



T.C.



İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ - CERRAHPAŞA

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ

KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI



ANABİLİM DALI

**LARENKS KANSERİ HASTALARINDA İMMÜN
MİKROÇEVRENİN TAYİNİ, REGULATUAR T HÜCRE
MARKERLARINDAN TIM-3 VE LAG-3
EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ VE
PROGNOZA ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Fırat TEVETOĞLU

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr. Haydar Murat YENER

İstanbul – 2021

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ - CERRAHPAŞA

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ

KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI

ANABİLİM DALI

**LARENKS KANSERİ HASTALARINDA İMMÜN
MİKROÇEVRENİN TAYİNİ, REGULATUAR T HÜCRE
MARKERLARINDAN TIM-3 VE LAG-3
EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ VE
PROGNOZA ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Fırat TEVETOĞLU

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr. Haydar Murat YENER

İstanbul – 2021

ÖNSÖZ

Eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen başta anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ahmet Özdoğan, eski anabilim dalı başkanımız ve dekanımız Prof. Dr. Özgün Enver ve kliniğimize çok emeği geçmiş rahmetli hocamız Prof. Dr. Yalçın Oran olmak üzere; değerli hocalarım Prof. Dr. Cengiz Yağız, Prof. Dr. Tahir Altuğ, Prof. Dr. Hüsnü Özek, Prof. Dr. İrfan Devranoğlu, Prof. Dr. Salih Çanakçıoğlu, Prof. Dr. İrfan Papila, Prof. Dr. Mehmet Ada, Prof. Dr. Harun Cansız, Prof. Dr. Fatih Öktem, Prof. Dr. Ender İnci, Prof. Dr. Emin Karaman, Doç. Dr. Ayşegül B. Karaaltın'a; her konuda bize yardıma hazır kıymetli uzmanlarımız Dr. Öğr. Üyesi Yetkin Z. Yılmaz, Dr. Öğr. Üyesi E. Deniz Gözen ve Uz. Dr. Doğan Çakan'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimin hazırlanma sürecinde eşsiz sabrı, özverisi, güzel kalbiyle hep yanımda olan ve bundan sonraki ömrümde öz ağabeyim gibi göreceğim değerli hocam Doç. Dr. H. Murat Yener'e,

Tezimin hazırlanma sürecinde yardımlarını benden esirgemeyen ve büyük bir özveri ile bana destek olan Prof. Dr. Nil Çomunoğlu'na,

Burada geçirdiğim beş sene boyunca beraber güldüğümüz beraber üzüldüğümüz, zor günleri beraber kolaylaştırdığımız sevgili asistan arkadaşlarıma,

İşlerini her zaman büyük bir özveri ile yapan başta Prof. Dr. Ahmet Ataş olmak üzere Odyoloji Bölümü'nün tüm değerleri hocalarına, uzmanlarına ve çalışanlarına,

Birlikte çalışmaktan her zaman çok keyif aldığım, yardımı ve emeği dokunmuş hemşire, sekreter ve personel tüm mesai arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca beni her zaman destekleyen, her kararında arkamda olduklarını bildiğim, yetişmemde hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, haklarını ne yapsam ödeyemeyeceğim annem Seval Tevetoğlu ve babam Hüseyin Tevetoğlu'na,

Son olarak, tıp fakültesi günlerinden beri her zaman yanımda olan ve ömrümün sonuna kadar da yanımda olacak olan, her alanda en büyük destekçim sevgili eşim Işıl Tevetoğlu'na,

sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER ve KISALTMALAR	i
ŞEKİLLER DİZİNİ	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ETİK KURUL ONAYI	vi
TEZ FİNANSAL DESTEK BİLDİRİMİ	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	1
2.1. Larenks Anatomisi, Histolojisi, Embriyolojisi ve Fizyolojisi	4
2.1.1. Larenks Kartilajları	4
2.1.2. Larenks Eklemleri	4
2.1.3. Larenks Kasları	5
2.1.4. Larenksin Vaskülarizasyonu, Lenfatik Drenajı ve İnervasyonu	6
2.1.5. Larenksin Alt Bölgeleri	6
2.1.6. Larenks Histolojisi	6
2.1.7. Laringeal Membranlar ve Boşluklar:	7
2.2. Larenks Kanseri	8
2.2.1. Epidemiyoloji	8

