı diskeratotiktir.

Atipik (riskli) hiperplazi: Epitelial hücrelerde malignite yönünde tanımlanabilir değişiklikler vardır. Ancak bu değişiklikler karsinom hücrelerindeki kadar şiddetli değildir.

Ölçütler: Epitelial tabakada stratifikasyonun korunduğu izlenir. Bir çok epitel hücrelerinin nükleusu atipik değişiklikler gösterir. Nükleuslar genişlemiştir. Nükleer membran, boyanma yoğunluğundaki değişikliklerle birlikte, irregülerdir. Nükleolus sayıca artmıştır, büyüklük bakımından ve artmış boyanma yoğunluğu ile birlikte belirgindir. Nükleus / sitoplazma oranı artmıştır. Mitoz artmıştır, ancak çok sayıda değildir. Bazal membran üstünde epitel kalınlığının 2/3'ünde izlenmektedir. Seyrek anormal formlar izlenir. Diskeratotik hücreler sıktır. Hiyalin eozinofilik sitoplazmalı ve piknotik nükleuslu (apoptotik epitelial hücreler) (Civatte cisimcikleri) izlenebilir.

Lezyon bazı olgularda iki gruba ayrılabilir:

a- bazal hücre tipi

b- spinal hücre tipi

In situ karsinom: Epitel invazyon yapmaksızın karsinom özelliklerini gösterir.

Ölçütler: Üç farklı özellik vardır.

a- Epitelin stratifikasyon kaybı. Üç-beş tabaka horizontal olarak stratifiyedir, sıklıkla kompresedir ve bazen kornifiye hücreler yüzeyi örtebilir. Ancak bu değişikliklerin varlığı tanıyı etkilemez.

b- Atipik hiperplazide bulunan belirgin hücresel değişiklikler oldukça ileri derecededir. Hücreler invaziv karsinomun bazı formlarındaki hücrelere benzerler.

c- Mitoz çok sayıda olup, bir büyük büyütme alanında beşten fazladır. Tüm epitel kalınlığı boyunca izlenir. Anormal mitoz sıklıkla vardır. Civatte cisimcikleri olabilir.

Epitelyal hiperplastik değişikliklere sıklıkla stromal ödem, fibrozis, vasküler anormallikler gibi değişiklikler de eşlik edebilir.

Bu sınıflandırmalar arasında göze çarpan farklılıklardan birisi in situ karsinomun farklı olarak değerlendirilmesidir. Kleinsasser (1988) şiddetli displazi ve in situ karsinomu tek grup olarak tanımlayan ilk kişidir. İki grup arasında ayrımın gerekli olmadığını düşünmüştür. Çünkü her iki lezyon preinvaziv gelişim sırasında farklılaşma açısından çok az değişiklik içerir ve her iki lezyon da mikroinvaziv evre sonrası invaziv karsinoma ilerleme gösterir (29).

DSÖ sınıflaması şiddetli displazi ve karsinoma in situ ve Ljubljana sınıflaması atipik hiperplazi (ATH) ile karsinoma in situ histomorfolojik özelliklerinden dolayı iki farklı antite olarak kabul etmektedir. Karsinoma in situ tanısında en yardımcı ölçütler, tüm epitel tabakası boyunca hücresel atipi, atipik mitoz ve mukozal epitelin üst kısmında mitoz izlenmesidir (29). DSÖ ve Ljubljana sınıflandırmalarının karşılaştırması Tablo IV'de yer almaktadır.

Michaels (1997) yaptığı bir çalışmada atipik hiperplazi ve in situ karsinomun farklı lezyonlar olduğunu gösterir sonuçlar elde etmiştir. İki lezyon arasındaki ayırimda anormal mitotik figür, mitotik aktivite, nükleer polimorfizm, sellüler atipi ve diskeratozun en yararlı kriterler olduğunu saptamıştır. Çalışmasında, atipik hiperplazili olguların daha iyi prognoza sahip olduğu ve tedavilerinin in situ karsinom olgularından daha farklı olduğunu vurgulamıştır. Atipik hiperplazide eksizyon yeterli iken karsinoma in situda daha radikal tedavi ya da radyoterapi gereklidir. Bununla birlikte her iki lezyon yakın izleme alınmalıdır (21).

Tablo IV: Invaziv karsinom gelişiminde risk taşıyan prekanseröz lezyonların DSÖ ve Ljubljana sınıflamalarına göre karşılaştırılması (26) *

	DSÖ	Ljubljana
Benign	Basit skuamöz hücre hiperplazisi	Basit hiperplazi Anormal hiperplazi
Invaziv karsinom gelişiminde Bir miktar risk taşıyan Prekanseröz lezyonlar	Displazi, derece I Displazi, derece II	Atipik hiperplazi
Invaziv karsinom gelişiminde Yüksek riskli prekanseröz Lezyonlar	Displazi, derece III Karsinoma in situ	Karsinoma in situ

*: DSÖ ve Ljubljana sınıflandırmaları arasında doğrudan bir ilişki bulunmamaktadır. Bu tablo yalnızca iki sınıflama arasındaki benzerlikleri yansıtmaktadır.

Şimdiye kadar belirtilen sınıflandırmalarda kullanılan morfolojik özellikler sıklıkla tanımlayıcıdır. Nükleer atipi, hiperkromazi gibi özellikler rutin histoloji için kantitatif değildir. Basit morfolojik değerlendirmeden elde edilenden daha iyi bir uygulanabilirlik ve nesnellik, kantitatif histopatolojik yöntemlerle sağlanabilir. Birkaç kantitatif histopatolojik yöntem kesin tanı için uygulanmıştır. Planimetrik morfometri ve DNA-ölçümü en sık kullanılan yöntemler arasında yer almıştır (10,30,31).

Yakın zamanda bir grup araştırmacı (32) analitik ve kantitatif yöntemleri kullanarak larinks karsinomunda prognostik faktörleri araştırmışlardır. Bu morfometrik parametrelere göre larinksin atipili hiperplastik lezyonları, daha sonra karsinom gelişen ve gelişmeyen olgular olarak iki gruba ayrılırlar. Bu çalışmada kullanılan parametreler; nükleer alan, nükleer perimetre, nükleer ölçüm, nükleer biçim ve nükleer oryantasyonun ortalama ve standart deviasyonu ile epiteliyal kalınlığın ortalamasıdır.

Resta ve ark (24) larinksin normal, preneoplastik ve neoplastik epitelinin bazal tabakasına yönelik analitik morfometrik çalışma yapmışlardır. Karsinogenezis sırasında laringeal epitel hücrelerinin büyüklük ve şekillerinde değişiklik miktarını ölçmek amacıyla yönelik bu çalışmada, normal ve displastik nükleuslarda belirgin bir farklılık izlenmezken, karsinomatöz nükleuslarda anlamlı bir büyüme saptanmıştır.

5. LARİNGEAL EPİTELİYAL HİPERPLASTİK-DİSPLASTİK LEZYONLARDA OBJEKTİF BELİRLEYİCİLERİN YERİ

Skumöz hücreli karsinom larinksin en önemli neoplazmidir ve prekanseröz lezyonlardan gelişmektedir. Kaynaklarda bu konu ile ilgili veriler az olduğu için, preneoplastik lezyonların insidansını belirlemek oldukça zordur (33).

Laringeal displastik lezyonların malign transformasyon oranı % 1.5 ile % 52.9 arasında değişmektedir (9,33). Displazinin yalnızca mikroskopik olarak değerlendirilmesi bazı yanlış pozitif ve daha çok da yanlış negatif sonuçlara yol açmaktadır (10). Daha nesnel bir değerlendirmeye ve lezyonların neoplastik potansiyelini belirlemek için yeni histolojik belirleyicilere gereksinim vardır (33).

Hücre kinetik bilgisi histolojik olarak tümör sınıflandırmasına dayanan yararlı bir yardımcı olabilir ve nonneoplastik durumların anlaşılmasına olanak sağlayabilir. Hücresel proliferasyon en geniş biyolojik olaylardan biridir. Farklı yöntemler değişik yönlerdeki hücre siklusunu ölçmek için denenmiş ve hücrelerin biyolojik davranışlarına bu ölçümleri ilişkilendirmek için uygulanmıştır. Bu yöntemler arasında kullanılanlar mitoz sayımı, timidin bağlama indeksi, nükleer organize alanlar (NOR), mikrospektrofotometrik DNA ölçümü, flow sitometri ve nükleer proliferasyonla ilişkili antijenlerin immundokimyasal gösterimidir (10,30,34,35).

Bracko'nun bir çalışmasında (36) flow sitometri aracılığıyla laringeal epiteliyal hiperplastik lezyonların anormal DNA içeriğine sahip oldukları ve bu bulguların displazi ya da atipi derecesiyle ilişkili oldukları belirtilmiştir.

Yakın zamanda proliferasyonla ilişkili antijenlere karşı antikorlar kullanılarak, immundokimyasal boyamayla büyüme fraksiyonu belirlenmesi yaygın olarak uygulanmaktadır. Hücre proliferasyonunu değerlendiren immundokimyasal

yöntemler uygulamadaki kolaylık ve sonuçların daha hızlı elde edilmesi nedeniyle diğer yöntemlerden daha avantajlıdır. Anti-PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ve Ki-67, proliferatif aktivite değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan iki antikordur. PCNA, DNA polimeraz-delta'nın yardımcı proteinidir. Deneysel çalışmalar PCNA ekspresyonunun hücre siklusunun S fazına sınırlı olduğunu göstermiştir (30,37). Ki-67 Go ve erken G1 fazı dışında hücre siklusunun tüm fazlarında eksprese edilen yüksek molekül ağırlıklı bir proteindir. Ki-67 monoklonal antikoru 1983'de Gerdes ve ark. ları tarafından üretilmiştir (38-41). Çeşitli çalışmalarda Ki-67 immunreaktivitesi ile hücresel proliferasyonun diğer belirleyicileri arasında anlamlı ilişki saptanmıştır (12,42).

Yüksek proliferatif indeksli tümörlerin daha agresif ve daha yüksek metastatik potansiyele sahip olduğunu gösterir kanıtlar vardır. Kaynaklardaki çalışmalar Ki-67 ekspresyonunun özefagus, larinks ve oral epitelin preneoplastik lezyonlarında displastik değişikliklerin şiddetiyle artış gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (43,44). Örneğin vulvar intraepitelial neoplaziler (VIN) epiteldeki displastik değişikliklerin şiddetine göre VIN 1, VIN 2 ve VIN 3 olarak üç dereceye ayrılmıştır. Buna karşın, Beurden ve ark. nın (45) çalışmasında Ki-67 ekspresyon sonuçlarına göre bu lezyonların, "düşük dereceli skuamöz intraepitelial neoplazi" ve "yüksek dereceli skuamöz intraepitelial neoplazi" olarak derecelendirilmesinin gerektiği sonucuna varılmıştır.

Genetik faktörler karsinogenezisde önemli rol oynar. Natural genler ya da protoonkogenler aktif onkogen haline gelebilir (33). Zlatko ve ark (46) oral kavitede hiperplazi, displazi ve karşinom gelişimini genetik hasar birikimiyle açıklamaktadır. Genetik hasar birikimleri olarak protoonkogen mutasyonu, gen amplifikasyonu, kromozom kırılması, translokasyon, protoonkogen overekspresyonu ve tümör supresör gen kaybı ele alınmıştır. Malign tümörlerde en iyi bilinen genetik değişikliklerden biri, p53 tümör supresör geninin mutasyonudur (33,42,43). p53 geni 17. kromozomun kısa kolunda (17p) lokalize olan, 393 aminoasit protein ile kodlanan ve tümörlerde en sık mutasyona uğrayan gendir. p53 proteini hücre proliferasyonunun kontrolünde, DNA onarım ve sentezinde, programlanmış hücre ölümünde (apoptozis) rol oynar. DNA hasarı, hipoksi ve diğer streslerde hücre siklusunu G1 fazında durdurduğu için insan genomunun koruyucusu olarak kabul

edilmektedir (41,47-50). Normal p53 proteini çok kısa yarı ömre sahiptir (6-20 dk). Normal olarak konvansiyonel immundokukimyasal yöntemlerle saptanabilecek düzeyde hücrelerde birikmez. Bu gendeki birçok mutasyonlar yarılanma ömrünü 6 saata kadar uzatan değişikliklere neden olur (35,50,51). p53, hücre siklusunun G1 fazında santral rol oynar. p53, genotoksik streslere karşı transkripsiyonel olarak p21 genini aktive eder. p21 geni siklin bağımlı kinazı inhibe eder ve böylelikle G1'de hücre siklusunu bloke eder. Eğer DNA hasarlanması onarılamazsa p53, Bax artımıyla ve bcl-2 protein ekspresyonunun azalmasıyla indüklenen programlı hücre ölümünü başlatır. Bu p53 regüle yollar sıklıkla gen mutasyonlarıyla ve tümörögenezisin erken evresinde viral ya da hücrel proteinlere bağlanmayla inaktive edilir (44,52).

p53 proteinin overekspresyonu malign ve premalign skuamöz epitelde tanımlanmıştır. Baş-boyun karsinomlarının multistep karsinogenez sürecinde p53 gen değişiklikleri en iyi ve en çok incelenen konu olmuştur. Çeşitli çalışmaların sonuçları p53 gen değişikliklerinin baş-boyun skuamöz hücreli karsinom gelişiminde erken bir belirleyici olabileceğini göstermektedir (15,35,42,48).

Çeşitli çalışmalarla genetik hasarların, larinks tümörögenezisinin çeşitli evrelerinde biriktiği gösterilmiştir. Bu hasarlar sıklıkla hücre siklus regülasyonunu kapsayan genleri etkiler (44).

Immundokukimyasal yaklaşımın laringeal tümörlerde hücre siklusunu regüle eden gen değişikliklerini saptamada yararlı bir yöntem olabileceği gözlenmiştir. p53'ün sadece infiltratif tümörlerde değil, aynı zamanda komşu preneoplastik lezyonlarda ve histolojik olarak normal mukozada da bulunduğu izlenmiştir. Ayrıca, p53 overekspresyonunun invaziv karsinoma ilerleme gösteren displaziyle ilişkili olabileceği bulunmuştur. Bu veriler immundokukimyasal analizin, displastik lezyonların karsinoma ilerlemesini belirlemede geleneksel histolojik değerlendirmeden daha güvenilir olduğunu göstermektedir (53-55).

Bir kanserin başlangıcı, büyümesi ve yayılması yalnızca hücre proliferasyonuna bağlı değildir; aynı zamanda konakçı dokunun duyarlılığına da bağlıdır. Kanser invazyon ve metastaz yapması için tümör hücreleri ile damarlar, immün sistem ve konnektif doku arasında önemli etkileşimler olmaktadır (56).

