



**EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

ANABİLİM DALI BAŞKANI: PROF. DR. TAYFUN KİRAZLI

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ÜMİT ULUÖZ

**PREMALİGN LARENGEAL LEZYONLARIN MALİGNİTE
POTANSİYELLERİNİN Kİ-67,P53 VE PHH-3 BELİRTEÇLER
İLE GÖSTERİLMESİ**

**DR. ALİ IŞIK
(UZMANLIK TEZİ)**

İZMİR-2015

ÖNSÖZ

Başta K.B.B Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Tayfun Kirazlı olmak üzere, tez çalışmam süresinde yakın ilgi ve samimiyeti ile bana destek olan tez hocam Sayın Prof. Dr. Ümit Uluöz'e, eğitimim ve yetkin yetiştirilmemde bilgi, birikimini benden esirgemeyen, deneyimlerini paylaşmaktan gurur duyduğum, tecrübelerini bana aktaran Sayın Prof. Dr. Atilla Yavuzer, Sayın Prof. Dr. Bülent Karcı, Sayın Prof. Dr. Fazıl Apaydın, Sayın Prof. Dr. Fatih Ögüt, Sayın Prof. Dr. Cem Bilgen, Sayın Prof. Dr. Raşit Midilli, Sayın Prof. Dr. Serdar Akyıldız, Sayın Yrd. Doç. Dr. Kerem Öztürk, Sayın Uz. Dr. Sercan Göde, Sayın Uz. Dr. İsa Kayave Sayın Prof. Dr. Murat Cem Miman'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Tez hazırlığım süresince patoloji preparat bulunması ve incelenmesinde her türlü desteğini esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı'dan Sayın Prof. Dr. Ali Veral'a teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalışma şansı elde ettiğim ve uyum için de başarılı bir şekilde çalıştığımız değerli asistan arkadaşlarım, hemşireler, hastane personelleri ve sekreter arkadaşlara teşekkürlerimi sunarım.

Tüm öğrencilik ve meslek hayatım boyunca her türlü desteğini üzerimden eksik etmeyen annem Hülya Işık, babam Taşkın Işık ve kardeşim Doğan Işık'a ayrıca teşekkür ederim.

İhtisas süresince desteğini her zaman hissettiğim sevgili nişanlım Merve Karakayaoğlu'na teşekkür ederim.

Dr. Ali Işık

İÇİNDEKİLER

Önsöz.....	I
İçindekiler.....	II
Şekiller Dizini.....	III
Tablolar Dizini	IV
Özet	V
Giriş	VI
Genel Bilgiler	1
Materyal-Metod	26
Bulgular	28
Tartışma	47
Resimler	54
Kaynaklar	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1: Yalancı çok katlı kolumnar epitel

Şekil -2: Çok katlı yassı epitel

Şekil -3: Larenksin mikroskobik anatomisinin görüntüsü

Şekil-4: Larenks iskeleti

Şekil-5 : Larenks kaslarının yukarıdan, önden ve arkadan görünümü

Şeki- 6: Larenks boşlukları ve bölümleri

Şekil-7: p53 genetik lokus

Şekil-8: p53 çalışma prensibi

Şekil-9: p53 büyüme durması ve apopitoz

Şekil-10 :Yaş

Şekil-11 : Malign progresyon gösteren patoloji tipleri

Şekil 12 : Malign progresyon göstermeyen patoloji tipleri

Şekil-13: Takip süresi

Şekil-14: Malign progresyon(Ay)

Şekil-15: Ki-67 boyanma yüzdesi

Şekil-16: Malign dönüşüm olan Ki-67 boyanması

Şekil-17: Malign dönüşüm olmayan Ki-67 boyanması

Şekil-18: p53 boyanma

Şekil-19: Malign dönüşüm olan p53 boyanması

Şekil-20: Malign dönüşüm olmayan p53 boyanması

Şekil-22: phh-3 boyanma

Şekil-23: Malign dönüşüm olan phh-3 boyanması

Şekil-24: Malign dönüşüm olmayan phh-3 boyanması

TABLolar DİZİNİ

Tablo-1: Cinsiyet

Tablo-2: Patoloji

Tablo-3: Yaş

Tablo-4: Malign progresyon olan ve olmayan

Tablo-5: Takip süresi

Tablo-6: Malign Progresyon Süresi

Tablo-7: Ki-67 boyanma

Tablo-8: Ki-67 malign progresyon olan ve olmayan

Tablo-9: p53 boyanma

Tablo-10: Malign progresyon olan ve olmayan p53 boyanma

Tablo-11: phh-3 boyanma

Tablo-12: Malign progresyon olan ve olmayan phh-3 boyanma

Tablo-13: Ki-67, p53 ve phh-3 istatistik

Tablo-14: Patoloji grupları ile malign transformasyon Ki-67, p53 ve phh-3 boyanma

ÖZET

Giriş: Larenks karsinomu baş boyun maligniteleri içinde sık görülen kanserlerdendir. Erken tanı ve tedavi ile iyi prognozlar elde edilebilmektedir. Normal larenks mukozasından malign progresyonun belli premalign lezyonlar üzerinden olduğu bilinmektedir. Bunlar lezyonlar Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırmasına göre skuamöz hiperplazi, hafif displazi (LIN-1), orta displazi (LIN-2) ve ağır displazi (LIN-3) olarak sınıflandırılmaktadır. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki premalign larengeal lezyonların displazi derecesi ile malign progresyon arasında net bir korelasyon bulunmamaktadır. Bu lezyonların hangisinin malign progresyon göstereceğini göstermek için histolojik kriterlere ek olarak yardımcı belirteçler kullanılması faydalı olabilir. Bu çalışmamızda Ki-67, p53 ve phh-3 belirteçlerinin malign progresyonu göstermede yardımcı olup olmayacağını araştırdık.

Materyal ve Metod: Eylül 2004- Eylül 2014 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları kliniğinde ses kısıklığı (disfoni) nedeniyle muayene edilen ve larenks mikroişirüjisi operasyonu uygulanan ve premalign larengeal lezyon saptanan 804 hasta bulunarak 5 yıllık takip sonucunda malign progresyon göstermeyen 20 ve malign progresyon gösteren 18 hasta çalışmaya dahil edildi. İmmünohistokimyasal boyanma p53, Ki67 ve PHH-3 primer antikorları kullanılarak boyandı. Olgular yaş, cinsiyet, patolojik tanı, takip süresi, maligniteye dönüşüm süresi, Ki-67 boyama yüzdesi, p53 boyanma yüzdesi ve phh-3 boyanma yüzdelere göre sınıflandırıldı.

Bulgular: Malign progresyon gösteren ve göstermeyen gruplar arasında Ki-67 ve p53 boyanma yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$). Malign progresyon gösteren grupta phh-3 boyanma yüzdesi istatistiksel olarak daha yüksek izlendi ($p<0,05$). Displazi derecesi ile malign progresyon arasında Ki-67, p53 ve phh-3 boyanma yüzdeleri arasında korelasyon izlenmedi ($p>0.05$).

Sonuç: Çalışmamızda phh-3 premalign larengeal lezyonların malignite potansiyelini göstermede uygun ve güvenilir bir belirteç olarak bulunmuştur. Ki-67 ve p53 boyanması ile malign progresyon arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır. Her 3 belirteç de displazi derecesi ile malign progresyonu göstermede yetersiz bulunmuştur.

GİRİŞ-AMAÇ

Larenks karsinomu baş boyun kanserleri içinde sık görünen, erken tanı ve tedavi ile daha iyi prognoz elde edilebilen maligniteleridir. Yapılan araştırmalar larenks karsinoma ilerleyişin premalign larengeal lezyonlar üzerinden olduğunu göstermektedir. Bu premalign larengeal lezyonları belirlemek için çeşitli sınıflandırma yöntemleri kullanılmaktadır. En sık kullanılan sınıflandırma yöntemi DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) sınıflandırmasıdır. Bu sınıflandırma skuamöz hiperplazi, LIN-1 (hafif displazi), LIN-2 (orta displazi) ve LIN-3 (ağır displazi) olarak sıralanmıştır.

Premalign larengeal lezyonların malign progresyonu tam olarak aydınlatılamamıştır. Sınıflandırma yöntemlerinin ana amacı malign progresyon ihtimali az olan lezyonlar ile fazla olan lezyonları ayırmaktır. Fakat displazi derece ile malign progresyon arasında net bir korelasyon saptanamamıştır.

Bu noktada displazik lezyonların malign potansiyellerinin gösterilebilmesi adına güvenilir belirteçler kullanılması faydalı olacaktır. Bu çalışmamızda amaç Ki-67, p53 ve p16 belirteçler ile premalign lezyonların malign potansiyellerinin gösterilmesidir.

GENEL BİLGİLER

LARENKS EMBRİYOLOJİSİ

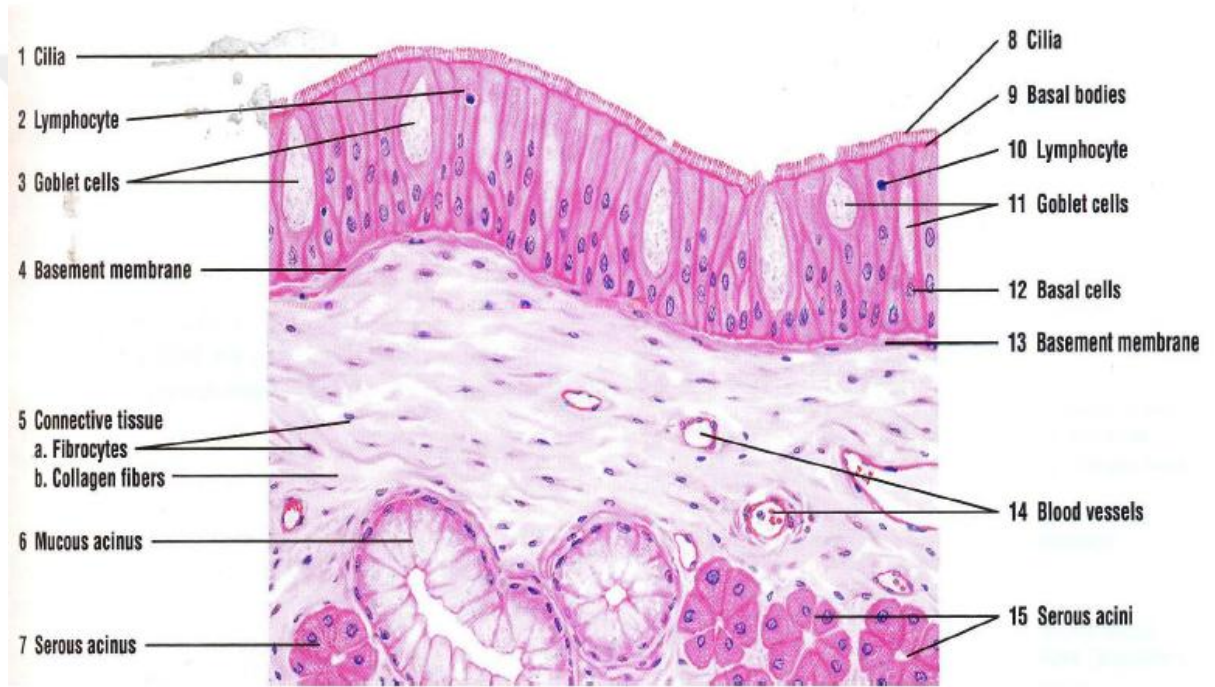
Larenks epiteli larengotrakeal t b n kranyal ucunun endoderminden gelişir. Larenksin kıkırdakları dördüncü ve altıncı brankial yay çiftlerindeki kıkırdaklardan gelişir. Larengeal kıkırdaklar nöral krista hücrelerinden köken alan mezenkimden gelişirler. Larengotrakeal t b n kranyal ucundaki mezenkim hızla çoğalarak aritenoid şişkinlik (tuber aritenoideum)  iftlerini meydana getirir. Dile doğru gelisen bu şişkinlikler yarık şeklindeki deliği (glottis primitiva - ilkel dil) T harfi biçimli larengeal girişe ve gelişmekte olan larengeal lümeni dar bir yarı a dönüştürür. Larengeal epitelin hızla çoğalması geçici olarak larengeal lümenin tıkanmasıyla sonuçlanır. Onuncu haftaya kadar larenks yeniden kanalize olur. Yeniden kanalize olma işlemi sırasında, larengeal ventriküller oluşur. Bu girintiler ses tellerini (plikavokalis) ve vestibüler katlantıları (plika vestibularis) oluşturan müköz membran katlantıları ile sınırlanır. Epiglot    nc  ve dördüncü farengeal yayların ventral ucunda mezenkim  o almasıyla meydana gelen hipobrankiyal kabartının kaudal kısmından gelişir. Bu kabartının rostral kısmı dilin orta 1/3 'l k kısmı olan farengeal kısmı oluşturunur. Larengeal kaslarfarengeal yayların dört ve altıncı çiftlerindeki myoblastlardan geliştiği için, bu yayları destekleyen nervus vagusun laringeal dalları ile innerve olurlar. Larenks ve epiglotun b y mesidogumdan sonraki ilk üç yılda hızlıdır. Bu zaman içinde epiglot yetişkin şeklini kazanır.

Embriyolojik olarak supraglottik bölge, üçüncü ve dördüncü brankiyal arklardan gelişir. Glottik ve subglottik bölgeler ise altıncı brankiyal arktan gelişir.

LARENKS HİSTOLOJİSİ

Epiglottisin lingual yüzeyi ve larengeal yüzeyin üst kısmı nonkeratinize çok katlı yassı epitel ile örtülüdür. Yassı epitel, epiglottisin inferior larengeal kısmında solunum tipi epitel ile birleşir. Epiglottisin inferior larengeal kısmında epitel altında ser -müköz bezler vardır. Solunum tipi epitel yalancı vokal kordları, ventrikülü ve subglottisi de örtmektedir. Gerçek vokal kordlar nonkeratinize çok katlı yassı epitel ile döşelidir (Sekil 3). Sigara i meyeneriskinlerin yarısında supraglottik ve subglottik bölgelerdeki silyalı solunum tipi epitelerasında yassı epitel adaları bulunmaktadır.

Sigara içenlerde ise larenksteki silyalı solunum tipi epitel sıklıkla tamamen yassı epitel ile yer değiştirebilmektedir.^{1,2,3} Larenksin solunum epiteli yalancı çok katlı silyalı kolumnar tiptedir. Kolumnar epitel nükleuslarındaki pozisyon farklılığı epitele psödostratifiye bir görünüm verir. Silyalı epitel 1-2 ile 8-10 hücre arasında değişen kalınlıklarda olabilir. Silyalı epitel yalancı vokal kordlar, ventrikül ve subglottiste bulunmaktadır. Kolumnar epitelin en alt kısmında küçük, yuvarlak hücrelerden oluşan bazal veya rezerv hücreler bulunur. Epitel altındaki lamina propriada çoğunluğu müköz olan mikst glandlar bulunur. Bu glandların boşaltıcı kanalları epitelyüzeye açılır. Ayrıca lamina propriada lenfoid nodüller mevcuttur. Ayrı olarak submukoza bulunmaz. (Şekil 1)

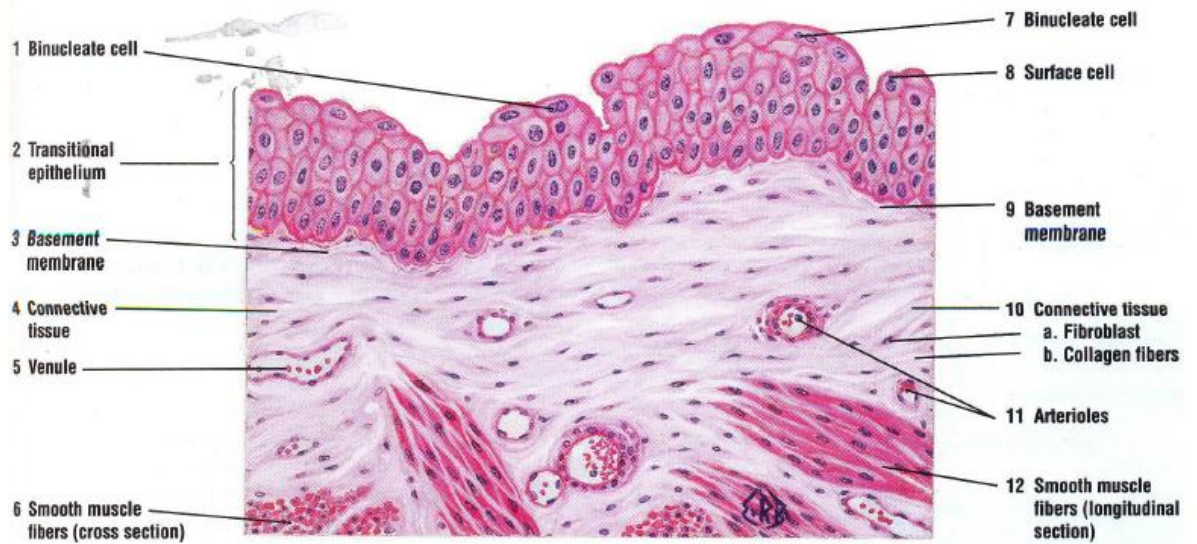


Şekil 1: Yalancı çok katlı kolumnar epitel (H&E)

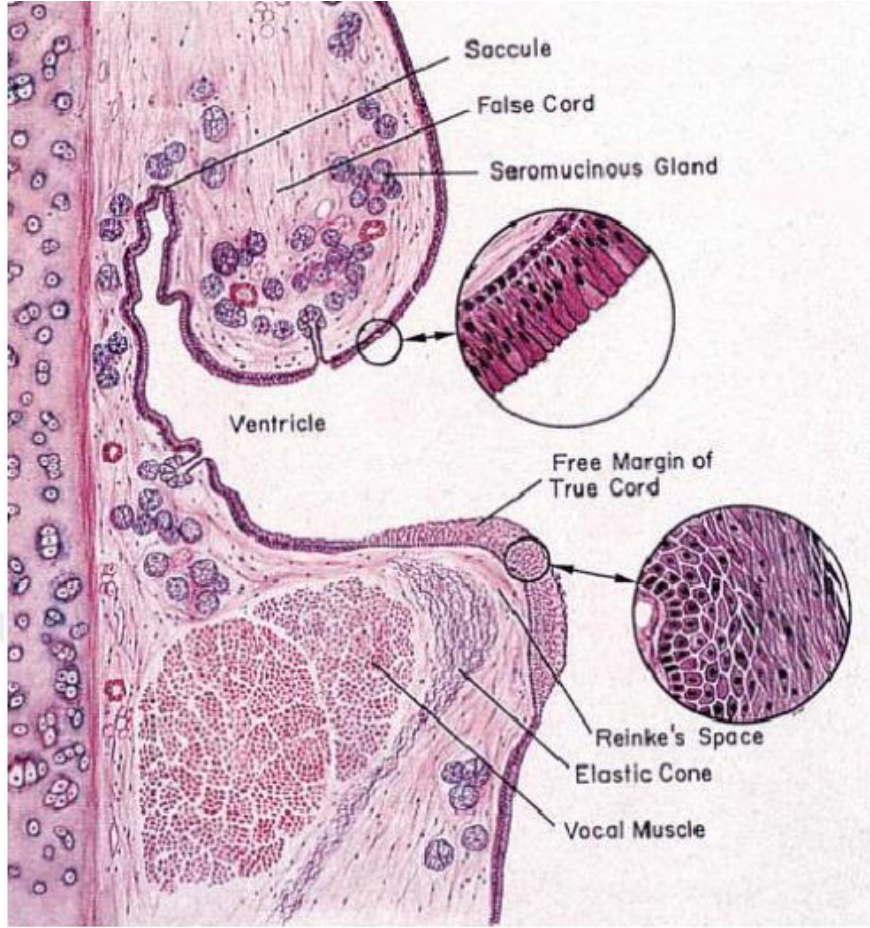
Larenksin çok katlı yassı epitelinde dar sitoplazmalı, ovoid nükleuslu, yüzeye dik şekilde dizilenim gösteren bir bazal tabaka vardır. Mitoz normalde bu tabakada sınırlıdır. Laringeal mukoza matürasyonunda skuamöz hücreler yüzeye doğru migrasyon gösterirler. Bu hücreler poligonal biçimli olup normokromatik nükleus vardır ve nükleolusları izlenebilir. Eozinofilik sitoplazma geniştir ve fiksasyon sırasında hafif hücre büzüşmesi 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.² Özellikle siyah ırktabazal tabakada dentritik melanositler görülebilir.^{2,3} Yüzeye doğru ilerledikçe yassı epitel nükleusları büyür, daha sferik bir hal alır ve veziküler kromatine sahiptir. Larenksin yassıepiteli 5 ila 25 hücre arasında değişen kalınlıklarda olabilir. Larenkste normalde parakeratozisyoktur ancak sigara gibi iritanlara maruziyet parakeratozis odaklarına neden olabilir.

Çok katlı yassı epitel yüzeyi altındaki lamina propria incedir ve glandlar, lenfoid doku ve kan damarlarından yoksun yoğun bir bağ dokusu mevcuttur. Lamina propria altında vocal ligamenti oluşturan iri demetler halindeki paralel elastik lifler ve bu liflere paralel olarak vokal kordların gerilimini düzenleyen iskelet kası demetlerinden oluşan vokal kaslar bulunur. (Şekil 2)



Şekil 2: Çok katlı yassı epitel (H&E)



Şekil 3: Larenksin mikroskopik anatomisinin görüntüsü

Yalancı vokal kordlarda serömüsinöz glandlar ve silyalı kolumnar epitel yapısı gözükmemektedir. Vokal kas, elastik lif ve Reinke boşluğunu içeren gerçek vokal kordda ise çok katlı yassı epitel gözlenmektedir.⁴

Reinke mesafesi gerçek vokal kordların lamina propriası için kullanılan bir terim olup yassı epitel tabanı ile vokal ligament arasında kalan alandır. Bu alan kapiller ve lenfatiklerden fakirdir. ^{1,2,3,4}

Larenksin çoğu yerinde serömüsinöz glandlar bulunur ve bunlar duktuslar vasıtasıyla yüzey epiteli ile ilişkilidir. Duktuslar kolumnar epitel, skuamoz epitel veya her iki tipte epitel ile döşeli olabilir. Bu duktuslardaki epitelde bazal hücre hiperplazisi ya da displazi mevcutsa, tanjansiyenel kesitlerde derin yassı epitel adaları invaziv karsinom ile karışabilir. Glandlar yaşlı bireylerde onkositik metaplazi gösterebilir.^{2,3}

Histopatolojik Terminoloji:

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

Metaplazi: Metaplazi geri dönüşümlü olarak yetişkin bir hücre tipinin yerini diğer bir yetişkin hücre tipinin almasıdır.

Hiperplazi: Hücre sayısının artması ile paralel giden mukoza epiteli kalınlaşmasıdır. Sitolojik atipi eşlik edebilir veya etmeyebilir. Enfeksiyonlarda ve reaktif olaylarda izlenebilir.

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

Keratozis: Mukoza epiteli yüzeyindeki dikensi hücrelerin sitoplazmasında keratohyalin granüllerinin oluşmasıdır.

Parakeratozis: Mukoza epiteli yüzeyindeki keratin tabakasının içinde nukleuslar da varsa parakeratozis adını alır. Larenkste hiperkeratoz sigara içimiyle ilişkilidir ve kord vokallerde izlenir. Klinik olarak, alttaki stromada artmış belirgin vaskülarite ile birlikte mukoza beyaz, kalınlaşmış görünümündedir.

Diskeratozis: Epitel hücrelerin anormal keratinizasyonudur. İzole hücrelerdeki premature keratinizasyondur. 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.