2.2.2. Etiyoloji.....	8
2.2.3. Klinik Prezantasyon	8
2.2.4. Tanı ve Değerlendirme.....	9
2.2.5. Larenks Kanserlerinde Evreleme	9
2.2.6. Larenks Kanserlerinde Tedavi	13
2.2.6.1. Glottik Kanserlerde Tedavi.....	13
2.2.6.2. Supraglottik Kanserlerde Tedavi	14
2.2.6.3. Subglottik Kanserlerde Tedavi	14
2.3. Kanser Tedavisinde Paradigma Değişikliği	15
2.4. Kanser İmmünolojisi	16
2.5. Kanserlerde İmmün Mikroçevre.....	17
2.5.1. Tümör İnfiltrate Eden Lenfositler (TIL)	18
2.5.1.1. T Lenfositler	18
2.5.1.2. B Lenfositler	23
2.5.2. İmmün Checkpoint Mekanizmalar.....	23
2.5.2.1. T Cell Immunoglobulin and Mucin Domain (TIM-3).....	24
2.5.2.2. Lymphocyte Activation Gene -3 (LAG-3)	24
2.6. İmmünoterapi	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Gereç	28
3.1.1. Çalışma Grubu	28

3.1.2. Kullanılan Cihazlar	29
3.1.3. Kullanılan Ticari Kitler	30
3.1.4. Kullanılan Sarf Malzemeler	31
3.2. Yöntem	32
3.2.1. İmmünohistokimya boyaması	32
3.2.2. İmmünohistokimya preparatlarının değerlendirilmesi	32
3.2.2.1. Tümör infiltre eden lenfositlerin sınıflandırılması.....	33
3.2.2.2. TIM-3 ve LAG-3 ekspresyonu	33
3.2.3. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	33
4. BULGULAR.....	35
5. TARTIŞMA.....	64
6. SONUÇ	78
7. KAYNAKLAR	79
8. ÖZGEÇMİŞ	99
9. İNTİHAL TARAMA RAPORU	104

SİMGELER ve KISALTMALAR

SHK	: Skuamöz hücreli karsinom
HPV	: Human Papilloma Virüs
LFR	: Laringofarengeal Reflü
BT	: Bilgisayarlı Romografi
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
PET	: Pozitron Emisyon Tomografi
18-FDG	: 18 F-florodeoksiglukoz
AJCC	: American Joint Committee on Cancer
UICC	: Union for International Cancer Control
TNM	: Tümör Nod Metastaz
RT	: Radyoterapi
KRT	: Kemoradyoterapi
SKPL	: Suprakrikoid parsiyel larenjektomi
SGPL	: Supraglottik parsiyel larenjektomi
KHEP	: Krikohyoidoepiglottopeksi
KHP	: Krikohyoidopeksi
APC	: Antigen Presenting Cell (APC)
MHC	: Major Histocompatibility Complex

TCR	: T Cell Receptor
CD	: Cluster of Differentiation
TIL	: Tümör İnfiltrate Eden Lenfositler
Treg	: Regulatuar T Lenfositler
CTL	: Sitotoksik T Lenfositler
Th	: Yardımcı T Lenfositler
LAG-3	: Lymphocyte Activation Gene-3
TIM-3	: T-Cell Immunoglobulin and Mucin Domain
Ceacam-1	: Carcinoembryonic Antigen Cell Adhesion Molecule 1
IL	: Interleukin
IFN	: Interferon
TNF	: Tumor Necrosis Factor
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
PD-1	: Programmed Cell Death -1
PD-L1	: Programmed Cell Death Ligand -1
CTLA-4	: Cytotoxic T Lymphocyte Antigen
TCGA	: The Cancer Genome Atlas
IHK	: İmmünohistokimya