Anjiogenezis yeni kan damarı oluşumu anlamına gelir ve embriyogenez, yara iyileşmesi, immun reaksiyonlar ve tümörögenezde meydana gelen önemli bir olaydır. Örneğin, Folkman (57) organ kültüründe, tümörlerin vaskülarizasyon yokluğunda sadece 1-2 mm boyuta kadar büyüebileceklerini göstermiştir. Bununla birlikte, bu nodüller dokuya implante edildiğinde, çevre konakçı dokudan kan desteği ve ardından büyüme meydana gelir.

İnsanlarda birçok tümör neovaskülarizasyon olmadan aylar-yıllar içinde in situ halde kalır ve tümörde subgrup hücreler anjiogenik fenotip için harekete geçtiğinde vaskülarizasyon meydana gelir. Prevasküler dönemde tümörün boyutu genelde 3 mm³'den küçüktür. Böyle asemptomatik lezyonlar örnek olarak mesane, meme, serviks, deri karsinomlarında izlenebilir (58).

Tümörler anjiogenezi direkt olarak anjiogenik maddeler salgılayarak ya da ekstrasellüler matrikste bulunan anjiogenik bileşikler aktive ederek gerçekleştirir. Tümörle ilişkili vaskülariteyi tümörü infiltre eden lenfositler, makrofajlar, mast hücreleri tarafından salgılanan anjiogenik maddeler de artırabilir (59).

Normal koşullarda vücuttaki endotel hücrelerinin % 0.01'i aktiftir. Düşük düzeydeki anjiogenik uyarıcılar, inhibitörleri ile nötralize edilir. Normal hücreler tarafından inhibitörlerin yüksek düzeyde salınması erişkin dokularda durağanlığı sağlar. Malign hücrelerde ise uyarıcıların salınımı artarken inhibitörlerin salınımı azalır (59). Anjiogenetik uyarının temel hedefi olan damarlar, postkapiller venüller ve küçük terminal venüllerdir (60). Yeni damar gelişiminde en azından dört basamak söz konusudur. Bunlar kısaca şu şekilde özetlenebilir:

- 1- Bir kapiller tomurcuk oluşabilmesi için ana damarın bazal membranının enzimatik degradasyonu,
- 2- Endotel hücrelerin anjiogenik uyarı yönünde göçü,
- 3- Göç eden öncü hücrelerin hemen ardındaki endotelial hücrelerin proliferasyonu,
- 4-Endotel hücrelerin matürasyonu ve kapiller kanallar biçiminde organizasyonu (59) .

Anjiogenezin ölçülmesi ve değerlendirilmesi oldukça kompleks bir olaydır. Tümörlerde anjiogenezin prognozla ilişkisini araştıran morfometrik yöntemlerde mikrodamar sayımı ya da damar yüzey yoğunluğu belirlenmektedir.

Mikrodamarların yeterli görülebilmesi için immundokukimyasal boyamalar yapılmaktadır. Endotel hücreleri immundokukimyasal boyama ile gösterilebilen değişik belirleyiciler salgılamaktadır. Bunlar arasında Faktör 8 related antijen (F8-RA), ABH kan grubu antijenleri, CD31, CD34, CD36 ve Ulex europaeus aglutuninin-1 yer almaktadır (60).

CD34 antijeni hematopoetik progenitor hücre ve vasküler endotelial hücrelerden eksprese edilen 110 kDa glikozilasyonlu transmembran proteinidir. Akut lösemilerin % 30-60'ında pozitifdir. Benign endotelial hücreler CD34 antijeni için reaktivite gösterdiğinden dolayı Traweck ve ark. (61) çeşitli vasküler neoplazmlarda test etmişlerdir. CD34 vasküler tümörlerin bir çoğunda pozitif olarak saptanmıştır. Bu tür çalışmalarda neoplastik endotelial hücrelerin CD34 ile, komşu benign endotelial hücrelerden daha güçlü bir boyanma gösterdiği izlenmiştir (61-64).

6. AMAÇ

Laringeal epiteliyal hiperplastik-displastik lezyonların tanı, tedavi ve prognozu var olan histolojik değişikliklerle ilişkilidir. Halen epiteliyal hiperplastik lezyonların derecelendirmesindeki standart yöntem histolojik incelemedir. Mikrolaringoskop uygulanımı ve mikrocerrahi histolojik değerlendirme için daha uygun doku örneklerinin eksizyonunu sağlar. Larinksin epiteliyal hiperplastik-displastik lezyonlarının histolojik tanısı ile ilgili zorlukların başında terminolojik uniformitenin bulunmayışı ve varolan terimlerin birbirleriyle uyuşmaması gelir. Çeşitli yazarlar benzer klinik ve histolojik değişiklikleri farklı terimlerle tanımlarlar. Örnek olarak, laringologlar ve patoloğlar lökoplaki, keratoz ya da hiperkeratoz terimlerini farklı anlamlarda kullanırlar.

Laringeal epiteliyal hiperplastik-displastik lezyonları sınıflandırmak için mikroskopik anormalliklerin kesin ve tutarlı bir biçimde değerlendirilmesi gerekir. Lezyonların histolojik özellikleri ve biyolojik davranışları arasındaki ilişkinin her zaman uyumlu olmamasına bağlı olarak bazı güçlükler ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, kaynaklarda epiteliyal hiperplastik-displastik lezyonlarla ilişkili 20'den çok sınıflamanın olması şaşırtıcı değildir. Ancak söz konusu bu lezyonların histolojik özelliklerini değerlendirmede kullanılan ölçütlerin prognozla ilişkisi yeterli biçimde dökümente edilemediğinden, bu sınıflamaların çoğu ilgi görmemiştir.

Laringeal displazi ile ilgili sınıflamaların büyük çoğunluğu serviks uterusunun skuamöz epiteliyal lezyonlarının derecelendirilmesinde kullanılanlara benzer ölçütleri içerir. En çok kullanılan dereceleme yöntemi olan DSÖ sınıflaması (1991) epiteliyal hücre anormalliklerinin düzeyi ve şiddetine dayanarak (mitoz, sayısı ve durumu, indifferansiye ya da atipik hücrelerin bazal, intermedier ya da superfisiyel epitel tabakalarına kadar uzanım derecesi baz alınarak) skuamöz intraepiteliyal lezyonları hafif, orta, şiddetli displazi ile karsinoma in situ olmak üzere dörde ayırmaktadır (Shanmugaratnam *et al*, Cancer 1993; 2689-2697). Son olarak 1997'da Ljubljana'da toplanan "Avrupa Patoloji Birliği'nin epiteliyal hiperplastik lezyonlar üzerine olan çalışma grubu" tarafından epiteliyal hiperplastik lezyonlar için farklı bir sınıflama ileri sürülmüş ve daha sonra bu sınıflamanın yararlılığı

yönünde çalışmalar yapılmıştır. Bu son sınıflama laringeal epiteliyal lezyonları basit hiperplazi, anormal hiperplazi, atipik (riskli) hiperplazi ve karsinoma in situ olarak dörde ayırmaktadır (Hellquist *et al*, Histopathology 1999; 226-233).

Bu çalışmada laringeal preinvaziv epiteliyal hiperplastik-displastik lezyonlarda önerilen başlıca sınıflamalar olan DSÖ ve Ljubljana sınıflandırmalarının karşılaştırılması; hiperplastik ve displastik lezyonlarda anti-Ki-67, p53 ve CD34 immundokimyasal belirleyicileri kullanılarak proliferatif aktivite, genetik değişiklikler ve anjiogenezis hakkında objektif verilerin sağlanması ve söz konusu sınıflandırmalardaki histolojik ölçütlerin geçerliliğinin bu objektif verilerle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



7. GEREÇ VE YÖNTEM

7.1 Gereç

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 1990-2000 yılları arasında laringeal hiperplazi-displazi tanısı almış 108 olguya ait materyal yeniden gözden geçirilmiştir. Olguların orijinal tanıları Tablo V'da gösterilmektedir.

Tablo V: Orijinal tanılarına göre olguların dağılımı.

Tanı	Olgu Sayısı (n)
Epitelial hiperplazi	5
Atipik değişiklikler	2
Displazi	13
Hafif displazi	35
Orta derecede displazi	15
Şiddetli displazi	14
Karsinoma in situ	24
Toplam	108

Retrospektif nitelikteki bu çalışmada hastalara ait H&E boyalı preparatlar anabilim dalı preparat arşivinden çıkarılarak yeniden incelenmiştir. Yeterli doku içermeyen 41 olgu, fungal enfeksiyon içeren 2 olgu ve parafin blok arşivinden blokları bulunamayan 11 olgu çalışma dışı bırakılmıştır. Geri kalan 54 olgu çalışma kapsamına alınmıştır. Çalışmamızın gerecini bu 54 olgu oluşturmaktadır.

7.2 Yöntem

Öncelikle bu 54 olguya ait H&E boyalı kesitler ışık mikroskopik düzeyde gözden geçirilmiş ve olgular DSÖ (1991) ve Ljubljana (1997) sınıflandırmasına göre histolojik olarak derecelendirilmiştir.

Daha sonra, olgulara ait parafin bloklardan immünohistokimyasal boyama için poly-L-lizin kaplı lamlara 5 mikron kalınlığında kesitler hazırlanmıştır. İmmünohistokimyasal boyama işlemine geçilmeden önce kesitler oda sıcaklığında en az 24 saat bekletilmiştir.

7.2a. İmmundokukimyasal yöntem:

Hazırlanan kesitlerde proliferatif aktiviteyi belirlemek için Ki-67 antijeni (Ki-67; DAKO M0722 dilüsyon 1:50), p53 antijeni (p53; DAKO M7001 dilüsyon 1:50), anjiogenezi değerlendirmek için ise CD-34 antijeni (CD-34; DAKO M7165 dilüsyon 1:25) streptavidin-biotin immünperoksidaz yöntemi ile çalışılmıştır.

Uygulama aşamaları:

- 1- Kesitler ksilolde 20 dakika bekletilerek deparafinize edilmiştir.
- 2- Daha sonra % 96'lık alkolden başlayarak % 70'lik alkole dek alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilmiştir.
- 3- Ki-67, p53 ve CD34 antikorları uygulanacak deparafinize kesitler immundokukimyasal boyama öncesinde sitrat tampon solüsyonu (10Mm, pH 6) içinde özel kaplara yerleştirilerek, mikrodalga fırında üç kez beşer dakika süre ile kaynatılmış ve böylece antikorum açığa çıkması sağlanmıştır. Kesitler bu aşamadan sonra 15-20 dakika süre ile oda ısısında soğumaya bırakılmıştır.
- 4- Kesitler pH'sı 7.2 olan TRİS (Hydroxymethyl-aminomethan) solüsyonunda 5 dakika yıkandıktan sonra kesitlerin çevresi sınırlayıcı kalem ile çerçeve içine alınmıştır.
- 5- Kesitlere % 3'lük hidrojen peroksit (H2O2) damlatılarak 5 dakika bekletilmiştir. Bu uygulama ile endojen peroksidaz aktivitesi bloke edilmiştir.
- 6- Kesitler 5 dakika TRİS solüsyonunda yıkandıktan sonra üzerine Ki-67 (1/50), p53 (1/50) ve CD34 (1/25) primer antikorları damlatılarak tüm kesit yüzeyini kaplaması sağlanmış ve oda ısısında 60 dakika bekletilmiştir.
- 7- Kesitler TRİS solüsyonunda 5 dakika yıkanmıştır.
- 8- Kesitlere bağlayıcı bioitimize sekonder antikör damlatılmış ve 10 dakika bekletilmiştir.
- 9- Kesitler TRİS solüsyonunda 5 dakika yıkanmıştır.
- 10- Kesitlere streptavidin peroksidaz solüsyonu damlatılarak 10 dakika bekletilmiştir.
- 11- Kesitler TRİS solüsyonunda 5 dakika yıkanmıştır.

12- Kromojenik reaksiyon için daha önceden hazırlanan 3,3-diaminobenzidintetrahidroklorür (DAB) (DAKO, Danimarka) solüsyonu kesitlerin üzerine damlatılmıştır, kahverengi renklenme gözlenene dek bekletilmiştir. Sonra kesitler çeşme suyunda yıkanmıştır.

13- Tüm kesitler zıt boyama sağlamak için Mayer's hematoksilende 2 dakika süreyle bekletilmiştir.

14- Çeşme suyunda yıkanan kesitler % 70'lik etil alkolden % 96'lık alkol ve izopropil alkole kadar yükselen alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiştir.

15- Şeffaflama sağlamak amacı ile 20 dakika ksilolde bekletildikten sonra Entellan (Merck) ile kapatılmıştır.

7.2b. İmmunreaktivite değerlendirilmesi:

Ki-67:

Hücrel proliferatif aktivitenin değerlendirilmesi için x400 büyütmede 1000 hücre sayılmıştır. Bunlar arasında kahverengi nükleer boyanma pozitif kabul edilmiştir ve her olgu için pozitif boyanan hücrelerin yüzdesi elde edilmiştir. Olgular Ki-67 boyanma yüzdesine göre 3 gruba ayrılmıştır. Grup I nükleer boyanması %10'un altında olan olguları, grup II %10-50 arasında boyanma olan olguları, grup III ise %50'nin üstünde olan olguları içermektedir (43).

p53:

Değerlendirme için x400 büyütmede kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler pozitif olarak ele alınmıştır. Hücrelerin epitel içindeki dağılımına göre skorlanma yapılmıştır. Buna göre skor 0 boyanma olmayan, skor I bazal hücrelerde fokal boyanma olan, skor II epitel kalınlığının 1/2'sine kadar olan bazal ve suprabazal alanlardaki hücrelerde boyanma izlenen, skor III ise tüm epitel kalınlığınca boyanma izlenen olgular olarak nitelendirilmiştir (54).

CD34:

Lezyona komşu subepitelyal alandaki endotel hücreleri boyanarak damarlanma belirgin hale getirilmiştir. Kamera (Sony C CD, Japonya) ile monitöre (Sony Trinitron, Japonya) bağlı mikroskopta 100x'lik büyütmede sabitlenen

kesitlerle 525x'lik bir büyütme elde edilmiştir. Üç alan ele alınarak bu alanlardaki damar sayılarının ortalaması hesaplanmıştır. Damar sayıları 1-5, 6-10 ve 11-15 arasında olan olgular damar sayılarına göre gruplandırılmıştır (58). Her alanda kahverengi boyanan endotelial hücreler ya da endotelial hücre kümeleri sayılmıştır. Genelde damar lümenleri izlenebilmiştir ancak, kaynaklara göre mikrodamarların tanımlanabilmesi için damar lümeni gerekli değildir (56).

7.2c. İstatistiksel analiz:

İstatistiksel işlemler SPSS (Scientific Package for Social Sciences) software programı ile IBM uyumlu bilgisayarda yapılmıştır. DSÖ ve Ljubljana sınıflamasına göre derecelendirilen olguların Ki-67 ve CD34 immundokukimyasal ekspresyonları histolojik dereceler bazında 'Kruskal-Wallis' testi ile karşılaştırılmıştır. Bu test çoklu kategorili değişkenlerde ortalamalar arasındaki farkın anlamlılığını test etmek için kullanılmıştır. 0.05'e eşit ve küçük olasılık katsayıları istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ($p < 0.05$ ya da $p = 0.05$).