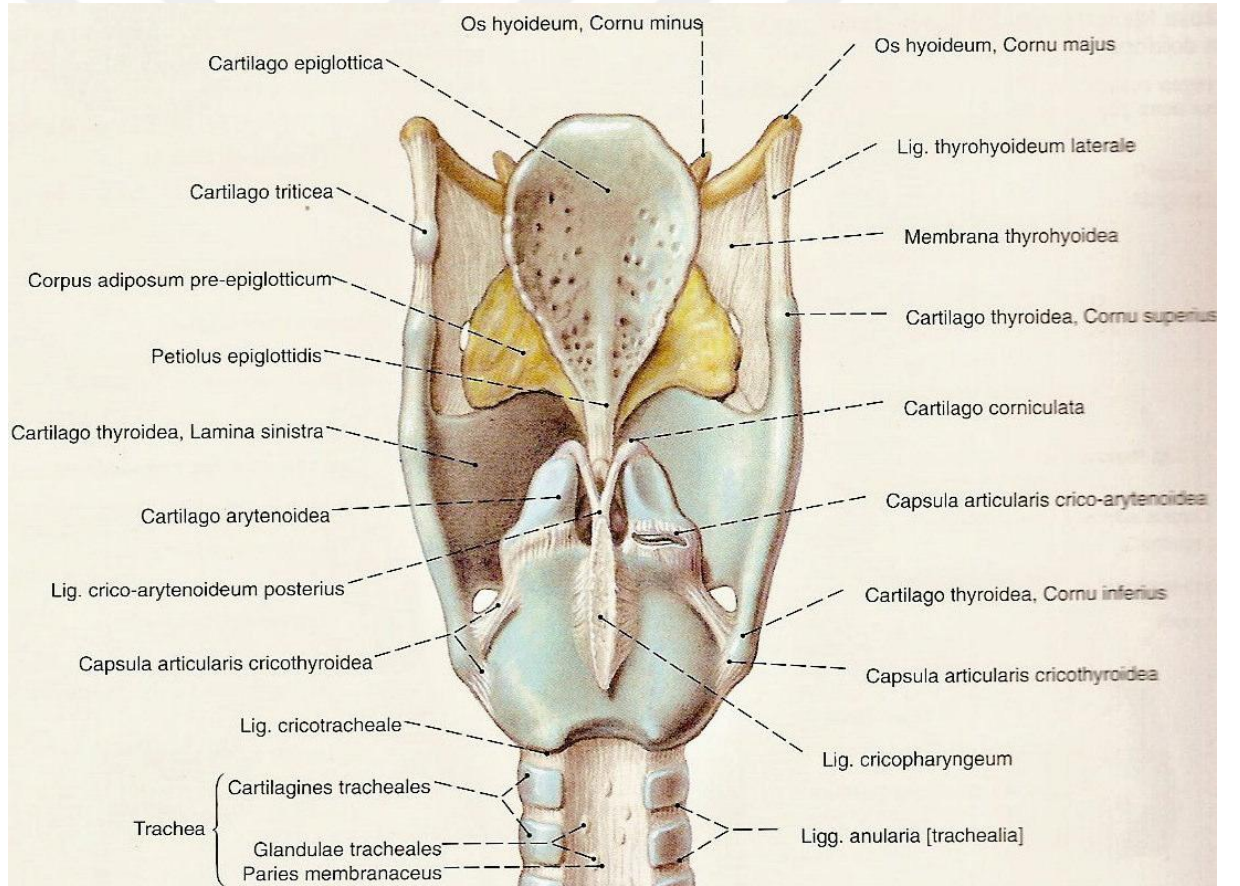
Displazi: Hücre morfolojisinde malignite yönünde değişimi yansıtan görünüm (atipi) ve anormal hücre maturasyonunu yansıtır. Müköz membranlardaki beyaz lezyonları tanımlayan "lökoplaki" ve kırmızı lezyonları belirleyen "eritroplaki" terimleri klinik terimler olup, yukarıda tanımlanan mikroskopik terimlerle 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.⁴

LARENKS ANATOMİSİ

Larenks, boyunun ön kısmında, orta hatta kıkırdak iskeletten oluşan, çevresine ligamentler ve membranlar ile asılı, mobil, boşlukları mukoza ile örtülü, iç kaslarının çalışması ile öncelikli olarak alt solunum yollarının korunması, solunum ve fonasyon görevlerini üstlenen bir organdır. Yetişkinlerde 3. ve 6. servikal vertebra, çocuklarda 1. ve 4. servikalvertebralar arasında yer alır.⁵

LARENGEAL İSKELET

Larengeal iskelet tiroid, krikoid ve epiglot kıkırdaklardan oluşur. Fonksiyonel önemi çok fazla olan bir çift aritenoid kıkırdaktan başka üç çift küneiform (Wrisberg), kornikulat (Santorini) ve sesamoid kıkırdaklar da aksesuar kıkırdaklar olarak yapıda yer alır.⁵ (Şekil 4)



Şekil4: Larenks iskeleti

Tiroid Kıkırdak

Hyalin yapıda olan tiroid kıkırdak larenksin en büyük kıkırdağıdır. Kalkan şeklinde olup, 25 yaşında kemikleşmeye baslar, 65 yaşında tamamen kemikleşmiş olabilir. İki adetkanattan (ala-lamina) oluşur. Alalar, ortada birleşmiş olup, arkada açıktır. Erkeklerde alalaradem elması denilen larengeal çıkıntıyı olusturacak şekilde 90 derece açıyla birleşmiştir.Kadınlarda bu çıkıntı 120 derecelik açıyla birleşme nedeni ile yoktur. Ala laminaların arkakenarlarında üst ve alt kornular yer alır. Uzun olan süperior kornu lateral tirohiyoid ligamentvasıtası ile hiyoid kemiğin büyük boynuzu ile bağlantılıdır. Kısa olan alt kornular, krikoidinposterolateral yüzüyle krikotiroid eklemi yapar. Bu eklem sinoviyal yapıda olup krikoid kıkırdağın rotasyonunu sağlar. Bu rotasyon vokal kordlar üzerine uygulanan gerginliği değiştirir. Laminaların lateral yüzünde, tirohiyoid, sternotiroid ve inferior konstriktör kasların yapıştığı *Linea obliqua* adı verilen bir çizgi vardır.⁶

Tiroid kıkırdağın iç ve dış yüzü, perikondrium ile örtülüdür. Kıkırdağın iç yüzeyi oldukça düzdür. İç yüzde tiroid notch ile alt kenar arasındaki mesafenin, yaklaşık olarak ortasına denk gelen yerde küçük bir kabartı vardır. Buraya ön komissür tendonu (*Broyle'sligamenti*) yapışır. Tiroid kıkırdağın üst kenarına tirohiyoid membran, alt kenarına krikotiroidmembran ve ligament yapışır. Bu ligament kan damarları, lenfatik damarlar içerir ve larengeal kanserlerin yayılmasında önemli bir bariyerdir.⁷

Krikoid Kıkırdak

Halka şeklindedir. Hyalin yapıda ve kalındır. Hava yolunu tamamen çevreleyen tekdestek yapı olup, fonksiyonel larenks için major koruyucu rol üstlenir. Mühür yüzüğü şeklinde olup, öndeki arkı 3 mm yüksekliğinde iken orta laminası 20-30 mm civarındadır. Üstyüzeyinde aritenoid kıkırdakla eklem yapan iki eklem yüzeyi vardır. Krikoaritenoid eklem sinoviyal eklemidir. Dışa ve içe rotasyon hareketleri yapar. Kıkırdağın her iki arka yanyüzlerinde, inferior tiroid kornularıyla eklem yapan yüzey mevcuttur. Bu eklem rotasyon hareketi yaparak, krikoid ve tiroid kıkırdakların aralarında mesafenin azalıp artmasına ve ses tellerinin gerilip gevşemesine neden olur. Laminanın arka yüzeyinde, özofagusun longitudinal liflerinin yapıştığı bir çıkıntı vardır. Arkus alt kenar, yanlarda krikotrakeal ligament vasıtasıyla 1. trakeal halkayla birleşir.⁶

Epiglot

Yaprak seklinde, fibroelastik kıkırdaktır. Alt ucu tiroepiglottik ligament ile tiroid kıkırdak iç yüzüne, incisura tiroideanın hemen altına tutunur. Bu kısmına petiolus denir. Yankenarları ariepiglottik kıvrım ile aritenoid kıkırdağa ve ön yüzü hiyoepiglottik ligament ilehiyoid kemiğe tutunur. Epiglotun üst kenarını döşeyen mukoza ile dil kökü mukozası arasında lateral ve median glossoepiglottik plikalar bulunur. Bu plikalar arasında oluşan çukurluğa vallekula denir. Epiglotun hiyoid kemik üzerindeki serbest bölümüne suprahıyoid kısım denir. Bu kısımdaki lingual ve larengeal yüzeyi mukoza ile örtülüdür. İnfrahıyoid kısmın ise serbest yüzeyi yoktur ve epiglotun bu kısmı preepiglottik boşluğun posterior sınırını oluşturur. Epiglot kıkırdağın yüzeyinde çok sayıda mukus glandlarla dolu delik bulunmaktadır. Bunlar kanserin epiglot yüzeyinde yayılımına izin verir. Fonksiyonu esas olarak yutulan materyelinlarengeal boşluğa kaçmasını engellemektir. Yutma sırasında larenks anterosuperiora kalkar.Bu hareket epiglotu dil köküne doğru iter ve posteriora doğru yer değiştirmesini sağlar.⁸

Aritenoid Kıkırdaklar

Posterior krikoid laminanın superior yüzünde yerleşmiş, çift kıkırdakların en büyüğüve larenksin en hareketli ve en fonksiyonel kıkırdaklarıdır. Hyalin yapıdadır. Tepesi yukarıda,tabanı aşağıda piramid şeklindedir. Krikoid kıkırdağın posterior arkının superior yüzündekifasetlerle eklemleşir. Aritenoidin tabanı eklem yüzünü oluşturduğu gibi musküler ve vocal çıkıntıları da içerir. Lateralde taban, genişçe musküler çıkıntıyı anteriorde ise daha ince olanvokal çıkıntıyı oluşturur. Anterolateral yüzey vestibüler ligamenti ve bunun yanında tiroaritenoid ve vokal kasları alır. Arka yüzeyde kas yapışma yerleri mevcutken yan yüzde ise belirgin posterior krikoartenoid ligament bağlanır. Medial yüzeyi sadece perikondrium ile kaplıdır. Bu kıkırdakların hareketi ve vokal kordlarla ilişkisi larenksin kompleks fonksiyonunu sağlar.⁶

Kornikulat kıkırdaklar (Santorini kıkırdağı)

İki adettir. Aritenoid kıkırdağın apeksi ile eklem yaparlar.⁷

Kuneiform kıkırdaklar (Wrisberg kıkırdağı)

Ariepiglottik kıvrım içinde bulunur ve pasif destek sağlarlar.⁷

LARENKSİN LİGAMENT VE MEMBRANLARI

Larenksin Ligamentleri

Tiroepiglottik ligament: Epiglotu tiroid kıkırdağa bağlar.

Hiyoepiglottik ligament: Hiyoid kemiğin posterior yüzeyi ile epiglotun lingual yüzü arasındadır.

Stylohyoid ligament: Temporalkemik tabanından hiyoidin küçük kornusuna uzanır.

Faringoepiglottik ligament: Farenksin yan duvarlarıyla epiglot arasında bulunan plikanın içerisinde yer alır ve üzeri mukozayla örtülüdür.

Ventriküler ligament: Aritenoid kıkırdaktan anterolateral yüzüyle Broyles tendonunun arasında yer alarak, ventriküler bandın serbest kenarını meydana getirir.

Krikotrakeal ligament: Krikoid alt kenarından trakeanın birinci halkasının üst kenarına ulaşır.⁷

Larenksin Membranları

Tirohiyoid membran

İnferiorda tiroid kıkırdağın üst kenarına ve üst kornunun ön yüzüne, süperiorda ise hiyoid kemiğin korpusuna ve büyük boynuzuna yapışır. Membranın medialindeki kalınlaşmış bölümüne median tirohiyoid ligament denir. Her iki tarafta lateralde, tiroid üst kornusunun yaklaşık 1 cm önünde ve yukarısında superior larengeal damarlar, superior larengeal sinirinin internal dalı ve supraglottik lenfatik pedikül mevcuttur.⁷

Kuadrangüler membran

Epiglotun lateralinden aritenoide uzanır. Supraglottik larenksi paraglottik alandan ayırır. Üstte ariepiglottik plika, altta ventriküler ligament yaparak sonlanır. Membranın superior kısmı serbesttir ve epiglot üst kısmında kornikulat kıkırdağa kadar oblik bir seyir gösterir. İnferior kısmı epiglotun tiroid kıkırdağıyla bağlantısının iç noktasından aritenoid kıkırdağın vocal prosesine kadar uzanır. Superior ve inferior sınırları ise serbesttir.⁸ Üst ve alt serbest kenarları kalınlaşarak ligament halini alır:

- Arieplottik fold
- Vestibüler fold

Konus elastikus (Triangüler Membran)

Larenks alt parçasının elastik membranıdır. Krikoid kıkırdak üst kenarından, öndetiroid kıkırdak alt kenarına, arkada ise aritenoid kıkırdağın vokal çıkıntısına uzanır. Kenarları serbesttir, medial ve lateral yüzleri kalınlaşıp vokal ligamenti oluşturur.

- Median krikotiroid ligament: Konus elastikus kalın ön parçası tarafından yapılır.
- Vokal ligament: Vokal kord iskeletini yapar. Konus elastikusun serbest, güçlü olan üst kenarınca oluşturulur.⁸

LARENKS KASLARI

A) Ekstresek Kaslar

Ekstresek larenks kasları bir bütün olarak larenksin hareketini ve fiksasyonunu sağlarlar. Ekstresek kaslar fonksiyonel yönden elevatör ve depresör olmak üzere iki gruba ayrılırlar. (Şekil 5-6)

1. Elevatörler: M. Geniohyoideus, M. Digastricus, M. Mylohyoideus, M. Stylohyoideus.

Larenksi yutma sırasında yukarı çeken bu kaslar epiglotun kapanmasını sağlarlar.⁵, 7. ve 9. sinirler tarafından innerve edilirler.

2. Depresörler: M. Sternohyoideus, M. Thyrohyoideus, M. Omohyoideus, M. Sternothyroideus.

İnfracrioid dışı larenks kasları inspirasyonda larenksi aşağı çekerken bir miktar da vokal kordları gererler. Asıl tutunma yerleri larenks dışındadır ve hepsi ansa hipoglossi tarafından innerve edilirler.⁷

B) İntrensek Kaslar

Anatomik olarak larenksin içine sınırlandırılmış kaslardır. Glottik açıklığının boyutlarıyla birlikte vokal kıvrımların uzunluk ve gerginliğini ayarlarlar. Multipl adduktör vetek bir adet abduktörden ibarettirler. İnteraritenoid hariç ikiyeş adettirler ve eş zamanlı hareket ederler.⁶

Krikotiroid kas

Larengeal kıkırdakların dış yüzeyine yerleşmiştir. Krikoid kıkırdağın dış yüzünden başlayan lifler iki demete ayrılarak krikoid ve tiroid kıkırdaklar arasını doldurur. Oblik olarak seyreden medial kısım, krikoid ark anterolateral kenarından oblik şeklinde yukarı ilerleyerek inferior kornunun ön kısmına yapışır. Bu kısım krikoid laminasını geriye doğru çekerek, üzerinde bulunan aritenoidin geriye doğru gitmesini sağlar ve vokal kordu uzatarak gerer. Pars recta olarak adlandırılan ikinci kısım, krikoid arkı lateral kısımdan tiroid kıkırdağın alt kenarının posterioruna doğru uzanarak, superior ve laterale yönelir.⁶

Posterior krikoaritenoid kas

Krikoid kıkırdağın laminasının bütün arka yüzeyine tutunarak başlar, yukarı ve laterale yönelen lifleri, aritenoid kıkırdağın muskuler kısmına tutunmak üzere bir araya gelir. Üst lifler horizontal, orta lifler oblik ve alt lifler vertikaldir. Kasılmayla aritenoid kıkırdaklar laterale döndürülerek, vokal kordların abduksiyonunu sağlar.⁷

Lateral krikoaritenoid kas

Posterior krikoaritenoidin ana antagonistidir. Krikoid arkusunun dış yüzü ve üst kenarından ve konus elastikustan başlayıp yukarı arkaya ilerleyerek aritenoidin muskuler çıkıntısının önyüzüne yapışır. Kontraksiyonu ile muskuler çıkıntı ön ve laterale çekilir. Böylece kord ortayaklaşır.⁷

İnteraritenoid kas

İntrinsik kaslar içinde tek olarak bulunan tek kastır. Her iki aritenoid kıkırdağın posterioryüzeyi arasında olup transvers ve oblik lifleri vardır. Oblik parça larenks aditusunu daraltırken, transvers parça rima glottisi daraltmaya yardım eder. Aynı zamanda kord vokallere adduksiyon yaptırır. Bu kas rekürren larengeal sinirle bilateral olarak innerve edilir. Aynı zamanda, superior larengeal sinirden de motor dallar alır.⁷

Tiroaritenoid kas

Tiroid kıkırdak ve konus elastikusun iç yüzeyinden çıkarlar ve arkaya dışa ve biraz yukarı doğru ilerleyerek iki parçaya ayrılırlar.

1. *M. vocalis veya thyroarytenoideus internus*: Konus elastikusun serbest kenarına ve vokal çıkıntısının lateraline yapışır.

2. *M. thyroaritenoides externus*: Vokal çıkıntı ile krikoaritenoid kas arasına yapışır. İçliflerin dışında olarak, ventrikülün dış duvarı boyunca uzanarak aritenoid yapışır. Bu kasın bazı lifleri yukarı doğru ilerleyerek ariepiglottik plikaya ilerler ve epiglotun yan kenarına yapışırlar. Bu lifler *tiroepiglottik kas* adını alırlar. Tiroaritenoid kas, aritenoidi ileri çekip mediale döndürür. Krikotiroid ve posterior krikoaritenoid kasın antagonistidir. Ventrikülerbandları da transvers aritenoid ile birlikte birbirine yaklaştırarak sfinkter görevi sağlar. Bu kas vokal kordlara adduksiyon yaptırır. Vokal kordun serbest kenarının gerilimi ve kalınlığını değiştirir. Bu glottik sfinkter aritenoidi ileri çekerek vokal ligamenti gerip vokal kord kalınlığını artırır. Fonasyon için en önemli kasdır.⁷

Larenksin intrinsek kasları fonksiyonel olarak şöyle sınıflandırılır;

A. Adduktor kas

M. Cricoarytenoideus posterior (N. Laryngeus recurrens)

B. Abduktör kaslar

M. Cricoarytenoideus lateralis (N. Laryngeus recurrens)

M. İnterarytenoideusun transvers parçası (N. Laryngeus recurrens)

M. Thyroarytenoideus (N. Laryngeus recurrens)

C. Tensor kaslar

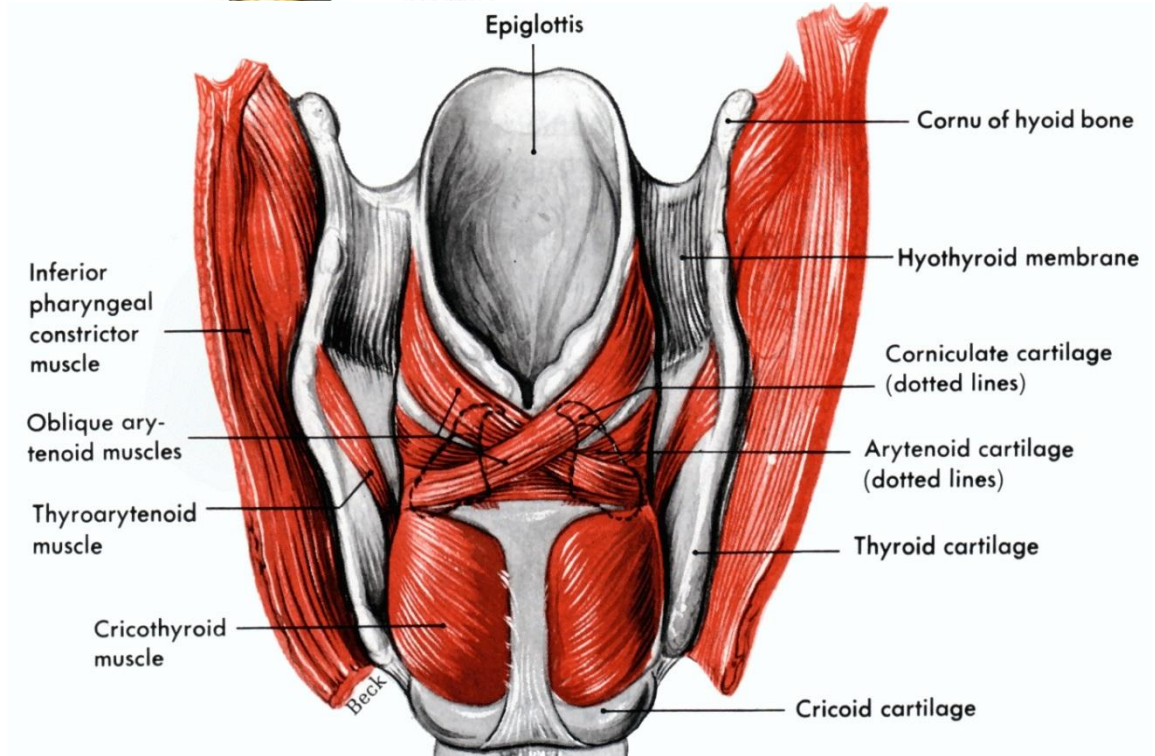
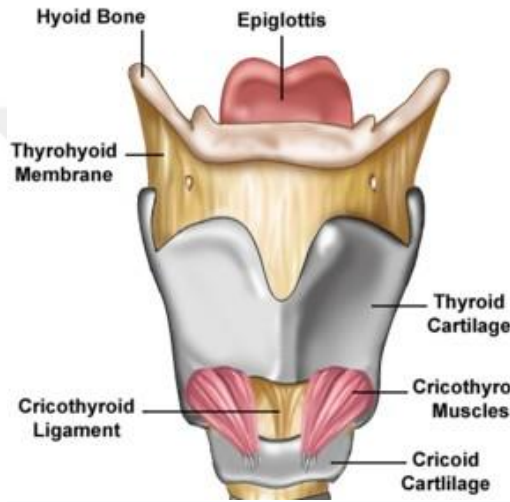
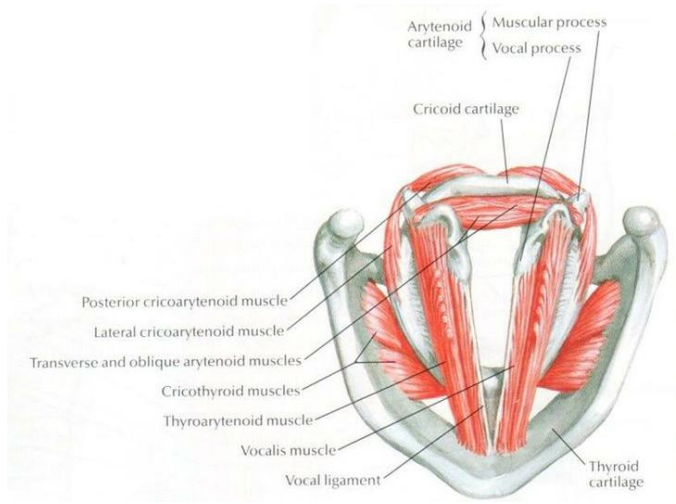
M. Cricothyroideus (N. Laryngeus superiorun ekstrensek dalı)