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2-1: Larenksin lateral görüntüsü. Larenks sagital olarak orta hattan kesildiğinden krikoid ve aritenoid kıkırdaklar arasındaki ilişki görülmektedir. [Seikel JA, King DW, Drumright DG. Anatomy ve Physiology for Speech, Language and Hearing. 4. Baskı].	5
Şekil 2-2: Koronal kesitte larenks boşluğunun posteriordan görüntüsü. [Seikel JA, King DW, Drumright DG. Anatomy ve Physiology for Speech, Language and Hearing. 4. Baskı].	7
Şekil 2-3: Anti-tümoral immün yanıt ile ilişkili hücrelerin ve tümör mikroçevresindeki immünsupressif mekanizmaların şematik gösterimi. [Chen SMY, Krinsky AL, Woolaver RA, Wang X, Chen Z, Wang JH. Tumor immune microenvironment in head and neck cancers. Mol Carcin. 2020;59(7):766-774. doi:10.1002/mc.23162)]	17
Şekil 2-4: Kansere karşı immün yanıtta regülatuar T lenfositlerin (Treg) rolü. Treg baskın mikroçevrede immünsupresyon nedeni ile kanser progresyonu daha belirgin olurken, CD8+ T lenfosit (sitotoksik T lenfosit) baskın ortamda ise tümör progresyonu baskılanır. [Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. Int Immunol. 2016;28(8):401-409. doi:10.1093/intimm/dxw025].	22
Şekil 2-5: Ko-inhibitör ve ko-stimülatör checkpoint moleküller. [Forster MD, Devlin MJ. Immune checkpoint inhibition in head and neck cancer. Front Oncol. 2018;8(AUG). doi:10.3389/fonc.2018.00310].	25
Şekil 2-6: İmmünoterapide kullanılan monoklonal antikorlar ve hedef aldıkları immün checkpointler (Forster MD, Devlin MJ. Immune checkpoint inhibition in head and neck cancer. Front Oncol. 2018;8(AUG). doi:10.3389/fonc.2018.00310).	27
Şekil 4-1: İmmünohistokimya ile CD3+ lenfositlerin (T lenfosit) gösterimi. A) CD3 yüksek (200x). B) CD3 düşük (200x).	43
Şekil 4-2: İmmünohistokimya ile CD20+ lenfositlerin (B lenfosit) gösterimi. A) CD20 yüksek (200x). B) CD20 düşük (200x).	43
Şekil 4-3: İmmünohistokimya ile CD4+ lenfositlerin (yardımcı T lenfosit) gösterimi. A) CD4 yüksek (200x). B) CD4 düşük (200x).	43
Şekil 4-4: İmmünohistokimya ile CD8+ lenfositlerin (sitotoksik T lenfosit) gösterimi. A) CD8 yüksek (200x). B) CD8 düşük (200x).	44

Şekil 4-5: İmmünohistokimya ile CD25+ lenfositlerin gösterimi. A) CD25 yüksek (200x). B) CD25 düşük (200x).	44
Şekil 4-6: İmmünohistokimya ile FoxP3+ lenfositlerin (regulator T lenfosit) gösterimi. A) FoxP3 yüksek (200x). B) FoxP3 düşük (200x).	44
Şekil 4-7: İmmünohistokimya ile TIM-3 ekspresyonunun gösterimi. A) TIM-3 pozitif (400x). B) TIM-3 negatif (200x).....	45
Şekil 4-8: İmmünohistokimya ile LAG-3 ekspresyonunun gösterimi. A) LAG-3 pozitif (200x). B) LAG-3 negatif (200x).	45
Şekil 4-9: CD3 ile a) ortalama sağkalım (OS) ve b) hastalığa özgü sağkalım (DSS) arasındaki ilişkinin Kaplan-Meier grafikleri ile gösterimi.	56
Şekil 4-10: Hastalığa özgü sağkalım (DSS) ile a) CD20 ve b) CD4 ile arasındaki ilişkinin Kaplan-Meier grafikleri ile gösterimi	57
Şekil 4-11: Hastalıksız sağkalım (DFS) ile a) inflamatuvar yanıt yoğunluğu, b) CD3, c) CD20 ve d) CD4 ilişkisinin Kaplan-Meier grafikleri ile gösterimi	58
Şekil 4-12: Rekürrenssiz sağkalım (RFS) ile a) inflamatuvar yanıt yoğunluğu, b) CD3, c) CD20 ve d) CD4 ilişkisinin Kaplan-Meier grafikleri ile gösterimi.	59
Şekil 4-13: Tüm hasta popülasyonunda TIM-3 ekspresyonunun sağkalım parametreleri ile ilişkisinin Kaplan-Meier grafikleri ile gösterimi. a) ortalama sağkalım (OS), b) hastalığa özgü sağkalım (DSS), c) hastalıksız sağkalım (DFS), d) rekürrenssiz sağkalım (RFS).	60
Şekil 4-14: Tüm hasta popülasyonunda LAG-3 ekspresyonunun sağkalım parametreleri ile ilişkisinin Kaplan-Meier grafikleri ile gösterimi. a) ortalama sağkalım (OS), b) hastalığa özgü sağkalım (DSS), c) hastalıksız sağkalım (DFS), d) rekürrenssiz sağkalım (RFS).	61
Şekil 4-15: Tümöre karşı immün yanıtı düşük olan grupta TIM-3 ekspresyonunun sağkalım parametreleri ile ilişkisinin Kaplan-Meier grafikleri ile gösterimi. a) ortalama sağkalım (OS), b) hastalığa özgü sağkalım (DSS), c) hastalıksız sağkalım (DFS), d) rekürrenssiz sağkalım (RFS).	62
Şekil 4-16: Tümöre karşı immün yanıtı düşük olan grupta LAG-3 ekspresyonunun sağkalım parametreleri ile ilişkisinin Kaplan-Meier grafikleri ile gösterimi. a) ortalama sağkalım (OS), b) hastalığa özgü sağkalım (DSS), c) hastalıksız sağkalım (DFS), d) rekürrenssiz sağkalım (RFS).	63