Ayrıca Ki-67, p53 ve CD34 ekspresyonları ile her iki sınıflandırmaki artan histolojik dereceler arasında ilişki olup olmadığı 'Spearman korelasyon' testi ile karşılaştırılmıştır. Bu test ise iki değişken arasındaki doğrusal ilişkinin derecesini göstermek için kullanılmıştır. Bağlantı katsayısı (r) değeri 0-0.25 arasında ise hiç ilişki yok ya da zayıf ilişki; 0.26-0.50 arasında ise zayıf-orta derecede ilişki; 0.51-0.75 arasında ise iyi derecede ilişki; 0.76-1.00 arasında ise çok iyi derecede ilişki olarak kabul edilmiştir.

Ayrıca basit hiperplazi olguları kontrol grubu olarak ele alınıp, hiperplazi olgularındaki immundokukimyasal ekspresyonları DSÖ sınıflamasındaki hafif displazi ve orta dereceli displazi olgularının immundokukimyasal ekspresyonları ile; ayrıca yine kontrol grubunun verileri Ljubljana sınıflamasındaki anormal hiperplazi olgularının immundokukimyasal verileri ile 'Mann-Whitney U' ve 'Chi-Square' testleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Ayrıca DSÖ sınıflamasında hafif displazi olguları ile orta derecede displazi olgularının immundokukimyasal verileri aynı istatistik testler kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Böylelikle gerek DSÖ ve gerekse Ljubljana sınıflamasındaki histolojik derecelerin tutarlılığının, nesnel ölçütler uygulanarak araştırılması; ayrıca, her iki sınıflamadaki düşük histolojik derecelerin basit hiperplazi ile farkının irdelenmesi ve son olarak DSÖ sınıflamasında hafif ve orta dereceli displazi kategorilerinin anlamlı fark yönünden karşılaştırılması amaçlanmıştır.

BULGULAR

1.Hastaların özellikleri:

Bu çalışmada yer alan 54 olgunun 48'i (% 88.8) erkek, 6'sı (% 11.1) kadındır. Genel yaş ortalaması 52±12 (27-76) yıldır.

Olgular tekrar gözden geçirildikten sonra DSÖ sınıflandırmasına göre 6 olgu (% 11.1) basit hiperplazi, 22 olgu (% 40.7) hafif displazi, 8 olgu (% 14.8) orta derecede displazi (Resim 1), 12 olgu (% 22.2) şiddetli displazi (Resim 2), 6 olgu (% 11.1) karsinoma in situ tanısı almıştır (Tablo VI). Ljubljana sınıflandırmasına göre ise 6 olgu (% 11.1) basit hiperplazi, 26 olgu (% 48.1) anormal hiperplazi, 15 olgu (% 27.7) atipik hiperplazi (Resim 3), 7 olgu (% 12.9) karsinoma in situ (Resim 4) tanısı almıştır (Tablo VII). Olguların her iki sınıflandırmaya göre histolojik derecelendirilmesi ve immundokimyasal sonuçları Tablo XV'da verilmiştir.

Tablo VI: Olguların DSÖ sınıflandırmasına göre dağılımı

Basit hiperplazi	6 (% 11.1)
Hafif displazi	22 (% 40.7)
Orta derecede displazi	8 (% 14.8)
Şiddetli displazi	12 (% 22.2)
Karsinoma in situ	6 (% 11.1)
Toplam	54 (% 100)

Tablo VII: Olguların Ljubljana sınıflandırmasına göre dağılımı

Basit hiperplazi	6 (% 11.1)
Anormal hiperplazi	26 (% 48.1)
Atipik hiperplazi	15 (% 27.7)
Karsinoma in situ	7 (% 12.9)
Toplam	54 (% 100)

2. İmmundokukimyasal bulgular:

2.1. Ki-67 indeksi

Ki-67 antikoru ile toplam 50 olgunun 42'sinde %10-50 arasında (Resim 5), 8'inde %50'nin üstünde (Resim 6) proliferatif aktivite gösterilmiştir. %10'un altında proliferatif aktivite gösteren olgu izlenmemiştir (4 olgu teknik nedenlerle değerlendirilememiştir) (Tablo VIII). DSÖ ve Ljubljana sınıflandırmalarına göre olguların Ki-67 ekspresyonlarının ortalamaları hesaplanmıştır (Oneway-ANOVA testi) (Tablo IX). Her iki sınıflamada olguların artan histolojik dereceleri ile Ki-67 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak ($p=0.000$) anlamlı sonuç elde edilmiştir (Kruskal Wallis testi). Ayrıca gerek DSÖ ve gerekse Ljubljana sınıflamalarında artan derece ile Ki-67 ekspresyonu arasında pozitif yönlü olarak iyi derecede ($r=0.80$) korelasyon bulunmuştur (Spearman korelasyon testi).

2.2. p53 Ekspresyonu

p53 antikoru için pozitif boyanan DSÖ sınıflandırmasına göre toplam 53 olguda (1 karsinoma in situ olgusu teknik nedenlerle değerlendirilememiştir) 6 (%11.3) basit hiperplazi olgusu skor I, hafif displazi olgularından 14'ü (% 26.4) skor I, 8'i (% 15) skor II, orta derece displazi olgularından 3'ü (% 5.6) skor I, 5'i (% 9.4) skor II (Resim 7), şiddetli displazi olgularından 1'i (% 1.8) skor I, 5'i (% 9.4) skor II, 6'sı (% 11.3) skor III (Resim 8), karsinoma in situ olgularından 1'i (% 1.8) skor II, 4'ü (% 7.5) skor III olarak değerlendirilmiştir (Tablo X). Ljubljana sınıflandırmasına göre 6 (% 11.3) basit hiperplazi olgusu skor I, anormal hiperplazi olgularından 15'i (% 28.3) skor I, 11'i (% 20.7) skor II, atipik hiperplazi olgularından 3'ü (% 5.6) skor I, 7'si (% 13.2) skor II, 5'i (% 9.4) skor III, karsinoma in situ olgularından 1'i (% 1.8) skor II, 5'i (% 9.4) skor III (Resim 9) olarak değerlendirilmiştir (Tablo XI). DSÖ ve Ljubljana sınıflandırmalarında artan histolojik derece ile p53 ekspresyonu arasında pozitif yönlü iyi derecede ($r=0.63$, $r=0.60$) korelasyon bulunmuştur (Spearman korelasyon testi).

2.3. CD34 ekspresyonu

DSÖ sınıflandırmasına göre toplam 53 olguda (1 olgu teknik nedenlerle değerlendirilememiştir) CD34 antikoru ile x400'lük büyütmede pozitif boyanan damar sayısı 6 (% 11.3) basit hiperplazi olgusunda 1-5; hafif displazi olgularından 3'ünde (% 5.6) 1-5; 16'sında (% 30.1) 6-10; 2'sinde (% 3.7) 11-15; orta derece displazi olgularından 7'sinde (% 13.2) 6-10 (Resim 10); 1'inde (% 1.8) 11-15; şiddetli displazi olgularından 8'inde (% 15) 6-10 (Resim 11); 4'ünde (% 7.5) 11-15; 6 (% 11.3) karsinoma in situ olgusunda 11-15 olarak saptanmıştır (Tablo XII). Ljubljana sınıflandırmasına göre ise toplam 53 olguda 6 (% 11.3) basit hiperplazi olgusu 1-5; anormal hiperplazi olgularından 2'si (% 3.7) 1-5; 20'si (% 37.7) 6-10; 3'ü (% 5.6) 11-15; atipik hiperplazi olgularından 11'i (% 20.7) 6-10; 4'ü (% 7.5) 11-15; karsinoma in situ olgularından 1'i (% 1.8) 6-10; 6'sı (% 11.3) 11-15 (Resim 12) olarak saptanmıştır (Tablo XIII). DSÖ ve Ljubljana sınıflandırmalarında artan histolojik derece ile CD34 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.000$) ilişki saptanmıştır (Kruskal Wallis testi). Ayrıca DSÖ sınıflandırmasında artan histolojik derece ile CD34 ekspresyonu arasında pozitif yönlü zayıf-orta derecede ($r=0.48$) korelasyon saptanırken, Ljubljana sınıflandırmasında ise artan histolojik derece ile pozitif yönlü iyi derecede ($r=0.64$) korelasyon saptanmıştır (Spearman korelasyon testi). DSÖ ve Ljubljana sınıflandırmalarına göre olguların CD34 ile boyanan damar sayılarının ortalamaları hesaplanmıştır (Oneway-ANOVA testi) (Tablo XIV).

2.4. Ki-67, p53 ve CD34 kullanılarak DSÖ ve Ljubljana sınıflandırmalarındaki düşük dereceli preneoplastik lezyonların kendi içlerinde ve basit hiperplazi ile karşılaştırılması

Burada DSÖ sınıflamasındaki hafif, orta derecede displazi ayrımının anlamlı olup olmadığının ve yine bu düşük dereceli displazi gruplarının basit hiperplazi ile farklılık gösterip göstermediğinin araştırılması amaçlanmıştır. Aynı uygulama Ljubljana sınıflamasındaki anormal hiperplazi grubunda da uygulanmıştır. Ljubljana sınıflamasındaki anormal hiperplazi grubu, DSÖ sınıflamasındaki hafif ve orta derecede displazi ölçütlerine uyan bazı nitelikleri de kapsadığından, özellikle bu gruplar arasında karşılaştırma yapılmıştır. DSÖ sınıflamasındaki şiddetli

displazi ve karsinoma in situ ile Ljubljana sınıflamasındaki atipik hiperplazi yüksek dereceli preneoplastik lezyonlar olduğundan burada ele alınmamıştır.

Bu aşamada 6 basit hiperplazi olgusu kontrol grubu olarak ele alınmıştır. Ki-67 antikoru kullanılarak DSÖ sınıflandırmasında hafif displazi olguları kontrol grubundaki basit hiperplazi olguları ile ve orta derecede displazi olguları kontrol grubundaki basit hiperplazi olguları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.002$ ve $p=0.007$) bir fark elde edilmiştir (Mann-Whitney U testi). Ayrıca hafif displazi ve orta derecede displazi olguları Ki-67 antikoru kullanılarak karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.044$) bir fark elde edilmiştir. Ljubljana sınıflandırmasında ise anormal hiperplazi olguları kontrol grubundaki basit hiperplazi olguları ile Ki-67 antikoru kullanılarak karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.002$) bir fark elde edilmiştir (Mann-Whitney U testi).

CD34 antikoru kullanılarak Ljubljana sınıflandırmasındaki anormal hiperplazi olguları ile kontrol grubundaki basit hiperplazi olguları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.001$) bir fark elde edilmiştir (Mann-Whitney testi). DSÖ sınıflandırmasında hafif displazi olguları kontrol grubundaki basit hiperplazi olguları ile ve orta derecede displazi olguları ile kontrol grubundaki basit hiperplazi olguları CD34 antikoru kullanılarak karşılaştırıldığında basit hiperplazi ile hafif displazi arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.001$) bir fark elde edilmiştir. Basit hiperplazi ile orta derecede displazi arasında yine istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.002$) bir fark elde edilmiştir. Ancak DSÖ sınıflamasındaki hafif displazi ile orta derecede displazi olguları CD34 antikoru kullanılarak karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.09$) bir fark elde edilmemiştir (Mann-Whitney testi).

p53 antikoru kullanılarak Ljubljana sınıflandırmasındaki anormal hiperplazi olguları ile kontrol grubundaki basit hiperplazi olguları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.04$) bir fark elde edilmiştir (Chi-Square testi). Ancak DSÖ sınıflandırmasındaki hafif displazi olguları ile kontrol grubundaki basit hiperplazi olguları p53 antikoru kullanılarak karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.07$) bir fark elde edilmezken, orta derecede displazi olguları ile basit hiperplazi olguları karşılaştırıldığında anlamlı ($p=0.01$) bir fark elde edilmiştir. Yine p53 antikoru kullanılarak DSÖ sınıflandırmasındaki hafif displazi olguları ile orta

derecede displazi olguları karşılaştırıldığında anlamlı ($p=0.2$) bir fark elde edilmemiştir.

Tablo VIII: Olguların Ki-67 proliferatif indeksinin genel dağılımı

%10↓	0
%10-50	42
%50↑	8
Toplam	50

Tablo IX: Ki-67 ekspresyonunun Oneway-ANOVA testi ile her iki sınıflamadaki ortalamaları

DSO		LJUBLJANA	
Basit hiperplazi	18.3± 2.1	Basit hiperplazi	18.3± 2.1
Hafif displazi	24.9± 6.1	Anormal hiperplazi	25.7± 6.7
Orta derecede disp.	32.6± 8.1	Atipik hiperplazi	46.0± 9.3
Şiddetli displazi	50.7± 8.4	Karsinoma in situ	55.7± 10.3
Karsinoma in situ	54.2± 10.8		

Tablo X: DSÖ sınıflandırmasının histolojik derecelerine göre p53 boyanma skorlarının dağılımı (sayılar olguları belirtmektedir)

	Skor I	Skor II	Skor III
Basit hiperplazi	6		
Hafif displazi	14	8	
Orta derecede displ.	3	5	
Şiddetli displazi	1	5	6
Karsinoma in situ		1	4
Toplam	24	19	10

Tablo XI: Ljubljana sınıflandırmasının histolojik derecelerine göre p53 boyanma skorlarının dağılımı (sayılar olguları belirtmektedir)

	Skor I	Skor II	Skor III
Basit hiperplazi	6		
Anormal hiperplazi	15	11	
Atipik hiperplazi	3	7	5
Karsinoma in situ		1	5
Toplam	24	19	10

Tablo XII: DSÖ sınıflandırmasının histolojik derecelerine göre olguların CD34 boyanma dağılımı

	1-5	6-10	11-15
Basit hiperplazi	6		
Hafif displazi	3	16	2
Orta derecede displ.		7	1
Şiddetli displazi		8	4
Karsinoma in situ			6
Toplam	9	31	13

Tablo XIII: Ljubljana sınıflandırmasının histolojik derecelerine göre olguların CD34 boyanma dağılımı

	1-5	6-10	11-15
Basit hiperplazi	6		
Anormal hiperplazi	2	20	3
Atipik hiperplazi		11	4
Karsinoma in situ		1	6
Toplam	8	32	13

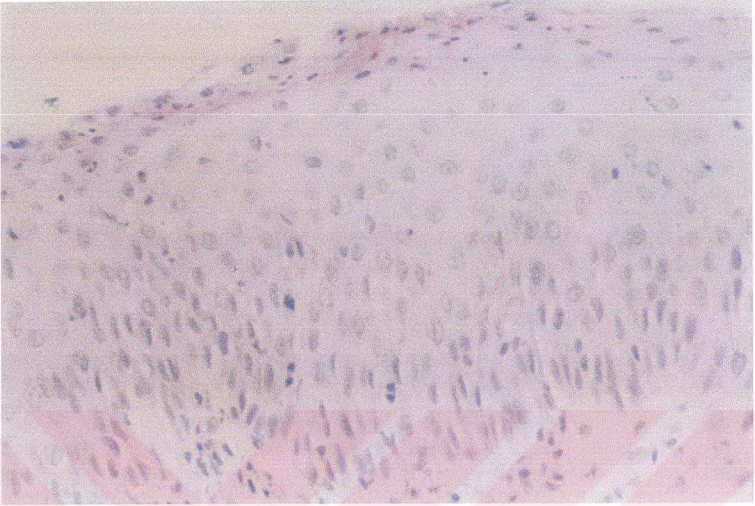
Tablo XIV: CD34 ekspresyonunun her iki sınıflamaya göre ortalama değerleri