M. Thyroarytenoideus (N. Laryngeus recurrens)

D. Konstriktör kaslar

M. İnterarytenoideusun oblik parçası (N. Laryngeus recurrens)

M. Aryepiglotticus (N. Laryngeus recurrens)



Şekil 5 : Larenks kaslarının yukarıdan, önden ve arkadan görünümü

LARENKSİN POTANSİYEL BOŞLUKLARI

Reinke Boşluğu

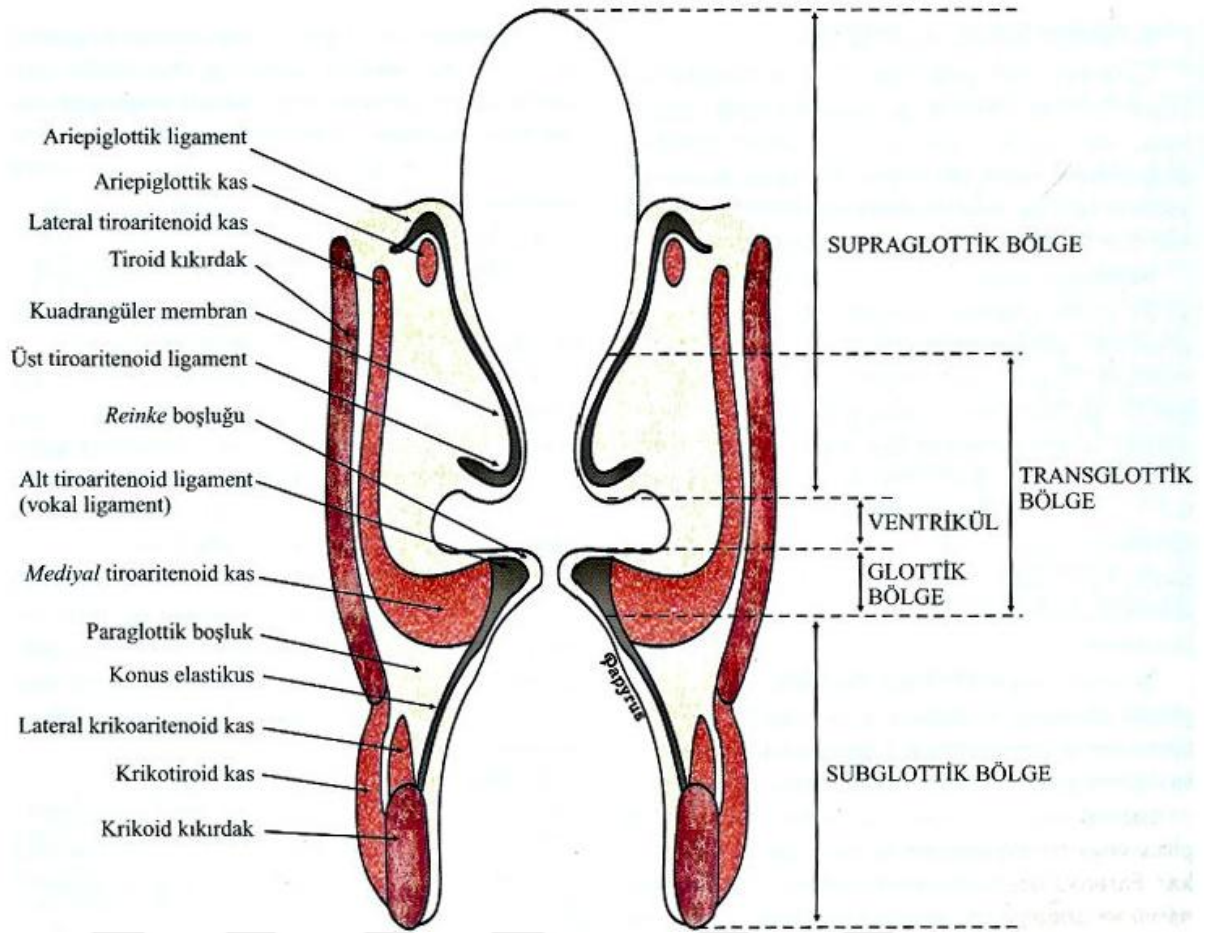
Vokal kord mukozasının altında bulunan, fibröz yapılardan zayıf subepitelyal konnektif doku tabakasıdır. Kordun serbest kenarından 2 mm uzaklıktadır.

Preepiglottik Boşluk

Bu boşluğun sınırlarını; yukarıda vallekula mukozası ve hiyoepiglottik ligament,arkada epiglot ve tiroepiglottik ligament, önde tirohiyoid membran ve tiroid laminanın iç yüzüoluşturur. Yanlarda paraglottik mesafeyle ilişkidir. Bu alandaki tümörler, supraglottik veparaglottik mesafeye yayılmaya meyillidir.

Paraglottik Boşluk

Ventrikül lateralindeki boşluktur. Dışta tiroid laminalar, inferomedialde konus elastikus, medialde larengeal ventrikül, süperomedialde ise kuadrangüler membran ile sınırlıdır. Bu boşluk önde, preepiglottik boşluk ile bağlantı kurar. Paraglottik boşluğun arkaduvanı sinüs piriformis mukozası ile kaplıdır.⁹



Şekil 6: Larenks boşlukları ve bölümleri

LARENKSİN İNTERNAL ANATOMİSİ

Larenks iki müköz membranla (yalancı ve gerçek vokal kordlarla) üç kompartmana ayrılır. Vestibül, ventrikül ve subglottik boşluklar.

Vestibül

Anteriorda epiglot posterior yüzü, posteriorda aritenoid kıkırdaklar arasındaki internalve lateralde arieplottik foldların iç yüzü ve yalancı kordların üst sınırı tarafından sınırlanır.

Ventrikül (Sinüs Morgagni)

Yalancı ve gerçek vokal kordlar arasındaki çıkmazdır. Ventrikülün anterior bitimindelarengeal sakkül olarak bilinen divertikulum bulunur. Hilton sakkülü mukus glandlarla örtülüdür, bu da vokal kordların ıslaklığını ve kayganlığını sağlar.

Subglottik Boşluk (İnfraglottik Kavite)

Glottisten krikoid kıkırdagın inferioruna doğru uzanır. Lateralde sınırı konus elastikusla ve krikoid kıkırdak duvarıyla sınırlandırılmıştır.

Rima Glottis

Gerçek vokal kordların serbest kenarları arasındaki boşluktur. Vokal kordlar respirasyon sırasında abduksiyundayken triangüler şekildedir. Fonasyonda ise yarık halinegeçer. Posterior glottik açıklık yetişkinlerde 18-19 mm, yenidoğanlarda ise 4 mm'dir. Total glottik açıklık yenidoğanlarda 14 mm'dir.

Yalancı Kordlar (Ventriküler Bantlar)

Larengeal kavitede her iki horizontal foldun üst sınırındır. Tiroid kıkırdak açısındananteroposterior olarak aritenoid kıkırdaga uzanır. Primitif kasılma fonksiyonuna sahiptir.⁸

Gerçek Kordlar (Vokal Kordlar)

Vokal kord aritenoidin vokal prosesi ile ön komissür arasındaki yapı olarak kabul edilir. Vokal kıvrımlar ve rima glottis adı verilen, kıvrımlar arasındaki boşluk glottis oluşturur. Glottis, vokal çıkıntıların uçlarından geçen horizontal çizgi ile belirlenir. Bu hayaliçizgi glottisi intermembranöz ve interkartilajinöz bölümlere ayırır. Bu bölümlerin ön arka uzunlukları oranları 3:2 şeklinde intermembranöz kısım lehine iken, yüzey alanlarında 2:3 şeklindedir. İnterkartilajinöz parça daha geniştir. Bazıları bu alana rimanın respiratuar bölümüderler. Vokal kıvrımların membranöz ya da vibratuar kısımları 3 adet belirgin yapısaltabakaya sahiptir: Yüzeyden derine doğru sırasıyla epitel, lamina propria, vokalis kası. Butabakalar gövde örtü konseptine göre bölümlenebilir. Yüzey döşemesi örtücü epitel ve laminaproprianın jelatinöz tabakalarından oluşur. Gövde ise vokalis kasından ibarettir. Bunların arasında lamina proprianın intermediate (elastik) ve derin (kollajenöz) tabakalarından oluşanbir geçiş bölgesi mevcuttur. Bu konseptte göre vokal kıvrımlar yüzeyden gövdeye doğru giderek artan sertliğe sahip çok tabakalı bir vibratör olurlar. Dolayısıyla yüzey örtüsü vocal kıvrımların vibratuar aktivitesinin çoğundan sorumludur. Vokal kıvrımların ön ve ortauçlarında sırasıyla birer anterior ve posterior makula flava mevcuttur.Temelde laminaproprianın elastik tabakasının kalınlaşmasından ibarettir.Bunların vokal kıvrım uçbölümlerinin vibratuar hasardan koruyan yastıklar şeklinde fonksiyon gördükleri düşünülmektedir. Benzer gövde örtü

konseptini daha homojenöz yapıdaki lamina proprienedeni ile çocuk larenksine uyarlamak mümkün değildir. Ergenliğin sonuna kadar laminanın erişkin formuna matürasyonu tamamlanamaz.⁶

Piriform Sinüs

Piriform sinüs, medialde ariepiglottik kıvrım, aritenoid ve krikoid üst kısmı ile lateralde isetirohiyoid membran ve tiroid lamina iç yüzeyi ile oluşan bir oluktur. Superiorda lateralglossoepiglottik kıvrımdan başlar. İnferiorda sinüs apeksi krikoid üst kenar seviyesindeözofagus girişi ile iştiraklenir.⁸

LARENKSİN BÖLÜMLERİ

1. **Supraglottis:** Epiglot tipinden ventrikül tabanında respiratuar ve skuamöz epitelinbirleşme yerine kadar uzanır. Pratik olarak inferior sınır ventrikülün tabanının ve lateralduvarının birleşme yeridir.

2. **Glottis:** Anterior komissür, gerçek vokal kord ve posterior komissür ile sınırlıdır.Vokal kordlar posterior sınırdaki karşılaşmazlar. Gerçek posterior sınır, aritenoid kıkırdaklar vekrikoid laminanın superior sınırındır.

3. **Subglottis:** Skuamöz ve respiratuar epitelin gerçek vokal kordların birleşimyerinden, krikoid kıkırdak alt sınırına uzanır. Üst sınırı gerçek vokal kordların serbestkenarının 5 mm aşağısı olarak kabul edilir.⁸

LARENKSİN DAMARLANMASI

Arteriyel Dolaşım

Larenksin arteriyel beslenmesi superior ve inferior larengeal arterlerden oluşur.Superior tiroid arterin dalı olan superior larengeal arter, larenkse girmeden önceinfrahioid ve krikotiroid olmak üzere iki dala ayrılır. Superior larengeal arter karotistenayrıldıktan sonra tirohiyoid membranın arka bölümünü superior larengeal sinirle beraberhorizontal olarak çaprazlar. Arter tirohiyoid membranı delerek, lateral duvarın ve piriformsinüsün tabanında submukozal olarak aşağı ilerleyerek, larenks

mukoza ve kaslarına dağılır. Süperior tiroid arter ayrıca tiroid kartilaj altında horizontal olarak seyreden krikotiroid dalıdır.

Inferior larengeal arter, inferior tiroid arterin bir dalıdır. Bu arter subklavian arterin tiroservikal trunkusunun dalıdır. Arter, tiroid lobu alt kenar hizasında önde rekürren sinir, arkada inferior tiroid arterin terminal dalları arasındadır. Inferior tiroid arter, inferior larengealsinirle birlikte krikotiroid eklemin gerisinde, inferior konstrüktör kasın alt kenarının posteriorundaki *Killian-Jamieson* bölgesindeki aralıktan larenkse girer.⁷

Venöz Dolasım

Larenksin venöz damarları superior ve inferior larengeal venlerdir. Arterlere paralel seyrederek. Superior ve inferior tiroid venlere açılırlar. Bunlar da intenal juguler veneboşalırlar.⁷

Lenfatik Dolasım

Larenkste lenfatik kanallar yüzeysel (intramukozal) ve derin (submukozal) olarakseyrederek ve bölgelere göre farklılıklar gösterirler.

Supraglottik bölgede: Epiglotun serbest kenarları, bant ventriküller ve ventrikül seviyesindelenfatik ağ çok zengin olup sinüs piriformisden gelenlerle birleşir. Bu bölgedeki lenfatikler,bir taraftan diğer tarafa serbestçe geçerek, üst ve orta juguler lenf nodlarına drene olur.

Glottik bölgede: Vokal kordların membranöz parçası lenfatik ağ yönünden fakirdir.Maligniteler ancak Reinke aralığına invaze olduklarında lenfatik sisteme girmiş olurlar. Önkommisür bölgesine uzanan malignitelerde lenfatik yayılım şansı artar.

Subglottik bölgede: İki çeşit drenaj yolu vardır. Bunlardan bir tanesi, krikotiroid membrandangeçerek trakea önünde prelarengeal (*Delphian lenf nodu*) pretrakeal ve oradan da orta derinjuguler nodlara gider. Diğer ise, inferior tiroid arter yakınındaki lenf noduna geçerek paratrakeal, trakeoözofageal nodlara gider.⁷

LARENKSİN İNNERVASYONU

Larenks motor ve sensitif uyarımının tamamını N. vagustan alır. N. vagus, superiorlarengeal ve inferior larengeal sinirler olmak üzere larenkse dallar gönderir.

N. Laryngeus superiorun internal ve eksternal dalı mevcuttur. İnternal dal daha kalın olup duysal lifleri içerir. Tirohiyoid membrandan geçip larenksin supraglottik bölgesinin duysal uyarımını sağlar. Bu sinirin eksternal dalı ise daha ince olup motor lifler içerir. M. Cricothyroideus'un motor uyarımını sağlar ve yaralanması durumunda vokal kordların gerginliği azaldığı için ses kısıklığı oluşur.

N. Laryngeus inferior (Nervus recurrens) n. vagustan ayrıldıktan sonra solda arkus aortayı, sağda ise subklavian arteri geçerek yukarı doğru ilerler. Krikotiroid ekleminden hemen arkasından larenkse girer. Anterior ve posterior dalı vardır. Anterior dal motor lifler içerirken posterior dal duysal lifler içerir. Larenksin kord vokal altında kalan kısmının duysal uyarımını ve m. cricothyroideus dışında kalan internal larenks kaslarının motor uyarımını sağlar. N. Laryngeus inferiorun posterior dalı ile n. laryngeus superiorun internal dalının dorsal dalcıkları, interaritenoid ve posterior aritenoid kaslarının dorsal yüzeyinde lokalize *Galen anastomozu*'nu meydana getirirler.⁸

LARENKSİN FONKSİYONLARI

1) Sfinkter (Koruma) görevi: Yutma sırasında larenksin kapanması larenks fizyolojisinin en önemli görevi olup sıvı ve katı gıdaların girişinde akciğerleri korur. Larenksin kapanması, rima glottisin kapanması, larenks vestibülünün kapanması ve epiglotun larenks lümenine doğru eğilmesi olmak üzere üç adımda gerçekleşir. Glottisin sfinkter görevi larenksin esas ve primitif fonksiyonudur. Yutma sırasında glottis refleksi olarak kapanır. Lokal etkiler ve larenksin kimyasal stimülasyonu ile solunum ve kardiyovasküler sistemde değişiklikler oluşur. Bu değişiklikler apne, bradikardi, hipertansiyon, bronkokonstriksiyon, öksürük ve periferik vasküler direnç değişiklikleridir. Genetik olarak larenks, yutma esnasında pulmoner sistemi koruyucu bir sfinkter olarak gelişmiştir. Aşağı solunum yollarının korunması larenksin ana görevidir. Bu nedenle larenks sabit ve dominant glottik kapanma reflekslerine sahiptir. Kapanma refleksi, süperior larengeal sinirin stimülasyonuna cevap olarak tiroaritenoid kasından kapanmasıdır. Larenksteki sfinkter fonksiyonu larenksteki üç bölgenin koruyucu addüksiyonu sonucu olur. Bunlar yukarıdan aşağıya doğru epiglot-ari-epiglottik plikalar, ventriküler bantlar ve vokal kordlardır. Larenksin sfinkter görevinin başlaması için iki taraflı süperior larengeal sinirin stimülasyonu gerekir.

2) Solunum fonksiyonu: Larenks solunum yolunun bir parçası olarak görev yapar. Solunum medulladaki merkez ile düzenlenir. Epiglot hayvanlarda daha uzun olup havanın yönlenmesine yardım eder.

3) Fonasyon: Larenkste sesin meydana gelmesinde çeşitli komponentler rol oynar. Bunlar havanın basıncı, vokal kordların gerilmesi, rima glottisin şekli, solunum yollarının durumu ve genişliğidir. Bu olaya fiziksel etkenler de katılır. Özellikle sinir sisteminin etkisi ile kaslarda uzama ve kısılma meydana gelir. Ses oluşunda işitmenin de önemli rolü vardır.

4) Yutma fonksiyonu: Yutma esnasında kasların sfinkter etkisi ile larenks girişi kapanır. Epiglotun kenarından lokmanın özofagusa kayması sağlanır. Ayrıca yutma sırasında larenksin yükselmesi lokmanın özofagusa girişine yardım eder.

5) Öksürük ve Eksploratif fonksiyonu: İntratorasik basıncın artmasına bağlı olarak bronş ve trakea sekresyonu dışarı atılır. Derin inspiryumla glottis kapanır. Ekspiryum kasları kasılarak intrapulmoner basınç artar. Glottis aniden açılarak hızla çıkan hava aşağı solunum yollarındaki sekresyonu veya yabancı partikülü dışarı atar.

6) Emosyonel fonksiyonu: Larenks kişinin psikolojik durumun göre heyecan, üzüntü, ağlama ve esneme ses değişiklikleri meydana getirir.

7) Dolaşıma yardımcı fonksiyonu: Trakeobronşial sistemde ve akciğer parankimindeki basınç değişikliklerinin etkisi ile kan dolaşımında pompa gibi etki yapar.

8) Fiksatif fonksiyonu: Rima glottisin kapanması ile toraks içine hava kapatılır. İstemli olarak yapılan bu işlem ağır kaldırma, ıkınma ve zorlama hareketine yardım eder.⁷

LARENKSİNPREMALİGN LEZYONLARI VE SINIFLANDIRILMALARI

Günümüze kadar premalign laringeal lezyonların sınıflandırılması için 20’den fazla klasifikasyon tanımlanmıştır (10). Rutin pratikte en fazla kullanılan DSÖ (11) ve Ljubljana sınıflamasıdır.(12)

DSÖ sınıflaması:

1. Skumöz hiperplazi
2. Hafif displazi (LIN-1)
3. Orta displazi (LIN-2)
4. Ağır displazi (LIN-3)
5. Karsinoma in situ

Skumöz hiperplazi, hafif displazi, orta displazi ve ağır displazi benign lezyonlar olup, karsinoma in situ malign süreç olarak değerlendirilmektedir.¹¹

Ljubljana sınıflaması:

1. Basit hiperplazi
2. Anormal hiperplazi
3. Atipik hiperplazi
4. Karsinoma in situ

Basit ve anormal hiperplazi benign, atipik hiperplazi potansiyel malign, karsinoma in situ kesin malign olarak değerlendirilmektedir.^{12,13}

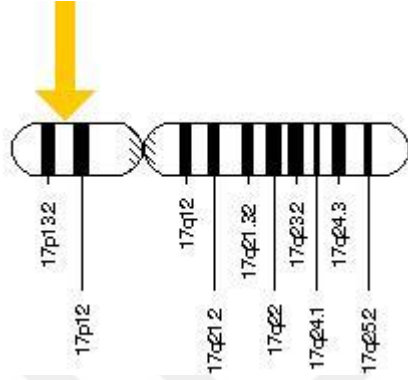
p53

P53 TP53 gibi çeşitli organizmalarda protein kodlayan, kanser formasyonunu önleyen ve tümör süpresör olarak görev yapan bir proteindir.¹⁴ p53 genom mutasyonunu önleyen, stabiliteyi sağlayan rolü nedeniyle “ genom gardiyanı” olarak tanımlanmaktadır.¹⁵ Dolayısıyla TP53 tümör baskılayıcı gen olarak sınıflandırılır ¹⁶. 1979 yılında tanımlandığında molekül ağırlığı 53 kilodalton (kDa) olduğu için p53

ismi verilmiştir ^{17,18}. Uluslar arası kanser genom konsorsuyumu insan kanserlerinde en fazla mutasyona uğrayan genomun TP53 olduğu ve kanser formasyonunun önlenmesinde kilit rol oynayacağı düşünülmüştür.¹⁴

İnsanda *TP53* geni chromosome 17'nin kısa kolunda yer almaktadır. (17p13.1)

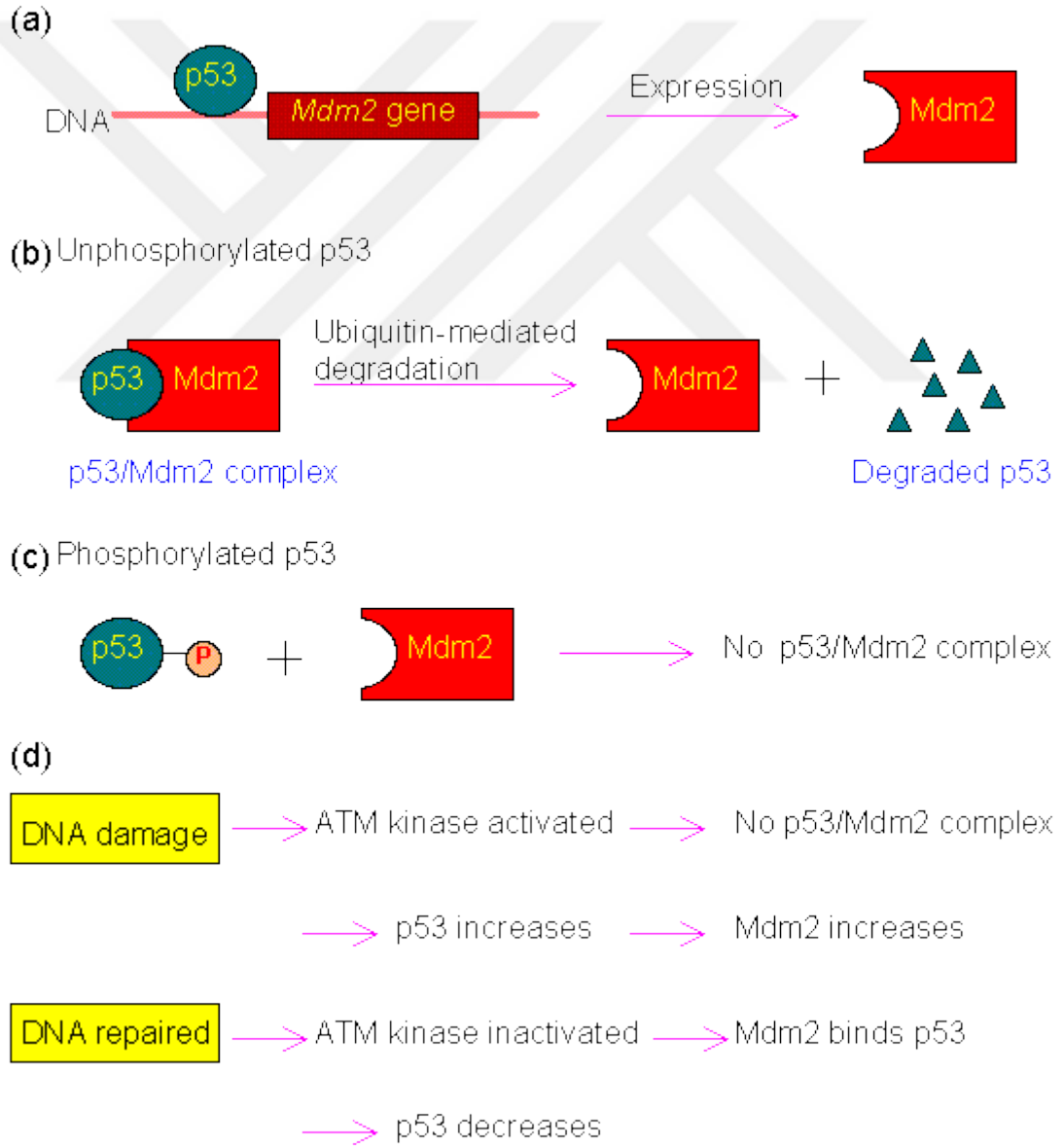
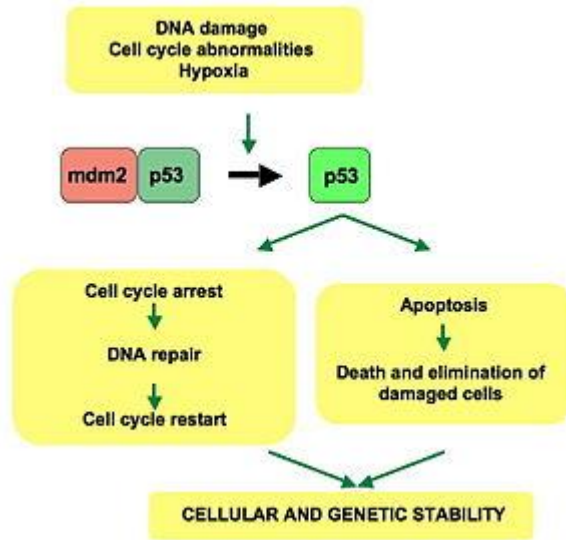
^{16,17,18}