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2-1. TNM sınıflamasına göre larenks kanserlerinde T evresi	10
Tablo 2-2. TNM sınıflamasına göre bölgesel lenf nodu (pN) evresi	12
Tablo 2-3. TNM sınıflamasına göre uzak metastaz (M) evresi.....	12
Tablo 2-4. Laringeal kanserlerin evreleri	13
Tablo 4-1: Hastaların demografik özellikleri	35
Tablo 4-2: Hastaların tümör bölgesi, operasyon tipi, boyun diseksiyonu türü, postoperatif adjuvan radyoterapi ve kemoterapi öykülerine göre dağılımı	36
Tablo 4-3: Hastalığın TNM evrelemesine ve tümörün histopatolojik özelliklerine göre dağılımı	38
Tablo 4-4: Hastaların takip süreleri ve parametreleri.....	39
Tablo 4-5: İmmünohistokimya ile değerlendirilen parametrelerin tanımlayıcı verilerinin ve hastalara göre dağılımının özeti.....	41
Tablo 4-6: CD3 ve CD20 ile histopatolojik ve klinik parametreler arasındaki ilişki.	46
Tablo 4-7: CD4 ve CD8 ile histopatolojik ve klinik parametreler arasındaki ilişki .	48
Tablo 4-8: CD25 ve FoxP3 ile histopatolojik ve klinik parametreler arasındaki ilişki	50
Tablo 4-9: Tüm hasta popülasyonunda TIM-3 ve LAG-3 ekspresyonları ile histopatolojik ve klinik parametreler arasındaki ilişki	52
Tablo 4-10: Tümöre karşı immün yanıtı düşük olan grupta TIM-3 ve LAG-3 ekspresyonları ile histopatolojik ve klinik parametreler arasındaki ilişki.....	54

ETİK KURUL ONAYI

İÜC Tarih ve Sayı: 08/08/2019-122



T.C.
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı :83045809-604.01.02-
Konu :Uzm.Öğr.Dr.Fırat
TEVETOĞLU'nun etik kurul kararı
A-44

KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :19.07.2019 tarih, 93777809-604.01.01-110878 sayılı yazı

Anabilim Dalımız öğretim üyesi Doç.Dr.Haydar Murat YENER'in danışmanlığında Uzm.Öğr.Dr.Fırat TEVETOĞLU'nun yürütücülüğünde Doç.Dr.Nil Üstündağ ÇOMUNOĞLU'nun yardımcılığında "Larenks Kanseri Hastalarında İmmün Mikroçevrenin Tayini, Regulator T Hücre Markerlarından TIM-3 ve LAG-3 Ekspresyonlarının Belirlenmesi ve Prognostik Etkileri" başlıklı Uzmanlık Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 06 Ağustos 2019 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

e-İmzalı
Prof. Dr. Suat Nail ÖMEROĞLU
Bölüm Başkanı V.