DSÖ		LJUBLJANA	
Basit hiperplazi	5.0± 0.6	Basit hiperplazi	5.0± 0.6
Hafif displazi	7.4± 1.9	Anormal hiperplazi	7.7± 1.9
Orta derece displ.	8.3± 1.5	Atipik hiperplazi	9.2± 1.9
Şiddetli displazi	9.8± 1.6	Karsinoma in situ	12.1± 1.7
Karsinoma in situ	12.6± 1.2		

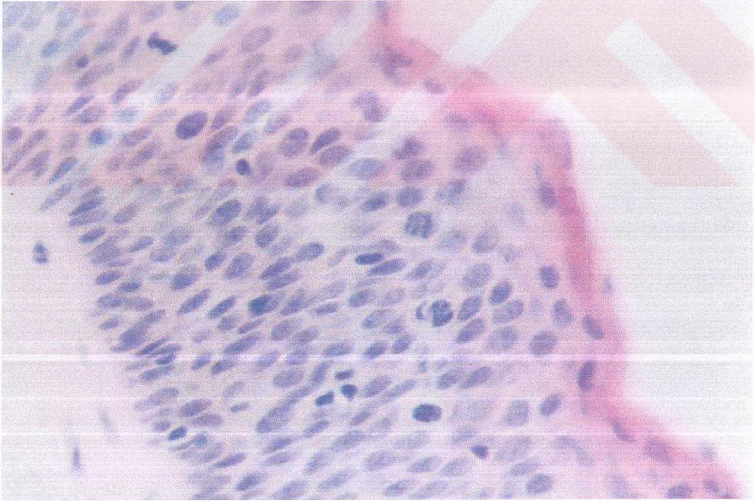
Tablo XV: Olguların DSÖ ve Ljubljana sınıflamalarına göre derecelendirilmesi ve immundokimyasal verileri (kısaltmalar= B.Hip: basit hiperplazi, H.D: hafif displazi, O.D: orta derecede displazi, Ş.D: şiddetli displazi, CIS: karsinoma in situ, An.H: anormal hiperplazi, At.H: atipik hiperplazi)

			DSÖ Sınıflandırması					Ljubljana Sınıflandırması						
Patoloji No	Yaş	Cin.	B.Hip.	H.D.	O.D	Ş.D.	CIS	B.Hip.	An.H.	At.H	CIS	Ki-67	p53	CD34
1979/94 A	60	E		+					+			24	2	7
1979/94 B	60	E		+					+			19,2	1	13
1621/94	58	E			+				+			33,2	2	11
12563/95	76	E			+				+			18	2	9
9791/95	42	K				+				+			1	11
9031/96	40	E		+					+			21,9	2	11
10052/96	70	E				+				+			3	8
8200/96	50	E				+				+		33,7	3	14
7318/96	59	E					+				+	69,3	3	14
8938/96	50	E					+				+	44,8	3	11
5867/97	68	E		+					+			18	1	7
5401/97	65	E				+				+		46,2	2	8
6921/97	50	E					+				+	48,1	3	14
11105/97	62	E				+				+		59,2	3	10
1849/97	39	E		+					+			20,6	2	10
6113/97	55	E		+					+			18,2	1	6
4689/97	66	E					+				+	46,8	2	12
7447/97	51	E			+				+			28,9	1	9
4571/98	45	E		+					+			38,2	2	6

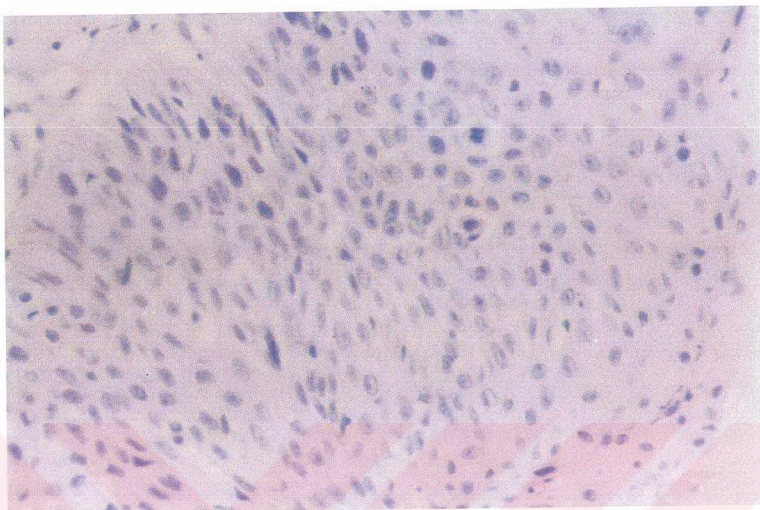
12534/98	61	E			+					+		40	2	9
8846/98	65	E				+					+	63	3	9
17206/98	62	E				+				+		55	3	8
13427/98	48	E				+				+		48,3	2	13
13657/98	45	E					+				+			12
17742/98	48	E		+					+			43	2	7
5100/98	48	E				+				+		43	2	9
3371/98	69	E			+				+			40	2	8
4571/98	45	E				+				+		51,2	2	9
12409/98	62	E		+					+			24	1	7
5649/99	61	E		+					+			29,1	1	8
6717/99	79	E			+					+			1	8
4178/99	27	E		+					+			26,1	2	7
4981/99 1	29	K		+					+			22,3	1	
4981/99 2	29	K		+					+			24,5	1	7
16182/99	70	E				+				+		51,5	3	11
17342/99	50	E			+					+		39,4	2	7
9376/99	45	E	+						+			19,8	1	5
9548/99	38	E		+					+			22,1	1	8
16662/99	53	E		+					+			30	2	7
4598/99	55	E		+					+			23,9	1	5
573/99	35	K		+					+			25,2	1	6
5257/99	60	K	+						+			22,1	1	5
637/99	57	E		+					+			30	1	6
1242/00	68	E		+					+			22,7	2	5
4472/00 1	46	E		+					+			24,1	1	8
4472/00 2	46	E			+					+		28,7	1	6
3161/00	60	E				+				+		56,2	2	10
1884/00 1	61	E		+					+			18,5	1	6
1884/00 2	61	E					+				+	62,3	3	13
3001/00	57	E		+					+			23,2	1	9
10150/00	60	E	+						+			17	1	4
12103/00	45	K	+						+			16,5	1	6
11301/00	55	E	+						+			17,6	1	5
12305/00	56	E	+						+			17,2	1	5



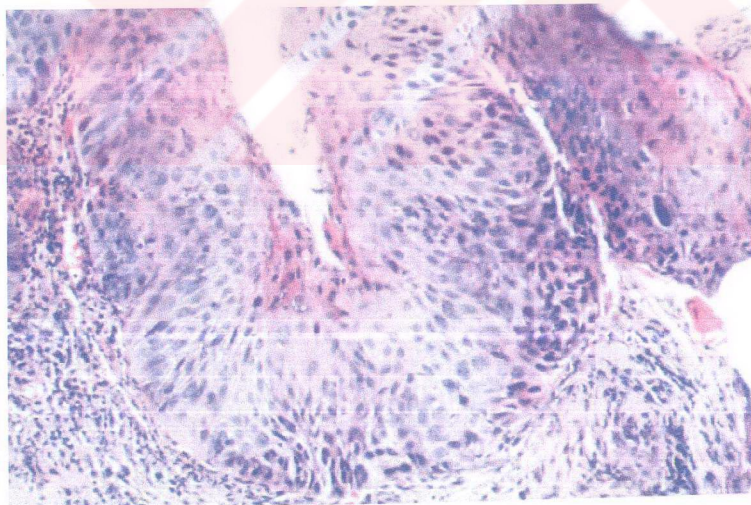
Resim 1 : DSÖ sınıflamasına göre orta derecede displazi (12534/98, H&E,x200)



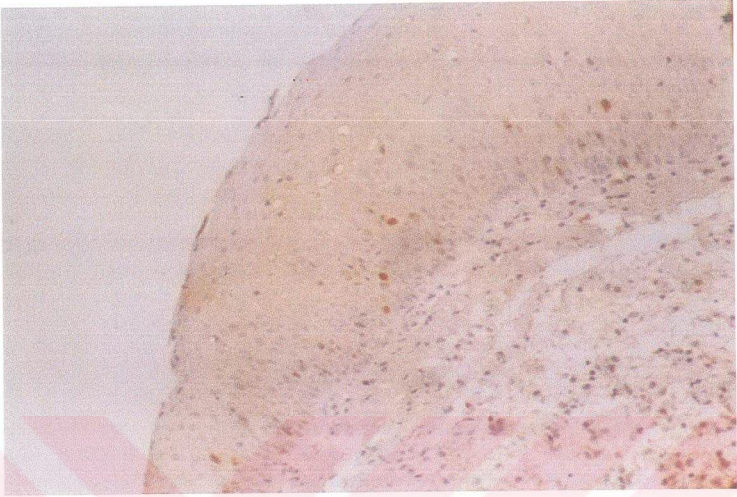
Resim 2 : DSÖ sınıflamasına göre şiddetli displazi (1571/98, H&E, x400)



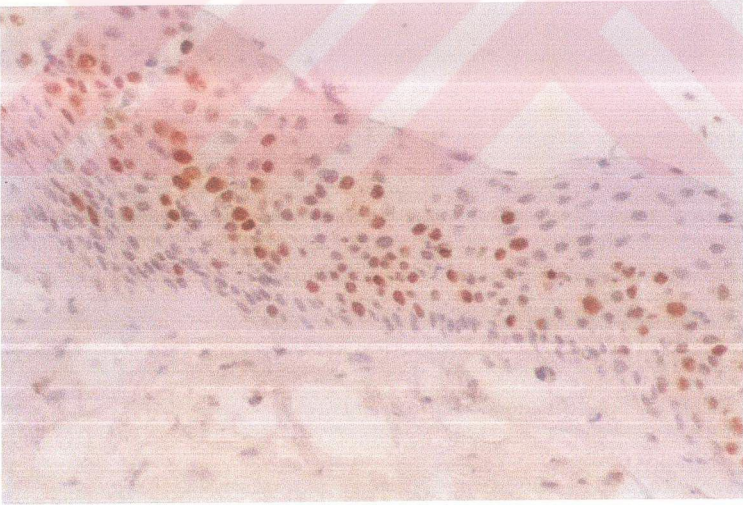
Resim 3: Ljubljana sınıflamasına göre atipik hiperplazi (5100/98, H&E, x200)



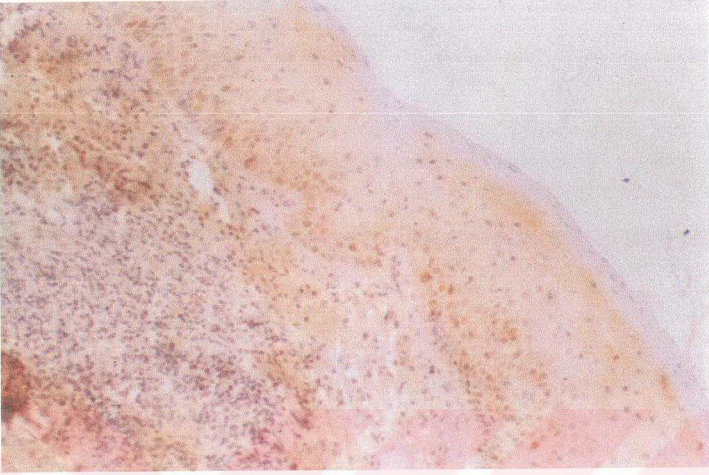
Resim 4: Ljubljana sınıflamasına göre in situ karsinom (7318/96, H&E, x100)



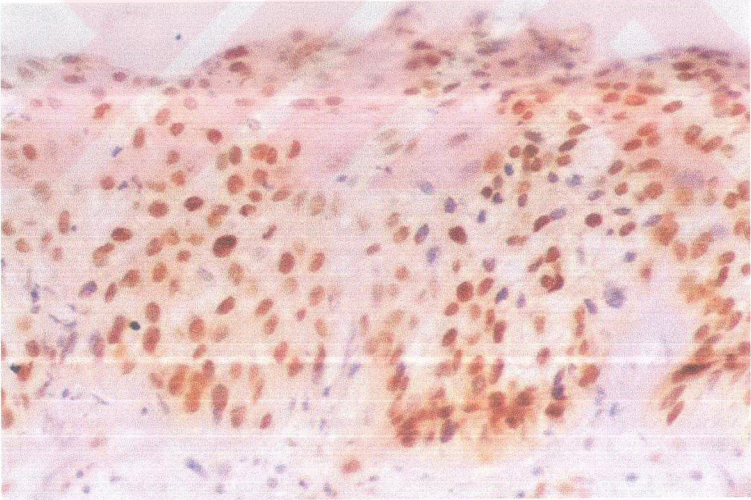
Resim 5: Hafif displazi olgusunda, %10-50 arasında pozitif Ki-67 ekspresyonu
(4571/98, x100)



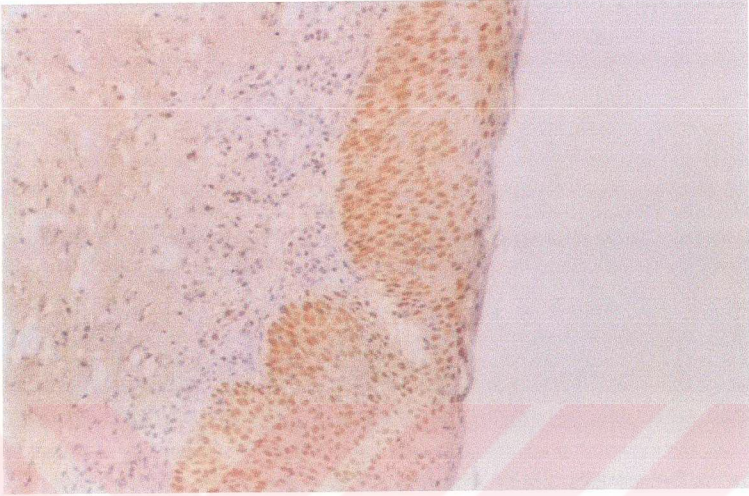
Resim 6: Şiddetli displazi olgusunda %50 nin üstünde pozitif Ki-67 ekspresyonu
(4571/98 1, x200)