Şekil 7: p53 genetik lokus

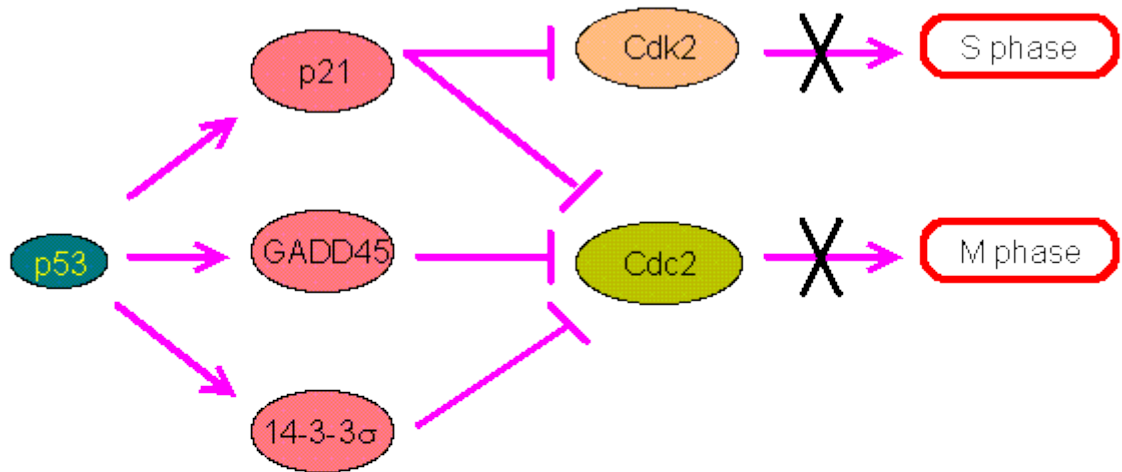
Tümör süpresör protein p53; DNA onarımı, apoptozis ve hücre siklusu durdurulması indükleyerek normal hücre siklusunun kanserojen dönüşümüne engel olan önemli bir rol üstlenmektedir. p53'ün önemli hedeflerinden birisi siklin bağımlı kinazı inhibe eden p21'dir. G₁ fazında hücre siklusunu aktivitesini inhibe ederek ya da cyclin D1/Cdk4 kompleksine bağlarak hücre siklusunu durdurulmasını indükler. Bu sebeple hücre siklusunu kontrol etmede önemli bir rol oynamaktadır. ^{18,19,20}

Mdm2 olarak isimlendirilen bir protein p53'e bağlarak nukleustan sitozole transportunu ve aksiyonunu önler. Mdm2 ubiquitin ligaz olarak davranır ve ubiquitini p53'e kovalent olarak bağlar ve proteozom degradasyonu için p53'ü işaretler. ^{18,19,20,21,22}

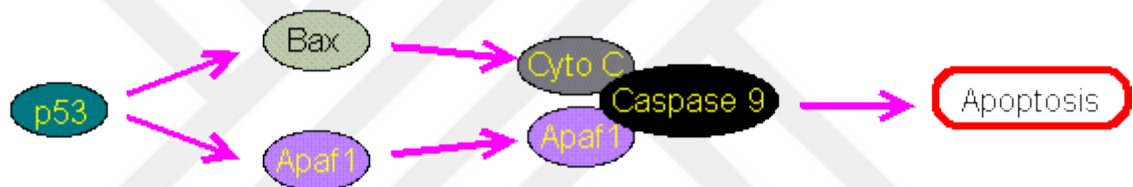


Şekil 8: p53 çalışma prensibi

(a) Growth Arrest



(b) Apoptosis



Şekil 9: p53 büyüme durması ve apoptoz

Ki-67

İlk olarak 1983'te Gerdes ve arkadaşları tarafından tanımlanmış, tonsil germinal merkez hücreleri, epitel bazal hücreleri ve intestinal epitelin kript hücreleri gibi proliferen hücrelerde gösterilmiştir. Ki-67; hücre siklusunun G0 fazı dışında tüm fazlarında bulunan nonhistone nükleer proteindir. 345 ve 395 kd ağırlığında 2 molekülden oluşur ve geni 10. kromozom üzerinde yer alır.^{23,24,25}

İmmünohistokimya ile Ki-67 için pozitif nükleer boyanma hücre yüzdesi proliferatif fraksiyonu gösterir. Agresif tümörlerde bu oran yüksektir. Birçok sistem tümörlerinde (meme, akciğer, özofagus, böbrek ve prostat kanseri, malign melanom, nonhodgkin lenfoma, glial tümörler) yüksek Ki-67 oranı kötü prognostik faktör olarak gösterilmiştir.^{26,27}

Larinks kanserlerinde de çok sayıda çalışmada Ki-67'nin histolojik grade, metastaz, rekürrens, radyoterapiye cevap ve sağkalım ile ilişkisi araştırılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir.^{23,24,50,56,60,61}

phh3

Histon H-3 ökaryotik hücrelerde diğer çekirdek histon proteinleriyle birlikte bulunan kromatin majör protein içeriğindendir. Memeli hücrelerinde histon H-3 proteinin serin 10 rezidüsünün fosforillenmesi interfaz süresince önemsizdir, fakat mitoz esnasında maksimum kromatin konsantrasyonuna ulaşır. PHH-3 e karşı direkt oluşan bir antikor, mitotik aktivitenin gösterilmesi açısından teknik ve geçerli bir metod olabilir.^{29,30,33,34}

PHH-3 antikoruna karşı oluşturulmuş antikorlar şunu göstermiştir ki, çekirdek proteini fosfohiston-3 sadece serin 10 ve serin 28 fosforillendiğinde antikor tarafından tanınmaktadır. Histon H-3 protein fosforillenmesi interfaz esnasında nadiren görülen ama mitoz esnasında her zaman görünen bir süreçtir.^{31,32} çalışmalar ayrıca apaopitoz esnasında histon H-3 proteininde fosforilasyon gösterilmemiştir.^{32,33,34} Bu sebepler PHH-3i çok kullanışlı bir mitotik belirteç yapmaktadır.

MATERYAL VE METOD

HASTA SEÇİMİ

Eylül 2004- Eylül 2014 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları kliniğinde ses kısıklığı (disfoni) nedeniyle muayene edilen, laringeal lezyon saptanıp larenks mikroişirürjisi operasyonu uygulanan ve verilerine ulaşılan 2538 hasta değerlendirildi. Bu hastalardan premalign larengeal lezyon saptanan 804 hasta, retrograd olarak kliniğimiz larinks mikroişirürji kayıt defterleri ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı arşivlerinde bulunan patoloji kayıtları ile tarandı ve bulundu.

PROSEDÜR

Daha önce larenks karsinomu tanısı olmayan, alınan biyopsi örnekleri Dünya Sağlık Örgütü premalign laringeal lezyon sınıflamasına göre (skuamöz hiperplazi, laringeal intraepitelyal neoplazi 1-2-3) saptanan hastalar protokol numaraları ile bulundu. Patoloji piyesleri patoloji arşivlerinden temin edildi. 23 adet en az 5 yıl süreyle takipte kalan, en az 2 kontrol biyopsisi olan ve larinks malignitesine progresyon göstermeyen ve 22 adet takip esnasında larenks karsinomuna progresyon gösteren hastaların preparatları bulunarak ayrıldı. Malign progresyon göstermeyen 3 ve gösteren 4 adet preparat boyanma uyumsuzluğu nedeniyle çalışmadan çıkarıldı. 20 malign progresyon göstermeyen, 18 malign progresyon gösteren toplam 38 hasta çalışmaya dahil edildi. Olgular yaş, cinsiyet, patolojik tanı, takip süresi, maligniteye dönüşüm süresi, Ki-67 boyama yüzdesi, p53 boyanma yüzdesi ve pph-3 boyanma yüzdelere göre sınıflandırıldı.

İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ

Olgulara ait beş mikron kalınlıkta kesilmiş formalin tesbitli, parafine gömülü doku kesitlerinde yapılan İHK incelemede, p53 (klon DO-7, Dako, RTU), Ki67 (klon MIB-1, Dako, RTU) ve PHH3 (poliklonal, Labvision, predilüe) primer antikorları araştırıldı. İHK boyama sistemi olarak biyotinsiz, HRP multimer bazlı, hidrojen peroksit substrat ve 3, 3' – diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB) kromojeni içeren

(EnVision™ Detection Kit, Catalog number K406511, Dako) ile tam otomatik immünohistokimya boyama cihazı (Dako Autostainer 48 Link) kullanıldı.

Doku kesitleri elektrostatik yüklü lamlara (X-tra™, Surgipath Medical Industries, Richmond, Illinois, USA) alındı ve 60°C’da en az iki saat kurutuldu. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere tüm IHK boyama süreci Dako Autostainer 48 Link tam otomatik immünohistokimya boyama cihazında gerçekleştirildi.

Yalnızca primer antikorlar p53, Ki67 ve PHH3 manuel olarak damlatıldı ve 37°C’de 20 dakika inkübe edildi. Cihazda zıt boyaması hematoksilen ve mavileştirici solüsyon ile tamamlanan kesitlerin dehidratasyonu, ksilen ile şeffaflandırılması ve lamel kapatılması aşamaları elde yapılarak işlem sonlandırıldı.

Pozitif kontrol örnekleri olarak p53, Ki67 ve PHH3 için önceden pozitifliği bilinen bir meme karsinomu kesitleri kullanıldı.

Pozitif kontrol için seçilen ancak primer antikorun damlatılmadığı örnekler ise negatif kontrol olarak kabul edildi.

IHK incelemede p53, Ki67 ve PHH3 nükleer boyanma pozitif olarak kabul edildi. Tüm boyalar için nükleer boyanma gösteren hücrelerin toplam hücre sayısına oranı hesaplandı.

İSTATİSTİK

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 22 programı kullanıldı. Veriler değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların (Ortalama, Standart sapma) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında ilk olarak Shapiro Wilk testi uygulandı ve hasta dağılımının normal olmadığı sonucuna varıldı. Bu nedenle nonparametrik testler uygulandı. Gruplar karşılaştırılırken Mann whitney U testi kullanılarak gruplar karşılaştırıldı. Sonuçlar %95’lik güven aralığında ve anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamıza alınan toplam 45 hastanın 38 tanesinin preparatları çalışmaya uygun izlendi. Hastalarımızın 34 tanesi erkek (%89,5), 4 tanesi kadındı (%10,5).

cinsiyet

	Sıklık	Yüzde	Geçerli Yüzde	Kümülatif Yüzde
kadın	4	10,5	10,5	10,5
erkek	34	89,5	89,5	100,0
Total	38	100,0	100,0	

Tablo-1: Cinsiyet

Çalışmaya alınan 38 hastanın patolojik tanıları: 6 hastada skuamöz hiperplazi (%15,8), 11 hastada LIN-1 (%28,9), 14 hastada LIN-2 (%36,8) ve 7 hastada LIN-3(%18,4) saptandı.

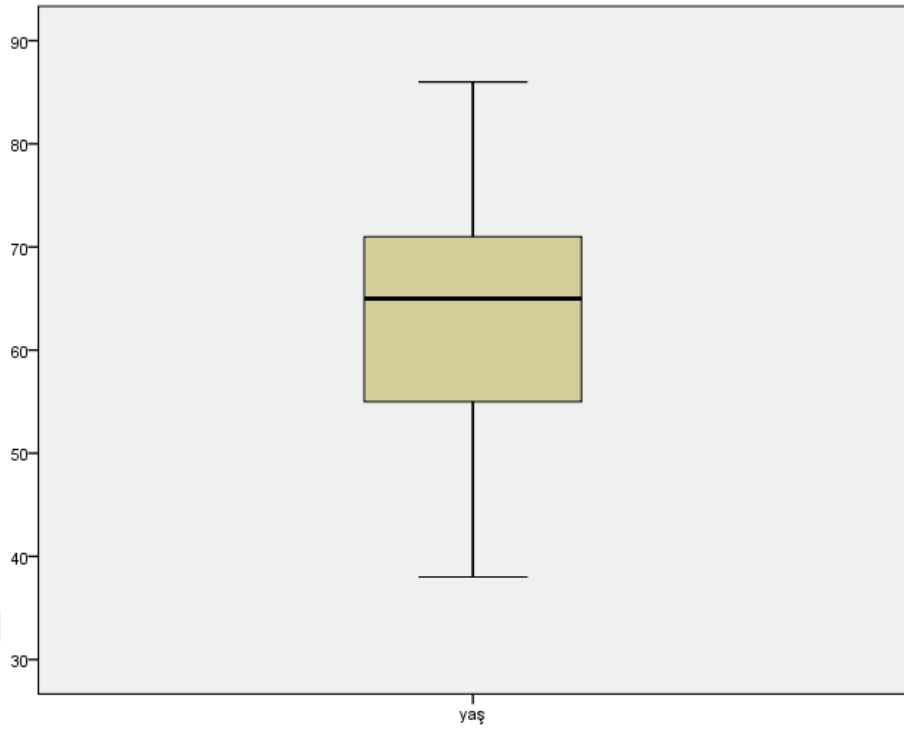
patoloji

	Sıklık	Yüzde	Geçerli Yüzde	Kümülatif Yüzde
Skuamöz hiperplazi	6	15,8	15,8	15,8
LIN 1	11	28,9	28,9	44,7
LIN 2	14	36,8	36,8	81,6
LIN 3	7	18,4	18,4	100,0
Total	38	100,0	100,0	

Tablo-2: Patoloji

Alınan 38 hastanın median yaşı 65,00 ($\pm 11,73$; IQR: 18) olarak bulundu. Min: 38, max: 86 olarak saptandı.

	Statistic	Std. Error
YAŞ		
Ortalama	64,16	1,964
Ortalama için 95% Güven Alt Sınır Aralığı	60,18	
Üst Sınır	68,14	
5% Kesilmiş Ortalama	64,54	
Median	65,00	
Varyans	146,515	
Std. Deviasyon	12,104	
Minimum	36	
Maksimum	86	
Aralık	50	
Çeyrek Değerler Aralığı	18	
Çarpıklık	-,353	,383
Basıklık	-,227	,750

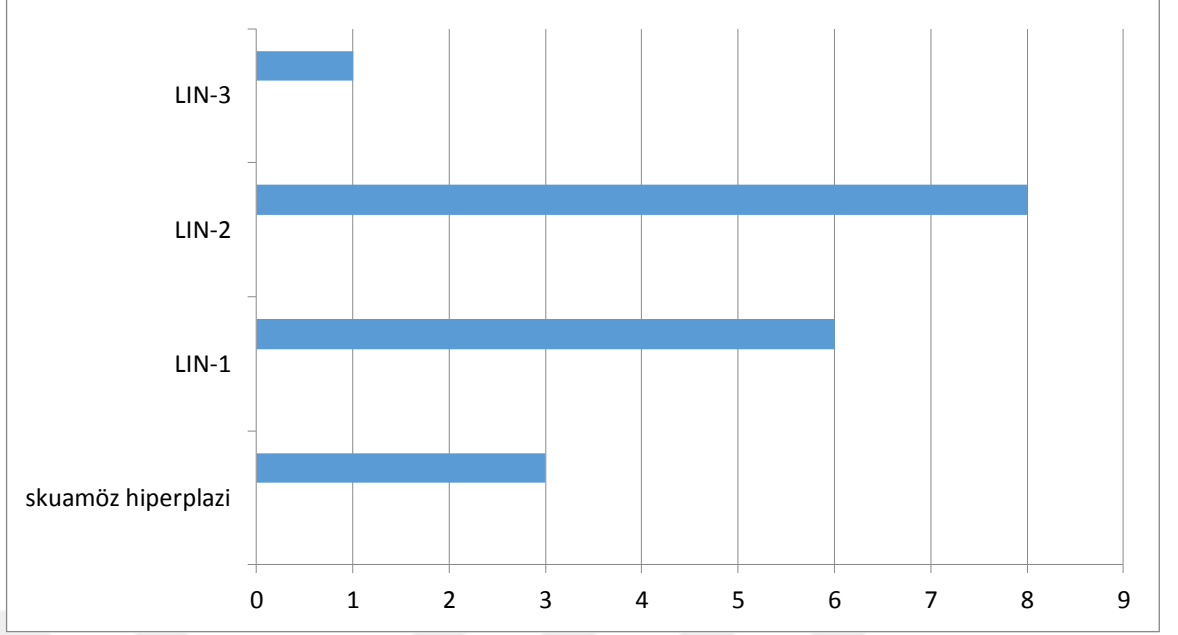


Şekil-10 :Yaş

38 hastanın 18 tanesi (%47,4) takip esnasında malign progresyon göstermiş, 20 tanesi(%52,6) takiplerde stabil kalmıştır.

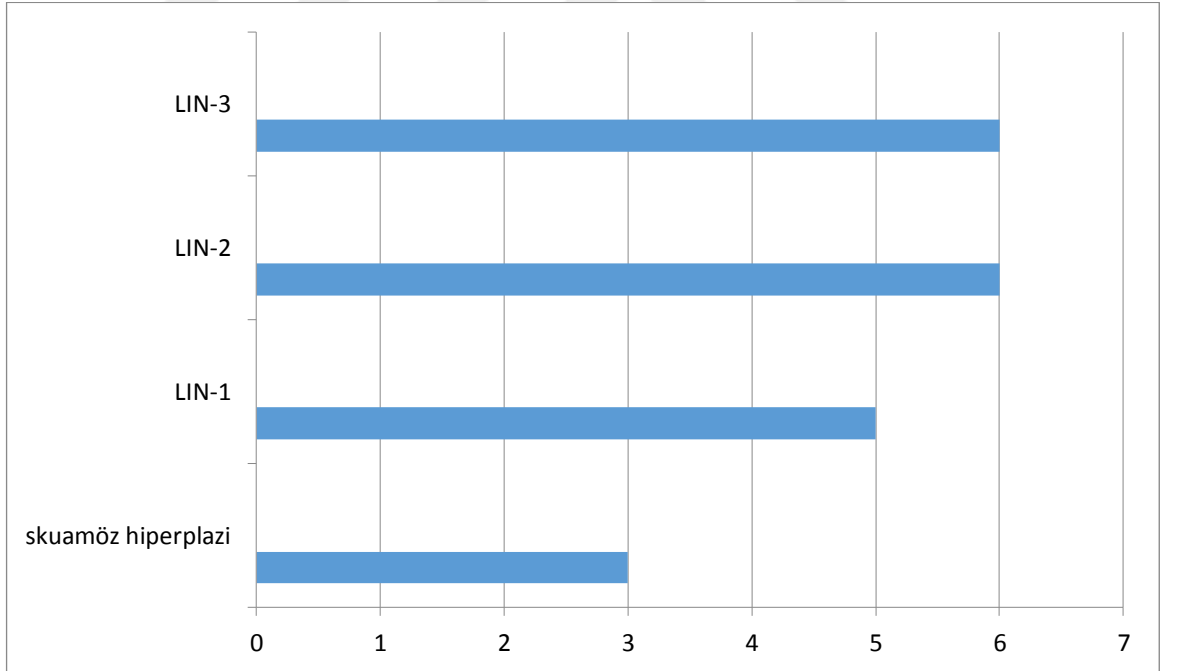
	Sıklık	Yüzde	Geçerli Yüzde	Kümülatif Yüzde
Malign progresyon olan	18	47,4	47,4	47,4
Malign progresyon olmayan	20	52,6	52,6	100,0
Total	38	100,0	100,0	

Tablo-4: Malign progresyon olan ve olmayan



Şekil-13 : Malign progresyon gösteren patoloji tipleri

Malign progresyon gösteren 18 hastanın tanıları: 3 hasta skuamöz hiperplazi, 6 hasta LIN-1, 8 hasta LIN-2, 1 hasta LIN-3 olarak saptandı.



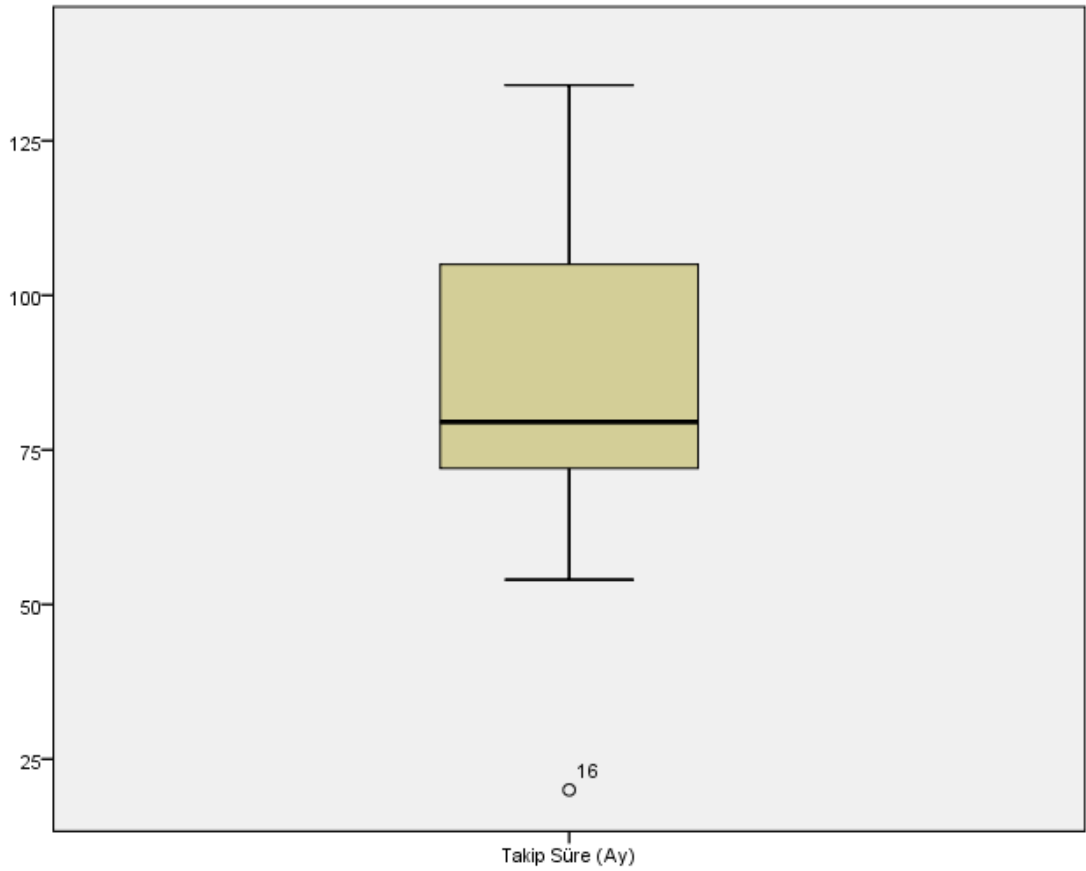
Şekil14 : Malign progresyon göstermeyen patoloji tipleri

Malign progresyon göstermeyen 20 hastanın tanıları: 3 hasta skuamöz hiperplazi, 5 hasta LIN-1, 6 hasta LIN-2, 6 hasta LIN-3 olarak saptandı.