Yönetmelik gereği Sonuç Raporunun ve Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Desteği onay belgesinin Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna iletilmesi gerekmektedir.

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak için:<http://dogrulama.istanbulc.edu.tr/enVision.sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BEKVEHA63>

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL

Tel : 0 (212) 414 30 00 Faks : 0 (212) 632 00 33

e-posta : ctfpersonel@istanbulc.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbulc.edu.tr

TEZ FİNANSAL DESTEK BİLDİRİMİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: 34821, Proje Kodu TTU-2020-34821'dir.



ÖZET

Amaç: Larenks kanserlerinde sağ kalım oranları, birçok kanserde olduğu gibi, olumlu bir değişiklik göstermemektedir. Araştırmalar özellikle kansere karşı immün yanıt üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmanın amacı da kanser etyopatogenezinde önemli rol oynadığı gösterilen immün mikroçevredeki tümör infiltre eden lenfositlerin alt gruplarının dağılımının ve kanser hücrelerinin immün yanıtta kaçışında rol oynayan TIM-3 ve LAG-3 belirteçlerinin prognoz ile ilişkisinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: 2016-2018 tarihleri arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda larenks skuamöz hücreli karsinomu nedeniyle açık cerrahi yöntemle larenjektomi yapılan 50 hasta üzerinde yapılmıştır. Hastaların tümör dokusu içeren patoloji spesimenleri CD3, CD20, CD8, CD4, CD25, FoxP3, TIM-3, LAG-3 belirteçlerinin ekspresyonunun tespiti açısından immünohistokimya metoduyla değerlendirilmiştir. Bu belirteçler ile tümörün histopatolojik özellikleri ve sağkalım arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Bulgular: CD3, CD20 ve CD4 infiltrasyonunun yüksek olması hastalığa özgü sağkalım, hastalıksız sağkalım ve rekürrensiz sağkalım parametrelerini olumlu etkilemektedir. TIM-3 pozitifliği özellikle tümöre karşı immün yanıtı düşük grupta ortalama sağkalımı negatif etkilemektedir ($p=0,045$). LAG-3 pozitifliği ise tüm hastalarda daha kötü rekürrensiz sağkalım ile ilişkili bulunmuştur ($p=0,015$).

Sonuç: Tümöre karşı immün yanıtın yoğunluğunu ifade eden CD3, CD20, CD4 infiltrasyonları iyi prognostik faktörler olarak ön plana çıkmaktadır. TIM-3 ekspresyonu intratümöral immün yanıtı düşük olan hasta popülasyonunda sağkalımı etkileyen önemli bir negatif prognostik belirteçtir. LAG-3 ise yine tüm hasta popülasyonunda sağkalım parametrelerini olumsuz etkileyen bir belirteç olarak ön plana çıkmaktadır. Bu açıdan immünoterapide yeni hedef moleküller arasında yer almaları olası gözükmemektedir.

Anahtar kelimeler: Larenks kanseri, immün mikroçevre, tümör infiltre eden lenfositler, TIM-3, LAG-3

ABSTRACT

Objective: Survival rates in laryngeal cancers have not been improved over years as in many cancers. Researches have focused especially on the immune response against cancer. The aim of this study is to investigate the distribution of subgroups of tumor infiltrating lymphocytes in the immune microenvironment, as well as the expression of TIM-3 and LAG-3 markers with histopathological characteristics of tumor and prognosis.

Material and Method: Study was performed on 50 patients who underwent open surgery laryngectomy for laryngeal squamous cell carcinoma between 2016-2018 in the Department of Otorhinolaryngology, Cerrahpaşa Medical Faculty. Pathology specimens containing tumor tissue were evaluated by immunohistochemistry method in terms of determining the expression of CD3, CD20, CD8, CD4, CD25, FoxP3, TIM-3, LAG-3 markers. The relationship between these markers and the histopathological features of the tumor and survival was investigated.