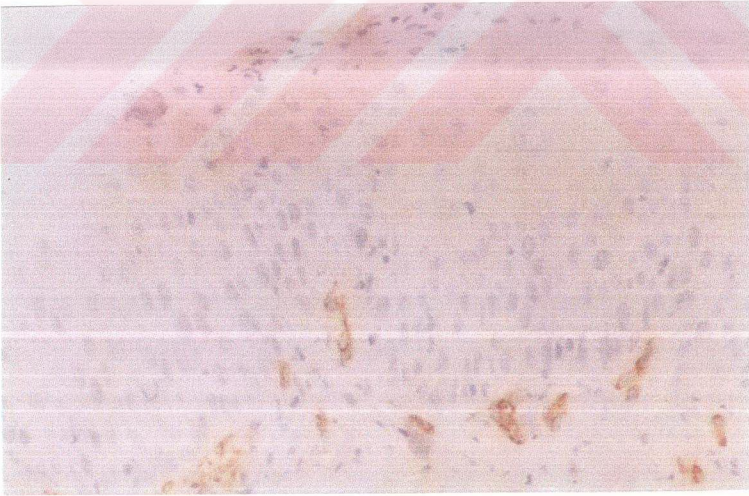
Resim 7: Orta derecede displazi olgusunda skor II pozitif p53 ekspresyonu
(3371/98, x100)



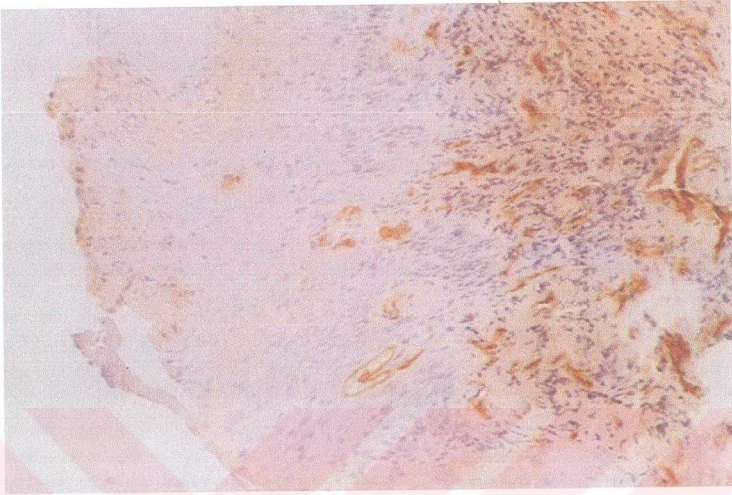
Resim 8: Şiddetli displazi olgusunda skor III pozitif p 53 ekspresyonu
(8846/98, x200)



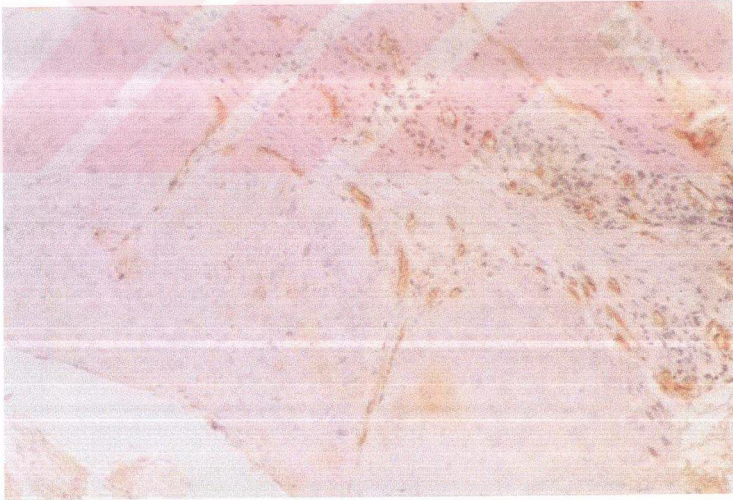
Resim 9: İn situ karsinom olgusunda skor III pozitif p53 ekspresyonu
(8938/96, x100)



Resim 10: Orta derecede displazi olgusunda subepitelyal alanda CD34 pozitif
Mikrodamarlar (6-10 grubu) (12534/98, x200)



Resim 11: Şiddetli displazi olgusunda subepitelyal alanda CD34 pozitif Mikrodamarlar (6-10 grubu) (5401/97, x100)



Resim 12: İn situ karsinom olgusunda subepitelyal alanda CD34 pozitif Mikrodamarlar (11-15 grubu) (7318/96, x100)

TARTIşMA

Larinksin invaziv karsinoma ilerleyebilen epitelyal hiperplastik-displastik lezyonları, en sık olarak kord vokal ve interaritenoid alanda izlenir (8). Çalışmalar bu lezyonların malign transformasyon olasılığının, atipinin varlığı, uygulanan ölçütler ve izlem süresine bağılı olarak % 1.5-52.9 arasında olabildiğini göstermiştir (9,33).

Epitelyal hiperplastik-displastik lezyonların tanı, tedavi ve prognozu var olan histolojik değişikliklerle ilişkilidir. Halen, bu lezyonların derecelendirilmesindeki standart yöntem histolojik incelemedir. Mikrolaringoskopinin uygulanımı ve mikrocerrahi histolojik değerlendirme için daha uygun doku örneklerinin eksizyonunu sağlar. Bu lezyonları sınıflamak için mikroskopik anormalliklerin kesin ve tutarlı bir biçimde değerlendirilmesi gerekir (8). Blackwell ve ark'ının (7) malign transformasyon riskini gösteren intraepitelyal değişiklikler konusundaki çalışmalarında, invaziv karsinoma dönüşen lezyonlarla, stabil kalan ya da gerileyen lezyonların histopatolojisi karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada beş parametre önemli bulunmuştur. Bunlar anormal mitozlar, mitotik aktivite, stromal inflamatuvar infiltrasyon, epitelin maturasyon düzeyi ve nükleer pleomorfizmdir. Mukoza epitelinin alt üçte birinin üzerindeki mitotik aktivite, karsinom gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca parabazal hücrelerin epitelin alt üçte birinin üzerine çıkan proliferasyonu yine invaziv tümör gelişimi açısından artmış bir potansiyeli yansıtmaktadır. Orta dereceli ya da şiddetli pleomorfizm, karsinoma dönüşen olguların % 77'sinde saptanmıştır. Bu arada, subepitelyal orta dereceli ya da şiddetli stromal inflamatuvar infiltrasyonun da invaziv karsinom gelişen olgularda daha çok görüldüğü belirlenmiştir. Eklenmesi gereken bir özellik de yüzey keratinizasyonunun prognostik açıdan önemi olmamasına karşın, diskeratozun artmış bir malignite potansiyeline işaret etmesidir.

Laringeal displastik lezyonların histolojik özellikleri ve biyolojik davranışları arasındaki ilişkinin her zaman uyumlu olmamasına bağılı olarak bazı zorluklar ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle, kaynaklarda epitelyal hiperplastik-displastik lezyonlarla ilişkili 20'den çok sınıflama önerisi yer almaktadır (8). Sınıflamaların

büyük çoğunluğu serviks uterusun skuamöz epiteliyal lezyonlarının derecelendirilmesinde kullanılanlara benzer ölçütleri içerir (65). En çok kullanılan derecelendirme yöntemi olan DSÖ sınıflaması (1991) epiteliyal hücre anormalliklerinin düzeyi ve şiddetine dayanarak skuamöz intraepiteliyal lezyonları hafif, orta, şiddetli displazi ve karsinoma in situ olmak üzere dörde ayırmaktadır. Son olarak 1997 yılında Ljubljana'da toplanan Avrupa Patoloji Birliği'nin epiteliyal hiperplastik lezyonları konusundaki çalışma grubunun üyeleri tarafından bu lezyonlar için farklı bir sınıflama ileri sürülmüş ve daha sonra bu sınıflamanın yararlılığı yönünde çalışmalar yapılmıştır. Bu son sınıflama laringeal epiteliyal lezyonları basit hiperplazi, anormal hiperplazi, atipik (riskli) hiperplazi ve karsinoma in situ olarak dörde ayırmaktadır (26).

Michales (66) Ljubljana sınıflandırmasının, intraepiteliyal karsinoma olgularını atipik (riskli) hiperplaziden ayırmasına ek olarak larinksin intraepiteliyal hiperplastik lezyonlarının değerlendirilmesinde de ileri bir adım olduğunu vurgulamaktadır. Bir histopatoloji raporundaki 'anormal'i 'atipik'ten daha anlam verici bulan cerrahların olduğunu belirten Friedman ise, (67) açıkça tanımlanmış bir derecelendirme sistemi kadar önemli olan konunun, kuşku olgularda patolog ile cerrah arasındaki iletişim olduğuna dikkat çekmiştir.

Şu bir gerçektir ki displazinin yalnızca ışık mikroskopik olarak değerlendirilmesi bazı yanlış pozitif ve daha çok da yanlış negatif sonuçlara yol açabilmektedir (10). Daha nesnel bir değerlendirmeye ve bu sayede lezyonların neoplastik potansiyelini belirleyebilecek yeni histolojik belirleyicilere gereksinim vardır (33).

Hücre kinetik bilgileri tümör sınıflandırmasında histolojiye dayanan yararlı bir yardımcı olabilir ve nonneoplastik durumların anlaşılmasına olanak sağlayabilir. Farklı yöntemler değişik yönlerdeki hücre siklusunu ölçmek için denenmiş ve hücrelerin biyolojik davranışlarıyla bu ölçümleri ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. Bu yöntemler arasında kullanılanlar daha önce de belirtildiği gibi mitoz sayımı, timidin bağlama indeksi, nükleer organize alanlar (NOR), mikrospektrofotometrik DNA ölçümü, flow sitometri ve nükleer proliferasyonla ilişkili antijenlerin immundokimyasal olarak gösterilmesidir (10,30,34,35).

Hücre proliferasyonunu değerlendirmede immundokimya, uygulamadaki kolaylık ve sonuçların daha hızlı elde edilmesi nedeniyle diğer yöntemlerden daha üstündür. Anti-PCNA ve Ki-67 proliferatif aktivite değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan iki antikordur (30,37). Çeşitli çalışmalarda Ki-67 immunreaktivitesi ile hücresel proliferasyonun diğer belirleyicileri arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır (12,42). Yüksek proliferatif indeksli tümörlerin daha agresif ve daha yüksek metastatik potansiyele sahip olduğunu gösterir kanıtlar vardır. Preneoplastik lezyonlar üzerinde yapılan çalışmalarda da Ki-67 ekspresyonunun displastik değişikliklerin şiddetiyle paralel bir artış gösterdiği saptanmıştır (43,44).

Genetik faktörler karsinogenezde önemli rol oynar. Malign tümörlerde en iyi bilinen genetik değişikliklerden biri, p53 tümör supresör geninin mutasyonudur (33,42,43,68). p53 tümör supresör geni, kanserlerde yaygın olarak mutasyona uğradığından, kanser araştırmalarında en önde yer almaktadır. p53 mutasyon spektrumu, neoplazilerin etyoloji ve moleküler patogeneze ışık tutmaktadır (47). Çalışmalar p53 gen mutasyonunun baş-boyun kanserlerinde % 35-45 oranında bulunduğunu göstermektedir. p53 mutasyonu hücre siklusu kontrolü ya da genetik stabilite üzerindeki etkileriyle karsinogenezde rol oynamaktadır (69). Farklı laringeal epitelial lezyonlarda mutant p53 protein ekspresyonunun karsinogenez sürecinde hücre transformasyonunun anlaşılmasına yardımcı olacağı varsayılmaktadır (50).

Anjiogenez insan vücudunda büyüme, fertilité ve yara iyileşmesi dışında normal fizyolojik bir durum değildir ve bir çok hastalığın patogenezinde de yer almaktadır (59). Tümörlerin büyümesi ve metastaz yeteneği kazanmaları da neovaskülarizasyona bağlıdır. Tümör neovaskülarizasyonu bulunmadıkça hücre proliferasyonu durağan kalır ve tümör büyümesi 3 mm'den daha büyük çapa ulaşamaz. Anjiogenezi değerlendirmek için değişik yöntemler kullanılabilir. Şu an gündemde olan yöntemler morfometrik yöntemlerle mikrodamar sayısının ve vasküler yüzey yoğunluğunun belirlenmesidir. Bunun için de değişik immundokimyasal yöntemlerle faktör 8 antijen, CD31, CD34, CD36 ya da Ulex europaeus aglutinin-1 gibi belirleyiciler kullanılarak endotel hücreleri belirgin hale getirilmelidir (56,60).

Çalışmamızda hiperplastik ve displastik lezyonlarda anti-Ki-67, p53 ve CD34 immundokimyasal belirleyicileri kullanarak proliferatif aktivite, genetik değişiklikler ve anjiogenezis hakkında objektif verileri sağlamayı ve DSÖ ve Ljubljana sınıflandırmalarındaki histolojik ölçütlerin geçerliliğini bu objektif verilerle değerlendirmeyi amaçladık.

Çalışmamızda DSÖ ve Ljubljana sınıflamalarına göre derecelendirilen olgularda, Ki-67 ekspresyonu ile artan histolojik dereceler arasında anlamlı bir sonuç elde edilmiştir. Bu bulgu kaynaklarda yer alan çalışmalarda elde edilen sonuçlarla benzer korelasyon göstermektedir. Normal laringeal epitelde, Ki-67 ekspresyonu yaygın olarak bazal tabaka çevresinde izlenirken, Lin ve ark (16) şiddetli displazi içeren olgular ile yaptıkları çalışmada, Ki-67 ekspresyonunun kontrolsüz hücre proliferasyonu gösteren laringeal epitelin tüm kalınlığı boyunca olduğunu saptamışlardır. Gerçi Ki-67 ekspresyonunun değerlendirilmesi için çalışmamızda kullandığımız yöntem, pozitif nükleer boyanma gösteren hücrelerin sayımı olmasına karşın lezyonlarda artan atipinin derecesi ile Ki-67 ekspresyonu arasında korelasyon saptamış olmamız Lin ve ark'nın yaptıkları çalışmayı desteklemektedir.

Pignataro ve ark (44) larinksin düşük dereceli displastik lezyonları üzerine yaptıkları bir çalışmada, daha sonrasında infiltratif tümör gelişen bu lezyonlarda Ki-67 ekspresyonunu değerlendirmişler ve lezyonların neoplastik progresyonlarıyla Ki-67 ekspresyonunun anlamlı ilişkiye sahip olduğunu bulmuşlardır. Kendilerinin çalışması displastik mukoza örneklerinde proliferatif indeksin immundokimyasal değerlendirilmesinin, ek işlem gereken hasta gruplarının saptanmasında yararlı olabileceğini göstermiştir. Çalışmamızda da Ki-67 ekspresyonu ile lezyonların neoplastik progresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır.