Ortalama takip süremiz 75 ay olarak bulundu (± 26.33 ; IQR: 27). Minimum takip süresi 20 ay, maksimum takip süremiz 129 ay olarak saptandı.

		Statistic	Std. Error
Takip Süresi	Ortalama	85,97	3,760
	Ortalama için 95% Güven Alt Sınır	78,36	
	Aralığı Üst Sınır	93,59	
	5% Kesilmiş ortalama	86,21	
	Median	79,50	
	Varyans	537,107	
	Std. Deviasyon	23,176	
	Minimum	20	
	Maksimum	134	
	Aralık	114	
	Çeyrek Değerler Aralığı	33	
	Çarpıklık	-,005	,383
	Basıklık	,756	,750

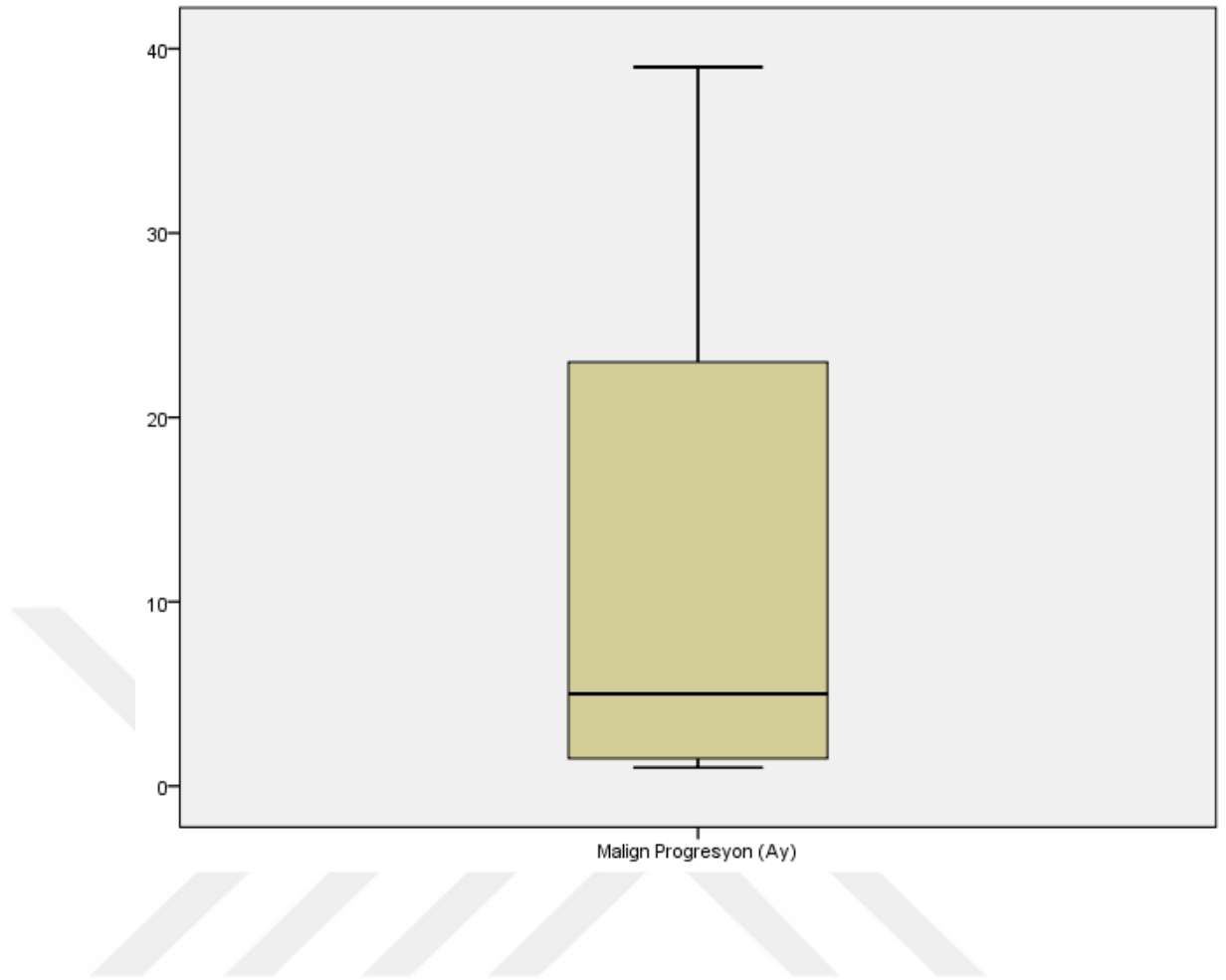
Tablo-5: Takip süresi



Maligniteye dönen hastalarımızın ortalama maligniteye dönme süresi 5 ay olarak bulundu ($\pm 11,90$; IQR:23). Maligniteye dönüşümde minimum süre 1 ay, maksimum süre 29 ay olarak bulundu.

		İstatistik	Std. Error
Malign progresyon (Ay)	Ortalama	10,74	2,730
	Ortalama için 95% Güven Alt Sınır	5,00	
	Aralığı Üst Sınır	16,47	
	5% Kesilmiş Ortalama	9,71	
	Median	5,00	
	Varyans	141,649	
	Std. Deviasyon	11,902	
	Minimum	1	
	Maksimum	39	
	Aralık	38	
	Çeyrek Değerler Aralığı	23	
	Çarpıklık	1,051	,524
	Basıklık	-,141	1,014

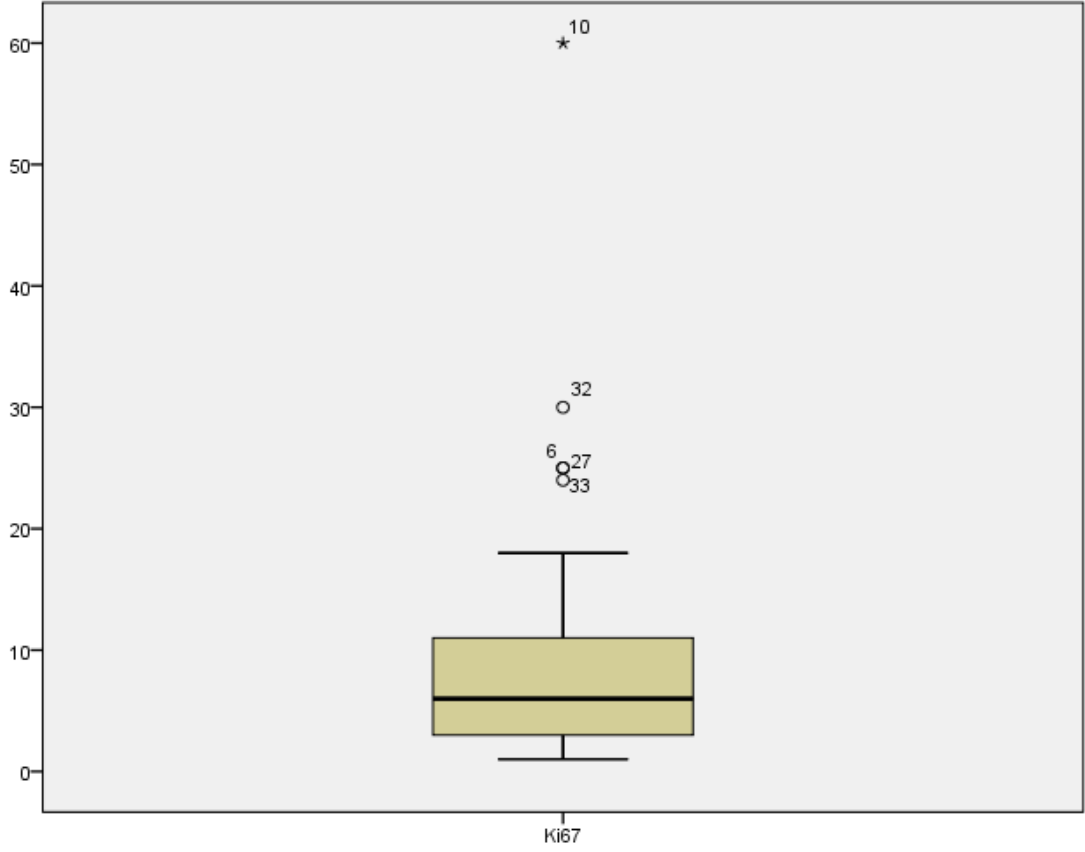
Tablo-6: Malign Progresyon Süresi



	Statistic	Std. Error
Ki-67 Ortalama	9,66	1,810
Ortalama için 95% Güven Alt Sınır	5,99	
Aralığı Üst Sınır	13,33	
5% Kesilmiş Ortalama	8,11	
Median	6,00	
Variyans	124,555	
Std. Deviasyon	11,160	
Minimum	1	
Maksimum	60	
Aralık	59	
Çeyrek Değerler Aralığı	9	
Çarpıklık	2,892	,383
Basıklık	10,667	,750

Tablo-7: Ki-67 boyanma

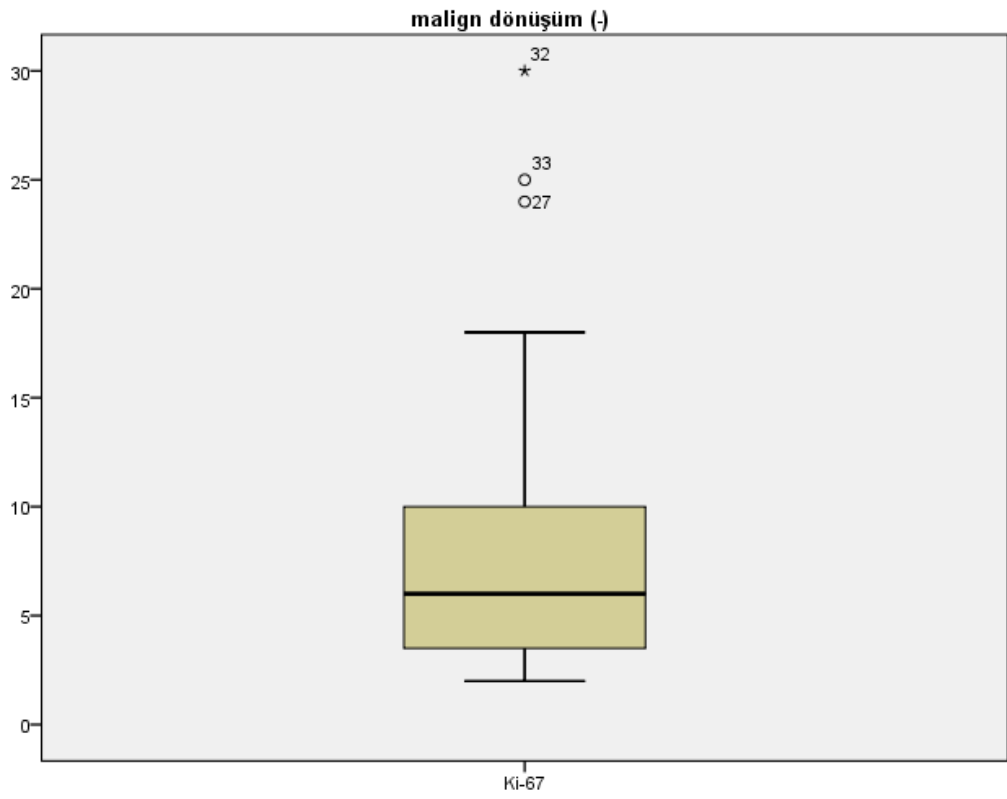
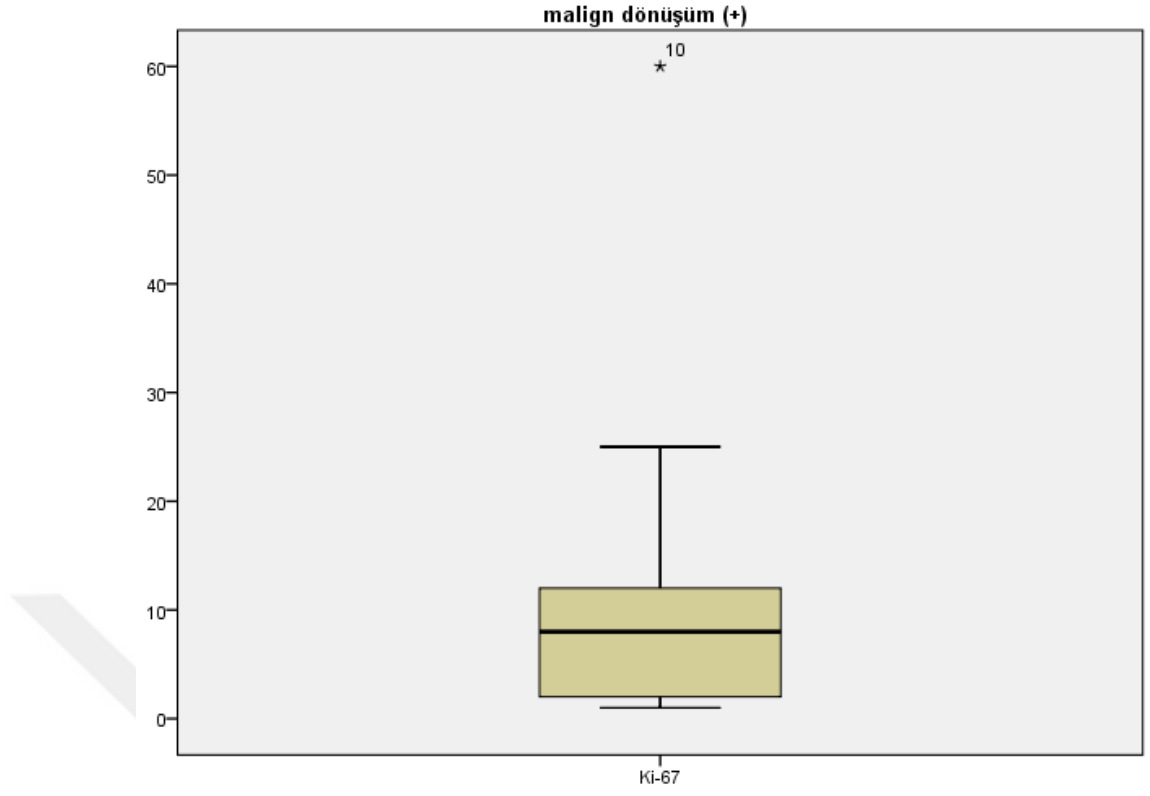
Tüm hastaların Ki-67 ile boyanma yüzdesine bakılınca median değer 6,00 olarak saptandı($\pm 11,16$; IQR:9). Minimum boyanma yüzdesi 1, maksimum 60 olarak saptandı.



	grup		İstatistic	Std. Error
Ki-67	Malign Progresyon (+)	Ortalama	10,44	3,253
		Ortalama için 95% Güven Alt Sınır	3,58	
		Aralığı Üst Sınır	17,31	
		5% Kesilmiş Ortalama	8,22	
		Median	8,00	
		Varyans	190,497	
		Std. Deviasyon	13,802	
		Minimum	1	
		Maksimum	60	
		Aralık	59	
		Çeyrek Değerler Aralığı	10	
		Çarpıklık	3,033	,536
		Basıklık	10,506	1,038
	Malign Progresyon (-)	Ortalama	8,95	1,884
		Ortalama için 95% Güven Alt Sınır	5,01	
		Aralığı Üst Sınır	12,89	
		5% Kesilmiş Ortalama	8,17	
		Median	6,00	
		Varyans	70,997	
		Std. Deviasyon	8,426	
		Minimum	2	
		Maksimum	30	
		Aralık	28	
		Çeyrek Değerler Aralığı	7	
		Çarpıklık	1,528	,512
		Basıklık	1,235	,992

Tablo-8: Ki-67 malign progresyon olan ve olmayan

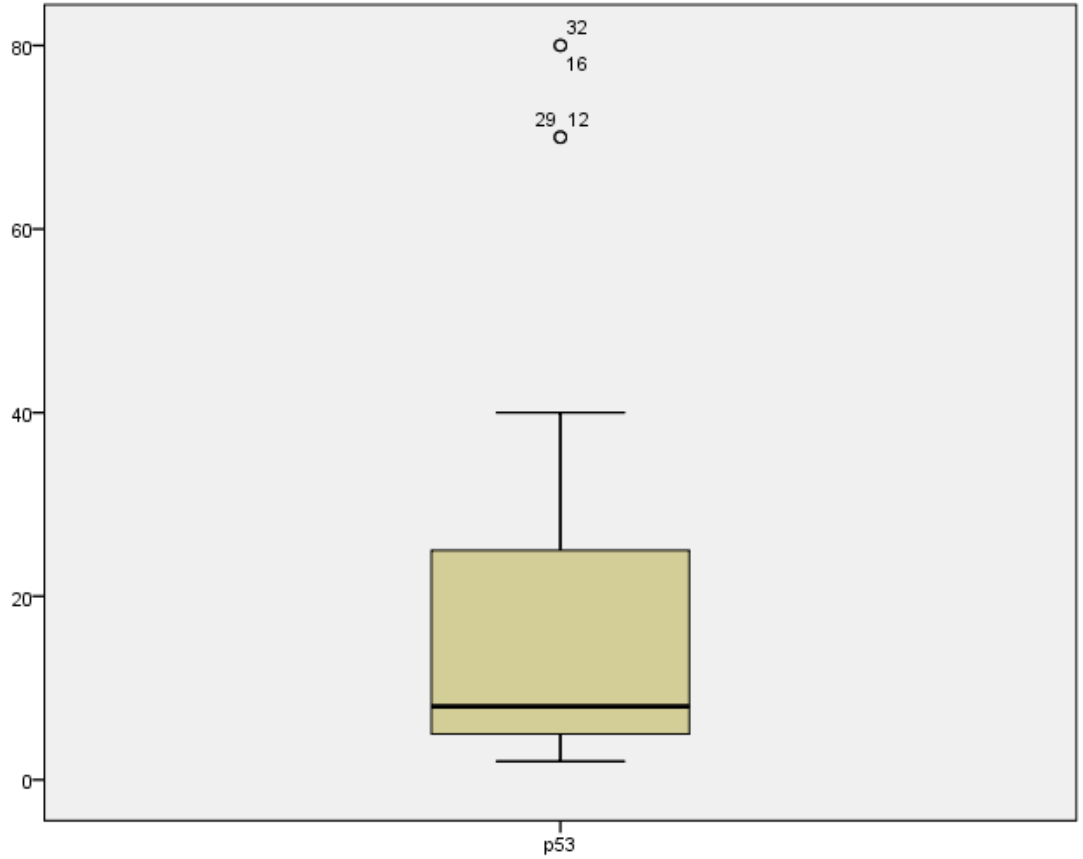
Malign progresyon gösteren grupta Ki-67 boyanma yüzdesi median değeri 8 olarak izlendi ($\pm 13,80$; IQR:10). Maksimum boyanma yüzdesi 60, minimum boyanma 1 olarak saptandı. Malign progresyon göstermeyen grupta Ki-67 boyanma yüzdesi median değeri 6 olarak saptandı ($\pm 8,42$; IQR:7). Maksimum boyanma yüzdesi 30, minimum boyanma yüzdesi 2 olarak saptandı.



		Statistic	Std. Error
p53	Ortalama	18,95	3,532
	Ortalama için 95% Güven Alt Sınır	11,79	
	Aralığı Üst Sınır	26,10	
	5% Kesilmiş Ortalama	16,50	
	Median	8,00	
	Varyans	474,051	
	Std. Deviasyon	21,773	
	Minimum	2	
	Maksimum	80	
	Aralık	78	
	Çeyrek Değerler Aralığı	21	
	Çarpıklık	1,905	,383
	Basıklık	2,734	,750

Tablo-9: p53 boyanma

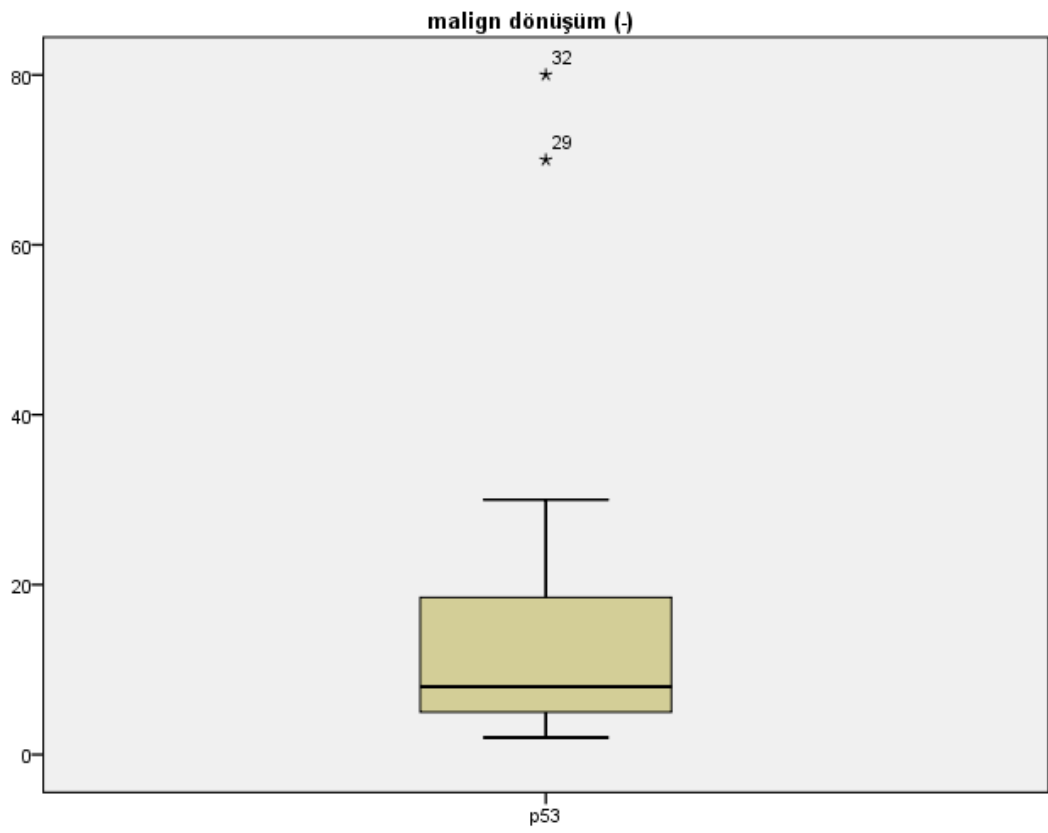
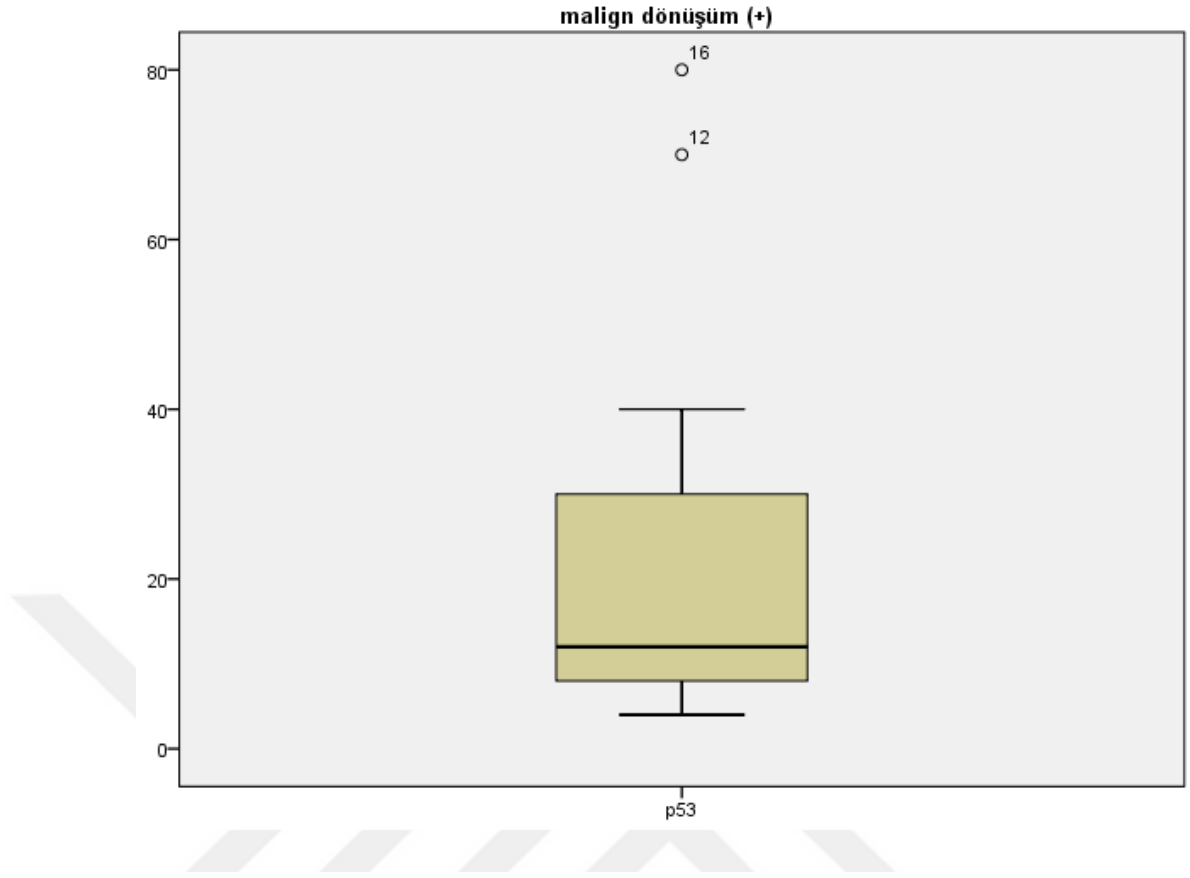
Tüm hastalara bakılınca p53 boyanma yüzdesi median değeri 8 izlendi ($\pm 21,77$; IQR:21). Minimum boyanma yüzdesi 2, maksimum boyanma yüzdesi 80 bulunmuştur.