Zidar ve ark (37) Kambic-Lenart sınıflamasını kullanarak basit, anormal ve atipik hiperplazi olarak derecelendirilmiş laringeal epiteliyal hiperplastik-displastik lezyonlarda Ki-67 ekspresyonu konusunda yaptıkları bir çalışmada, basit hiperplazide sadece bazal tabakada, anormal ve atipik hiperplazide ise epitelin suprabazal kısmında da belirgin olan anlamlı bir boyanma gözlemişlerdir. Çalışma sonucunda epitelin proliferatif bölümünün hiperplazinin derecesiyle paralel bir artış gösterdiği izlenmiştir. Çalışmamızda, epitel tabakalarına göre Ki-67

ekspresyonunu değerlendirmemiş olmamıza karşın, artan histolojik derece ile Ki-67 ekspresyonu arasında olumlu bir korelasyon saptanmıştır.

Garzetti ve ark (70) ise servikal intraepitelyal neoplazilerde Ki-67 ekspresyonu üzerine çalışmışlardır. İntraepitelyal neoplazilerin artan histolojik dereceleri ile Ki-67 indeksi arasında anlamlı bir korelasyon olduğunu ve hafif ve orta şiddetdeki displastik lezyonların klinik değerlendirilmelerinde Ki-67 çalışmanın yararlı olabileceğini göstermişlerdir.

Çalışmamızda yer alan olguların DSÖ ve Ljubljana sınıflamalarına göre artan histolojik dereceleri ile p53 ekspresyonu arasında pozitif yönlü olarak iyi derecede korelasyon saptanmıştır. Bu sonuç kaynaklarda yer alan çalışmalardaki sonuçlarla uyumludur. Shin ve ark (71) tümör gelişimi sırasında p53 ekspresyonunun artıp artmadığını ve eğer artış var ise tmroenez sırasında bu anormalliğin erken olarak nasıl saptanacağı konusunda bir çalışma yapmışlar ve bu çalışmada karsinom ve komşuluğundaki normal ve premalign epitelde çalışılmıştır. Tümörle birlikte tümöre komşu alanlarda da p53 ekspresyonun aralıksız olarak izlenmesi ‘alan kanserizasyonu’ teorisini desteklemiştir. Alan kanserizasyonu, bir doku alanında yineleyen karsinojenik uyarılar sonucu multipl kanserlerin gelişmesine öncülük eden bir olaydır. En önemli komponentlerden ve multistep tmroenezis olaylarını devam ettirenlerden biri genetik hasar birikimidir. Baş-boyun kanserlerinde genetik değişikliklerin önemi kromozomal ve DNA anormalliklerinin varlığı ile gösterilebilmektedir. Shin ve ark.’nın bu çalışmasında elde edilen sonuçlar p53 ekspresyonun yüksek riskli popülasyonda potansiyel tümör gelişimini değerlendirmede yararlı bir belirleyici olabileceğini göstermiştir.

Ayrıca p53 ekspresyonun invaziv karsinoma progresyon gösteren displazili olgularla ilişkili bulunması, immundokimyasal analizin progresyonu belirlemede geleneksel histolojik değerlendirmeden daha güvenilir olduğunu göstermiştir (44). Benzer bir alışma Dolcetti ve ark (72) tarafından yapılmıştır. Larinksin skuamöz hücreli karsinom olguları üzerine yaptıkları bir çalışmada, p53 ekspresyonunu invaziv alanlar yanısıra preneoplastik lezyonlarda da saptamışlardır. Bu verilerle p53 anormalliklerinin skuamöz hücreli karsinom gelişiminde oldukça erken bir gösterge olabileceği sonucuna varmışlardır.

Poljak ve ark'ı (50) bir çalışmada larinksin nonneoplastik ve neoplastik lezyonlarında tümörögenезisin birbirini izleyen aşamalarında p53 immunreaktivite prevalansını değerlendirmişler ve ayrıca prekanseröz olarak adlandırılan lezyonlarda (atipik hiperplazi ya da orta-şiddetli displazi) p53 protein ekspresyonunun gösterilmesinin prognostik değere sahip olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışmada p53 protein ekspresyonunun belirgin nükleer atipi varlığı izlenmeden önce erken laringeal epiteliyal hiperplastik lezyonlarda da ortaya çıktığı izlenmiştir. Epiteliyal anormalliklerin şiddetine göre basit hiperplaziden atipik hiperplaziye doğru p53 ekspresyonunda artış olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma laringeal karsinogenезisde elde edilen genetik verilerin erken bir bulgu olarak ele alınabileceğini göstermiştir. Çalışmamızda yer alan olgularda da, epiteliyal anormalliklerin artan şiddetine göre p53 ekspresyonunda da kaynaklardakine benzer bir artış saptanmıştır. Bu veriler bize çalışmalarda belirtilen genetik kanıtların erken bir bulgu olduğu yönündeki sonuçları doğrular nitelikte olduğunu göstermektedir.

Buna karşın, Holm ve ark (73) serviks uterinin normal, premalign ve malign lezyonlarında p53 ekspresyonu ile ilgili yaptıkları bir çalışmada sadece birkaç karsinoma in situ olgusunda p53 ekspresyonu izlemişlerdir. Çalışma sonucunda laringeal neoplazilerin aksine servikal neoplazilerin patogeneğinde p53 ekspresyonun erken bir gösterge olmadığı görüşüne varılmıştır.

Krecicki ve ark (33) yaptıkları çalışmada laringeal karsinogenезisin tüm aşamalarında p53 ve PCNA antikörlerinin ekspresyonları arasında da korelasyon olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu araştırmacılar proliferе hücre tabakalarında p53 protein lokalizasyonunun PCNA antikoru ile benzer lokalizasyonda olduğunu saptamışlardır. Elde edilen veriler sonucunda, çalışmamızda da olduğu gibi, hafif displazide ve karsinojene maruz normal epitelde p53 protein birikiminin gözlenmesi, p53 gen mutasyonunun larinks karsinogenезisinde erken bir kanıt olduğu hipotezini desteklediği kabul edilmiştir. Söz konusu çalışmada, diğer çalışmacıların sonuçlarına benzer şekilde, epiteliyal değişikliklerin artan derecesine paralel bir p53 ekspresyonu artışı gözlemlenmiştir. Munck-Wikland ve ark (55) laringeal karsinoma in situlu lezyonlarda PCNA ve p53 kombinasyonu ile

yaptıkları bir çalışmada, in situ lezyonların invaziv kansere ilerleme potansiyeli taşıyıp taşımadığının belirlenebileceğini bildirmişlerdir.

Gale ve ark (54) larinksin epiteliyal hiperplastik lezyonlarında epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve *c-erbB-2* ile birlikte p53 overekspresyon sıklığını analiz etmek ve histolojik derecelerle ilişkilerini saptamak için yaptıkları bir çalışmada, skuamöz hücreli karsinomun tümörögenезisi sırasında en sık genetik kanıt olan p53 protein ekspresyonunun erken epiteliyal hiperplastik lezyonlarda ortaya çıktığını, yoğunluk ve sıklığının epiteliyal değişikliklerin şiddetine göre arttığını ve bu bulguların diğer çalışmalarla uyumlu olduğunu izlemişlerdir. Benzer bir çalışma Miyaguchi ve ark (74) tarafından sadece EGFR kullanılarak yapılmıştır. Çalışma sonucunda şiddetli displazi ve in situ karsinom olgularında izlenen boyanmanın karsinomdakine benzer olduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar bu bulgularla, şiddetli displazi ile karsinoma in situnun potansiyel olarak malign biyolojik davranış gösterdiği teorisini destekler olduğu kanısına varmışlardır. Benzer bir çalışmada Maiorano ve ark (75) tarafından EGRF ve östrojen reseptörü kullanılarak yapılmıştır. Çalışma sonucunda laringeal karsinogenезisde hormon reseptörlerinin de rol oynadığı gözlenmiştir.

Fouret ve ark (76) larinksin prekanseröz lezyonlarında p53 ekspresyonunun yüksek sıklıkta saptandığını doğrulamışlardır. Ayrıca daha önceki çalışmalarla birlikte p53 proteinin baş-boyun karsinogenезisinin erken evrelerinde birikebileceğini göstermişlerdir.

Gallo ve ark (53) çalışmasında, larinksin preneoplastik lezyonlarının progresyonunu tahmin etmek için Ki-67 ve p53 proteini kullanılmıştır. Çalışma p53 ekspresyon değişikliklerinin laringeal karsinom gelişiminde erken bir bulgu olabileceğini göstermiştir. Aynı çalışmada Ki-67 ekspresyonun da maligniteye transforme olan ve olmayan lezyonlarda epiteliyal hiperplazi ve displazinin artan derecesine paralel olarak artış gösterdiği gözlenmiştir. Çalışmamızda yer alan olgularda da Ki-67 ve p53 ekspresyonları ile olguların artan histolojik dereceleri arasında benzer şekilde pozitif yönlü bir korelasyonun saptanması, bu antikörlerin larinksin preneoplastik lezyonlarının progresyonunu tahmin etmede yardımcı belirleyici olarak kullanabileceğimizi göstermektedir. Bununla birlikte farklı kanıda olan çalışmalar da mevcuttur.

Pignataro ve ark (44) çalışmalarında ise elde edilen veriler, p53 overekspresyonunun displaziden invaziv karsinoma gidişi göstermede yararlı olamayacağı yönündedir. Bu veri çalışmamızda elde ettiğimiz p53 ekspresyonu ile artan histolojik derece arasındaki anlamlı ilişkiye ters düşmektedir.

Çalışmamızda kontrol grubu olarak alınan basit hiperplazi olguları ile hafif displazi olguları arasında ve hafif displazi olguları ile orta derecede displazi olguları arasında p53 ekspresyonu açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ljubljana sınıflamasına göre ise basit hiperplazi olguları ile anormal hiperplazi olguları p53 ekspresyonları açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık saptanmıştır. Bu nedenle, p53 proteini ile ilgili verilerimiz, DSÖ sınıflamasından çok Ljubljana sınıflamasındaki derecelerin daha objektif ölçütlere dayandığını göstermektedir. Başka bir açıdan bakacak olursak, DSÖ sınıflamasına göre lezyonların hafif, orta derecede displazi şeklinde ayrılması p53 antikorunun ekspresyonu ile tam bir paralellik göstermemektedir. Kısacası, DSÖ sınıflamasındaki hafif displazi-orta dereceli displazi ve basit hiperplazi-hafif displazi ayrımı p53 ekspresyonu açısından objektif görünmemektedir. Bu nedenle DSÖ sınıflamasındaki hafif, orta displazi dereceleri Ljubljana sınıflamasında olduğu gibi tek bir başlık altında toplamak daha gerçekçi görünmektedir.

Baş-boyundaki skuamöz epitelin premalign lezyonlarındaki anjiogenezis ile ilgili çalışmalara, ulaşabildiğimiz kaynakların ışığında, rastlanılamamıştır. İntraepitelyal lezyonlardaki anjiogenezis ile ilgili çalışmalar büyük oranda serviks uterinin skuamöz intraepitelyal lezyonları üzerinde yapılmıştır. Çalışmamızda anjiogenezisi değerlendirmek için kullandığımız CD34 antikoru ile subepitelyal pozitif boyanan mikrodamarlar sayılmıştır. DSÖ ve Ljubljana sınıflamalarında yer alan olguların artan histolojik dereceleri ile CD34 boyanan damar sayıları arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Ravazoula ve ark (58) serviks uterinin intraepitelyal lezyonlarındaki anjiogenezis çalışmasında, vasküleritenin servikal epiteldeki atipinin şiddeti ile paralel bir artış gösterdiği saptanmıştır. Ancak aynı kaynakta belirgin olarak yeni damar oluşturma yeteneğinin, epitelin neoplastik olduğunu ya da neoplastik hale geleceğini göstermeyeceği de belirtilmektedir. Çalışmamızda her iki sınıflamada da artan histolojik derece ile birlikte damar sayısında bir artış olduğu gözlemlenmiştir.

Karen ve ark (77) serviks uterinin intraepitelyal lezyonlarındaki anjiogenezis ile ilgili çalışmalarında, özellikle orta derecede displazi olguları ile şiddetli displazi ve karsinoma in situ olgularında neovaskülarizasyonun normal epitel ile karşılaştırılmasında anlamlı bir fark izlemişlerdir. Anjiogenezezin derecesi ile lezyonun artan şiddeti arasında paralel bir artış olduğunu saptamışlardır. Bu veriler de çalışmamızda elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir.

Chomette ve ark ile Sillman ve ark (78,79) serviks 'uterinin intraepitelyal lezyonlarında vaskülarite şiddetinin epitelyal lezyonların artan histolojik dereceleri ile pozitif korelasyon gösterdiğini izlemişlerdir.

Çalışmamızda yine CD34 ekspresyonu yönünden DSÖ sınıflamasının hafif displazi olguları ile orta derecede displazi olguları kendi arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark elde edilememiştir. Bu veriler de, p53 ekspresyonunda olduğu gibi CD34 ekspresyonları ele alındığında da laringeal epitelyal lezyonların sınıflandırılmasında Ljubljana sınıflamasının daha güvenilir olduğu izlenimi vermektedir. Ancak, çalışmamızda kullandığımız olgu serisinin çok geniş olmaması ve sınırlı sayıda belirleyicilerin kullanılmış olması nedeniyle, DSÖ ve Ljubljana sınıflamalarının yeterliliği ve nesnelliğini test etme açısından daha geniş serilerle yapılan çalışmalara gereksinim vardır.

Sonuç olarak araştırmamızda, her iki sınıflamanın da larinksin preneoplastik lezyonlarının histolojik değerlendirilmesinde yararlı olduğu, objektif veriler ışığında Ljubljana sınıflamasının daha anlamlı ölçütlere dayandığı kanısına varılmıştır. Ayrıca, Ljubljana sınıflaması histolojik düzeyde daha kolay uygulanabilir bulunmuştur.

SONUÇLAR

Bu çalışmada 54 epiteliyal hiperplastik-displastik lezyon içeren laringeal biopsi DSÖ ve Ljubljana sınıflamalarına göre H&E boyalı kesitlerde ve ışık mikroskopunda derecelendirilmiş ve olgularda her iki sınıflamadaki histolojik dereceler ile Ki-67, p53 ve CD34 ekspresyonları arasındaki ilişki araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmektedir:

- 1- Olguların 48'i (% 88.8) erkek, 6'i (% 11.1) kadındır.
- 2- Olguların yaş ortalaması 52±12'dir.
- 3- DSÖ sınıflamasına göre olguların 6'sı (%11.1) basit hiperplazi, 22'si (%40.7) hafif displazi, 8'i (%14.8) orta derecede displazi, 12'si (%22.2) şiddetli displazi ve 6'sı (%11.1) karsinoma in situ olarak değerlendirilmiştir.
- 4- Ljubljana sınıflamasına göre olguların 6'sı (%11.1) basit hiperplazi, 26'sı (%48.1) anormal hiperplazi, 15'i (%27.7) atipik hiperplazi ve 7'si (%12.9) karsinoma in situ olarak değerlendirilmiştir.
- 5- Her iki sınıflamada olguların artan histolojik dereceleri ile Ki-67 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.000$) bir sonuç elde edilmiştir. Ayrıca, her iki sınıflamada artan histolojik derece ile Ki-67 ekspresyonu arasında pozitif yönlü olarak iyi derecede ($r=0.80$) korelasyon bulunmuştur.
- 6- Her iki sınıflamada artan histolojik derece ile p53 ekspresyonu arasında pozitif yönlü olarak iyi derecede ($r=0.63$, $r=0.60$) korelasyon bulunmuştur.
- 7- Her iki sınıflamada artan histolojik derece ve CD34 ile boyanan damar sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.000$) bir ilişki saptanmıştır. Ayrıca DSÖ sınıflamasında artan histolojik derece ile pozitif yönlü zayıf-orta derecede ($r=0.48$) korelasyon bulunurken, Ljubljana sınıflamasında ise pozitif yönlü iyi derecede ($r=0.64$) bir korelasyon bulunmuştur.
- 8- Altı laringeal epiteliyal basit hiperplazi olgusu kontrol grubu olarak ele alınmış ve bu grupla DSÖ sınıflamasına göre derecelendirilen hafif ve orta derece displazi olguları ile Ljubljana sınıflamasına göre derecelendirilen anormal hiperplazi olguları arasında istatistiksel ilişki incelenmiştir.
 - a- DSÖ sınıflamasına göre derecelendirilen hafif displazi olguları ile basit hiperplazi olguları ve orta derecede displazi olguları ile basit hiperplazi

olguları Ki-67 ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.002$ ve $p=0.007$) bir fark elde edilmiştir.

- b- DSÖ sınıflamasına göre derecelendirilen hafif displazi olguları ile orta derecede displazi olguları Ki-67 ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.044$) bir fark elde edilmiştir.
- c- Ljubljana sınıflamasına göre derecelendirilen anormal hiperplazi olguları ile basit hiperplazi olguları Ki-67 ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında yine anlamlı ($p=0.002$) bir fark elde edilmiştir.
- d- DSÖ sınıflamasına göre derecelendirilen hafif displazi olguları ile basit hiperplazi olguları CD34 ile boyanan damar sayıları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.001$) bir fark elde edilmiştir. Orta derecede displazi olguları ile basit hiperplazi olguları CD34 ile boyanan damar sayıları açısından karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.002$) bir fark elde edilmiştir.
- e- Ancak DSÖ sınıflamasına göre derecelendirilen hafif displazi olguları ile orta derecede displazi olguları CD34 boyanan damar sayıları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.09$) fark elde edilmemiştir.
- f- Ljubljana sınıflamasına göre derecelendirilen anormal hiperplazi olguları ile basit hiperplazi olguları CD34 ile boyanan damar sayıları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.001$) sonuç elde edilmiştir.
- g- p53 antikoru kullanılarak Ljubljana sınıflandırmasına göre derecelendirilen anormal hiperplazi olguları ile kontrol grubundaki basit hiperplazi olguları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.04$) bir fark elde edilmiştir.
- h- DSÖ sınıflandırmasına göre derecelendirilen hafif displazi olguları ile kontrol grubundaki basit hiperplazi olguları p53 ekspresyonları açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.07$) bir fark elde edilmezken, orta derecede displazi olguları ile basit hiperplazi olguları karşılaştırıldığında anlamlı ($p=0.01$) bir fark elde edilmiştir.
- i- Yine p53 antikoru kullanılarak DSÖ sınıflamasına göre derecelendirilen hafif displazi olguları ile orta dereceli displazi olguları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.2$) bir fark elde edilmemiştir.

ÖZET

Giriş ve amaç: Larinksin invaziv karsinoma ilerleyebilen epiteliyal hiperplastik-displastik lezyonları en sık olarak kord vokal ve interaritenoid alanda izlenir. Bu lezyonlar daha çok orta-yaşlı sigara içen erkeklerde ortaya çıkmaktadır. Laringeal epiteliyal hiperplastik-displastik lezyonlar farklı risk gruplarına göre derecelendirilmektedir. Ancak bu lezyonların histolojik özellikleri ve biyolojik davranışları arasındaki ilişkinin her zaman uyumlu olmamasına bağlı olarak bazı zorluklar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, kaynaklarda laringeal epiteliyal hiperplastik-displastik lezyonlarla ilişkili 20'den fazla sınıflandırma önerilmiştir. Çeşitli araştırmacılar farklı histomorfolojik ölçütleri kullanarak bu lezyonları sınıflandırmışlardır. Bu lezyonlar, DSÖ (1991) sınıflamasında hafif, orta, şiddetli displazi ve in situ karsinom olarak derecelendirilirken, 1997 yılında Ljubljana'da önerilen yeni sınıflamaya göre basit, anormal, atipik hiperplazi ve in situ karsinom olarak derecelendirilmiştir.

Laringeal displastik lezyonların malign transformasyon oranı % 1.5 ile % 52.9 arasında değişmektedir. Displazinin yalnızca mikroskopik olarak derecelendirilmesi bazı yanlış pozitif ve daha çok da yanlış negatif sonuçlara yol açmaktadır. Daha nesnel bir değerlendirmeye ve lezyonların neoplastik potansiyelinin tahmin etmeye yardımcı olabilecek yeni histolojik belirleyicilere gereksinim vardır. Bu çalışmada laringeal epiteliyal hiperplastik-displastik lezyonlarda uygulanan başlıca sınıflamalar olan DSÖ ve Ljubljana sınıflandırmalarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışma kapsamındaki hiperplastik ve displastik lezyonlarda anti Ki-67, p53 ve CD34 immundokimyasal belirleyicileri kullanılarak proliferatif aktivite, genetik değişiklikler ve anjiogenezis hakkında nesnel verilerin sağlanması ve söz konusu sınıflandırmalardaki histolojik ölçütlerin geçerliliğinin bu nesnel verilerle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: DEÜTF Patoloji Anabilim Dalında 1990-2000 yılları arasında laringeal epiteliyal hiperplastik-displastik lezyon tanısı almış 108 olgudan 54'ü çalışma kapsamına alınmıştır. Bu olgulara ait H&E preparatların tümü

yeniden gözden geçirilip, her bir olgu DSÖ ve Ljubljana sınıflamalarına göre yeniden derecelendirilmiştir.

Daha sonra olgulara Ki-67, p53 ve CD34 antijenleri için immunhistokimya uygulanmıştır. Ki-67 antijeni için pozitif boyanan hücre yüzdesi, 1000 hücre sayılarak hesaplanmıştır. p53 antijeni için nükleer boyanma gösteren hücrelerin epitelin içindeki dağılımına göre skorlanma yapılmıştır. CD34 antijeni içinse subepitelial alandaki endotelial hücreler görülebilir hale getirildikten sonra, her olgu için üç alandaki damar sayılarının ortalaması hesaplanmıştır.

Istatistik: DSÖ ve Ljubljana sınıflamasına göre derecelendirilen olguların Ki-67 ve CD34 ekspresyonları artan histolojik dereceler bazında Kruskal Wallis testi ile karşılaştırılmıştır. Ki-67, p53 ve CD34 ekspresyonları ile her iki sınıflamadaki artan histolojik dereceler arasındaki korelasyon Spearman korelasyon testi ile araştırılmıştır. Ayrıca basit hiperplazi olguları kontrol grubu olarak ele alınıp, hiperplazi olgularındaki immundokimyasal ekspresyonlar DSÖ sınıflamasındaki hafif displazi ve orta dereceli displazi olgularının immundokimyasal ekspresyonları ile; ayrıca yine kontrol grubunun verileri Ljubljana sınıflamasındaki anormal hiperplazi olgularının immundokimyasal verileri ile Mann-Whitney U ve Chi-Square testleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Ayrıca DSÖ sınıflamasındaki hafif displazi olguları ile orta dereceli displazi olgularının immundokimyasal verileri aynı istatistik testler kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmada yer alan 54 olgunun 48'i (% 88.8) erkek, 6'sı (% 11.1) kadındır. Genel yaş ortalaması 52±12 (27-76) yıldır. DSÖ sınıflamasına göre 6 olgu basit hiperplazi, 22 olgu hafif displazi, 8 olgu orta derecede displazi, 12 olgu şiddetli displazi ve 6 olgu karsinoma in situ tanısı almıştır. Ljubljana sınıflamasına göre ise 6 olgu basit hiperplazi, 26 olgu anormal hiperplazi, 15 olgu atipik hiperplazi ve 7 olgu karsinoma in situ tanısı almıştır.

Her iki sınıflamada olguların artan histolojik dereceleri ile Ki-67 ve CD34 ekspresyonları arasında anlamlı sonuç elde edilmiştir. Yine her iki sınıflamada olguların histolojik dereceleri ile Ki-67, p53 ve CD34 ekspresyonları arasında pozitif yönlü korelasyon saptanmıştır. Basit hiperplazi olguları kontrol grubu olarak ele alındığında, DSÖ sınıflamasına göre derecelendirilen hafif displazi ile basit

hiperplazi olguları; orta derecede displazi ile basit hiperplazi olguları ve hafif displazi ile orta derecede displazi olguları Ki-67 ekspresyonları açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark elde edilmiştir. Benzer sonuçlar Ljubljana sınıflamasına göre derecelendirilen anormal hiperplazi ile basit hiperplazi olguları arasında da elde edilmiştir. CD34 ile boyanan damar sayıları açısından, DSÖ sınıflamasına göre derecelendirilen hafif displazi olguları ile basit hiperplazi olguları; orta derece displazi olguları ile basit hiperplazi olguları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark elde edilirken, hafif displazi olguları ile orta derece displazi olguları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark elde edilmemiştir. Ljubljana sınıflamasına göre derecelendirilen anormal hiperplazi olguları ile basit hiperplazi olguları karşılaştırıldığında yine anlamlı bir fark elde edilmiştir. DSÖ sınıflamasına göre derecelendirilen orta dereceli displazi olguları ile basit hiperplazi olguları p53 ekspresyonları açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark elde edilirken, hafif displazi olguları ile basit hiperplazi olguları ve hafif displazi olguları ile orta dereceli displazi olguları arasında anlamlı bir fark elde edilememiştir. Ljubljana sınıflamasına göre derecelendirilen anormal hiperplazi olguları ile basit hiperplazi olguları p53 ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark elde edilmiştir.

Tartışma ve sonuç: Her iki sınıflamada da Ki-67, p53 ve CD34 ekspresyonları artan histolojik dereceler ile olumlu korelasyon göstermektedir. Ancak, p53 ve CD34 ekspresyonları ile ilgili verilerimiz DSÖ sınıflamasından çok Ljubljana sınıflamasındaki derecelerle daha nesnel ölçütlere dayandığı tezini desteklemektedir. Ortaya çıkan verilere göre, DSÖ sınıflamasında lezyonların hafif ve orta derece displazi şeklinde ayrılması p53 ve CD34 ekspresyonları ile tam bir paralellik göstermemektedir. DSÖ sınıflamasındaki bu kategorilerin, Ljubljana sınıflamasında olduğu gibi tek bir başlık altında toplanması makul görünmektedir. Ancak çalışmamızda kullandığımız olgu serisinin çok geniş olmaması ve sınırlı sayıda belirleyicilerin kullanılmış olması nedeniyle, DSÖ ve Ljubljana sınıflamalarının yeterliliği ve nesnelliğini test etme açısından daha geniş serilerde yapılan çalışmalara gereksinim vardır.

SUMMARY

Introduction and objective: Laryngeal epithelial hyperplastic-dysplastic lesions with progression to invasive carcinoma are seen most common in the vocal cord and interarytenoid field. These lesions most often occur on mid aged smoking males. Laryngeal epithelial hyperplastic-dysplastic lesions are graded according to different risk groups. As there is sometimes discordance between established histopathological criteria and the biological behavior of these lesions, some difficulties occur. So, more than 20 classifications have been proposed associated with laryngeal epithelial hyperplastic-dysplastic lesions in literature. Various investigators classified these lesions using different histomorphological criteria. While these lesions graded as mild, moderate, severe dysplasia and in situ carcinoma for WHO (1991) classification, according to new classification suggested in Ljubljana on 1997 these lesions graded as simple, abnormal, atypical hyperplasia and in situ carcinoma.

The rate of malignant transformation of laryngeal dysplastic lesions ranges between 1.5% and 52.9%. Evaluations of dysplasia solely based on light microscopic examination may lead to false-positive or even to false-negative results. Therefore, new markers are required in order to provide more objective data when it comes to determining the neoplastic potential of these lesions. In this study, the comparison of the WHO and the Ljubljana classifications applying to laryngeal epithelial hyperplastic-dysplastic lesions was aimed. With this purpose, it was aimed to provide objective data about proliferative activity, genetic changes and angiogenesis by using Ki-67, p53 and CD34 immunohistochemical markers and to evaluate validity of histological criteria of these classifications with these objective data.

Material and methods: Of 108 cases diagnosed laryngeal epithelial hyperplastic-dysplastic lesion from the archives of Dokuz Eylul University, School of Medicine, Department of Pathology between 1990-2000 years, 54 cases were included in this study. The histologic slides were re-examined, and each case was reclassified according to both the WHO and the Ljubljana classifications.

Then, sections from each paraffin block were stained for Ki-67, p53 and CD34 antibodies. For Ki-67 antigen, evaluation of immunostaining was based on the percentage of positively stained nuclei by counting 1000 cells. For p53 antigen, scoring was done based on the distribution of positively stained cells within the epithelium. For CD34 antigen, subepithelial CD34-positive vessels were counted in three high power fields for each case, and then the mean value was calculated.

Statistical analysis: Ki-67 and CD34 expressions of cases graded according to the WHO and the Ljubljana classifications were compared by Kruskal Wallis test with increasing histological grades. Correlation between Ki-67, p53 and CD34 expressions and increasing histological grades according to the WHO and the Ljubljana classifications was investigated by Spearman correlation test. Also simple hyperplasia was taken as control group, immunohistochemical expressions of cases with hyperplasia were compared with immunohistochemical expressions of cases with mild dysplasia and moderate dysplasia at the WHO classification; also results of control group were compared with immunohistochemical expressions of cases with abnormal hyperplasia at the Ljubljana classification by using Mann-Whitney U and Chi-Square tests. Also immunohistochemical expressions of cases with mild dysplasia were compared with immunohistochemical expressions of cases with moderate dysplasia at the WHO classification by using same statistical tests.

Results: Of 54 cases, 48 were men (88.8%) and six were women (11.1%). The mean age for all cases was 52±12 (27-76) years. According to the WHO classification, six cases were squamous cell hyperplasia, 22 cases were mild dysplasia, eight cases were moderate dysplasia, 12 cases were severe dysplasia and six cases were carcinoma in situ. According to the Ljubljana classification, six were simple hyperplasia, 26 cases were abnormal hyperplasia, 15 cases were atypical hyperplasia and seven cases were carcinoma in situ.