	grup		Statistic	Std. Error
p53	Malign Progresyon (+)	Ortalama	21,50	5,230
		Ortalama için 95% Güven Alt Sınır	10,47	
		Aralığı Üst Sınır	32,53	
		5% Kesilmiş Ortalama	19,22	
		Median	12,00	
		Varyans	492,265	
		Std. Deviasyon	22,187	
		Minimum	4	
		Maksimum	80	
		Aralık	76	
		Çeyrek Değerler Aralığı	24	
		Çarpıklık	1,785	,536
		Basıklık	2,560	1,038
	Malign Progresyon (-)	Ortalama	16,65	4,853
		Ortalama için 95% Güven Alt Sınır	6,49	
		Aralığı Üst Sınır	26,81	
		5% Kesilmiş Ortalama	13,94	
		Median	8,00	
		Varyans	470,976	
		Std. Deviasyon	21,702	
		Minimum	2	
		Maksimum	80	
		Aralık	78	
		Çeyrek Değerler Aralığı	17	
		Çarpıklık	2,244	,512
		Basıklık	4,443	,992

Tablo-10: Malign progresyon olan ve olmayan p53 boyanma

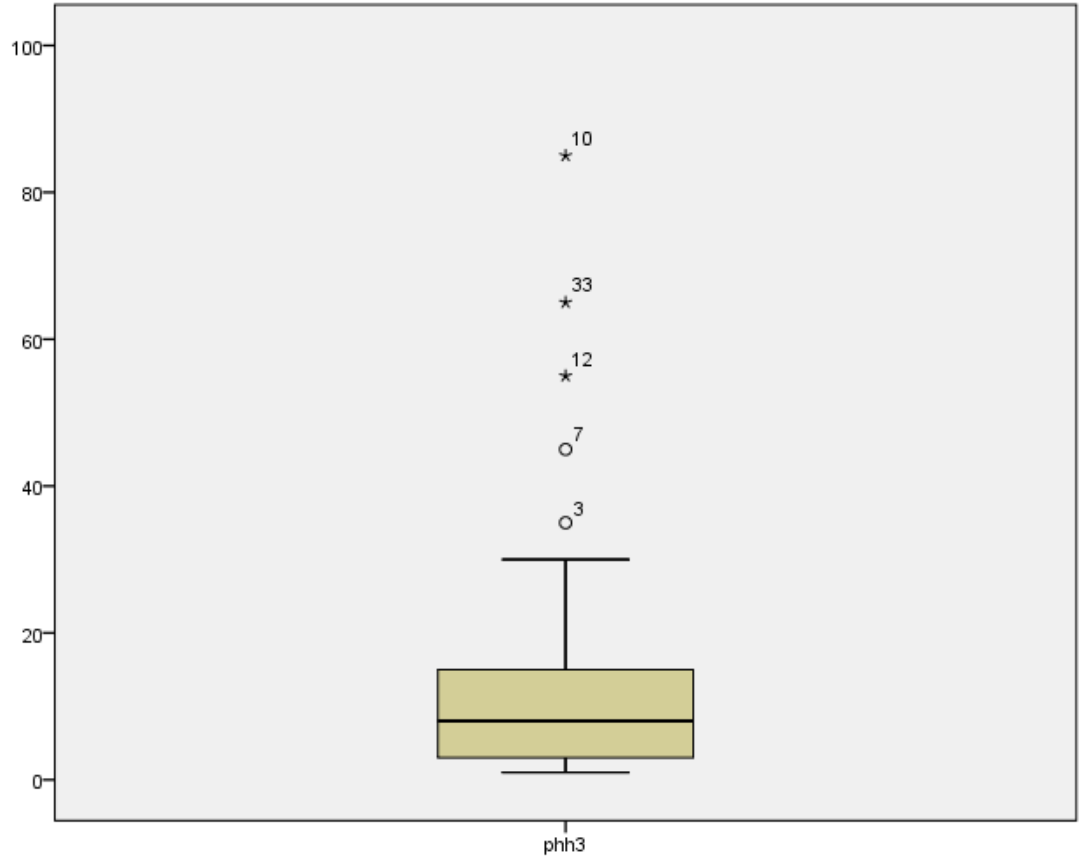
Malign transformasyon gösteren grupta p53 boyanma yüzdesi median değeri 12,00 izlendi ($\pm 22,18$; IQR:24). Maksimum boyanma yüzdesi 80, minimum boyanma 4 saptandı. Malign transformasyon göstermeyen grupta boyanma yüzdesi median değeri 8,00 saptandı ($\pm 21,70$; IQR:17). Maksimum boyanma yüzdesi 80, minimum 2 saptandı.



	Statistic	Std. Error
phh-3 Ortalama	14,47	3,122
Ortalama için 95% Güven Alt Sınır	8,15	
Aralığı Üst Sınır	20,80	
5% Kesilmiş Ortalama	11,83	
Median	8,00	
Varyans	370,418	
Std. Deviasyon	19,246	
Minimum	1	
Maksimum	85	
Aralık	84	
Çeyrek Değerler Aralığı	12	
Çarpıklık	2,235	,383
Basıklık	4,954	,750

Tablo-11: phh-3 boyanma

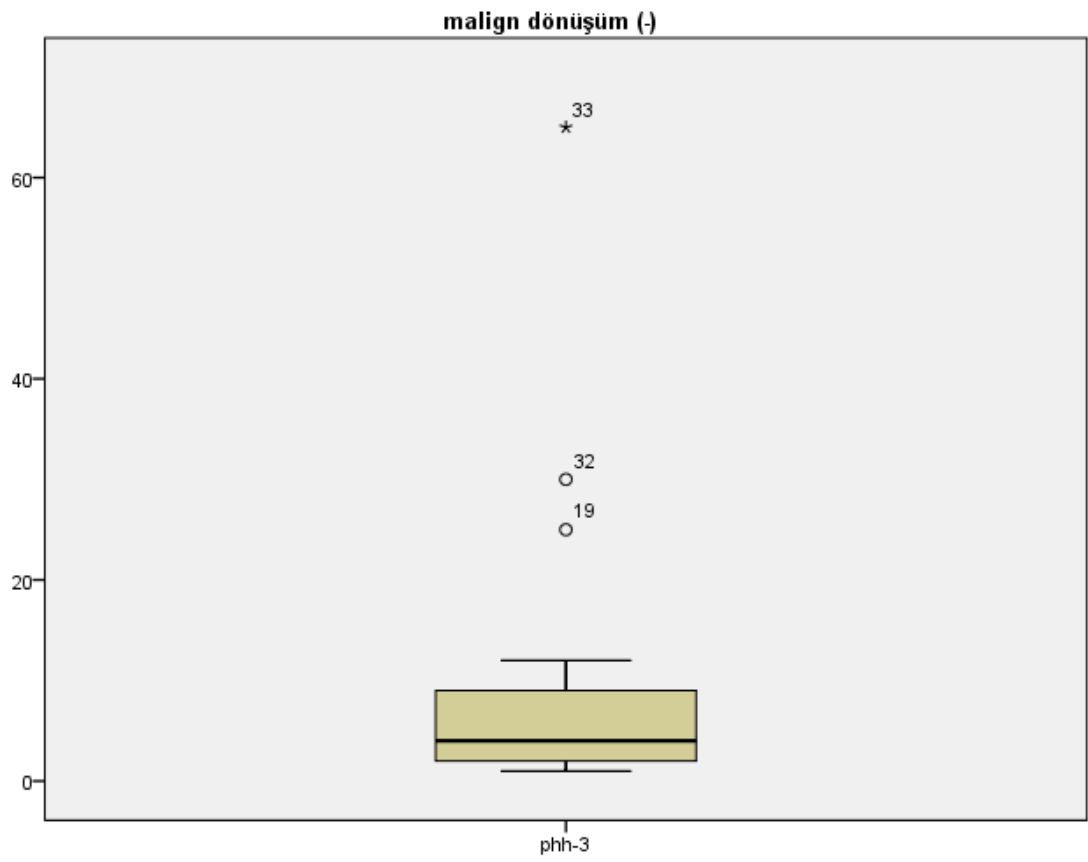
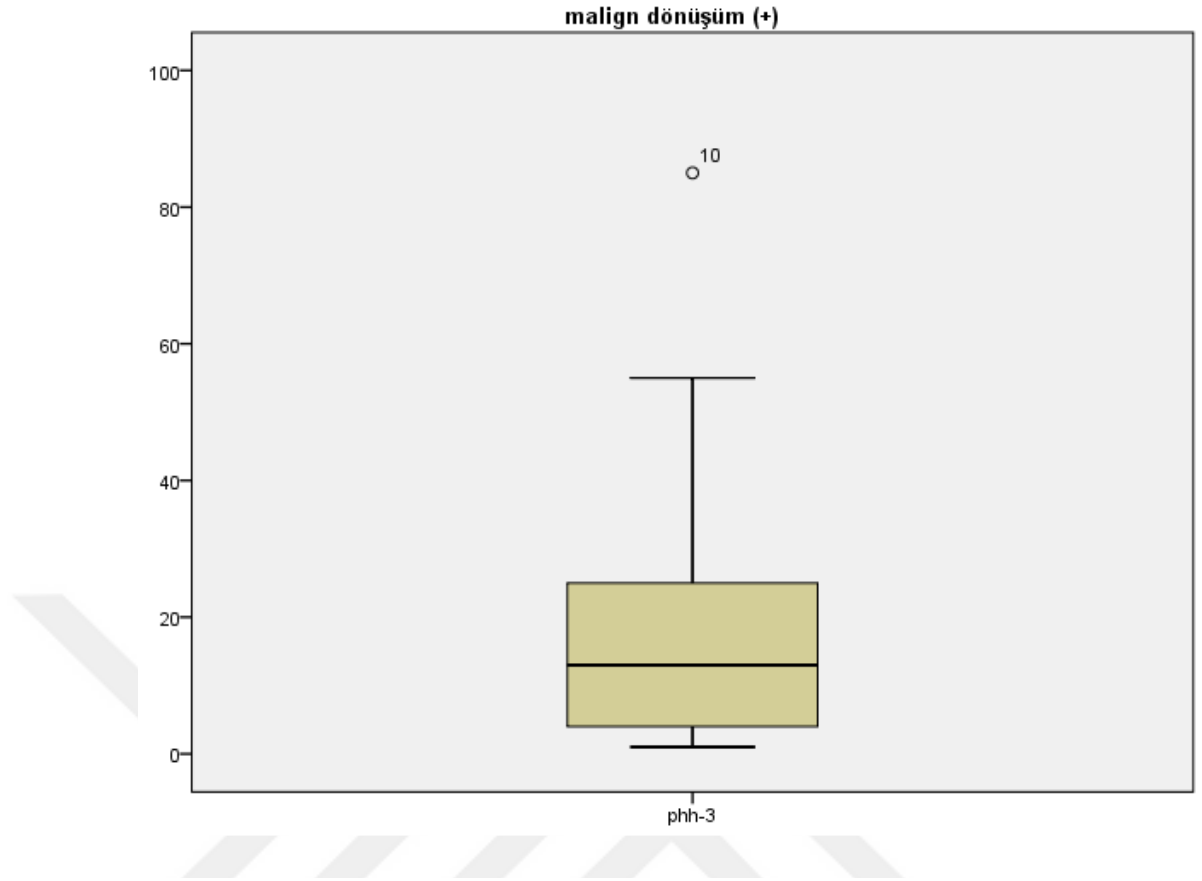
Tüm hastalarda phh-3 boyanma yüzdesine baktığımızda median değer 8,00 olarak saptandı ($\pm 19,24$; IQR:12). Maksimum boyanma yüzdesi 85, minimum boyanma yüzdesi 1 olarak saptandı.



	grup		Statistic	Std. Error
phh-3	Malign	Ortalama	19,56	5,269
	Progresyon	Ortalama için 95% Güven Alt Sınır	8,44	
	(+)	Aralığı Üst Sınır	30,67	
		5% Kesilmiş Ortalama	16,95	
		Median	13,00	
		Varyans	499,673	
		Std. Deviasyon	22,353	
		Minimum	1	
		Maksimum	85	
		Aralık	84	
		Çeyrek Değerler Aralığı	24	
		Çarpıklık	1,860	,536
		Basıklık	3,405	1,038
	Malign	Ortalama	9,90	3,375
	Progresyon	Ortalama için 95% Güven Alt Sınır	2,84	
	(-)	Aralığı Üst Sınır	16,96	
		5% Kesilmiş Ortalama	7,33	
		Median	4,00	
		Varyans	227,779	
		Std. Deviasyon	15,092	
		Minimum	1	
		Maksimum	65	
		Aralık	64	
		Çeyrek Değerler Aralığı	8	
		Çarpıklık	2,959	,512
		Basıklık	9,647	,992

Tablo-12: Malign progresyon olan ve olmayan phh-3 boyanma

Malign progresyon gösteren grupta phh-3 boyanma yüzdesi median değeri 13 olarak saptandı ($\pm 22,35$; IQR:24). Maksimum boyanma yüzdesi 85, minumum 1 olarak saptandı. Malign progresyon göstermeyen grupta boyanma yüzdesi median değeri 4,00 olarak saptandı ($\pm 15,09$; IQR:8). Maksimum boyanma 65, minumum boyanma 1 olarak saptandı.



	grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Ki67	var	18	19,56	352,00
	yok	20	19,45	389,00
	Total	38		
p53	var	18	22,22	400,00
	yok	20	17,05	341,00
	Total	38		
phh3	var	18	23,25	418,50
	yok	20	16,13	322,50
	Total	38		

Test Statistics^a

	Ki67	p53	phh3
Mann-Whitney U	179,000	131,000	112,500
Wilcoxon W	389,000	341,000	322,500
Z	-,029	-1,441	-1,980
Asymp. Sig. (2-tailed)	,977	,150	,048
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,988 ^b	,158 ^b	,048 ^b

a. Grouping Variable: grup

b. Not corrected for ties.

Tablo-13: Ki-67, p53 ve phh-3 istatistik

Yapılan analizde malign progresyon gösteren grup ile göstermeyen grup arasında boyanma yüzdesi farkı incelendiğinde Ki-67 (p:0,97) ve p53 (p:0,15) istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. phh-3 ise (p:0,048) istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Patoloji subgruplara bakıldığında skuamöz hiperplazi tanısı alıp malign progresyon gösteren ve göstermeyen hastalar arasında boyanma yüzdesi farkı incelendiğinde Ki-67 (p=0,507), p53 (p=0,658) ve phh-3(p=0,077) boyanma yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

LIN-1 tanısı alan hastalarda malign progresyon gösteren ve göstermeyen hastalar arasındaboyanma yüzdesi farkı incelendiğinde Ki-67 ($p=1,000$), p53 ($p=0,345$) ve phh-3 ($p=0,119$) istatistiksel olarak anlamlı izlenmedi.

LIN-2tanısı alan hastalarda malign progresyon gösteren ve göstermeyen hastalar arasındaboyanma yüzdesi farkı incelendiğinde Ki-67 ($p=0,897$), p53 ($p=0,515$) ve phh-3($p=0,796$) istatistiksel olarak anlamlı izlenmedi.

LIN-3tanısı alan hastalarda malign progresyon gösteren ve göstermeyen hastalar arasında boyanma yüzdesi farkı incelendiğinde Ki-67($p=0,299$), p53($p=1,000$) ve phh-3($p=0,203$) istatistiksel olarak anlamlı izlenmedi.



patoloji	grup		N	Mean Rank	Sum of Ranks
skuamözhiperplazi	Ki67	var	3	4,00	12,00
		yok	3	3,00	9,00
		Total	6		
	p53	var	3	3,83	11,50
		yok	3	3,17	9,50
		Total	6		
	phh3	var	3	4,83	14,50
		yok	3	2,17	6,50
		Total	6		
lin1	Ki67	var	6	6,00	36,00
		yok	5	6,00	30,00
		Total	11		
	p53	var	6	6,83	41,00
		yok	5	5,00	25,00
		Total	11		
	phh3	var	6	7,42	44,50
		yok	5	4,30	21,50
		Total	11		
lin2	Ki67	var	8	7,38	59,00
		yok	6	7,67	46,00
		Total	14		
	p53	var	8	8,13	65,00
		yok	6	6,67	40,00
		Total	14		
	phh3	var	8	7,75	62,00
		yok	6	7,17	43,00
		Total	14		
lin3	Ki67	var	1	2,00	2,00
		yok	6	4,33	26,00
		Total	7		
	p53	var	1	4,00	4,00
		yok	6	4,00	24,00
		Total	7		
	phh3	var	1	1,50	1,50
		yok	6	4,42	26,50
		Total	7		

Test Statistics^a

patoloji		Ki67	p53	phh3
skuamözhiperplazi	Mann-Whitney U	3,000	3,500	,500
	Wilcoxon W	9,000	9,500	6,500
	Z	-,664	-,443	-1,771
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,507	,658	,077
	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,700 ^b	,700 ^b	,100 ^b
lin1	Mann-Whitney U	15,000	10,000	6,500
	Wilcoxon W	30,000	25,000	21,500
	Z	,000	-,943	-1,559
	Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000	,345	,119
	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1,000 ^b	,429 ^b	,126 ^b
lin2	Mann-Whitney U	23,000	19,000	22,000
	Wilcoxon W	59,000	40,000	43,000
	Z	-,130	-,651	-,259
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,897	,515	,796
	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,950 ^b	,573 ^b	,852 ^b
lin3	Mann-Whitney U	1,000	3,000	,500
	Wilcoxon W	2,000	24,000	1,500
	Z	-1,038	,000	-1,273
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,299	1,000	,203
	Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,571 ^b	1,000 ^b	,286 ^b

a. Grouping Variable: grup

b. Not corrected for ties.

Tablo-14: Patoloji grupları ile malign transformasyon Ki-67, p53 ve phh-3boyanma

TARTIŞMA

Larinks kanserleri, baş-boyun bölgesinin en sık görülen, uygun tanı ve tedavi metodları ile uzun yaşam süreleri elde edilebilen kanserlerdir. Bu tümörlerin büyük çoğunluğu skuamöz hücreli karsinomlar (SHK) olup bunun yanında küçük hücreli, indifferansiyel, adenoid kistik ve mukoepidermoid gibi diğer histolojik tipler de görülebilir. ^{35,36,37,39} Erkeklerde daha sık görülen larinks kanserlerinde erkek:kadın görülme oranları 4:1 ile 20:1 arasında değişmektedir. Yaşa göre görülme sıklığı, 5.-7. dekadlar arasında yoğunlaşmaktadır. ^{38,39}

Larinks karsinomu etiyolojisi bakıldığında sigara en büyük risk faktörü olarak gösterilmiştir. Bunun yanında alkol, çevresel etmenler, heredite, diyet, radyasyon maruziyeti, viral enfeksiyonlar (HPV, HSV v.b) ve gastroözofageal – laringoözofageal reflü riski arttıran diğer faktörlerdir. ^{40,41}

Diğer epitelyal baş boyun tümörlerinde olduğu gibi larinks karsinomu gelişimi de premalign larengeal lezyonların dönüşümü sonucu olduğu düşünülmektedir. Larenkste skuamöz hücre farklılaşması skuamöz hiperplaziden karsinoma insituya kadar uzanan bir spektrum göstermektedir. ⁴² Larinks karsinomuna olan bu dönüşüm çok basamaklı bir ilerleyiş ile oluşmaktadır: normal mukoza – displazi – karsinoma in situ – invaziv karsinoma. Displazi hücresel artış, hücresel atipi (nükleer ve nukleolar anormallikler, nükleus/sitoplazma oranı değişimleri), epitel mimari değişimleri ile karakterize durumudur. ^{42,43}

Premalign larengeal lezyonların sınıflandırılması için 20'den fazla sınıflandırma yöntemleri kullanılmıştır. Bunların içinde en fazla kullanılanı DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) sınıflamasıdır. Bu sınıflandırmaya göre skuamöz hücrelerde sadece artış var ise skuamöz hiperplazi, bazal membranın 1/3 üst kısmına kadar displastik hücreler mevcutsa hafif displazi (LIN-1), bazal membranın 2/3 üst kısmına kadar uzanmışsa orta derece displazi (LIN-2), 2/3'ten daha fazla displastik hücre

mevcutsa ağır displazi (LIN-3) olarak sınıflandırılır. Bazal membran tutulmuş veya geçilmişse sırasıyla karsinoma in situ ve invazif karsinom olarak nitelendirilir.^{11,12,13,48,55} Çalışmamıza dahil edilen hastaların tamamı bu sınıflandırmaya göre gruplandırılmıştır.

Larengeal premalign lezyonların skuamöz hücreli karsinoma dönüşümleri değişik kaynaklarda %11 ile %32 arasında değişen bir sıklıkta bildirilmiştir.^{43,48,49}

Premalign larengeal lezyonda malign progresyon hafif displaziler için % 0 ile %11.5; orta derece displaziler için %4 ile %24; ağır displaziler için %9.3 ile %57 arasında gösterilmiştir. Ama bu çalışmaların çoğunda ağır displazi ile karsinoma in situ aynı kategori içinde değerlendirilmiştir. Farklı sınıflandırma sistemlerinin ve farklı morfolojik derecelendirmelerin kullanılmasının yapılan çalışmaların tutarsız olmasına neden oldukları düşünülmektedir.^{50,51,52,53,54}

Bu çerçevede değerlendirildiğinde ideal olan displazi sınıflandırması maligniteye dönüşme ihtimali az olanlarla, dönüşme ihtimali fazla olanları ayırabilmelidir. Çoğu çalışma displazi derecesi ile malign progresyon açısından doğru orantılı bir artış olduğunu göstermektedir.^{43,49} Diğer yandan histolojik tiplendirmenin larengeal karsinoma ilerlemede anlamlı prediktif değerinin olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. ^{42,48,50,51,52,53,}

Larenkste premalign lezyona sahip olan hangi hastaların karsinoma ilerleyeceğini tahmin edebilmek kıymetli bir klinik değer olurdu. Seçilen bu hastalara kansere ilerleme açısından lokal cerrahi prosedürler (kord vokal stripping, lazer cerrahiler), önleyici kemoprotektif maddeler ve sigara bırakma programları uygulanabilir.^{57,58,59}

Displaziden karsinoma ilerleyişte histolojik diyagnostik parametreler anormal mitotik figürler, mitoz aktivitesi, stromal infiltrasyon, maturasyon seviyesi ve nuklear polimorfizmdir. Ne yazık ki larengeal epitelyal displazi derecesi yüksek oranda subjektiftir ve premalign larengeal lezyonların infiltratif karsinoma kadar ilerleyişini önceden tahmin edebilecek kadar anlamlı görülmemektedirler. Bu nedenle skuamöz hücrelerin malign transformasyonlarının, rekürrenslerinin ve

diskriminasyonlarının sadece histolojik kriterlere bakılarak değerlendirilmesi oldukça zordur.^{42,43}

Tüm bunlar çerçevesinde değerlendirildiğinde histolojik ve klinik kriterlerin yanında premalign larengeal lezyonların prognostik değerlendirilmesinde ve yüksek riskli lezyonların tanımlanmasında objektif ve güvenilir biyolojik markerların bulunması yararlı olacaktır. Günümüze kadar hiçbir marker ya da marker paneli premalign larengeal lezyonların maligniteye progresyonunu göstermede güvenilir bulunmamıştır.^{42,50,51,52}

Ki67 hücre siklusunun G0 fazı dışında tüm fazlarında bulunan nonhistone nükleer proteindir. Bu nedenle hücre siklusu ile ilişkili bir proliferasyon göstergesidir.^{41,42} Birçok sistem tümörlerinde (meme, akciğer, özofagus, böbrek ve prostat kanseri, malign melanom, nonhodgkin lenfoma, glial tümörler) yüksek Ki-67 oranı kötü prognostik faktör olarak gösterilmiştir. Premalign larengeal lezyonların malignite potansiyelini göstermede Ki67 hala tartışmalıdır.^{41,42,43}

Yaptığımız çalışmada malign progresyon gösteren 18 ve göstermeyen 20 premalign larengeal lezyonlu hastada Ki-67 boyanması yüzdeleri median değerleri sırasıyla 8 ve 6 bulunmuş ve bu oran istatistiksel olarak anlamlı izlenmemiştir ($p<0,05$). Yine malign dönüşüm gösteren ve göstermeyen gruplarda displazi derecesi ile boyanma yüzdesi arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır.

Mirza ve ark. 14 hafif displazi, 38 orta derece displazi, 17 ağır derece displazi üzerinde Ki-67 marker bakılarak yaptıkları çalışmada tüm gruplar arasında malignite potansiyelini göstermede Ki-67 boyanmasının her ne kadar maligniteye dönen hastalarda boyanma yüzdesi fazla olsa da (malign dönüşüm olanlarda %29 - malign dönüşüm olmayanlarda %20) istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır.⁵⁷

Gallo ve ark. Toplam 28 hastada vaka kontrol çalışması yapmış sonuçta malign transformasyon olmayan grupta Ki-67 boyanmasının daha yüksek olduğunu, malign progresyonu göstermede Ki-67'nin uygun bir marker olmadığını belirtmişlerdir. Bu veriler çalışmamızda elde ettiğimiz sonucu destekler niteliktedir.⁶¹

Diğer taraftan Debashri ve ark. 2013 yılında yaptıkları 62 hastalık bir çalışmada Ki-67'nin skuamöz premalign larengeal lezyonlar ile skuamöz invaziv karsinomu karşılaştırmış tanılarda boyanma yüzdesi olarak anlamlı farklılıklar olduğunu bulmuşlardır. Malign potansiyelin arttıkça boyanma yüzdesinin arttığını ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirtmişlerdir.⁶⁰

Wayne ve Robinson 2006 yılında yaptığı bir çalışmada malign dönüşüm gösteren preparatlarda Ki-67 boyanmasını hafif - orta derece displazilerin karşılaştırılmasında ve hafif - ağır derece displazilerin karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmesine rağmen skuamöz hiperplazi - hafif derece displazi ve orta – ağır derece displazi arasında anlamlı bulunmamıştır. Tüm gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmemiştir. P53 boyanarak yapılan karşılaştırmada da displazi dereceleri ile boyanan hücreler arasında bir korelasyon izlenmemiştir.⁵⁶

Pignataro ve ark. yapmış oldukları 14 hafif displazi (LIN-1) ve 18 orta displazi (LIN-2) hastasının patoloji preparatları incelemesinde Ki-67 boyanmasının maligniteye ilerleyen hastalarda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığını saptamışlardır.⁵⁰

P53 TP53 geni tarafından kodlanan bir tümör supresor proteindir. Tüm epitelyal karsinomların içinde en fazla mutasyona uğrayan proteinlerin başında gelmektedir. P53 ekspresyon artışının malign transformasyonla doğru orantılı olduğu düşünülmektedir.^{50,60,61} Larenksin skuamöz epitelyal lezyonlarının P53 ile boyanması hala tartışmalı bir konudur. Çalışmamızda her ne kadar malign dönüşüm saptanan hastalarda yüzde olarak p53 boyanmasını daha fazla saptasak da istatistiksel olarak anlamlı bir bulgu elde edemedik ($p>0.05$). Aynı zamanda displazi derecesi ile p53 boyanması arasında da bir korelasyon izlenmemiştir. Jennah ve ark. 114 hastalık tedavi edilmemiş premalign larenks lezyonunda p53 boyanması ile kanser progresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulamamıştır.⁶²

Hirai ve ark. 20 skuamöz hiperplazi hastasının 6'sında, 19 displazi saptanan hastanın 3'ünde, 17 karsinom saptanan hastanın p53 ile anlamlı boyanma ($>5\%$) saptamışlar ve p53 ile histopatolojik bulgular arasında anlamlı bir ilişki

bulamamışlardır.⁶³ Yine Pignataro ve ark. da malign progresyon ile displazi dereceleri arasında anlamlı bir fark saptayamamıştır.⁵⁰

Gallo ve ark. yapmış olduğu çalışmada 15 malign transformasyon gösteren ve 15 malign transformasyon göstermeyen premalign larengeal lezyon hastasının incelenmesinde p53 boyanması ile kansere progresyon arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır.⁶¹ Yine Gallo ve ark. yapmış olduğu farklı bir çalışmada toplam 28 hastada vaka kontrol çalışması yapmış sonuçta p53 boyanmasının malign transformasyon olan grupta yüzde olarak daha yüksek olduğunu ama istatistiksel olarak anlamlı olmadığını sonucuna varmışlardır.⁶⁵

Yine Gale ve ark. 43 premalign larengeal lezyon ve 11 skuamöz hücreli karsinom sapanan hastalarda yapmış oldukları p53 boyama ile epitelial anormalite arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bulgu elde edememişlerdir. P53'ün premalign larengeal lezyonlarda bakılmasının çok düşük bir prediktif değer kattığını ve prognozu göstermede değerli bir belirteç olmadığını saptamışlardır.⁶⁴

Munckwikland ve ark. 38 hasta üzerinden yaptığı retrospektif bir çalışmada 9 hastanın malign dönüşüm gösterdiği, malign dönüşüm saptanan grupta p53 boyanması %36, malign dönüşüm gözlenmeyen grupta %18 olarak saptanmıştır. Bu durum istatistiksel olarak anlamlı izlenmiştir. Ama bu çalışmada ağır displazi grubu içine karsinoma in situ olan hastalar da dahil edilmiştir.⁶⁶

Yine Uhlman ve ark. yaptığı bir vaka-kontrol çalışmasında 18 malign dönüşüm izlenen ve 20 malign dönüşüm izlenmeyen kontrol grubunda yapılan p53 boyamasında, malign dönüşüm saptanan grupta p53 boyanmasının istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve p53'ün malignite potansiyelini göstermede güçlü bir belirteç olduğunu belirtmişlerdir.⁶⁷

Bizim çalışmamızda gerek Ki67 gerekse p53 immünohistokimyasal incelemesinde malign dönüşüm gösteren lezyonlar ile göstermeyenler arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Çalışmalar arasındaki farklılıkların birkaç nedeni aşağıda tartışılmıştır. Bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları vardı. Bunlardan birincisi

sadece immünohistokimya bakılmış olmasıdır. Genetik mutasyon analizi de yapıldığında bu sonuçlar başka bir çalışma ile tekrar ele alınabilir. Bunun dışında karsinogenez hiç durmayan bir süreçtir. İlk biyopsilerin uygulandığı süreçte fenotipik olarak eksprese olmamış olan bir marker belki bu devam eden süreç içerisinde eksprese olabilir. Bu çalışmanın kısıtlılıklarından bir tanesi de sürece ışık tutabilecek ara biyopsilerin bulunmamış olmasıdır. Ayrıca karsinogenez süreci çok bireysel bir süreçtir. Herkeste benzer hızda ve şekilde gerçekleşmemektedir. Bu çalışmanın amacı karsinogenez sürecini detaylı incelemek değil, alınan biyopsilerde immünohistokimyasal markerlar ile prognoz arasında var olabilecek potansiyel bir ilişkinin araştırılmasıdır. Bu açılardan da uzun takip süresi dikkate alındığında çok değerli sonuçları olan bir çalışmadır.

Phh-3 bir çekirdek proteini olan histon h-3'ün fosforillenmesi ile oluşan, interfaz hariç mitozun tüm safhasında saptanabilen bir proliferasyon markerıdır. Apoptoz ve nekroz durumunda seviyesi yükselmemesi spesifik bir proliferasyon göstergesi olması açısından anlamlıdır.^{32,33,34} Çalışmamızda phh-3 boyanma yüzdesinin malign progresyonu olan grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde malign progresyon olmayan gruba göre daha yüksek olduğunu gördük ($p<0.05$). Elde ettiğimiz bu bulguyu destekler şekilde Bosch ve ark. phh-3'ün epiteliyal baş boyun kanserlerinde güvenilir bir proliferatif marker olduğunu belirtmişlerdir.⁶⁸

Kapral ve ark. 32 larenks SCC tanılı hastada tümör dokusu ve tümörsüz cerrahi sınır dokusunda phh-3 seviyelerine gerçek zamanlı QRT-PCR yöntemi ile bakmış ve tümör dokusunda phh-3'ün anlamlı derecede fazla eksprese edildiğini saptamışlardır ($P = 0.0141$).⁶⁹

Chatrath ve ark 8 normal, 10 displastik ve 10 skuamöz hücreli karsinom tanısı almış larenks mukozasını incelemiş ve phh-3 ile boyanma yüzdelere bakmıştır. Normal larenks mukozasında %0.4, displastik mukozada %3.3, SCC mukozasında %1.3 boyanma yüzdesi görülmüş ve phh-3'ün malignite derecesi ile korelasyon izlenmemiştir ($p: 0.29$).⁷⁰

Fakat çalışmamızda olduğu gibi phh-3'ün premalign larengeal lezyonların malign progresyonu üzerine yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu anlamda çalışmamız bir ilk olması açısından değerlidir.

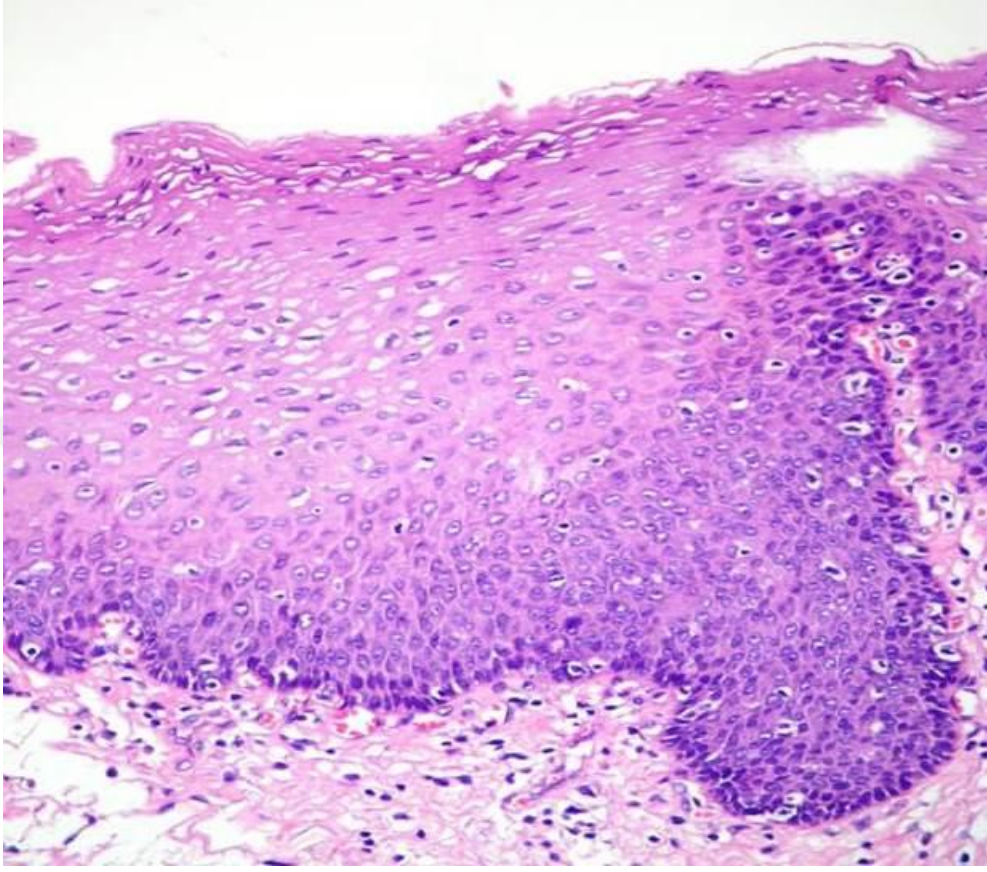
Alınan örnekler içinden displazi derecesi ile boyanma yüzdeleri arasında korelasyon izlenmedi. Bu durum farklı dispazik düzeylerde mitotik aktivitenin fazla olmasından kaynaklanabileceği gibi alınan örneklerin yüzeysel alınması ve mikroskop altında değerlendirmede bazal membran görülememesi gibi durumlar sebebiyle bizi yanıltmış olabilir.

Çalışmamızda malign dönüşüm gösteren sadece 1 adet LIN-3 preparatımız bulunmaktadır. Bu durum istatistiksel analiz yapabilmemize engel olmuştur. Çalışmamızın zayıf yönlerinden birisi de incelenen patoloji piyeslerinin sayısal olarak az oluşudur. Belki de preparat sayısı arttırılarak yapılacak bir çalışmada farklı sonuçlar elde edilebilir.

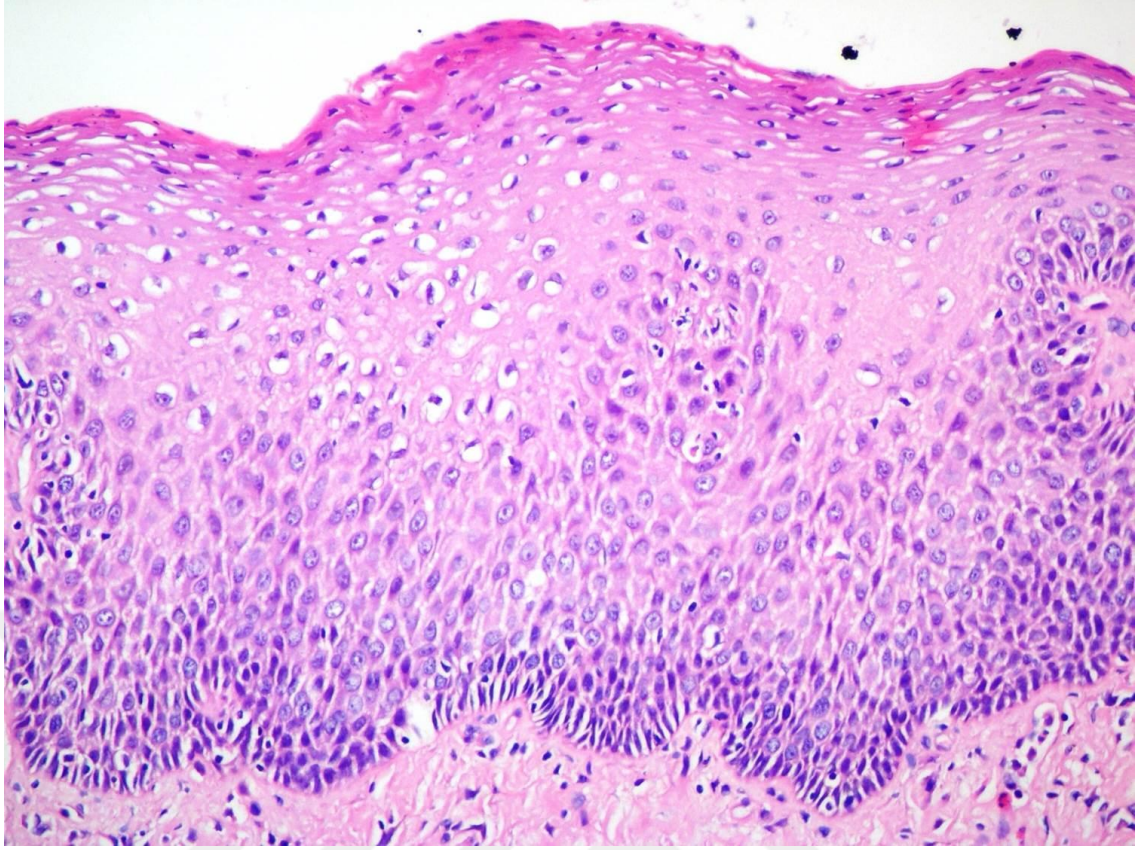
Hastaların malign progresyon sürelerine baktığımızda 5 hastanın 1 ay içinde, 2 hastanın 2 ay içinde malign dönüşüm gösterdiği izlenmektedir. Bu kadar erken olan malign dönüşüm acaba benign olarak alınan biyopsi örneği yetersiz miydi sorusunu akla getirmektedir.

Çalışmamızda phh-3 için malign progresyonu belirlemede güvenilir bir marker olduğunu saptadık. Boyanma yüzdesi 5 saptandığında sensitivitesi %72,2, spesifitesi %60 olarak izlendi. Tüm bunlar ışığında premalign larengeal lezyonlarda alınan patoloji örneğinde boyanma yüzdesi 5 ve üzerinde saptanırsa yakın takip gerektiğini düşünüyoruz.

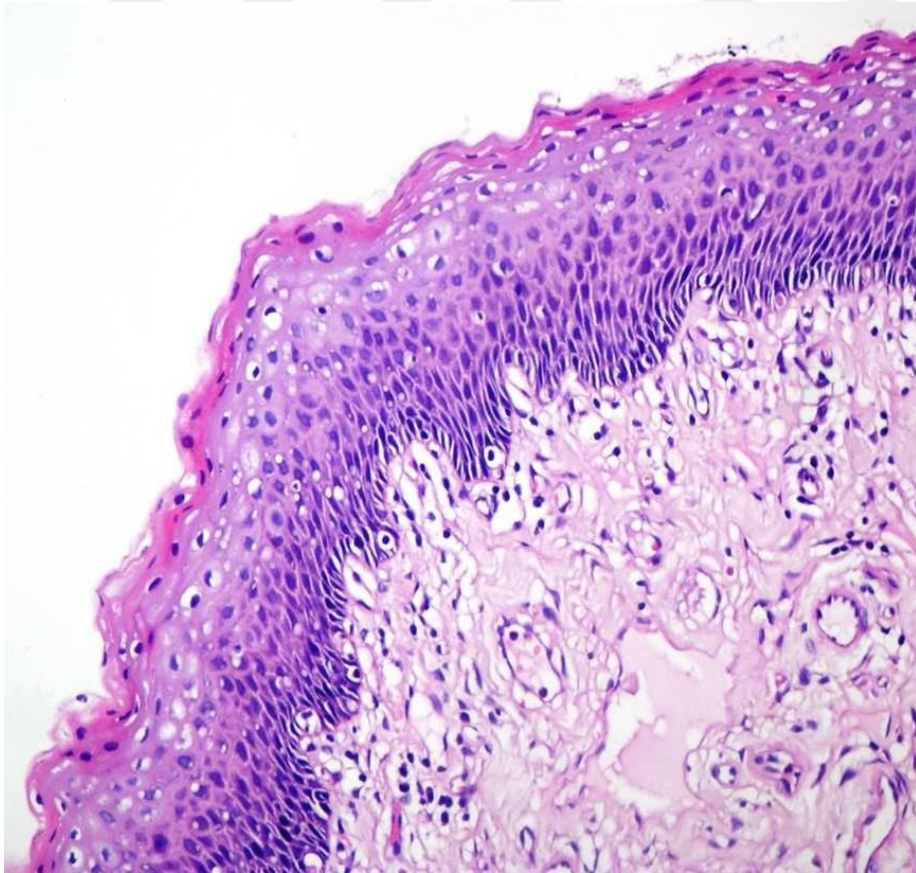
RESİMLER



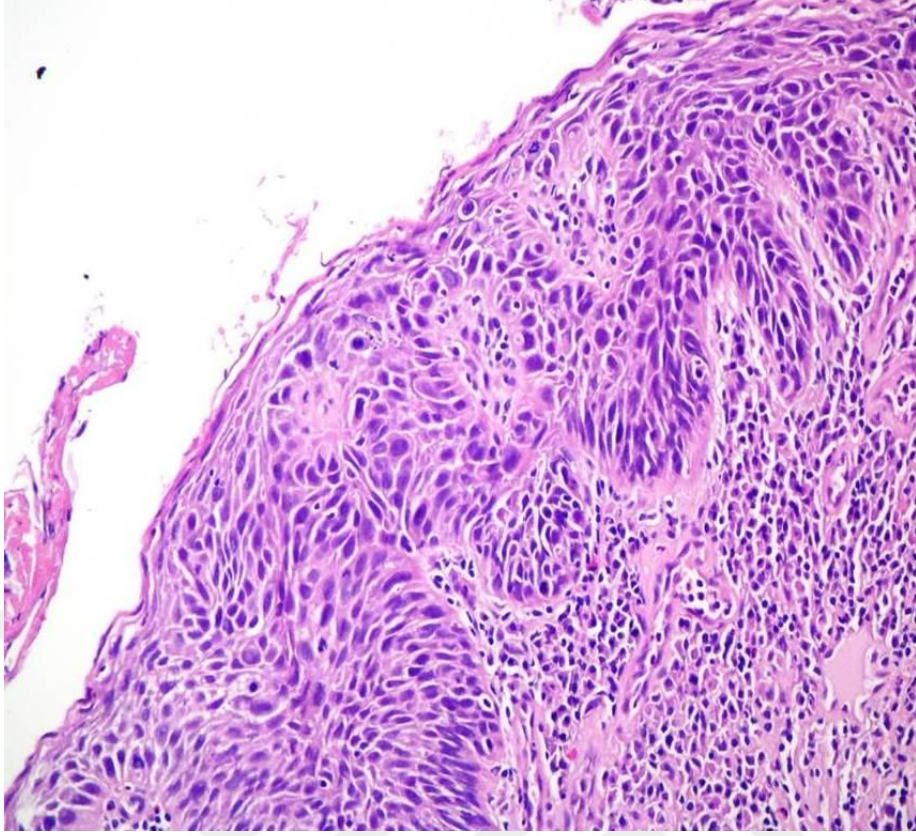
Resim5 - Skvamöz hiperplazi. Epitelde atipi olmaksızın proliferasyon. (HEx400)