There was a significant result between cases of increasing histological grades and Ki-67 and CD34 expressions of both the WHO and the Ljubljana classifications. As well as there was a positive correlation between Ki-67, p53 and CD34

expressions and histological grades. When simple hyperplasia was taken as control group, there was a significant difference between mild dysplasia and simple hyperplasia, moderate dysplasia and simple hyperplasia, and mild and moderate dysplasia graded according to the WHO classification compared with Ki-67 expressions. Similar results were obtained between abnormal hyperplasia and simple hyperplasia graded according to the Ljubljana classification. With regard to counts of vessels with stained CD34, a significant difference was obtained between mild dysplasia and simple hyperplasia and moderate dysplasia and simple hyperplasia, there was not a significant difference between mild and moderate dysplasia graded according to the WHO classification. A significant difference was also obtained between abnormal hyperplasia and simple hyperplasia graded according to the Ljubljana classification. For the p53 expression scores, there was a significant difference between moderate dysplasia and simple hyperplasia graded according to the WHO classification, there were not significant differences between mild dysplasia and simple hyperplasia, and mild dysplasia and moderate dysplasia. When compared with p53 expressions, a significant difference was obtained between abnormal hyperplasia and simple hyperplasia graded according to the Ljubljana classification

Discussion and conclusion: There was a positive correlation between and Ki-67, p53 and CD34 expressions of both the WHO and the Ljubljana classifications. But results of p53 and CD34 expressions supported thesis that grades of the Ljubljana classification based on more objective criteria compared with the WHO classification. According to obtained results, it showed no correlation between mild and moderate dysplasia categories of the WHO classification with regard to p53 and CD34 expressions. These categories in the WHO classification was favored to collect under a single title as in the Ljubljana classification. Since our case series were not very large and limited markers were used in our study, there is necessity to studies done with more large series in terms of examining the sufficiency and objectivity of the WHO and the Ljubljana classifications.

KAYNAKLAR

- 1- W.Hole. Human Anatomy Physiology. Sixth ed. WC Brown Publishers, USA, 1993; 584-586.
- 2- Junwueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Basic Histology. Seventh ed. Prentice-Hall International Inc., USA, 1992; 404-405.
- 3- Wenig BM. Atlas of Head and Neck Pathology. WB Saunders Co., Philadelphia, USA, 1993; 206-210.
- 4 - Mills SE, Gaffey MJ, Frierson HF. Tumors of the Upper Aerodigestive Tract and Ear. Armed Forces Institute of Pathology Washington DC., 2000; 45-50.
- 5- Sternberg SS. Histology for Pathologists. Second ed. Lippincott-Raven. Philadelphia, 1997; 391-398.
- 6- Stiblar-Martincic D. Histology of laryngeal mucosa. Acta Otolaryngol (Stockh) 1997; 527: 138-141.
- 7- Blackwell KE, Fu YS, Calcaterra TC. Laryngeal dysplasia. A clinicopathologic study. Cancer 1995; 75; 457-463.
- 8- Kambic V. Epithelial hyperplastic lesions-a challenging topic in laryngology. Acta Otolaryngol (Stockh) 1997; 527: 7-11.
- 9 - Cupic H, Kruslin B, Belicza M. Epithelial hyperplastic lesions of the larynx in biopsy specimens. Acta Otolaryngol (Stockh) 1997; 527: 103-14.
- 10- Burkhardt A. Morphological assessment of malignant potential of epithelial hyperplastic lesions. Acta Otolaryngol (Stockh) 1997; 527: 12-16.
- 11- Fiorella R, Nicolo V, Resta L. Epidemiological and clinical relief on hyperplastic lesions of the larynx. Acta Otolaryngol (Stockh) 1997; 527; 77-81.
- 12-Maier H, Tisch M. Epidemiology of laryngeal cancer: Results of the Heidelberg case-control study. Acta Otolaryngol (Stockh) 1997; 527:160-164.
- 13-Spitz MR. Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. Seminars in Oncology 1994; 21(3): 281-288.
- 14-Bouquot JE, Gnepp DR. Laryngeal precancer: A review of the literature, commentary and comparison with oral leukoplakia. Head & Neck 1991; 13: 488-497.

- 15-Sugar J, Vereczkey I, Toth J, Peter. New aspects in the pathology of the preneoplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; 527: 52-56.
- 16- Lin K, Westra WH, Kashima HK. Coinfection of HPV-11 and HPV-16 in case of laryngeal squamous papillomas with severe dysplasia. *Laryngoscope* 1997; 107: 942-947.
- 17-Sarioğlu S, Kuyucuoğlu F, Özer E, Pabuççuoğlu. Assessment of human papilloma virus immunoreactivity in laryngeal squamous cell carcinomas. *Marmara Medical Journal* 1998; 11(1); 22-26.
- 18-Kambic V, Gale N. Significance of keratosis and dyskeratosis for classifying hyperplastic aberrations of laryngeal mucosa. *Am J Otolaryngol* 1986; 7; 323-333.
- 19-Sllamniku B, Bauer W, Painter C, Sessions D. The transformation of laryngeal keratosis into invasive carcinoma. *Am J Otolaryngol* 1989; 10: 42-54.
- 20-Crissman JD. Laryngeal keratosis preceding laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol* 1982; 108: 445-448.
- 21-Michaels L. The Kambic-Gale method of assesment of epithelial hyperplastic lesions of the larynx in comparison with the dysplasia grade method. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; 527: 17-20.
- 22-Hojslet P, Nielsen VM, Palvio D. Premalignant lesions of the larynx. 1989; 107: 150-155.
- 23-Stenersen T, Hoel S, Boysen M. Carcinoma in situ of the larynx: an evaluation of its natural clinical course. *Clin. Otolaryngol* 1991; 16: 358-363.
- 24-Resta L, Colucci GA, Troia M, Russo S. Laryngeal intraepithelial neoplasia (LIN) an analytical morphometric approach. *Path. Res. Pract.* 1992; 188: 517-523.
- 25-Shanmugaratnam K, Path FR, Sobin LH. The World Health Organization histological classification of tumours of the upper respiratory tract and ear. *Cancer* 1993; 71: 2689-2697.
- 26-Hellquist H, Cardesa A, Gale N, Kambic V. Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. A study members of the Working Group on Epithelial Hyperplastic Laryngeal Lesions of the European Society of Pathology. *Histopathology* 1999; 34: 226-233.
- 27-Roasi J. Ackerman's surgical pathology. Eighth ed. Mosby, New YORK 1996; 314-321.

- 28-Crissman JD, Gnepp DR, Goodman ML, Hellquist H. Preinvasive lesions of the upper aerodigestive tract: Histologic definitions and clinical implications. *Pathol Annu* 1987; 22(1): 311-352.
- 29-Vodovnik A, Gale N, Kambic V, Luzar B. Correlation of histomorphological criteria used in different classifications of epithelial hyperplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; 527: 116-119.
- 30-Cör A, Gale N, Kambic V. Quantitative pathology of laryngeal epithelial hyperplastic lesions. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; 527: 57-61.
- 31-Stenersen TC, Boysen M, Juhng S, Reith A. Quantitative histopathological evaluation of vocal cord dysplasia with particular emphasis on nuclear orientation. *Pat. Res. Pract.* 1992; 188: 524-530.
- 32-Sampedro A, Alvarez CA, Suarez c. Quantitative pathology of the intraepithelial laryngeal neoplasia. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 110: 185-194.
- 33-Krecicki T, Jelen M, Krecicka MZ. Immunohistochemically stained markers (p53, PCNA, bcl-2) in dysplastic lesions of the larynx. *Cancer Letters* 1991; 143: 23-28.
- 34-Bosatra A, Bussani R, Silvestri F. From epithelial dysplasia to squamous carcinoma in the head and neck region: An epidemiological assessment. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; 527: 47-48.
- 35-Cardesa A, Nadal A, Jares P. Hyperplastic lesions of the larynx. Experience of the Barcelona Group. *Acta Otolaryngol (Sotckh)* 1997; 527: 43-46.
- 36-Bracko M. Evaluation of DNA content in epithelial hyperplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; 527: 62-65.
- 37-Zidar N, Gale N, Kambic V. Expression of Ki-67 antigen and proliferative cell nuclear antigen in benign and malignant epithelial lesions of the larynx. *The Journal of Laryngology and Otology* 1996; 110: 440-445.
- 38-Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990; 17: 489-503.
- 39-Quinn CYM, Wright NA. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol* 1990; 160: 93-102.

- 40-Linden MD, Torres FX, Kubus J. Clinical application of morphologic and immunohistochemical assessments of cell proliferation Am J Clin Pathol 1992; 97(5): 4-13.
- 41-Kropveld A, Slootweg pj, Blakenstein MA. Ki-67 and p53 in T2 laryngeal cancer. The Laryngoscope 1998; 1008: 1548-1552.
- 42-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.
- 43-Silvestri F, Bussani R, Pavletic N. From epithelial dysplasia to squamous carcinoma of the head and neck region: Evaluative and prognostic histopathological markers. Acta Otolaryngol (Stockh) 1997; 527: 49-51.
- 44-Pignataro L, Capaccio P, Pruner G. The predictive value of p53, MDM-2, cyclin D1 and Ki-67 in the progression from low-grade dysplasia towards carcinoma of the larynx. The Journal of Laryngology and Otology 1998; 112: 455-459.
- 45-Beurden M, Craen AJM, Vet HCW. The contribution of MIB 1 in the accurate grading of vulvar intraepithelial neoplasia. J Clin Pathol 1999; 52: 820-824.
- 46- Pavelic ZP, Gluckman JL. The role of p53 tumor suppressor gene in human head and neck tumorigenesis. Acta Otolaryngol (Stockh) 1997; 527: 21-24.
- 47-Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to etiology and molecular pathogenesis. Cancer Research 1994; 54: 4855-4878.
- 48-Gorgoulis V, Rassidakis G, Karameris A. Expression of p53 protein in laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia: possible correlation with human papillomavirus infection and clinicopathological findings. Virchows Archiv 1994; 425: 481-489.
- 49-Brachman D. Molecular biology of head and neck cancer. Seminars in Oncology 1994; 21(3): 320-329.
- 50-Poljak M, Gale N, Kambic V. Overexpression of p53 protein in benign and malignant laryngeal epithelial lesions. Anticancer Research 1996; 16: 1947-1952.
- 51-Haerslev T, Jacobsen GK. An immunohistochemical study of p53 with correlations to histopathological parameter, c-erbB-2, proliferating cell nuclear antigen and prognosis. Hum Pathol 1995; 26: 295-301.

- 52-Hellquist H. Apoptosis in epithelial hyperplastic laryngeal lesions. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; 527: 25-29.
- 53-Gallo O, Franchi A, Chiarelli I. Potential biomarkers in predicting progression of epithelial hyperplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; 527: 30-38.
- 54-Gale N, Zidar N, Kambic V. Epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 and p53 overexpressions in epithelial hyperplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; 527: 105-110.
- 55-Munck-Wikland E, Edström S, Jungmark E. Nuclear DNA content, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53 immunostaining in predicting progression of laryngeal cancer in situ lesions. *Int. J. Cancer* 1994; 56: 95-99.
- 56-Weidner N. Tumor angiogenesis: Review of current applications in tumor prognostication. *Sem Diag Pathol* 1993; 10: 302-313.
- 57-Folkman J. Fighting cancer by attacking its blood supply. *Scientific American* 1996; 116-119.
- 58-Ravazoula P, Zolota V, Hatjicondi O. Assessment of angiogenesis in human cervical lesions. *Anticancer Research* 1996; 16: 3861-3864.
- 59-Campbell SC. Advances in angiogenesis research: Relevance to urological oncology. *J Urol* 1997; 158: 1663-1674.
- 60-Craft PS, Harris AL. Clinical prognostic significance of tumour angiogenesis. *Annals of Onc* 1994; 5: 305-311.
- 61-Traweek ST, Kandalaft P, Mehta P. The human hematopoietic progenitor cell antigen (CD34) in vascular neoplasia. *Am J Clin Pathol* 1991; 96: 25-31.
- 62-Cui S, Hano H, Sakata A. Enhanced CD34 expression of sinusoid-like vascular endothelial cells in hepatocellular carcinoma. *Pathology International* 1996; 46: 751-756.
- 63-Hemburg S, Oehler MK, Kristen P. The endothelial marker CD34 in the assessment of tumour vascularisation in ovarian cancer. *Anticancer Research* 1997; 17: 3149-3152.
- 64-Heimberg S, Oehler MK, Papadopoulos T. Prognostic relevance of the endothelial marker CD34 in ovarian cancer. *Anticancer Research* 1999; 19: 2527-2530.

- 65-Kurman RJ, Zairo RJ, Noms HJ. Precancerous lesions of the cervix. Blaustein's pathology of the female genital tract. Fourth ed. New York: Springer-Verlag, 1994: 229-277.
- 66-Michaels L. Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. *Histopathology* 1999; 35: 181-191.
- 67-Friedman I, Shah K, Salto-Tellez M. Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. *Histopathology* 1999; 35: 579.
- 68-Naggar A, Lai S, Luna MA. Sequential p53 mutation analysis of preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. *Int. J. Cancer* 1995; 64: 196-201.
- 69-Uhlman DL, Adams G, Knapp D. Immunohistochemical staining for markers of future neoplastic progression in the larynx. *Cancer Research* 1996; 56: 2199-2205.
- 70-Garzetti GG, Ciavattini A, Nictolis M. MIB 1 immunostaining in cervical intraepithelial neoplasia: Prognostic significance in mild and moderate lesions. *Gynecol Obstet Invest* 1996; 42: 261-266.
- 71-Shin DM, Kim J, Ro JY. Activation of p53 gene expression premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Research* 1994; 54: 321-326.
- 72-Dolcetti R, Doglioni C, Maestro R. p53 overexpression is an early event in the development of human squamous cell carcinoma of the larynx: Genetic and prognostic implications. *Int. J. Cancer* 1992; 52: 178-182.
- 73-Holm R, Skomedal H, Helland A. Immunohistochemical analysis of p53 protein overexpression in normal, premalignant and malignant tissues of the cervix uteri. *J. of Pathol* 1993; 169: 21-26.
- 74-Miyaguchi M, Olofsson J, Hellquist H. Immunohistochemical study of epidermal growth factor receptor in severe dysplasia and carcinoma in situ of the vocal cords. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1995; 527: 149-152.
- 75-Maiorano E, Botticella AM, Marzullo A. Expression of ER-D5 and EGFr in laryngeal carcinoma and premalignant epithelium. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; 527: 95-99.
- 76-Fouret P, Dabit D, Sibony M. Expression of p53 protein related to the presence of human papillomavirus infection in precancer lesions of the larynx. *Am J Pathol* 1995; 146(3): 599-604.

77-Karen S, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. Cancer Research 1994; 54: 800-804.

78-Chomette G, Auriol M, Tranbaloc P. Intraepithelial carcinoma of the uterin cervix and angiogenesis. Arc Anat Cytol Pathol 1989; 37: 73-79.

79-Sillman F, Boyce J, Fruchter R. The significance of atypical vessels and neovascularization in cervical neoplasia. Am J Obstet Gynecol 1981; 139: 154-159.