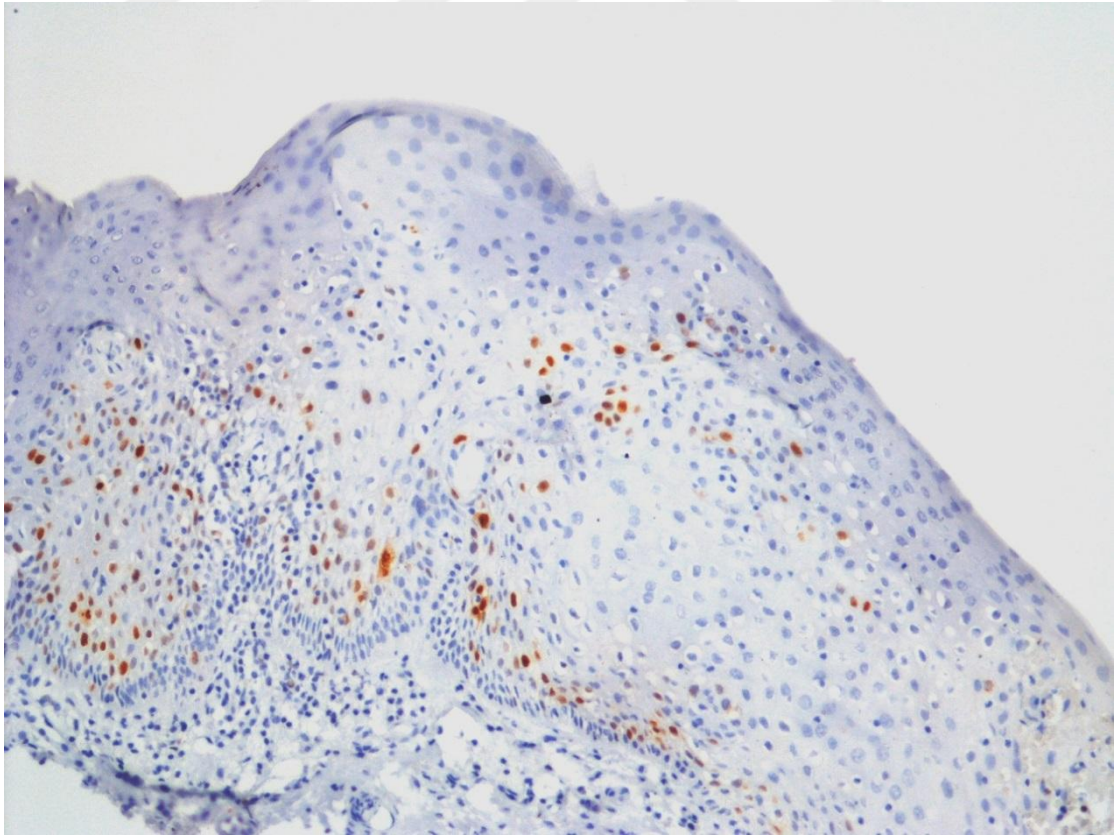
Resim6 LIN1. Epitelde proliferasyon ve 1/3 alt sıralarda atipi. (HE400)



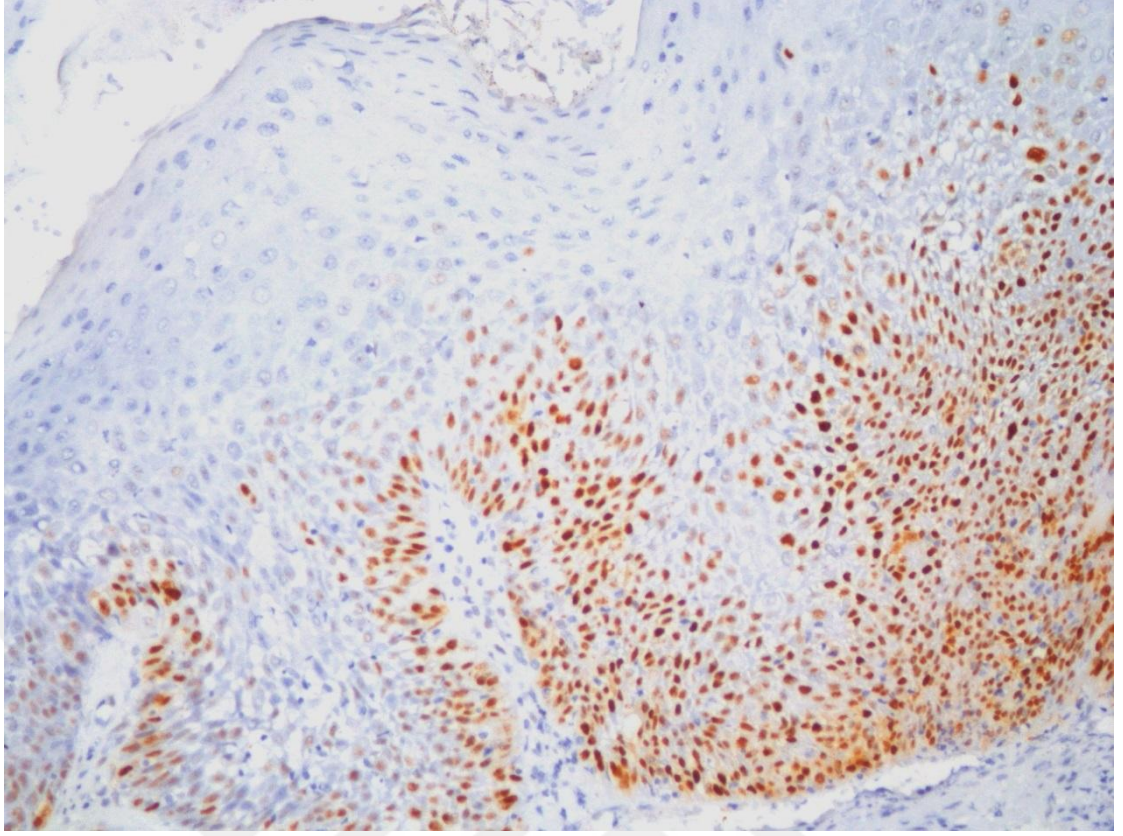
Resim7 LIN2. Epitelde proliferasyon ve 2/3 alt sıralarda atipi. (HE400)



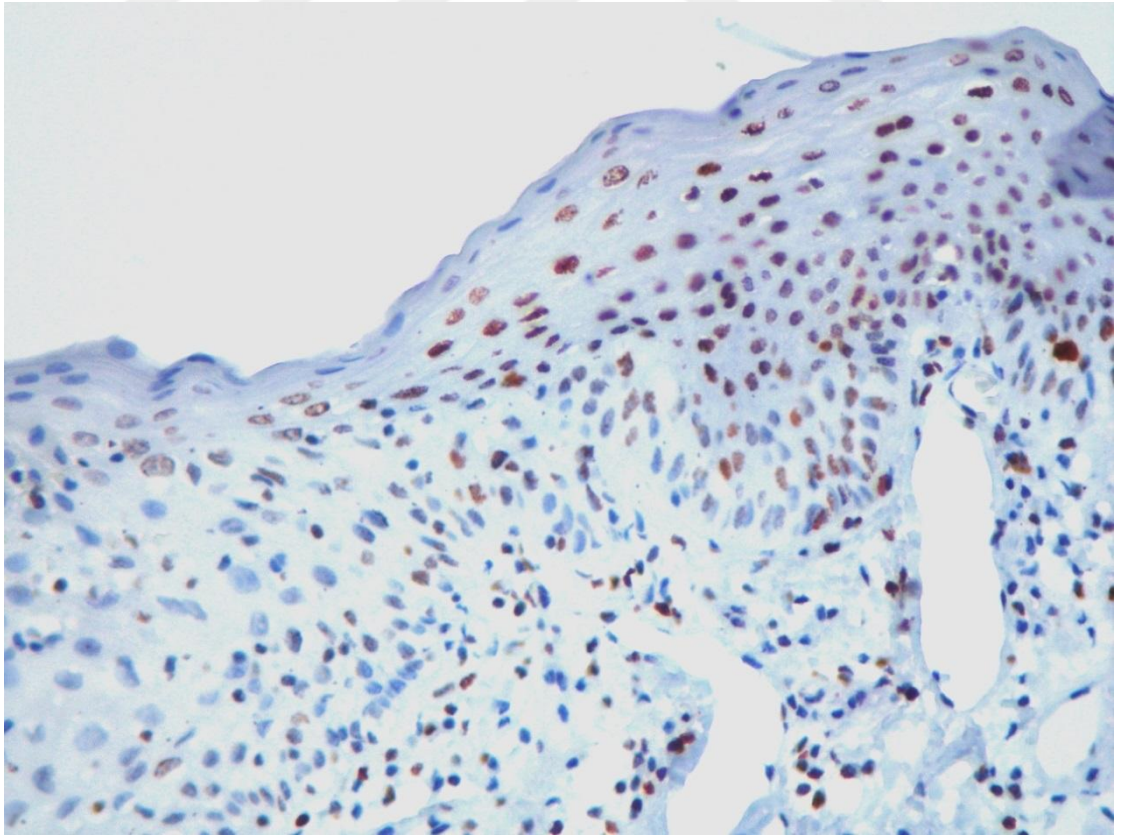
Resim8 LIN3. Epitelde proliferasyon ve tam kat atipi. (HEx400)



Resim9 - LIN2 olgusunda Ki-67 pozitivitesi (%25) (Anti-Ki-67x400)



Resim10 - LIN2 olgusunda p53 pozitivitesi (%80) (Anti-p53x400)



Resim11 - LIN2 olgusunda PHH3 pozitivitesi (%65) (Anti-PHH3x400)

KAYNAKLAR

1. Gnepp DR. Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck. 1st ed. Philadelphia:WBSaunders; 2000.
2. Kirchner JA, Carter D. Pathology of the Larynx. In: Mills SE, Carter D, Greenson JK, Oberman HA, Reuter V, Stoler MH, editors. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 1007-31.
3. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th ed. Toronto: Mosby Inc. ; 2004.
4. Mills SE, Fechner ER. Larynx and Pharynx. In Sternberg SS, editor. Histology for Pathologists. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott – Raven; 1997. p. 391-403.
5. Hızalan İ. Larenks Kanseri. Anatmik özellikler ve klinik gidiş. Engin K, Erişen L, editörler. Baş-Boyun Kanseri'nde. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2003. p. 345-52.
6. Sasaki CT, Driscoll BP, Gracco C. Larenks anatomi ve fizyolojisi. In Ballenger JJ, Snow JB, editors. Şenocak D, çeviri editörü. Otorinolaringoloji baş ve boyun cerrahisi. 16. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2000. p. 422-37.
7. Kaya S. Larenks Hastalıkları. İzmir: Bilimsel tıp yayınevi; 2002.
8. Weir N. Anatomy of the Larynx and Tracheobronchial tree. In: Alan GK, Michael G, editor. Scott-Brown's Otolaryngology. Vol 1, 6th ed. London: Butterworth-Heinemann Int; 1997. p. 12/1-27.
9. Janfaza P, Nadol J, Galla JR, Faban LR, Montgomery WW, editors. Cansız H, çev. ed. Başve Boyunun Cerrahi Anatomisi. İstanbul: Nobel Kitabevleri; 2002.
10. K.E. Blackwell, Y.S. Fu, T.C. Calcaterra, Laryngeal dysplasia, A clinicopathologic study, Cancer 75 (1995) 457–463
11. K. Shanmugaratnam, L.H. Sobin, The World Health Organization histological classification of tumours of the upper respiratory tract and ear. a commentary on the second edition, Cancer 71 (1993) 2689–2697
12. H. Hellquist, A. Cardesa, N. Gale, V. Kambic, L. Michaels, Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. A study by

members of the working group on epithelial hyperplastic laryngeal lesions of the European Society of Pathology, *Histopathology* 34 (1999) 226–233

13. The Ljubljana classification: a practical strategy for the diagnosis of laryngeal precancerous lesions. Gale N, Kambic V, Michaels L, Cardesa A, Hellquist H, Zidar N, Poljak M *Adv Anat Pathology*. 2000 Jul;7(4):240-51.

14. Surget S, Khoury MP, Bourdon JC (19 December 2013). "Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective". *OncoTargets and Therapy* 7: 57–68

15. Read, A. P.; Strachan, T..*Human molecular genetics* 2. New York: Wiley; 1999. ISBN 0-471-33061-2. Chapter 18: Cancer Genetics. 3. Matlashewski G, Lamb P, Pim D, Peacock J, Crawford L, Benchimol S (1984). "Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene". *EMBO J.* 3 (13): 3257–62.

16. Ziemer MA, Mason A, Carlson DM (1982). "Cell-free translations of proline-rich protein mRNAs". *J. Biol. Chem.* 257 (18): 11176–80.

17. Shyur LF, Lee SH, Chang ST, Lo CP, Kuo YH, Wang SY. Taiwanin A inhibits MCF-7 cancer cell activity through induction of oxidative stress, upregulation of DNA damage checkpoint kinases, and activation of p53 and FasL/Fas signaling pathways. *Phytomedicine* 2010;18:16-24.

18. Yu H, Huang YJ, Liu Z, Wang LE, Li G, Sturgis EM, Johnson DG, Wei Q (2011). "Effects of MDM2 promoter polymorphisms and p53 codon 72 polymorphism on risk and age at onset of squamous cell carcinoma of the head and neck". *Mol. Carcinog.* 50 (9): 697–706.

19. Lam M, Carmichael AR, Griffiths HR. An aqueous extract of *Fagonia cretica* induces DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells via FOXO3a and p53 expression. *PLoS One* 2012;7:e40152.

20. Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L, Debussche L (1998). "The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression". *EMBO J.* 17 (16): 4668–79.

21. Larsen S, Yokochi T, Isogai E, Nakamura Y, Ozaki T, Nakagawara A (2010). "LMO3 interacts with p53 and inhibits its transcriptional activity". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392 (3): 252–7.

22. Harms KL, Chen X (2005). "The C Terminus of p53 Family Proteins Is a Cell Fate Determinant". *Mol. Cell. Biol.* 25 (5): 2014–30.
23. Izawa H, Yonemitsu N, Shin T, Sugihara H (1999) Histopathological analysis of apoptosis, and expression of p53, bcl-2, bax, and Ki-67 in laryngeal squamous cell carcinomas and dysplasia. *Auris Nasus Larynx* 26:317–330
24. Ashraf MJ, Maghbul M, Azarpira N, Khademi B (2010) Expression of Ki67 and p53 in primary squamous cell carcinoma of the larynx. *Indian J Pathol Microbiol* 53:661–665
25. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol* 1990;1:199-206.
26. Masuda M, Iki M, Takano Y, Asakura T, Noguchi S, Ikeda I, et al. Prognostic significance of Ki-67 labeling index in urothelial tumors of the renal pelvis and ureter. *J Urol* 1996;155:1877-80; discussion 1880-1.
27. Lavertu P, Adelstein DJ, Myles J, Secic M. P53 and Ki-67 as outcome predictors for advanced squamous cell cancers of the head and neck treated with chemoradiotherapy. *Laryngoscope* 2001;111(11 Pt 1):1878-92.
28. Roland NJ, Caslin AW, Bowie GL, Jones AS. Has the cellular proliferation marker Ki67 any clinical relevance in squamous cell carcinoma of the head and neck? *Clin Otolaryngol* 1994;19:13-8.
29. Klintman M, Strand C, Ahlin C, et al. The prognostic value of mitotic activity index (MAI), phosphohistone H3 (PPH3), cyclin B1, cyclin A, and Ki67, alone and in combinations, in node-negative premenopausal breast cancer. *PLoS One*. 2013;8:e81902.
30. Tsuta K, Liu DC, Kalhor N, et al. Using the mitosis-specific marker anti-phosphohistone H3 to assess mitosis in pulmonary neuroendocrine carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2011;136:252–259.
31. Casper DJ, Ross KI, Messina JL, et al. Use of anti-phosphohistone H3 immunohistochemistry to determine mitotic rate in thin melanoma. *Am J Dermatopathol*. 2010;32:650–654.
32. Sauve DM, Anderson HJ, Ray JM, et al. Phosphorylation-induced rearrangement of the histone H3 NH2-terminal domain during mitotic chromosome condensation. *J Cell Biol*. 1999;145:225–235.

33. Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*. 1997;106:348–360.
34. Ladstein RG, Bachmann IM, Straume O, et al. Prognostic importance of the mitotic marker phosphohistone H3 in cutaneous nodular melanoma. *J Invest Dermatol*. 2012;132:1247–1252.
35. Tumours of the hypopharynx, larynx and trachea, in: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, (eds.) World Health Organization Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Pres: 108-162, Lyon 2005.
36. Bayazıt Y, Mumbuç S, Uçak R, Kanlıkama M, Bakır K : Significance of Fas protein in squamous cell carcinoma of the larynx. *Acta Otolaryngol* 2000; 120: 557-61.
37. Hamann KJ, Dorcheid DR, Ko FD, et al.: Expression of Fas (CD95) and Fas ligand (CD95L) in human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 537-42.
38. Bayazıt Y, Mumbuç S, Uçak R, Kanlıkama M, Bakır K : Significance of Fas protein in squamous cell carcinoma of the larynx. *Acta Otolaryngol* 2000; 120: 557-61.
39. Bacciu A, Mercante G, Ingegnoli A, et al.: Effects of gastroesophageal reflux disease in laryngeal carcinoma. *Clin Otolaryngol* 2004; 29: 545-48.
40. Tumours of the hypopharynx, larynx and trachea, in: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, (eds.) World Health Organization Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Pres: 108-162, Lyon 2005.
41. Batur Ş : Larinks skuamöz hücreli karsinomlarında FAS, FAS Ligand ve Ki-67 ekspresyonunun klinikopatolojik parametrelerle karşılaştırılması (uzmanlık tezi), İstanbul: Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim Hastanesi, Patoloji Bölümü, 2004.
42. Blackwell KE, Fu YS, Calcaterra TC (1995) Laryngeal dysplasia. A clinicopathologic study. *Cancer* 75:457–463
43. Gale N, Michaels L, Luzar B, Poljak M, Zidar N, Fischinger J et al (2009) Current review on squamous intraepithelial lesions of the larynx. *Histopathology* 54:639–656

44. Dispenza F, De Stefano A, Marchese D, Martines F, Dispenza C (2012) Management of laryngeal precancerous lesions. *Auris Nasus Larynx* 39(3):280–283
45. S. M. Ragab, M. N. Elsheikh, M. E. Saafan, and S. G. Elsherief, “Radiophonosurgery of benign superficial vocal fold lesions,” *The Journal of Laryngology & Otology*, vol. 119, no. 12, pp. 961–966, 2005
46. S. Restivo, R. Speciale, R. Gargano, R. Di Leo, F. Farinella, and S. Gallina, “Radiosurgery in the treatment of the glottic plane carcinoma,” *Operative Techniques in Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, vol. 14, no. 2, pp. 153–156, 2003.
47. V. Divi, M. Benninger, M. Kiupel, and A. Dobbie, “Coblation of the canine vocal fold: a histologic study,” *Journal of Voice*, vol. 26, no. 6, pp. 811–e13, 2012.
48. Sadri M, McMahon J, Parker A (2006) Management of laryngeal dysplasia: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 263:843–852
49. Eversole LR (2009) Dysplasia of the upper aerodigestive tract squamous epithelium. *Head Neck Pathol* 3:63–68
50. Pignataro L, Capaccio P, Pruneri G et al (1998) The predictive value of p53, MDM-2, cyclin D1 and Ki67 in the progression from low-grade dysplasia towards carcinoma of the larynx. *J Laryngol Otol* 112:455–459
51. Krecicki T, Jeleń M, Zaleska-Krecicka M, Szkudlarek T, Szajowski K (1999) Immunohistochemically stained markers (p53, PCNA, bcl-2) in dysplastic lesions of the larynx. *Cancer Lett* 143:23–28
52. Rodrigo JP, García-Carracedo D, González MV, Mancebo G, Fresno MF, García-Pedrero J (2010) Podoplanin expression in the development and progression of laryngeal squamous cell carcinomas. *Mol Cancer* 9:48
53. Rodrigo JP, Álvarez-Alija G, Tirados Meneández S et al (2011) Cortactin and focal adhesion kinase as predictors of cancer risk in patients with laryngeal premalignancy. *Cancer Prev Res* 4:1333–1341
54. Papadimitrakopoulou V, Izzo JG, Liu DD et al (2009) Cyclin D1 and cancer development in laryngeal premalignancy patients. *Cancer Prev Res* 2:14–21
55. Devaney KO, Rinaldo A, Zeitel SM, Bradley PJ, Ferlito A (2004) Laryngeal dysplasia and other epithelial changes on endoscopic biopsy: what does it all mean to the individual patient? *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 66(1):1–4

56. Wayne S, Robinson RA (2006) Upper aerodigestive tract squamous dysplasia: correlation with p16, p53, pRb, and Ki-67 expression. *Arch Pathol Lab Med* 130:1309–1314
57. Mirza S, Jeannon JP, Soames J, Wilson JA (2006) Is Ki67 a marker for the transformation of laryngeal dysplasia to carcinoma? *Acta Otolaryngol* 126:418–421
58. Plch J, Pa'r I, Navra'tilova' I, Bla'hova' M, Zavadil M (1998) Long term follow-up study of laryngeal precancer. *Auris Nasus Larynx* 25:407–412
59. Hirano M, Sato K (1993) Laser surgery for epithelial hyperplasia of the vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 102:85–91
60. Debashri Mondal ,Kaushik Saha, Chhanda Datta, Uttara Chatterjee, Arunabho Sengupta Ki67, p27 and p53 Expression in Squamous Epithelial Lesions of Larynx *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* (April–June 2013) 65(2):126–133
61. Gallo O, Franchi A, Chiarelli I et al (1997) Potential biomarkers in predicting progression of epithelial hyperplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol Suppl* 527:30–38
62. Jeannon JP, Soames JV, Aston V, Stafford FW, Wilson JA (2004)Molecular markers in dysplasia of the larynx: expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27, and p53 tumoursuppressor gene in predicting cancer risk. *Clin Otolaryngol AlliedSci* 29:698–704
63. Hirai T, Hayashi K, Takumida M, Ueda T, Hirakawa K, Yajin K (2003) Reduced expression of p27 is correlated with progression in precancerous lesions of the larynx. *Auris Nasus Larynx* 30:163–168
64. Gale N, Zidar N, Kambic V, Poljak M, Cör A.Epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 and p53 overexpressions in epithelial hyperplasticlesions of the larynx.*Acta Otolaryngol Suppl.* 1997;527:105-10.
65. Gallo O, Santucci M, Franchi A (1997) Cumulative prognostic value of p16/CDKN2 and p53 oncoprotein expression in premalignant laryngeal lesions. *J Natl Cancer Inst* 89:1161–1163
66. Munck-Wikland E, Edström S, Jungmark E, Kuylensstierna R, Lindholm J, Auer G (1994) Nuclear DNA content, proliferating-cell nuclear antigen (PCNA) and p53 immunostaining in predicting progression of laryngeal cancer in situ lesions. *Int J Cancer* 56:95–99

67. Uhlman DL, Adams G, Knapp D, Aeppli DM, Niehans G (1996) Immunohistochemical staining for markers of future neoplastic progression in the larynx. *Cancer Res* 56:2199–2205
68. Bosch FX, Udvarhelyi N, Venter E, Herold-Mende C, Schuhmann A, Maier H, Weidauer H, Born AI (1993) Expression of the histone H3 gene in benign, semi-malignant and malignant lesions of the head and neck: a reliable proliferation marker. *Eur J Cancer* 29:1454–1461
69. Malgorzata Kapral, Barbara Strzalka-Mrozik, Malgorzata Kowalczyk, Jaroslaw Paluch, Joanna Gola, Tatiana Gierek, Ludmila Weglarz Transcriptional activities of histone H3, cyclin D1 and claudin 7 encoding genes in laryngeal cancer *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2011) 268:709–714
70. P Chatrath, IS Scott, LS Morris, RJ Davies, K Bird, SL Vowler, N Coleman Immunohistochemical estimation of cell cycle phase in laryngeal neoplasia *British Journal of Cancer* (2006) 95, 314 – 321