Results: High CD3, CD20 and CD4 infiltration positively affects disease-specific survival, disease-free survival and recurrence-free survival parameters. TIM-3 positivity negatively affects the mean survival, especially in the group with low immune response to the tumor ($p = 0.045$). LAG-3 positivity was found to be associated with worse recurrence-free survival in all patients ($p = 0.015$).

Conclusion: CD3, CD20, CD4 infiltrations, which express the intensity of the immune response against the tumor, stand out as good prognostic factors. TIM-3 expression is an important negative prognostic marker affecting survival in a patient population with low intratumoral immune response. LAG-3, on the other hand, comes to the fore as a marker that negatively affects survival parameters in all patient population. In this respect, it seems possible that they are among the new target molecules in immunotherapy.

Keywords: Laryngeal cancer, immune microenvironment, tumor infiltrating lymphocytes, TIM-3, LAG-3

1. GİRİŞ

Larenks kanserleri baş boyun kanserleri arasında, cilt kanserleri dahil edilmediğinde, en sık görülen malignite olup, 5 yıl ve üzeri sağ kalım tüm larenks kanserleri arasında %67'dir [1].

Son 50 yıldır kansere karşı mücadele dünya genelinde giderek yoğunlaşmakta, yeni tanı ve tedavi metotlarının geliştirilmesine çalışılmakta, ancak buna rağmen bazı istisnalar dışında genele bakıldığında kanser mortalitesinde belirgin bir azalma sağlanamamaktadır [2]. Bu nedenle son zamanlardaki araştırmalar kanser immünolojisi üzerinde yoğunlaşmıştır. İmmün sistemin kanserli hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını sınırlandırdığı bilinmektedir [3].

Kanser hücreleri tümördeki hücrelerin ancak % 30'luk bir kısmını oluşturmaktadır. Tümörlü dokuda bulunan bu diğer hücre topluluğu, tümörün doğal yaşamında olumlu veya olumsuz etki ederek çeşitli roller oynayabilir. Bu durum da kanser mikroçevresi kavramını ortaya çıkarmaktadır [4]. Kanser hücrelerinin çevre doku ve immün sistem hücreleri ile birlikte oluşturduğu ortama mikroçevre veya immün mikroçevre adı verilir. Bu mikroçevreyi oluşturan hücreler ve kanser hücrelerinin bu mikroçevre unsurları ile reseptör düzeyindeki ilişkileri immün sistemden kaçış yollarının temelini oluşturur. İmmün sistem elemanlarının kanser hücrelerini tanımasını sağlayacak moleküllerin ekspresyonunda azalma, immün sistem unsurlarının inhibisyonunu sağlayacak moleküllerin ekspresyonundaki artış bunlardan bazılarıdır [5, 6].

Melanom, over kanseri, mesane kanseri ve diğer bazı solid kanserlerde T lenfosit infiltrasyonunun fazla olmasının olumlu bir prognostik faktör olduğu gösterilmiştir [4]. Bir meta-analiz çalışmasında lenfosit yoğunluğunun fazla olmasının sağkalım üzerinde olumlu etki gösterdiği ortaya konmuştur [7]. Baş boyun kanserleri de immün infiltrasyonun yoğun olarak görüldüğü ve immün tolerans mekanizmaların kanser progresyonu üzerinde rol oynadığı gösterilen kanserlerdendir [8].

Tümör infiltre eden lenfositler arasında alt grup olarak CD8+ T lenfosit oranı daha yüksek olan baş boyun kanserlerinin daha iyi klinik parametrelerle veya daha iyi

prognozla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [9, 10]. Baş boyun kanserlerinde tümör immün mikroçevresinde CD4+ T lenfositlerin, CD8+ T lenfositlere oranı daha yüksek olan tümörlerin daha ileri evre tümörler olduğu gösterilmiştir [10]. Bu açıdan CD4+ T lenfositlerin kanser immünolojisindeki rolü CD8+ T lenfositlere göre daha karmaşıktır. CD4+ T lenfositlerin tümöral immün yanıtta olumlu veya olumsuz etki gösterebileceğine dair çalışmalar mevcuttur [11, 12]. CD4+ T lenfositlerin CD8+ T lenfositlere oranı daha yüksek olan tümörlerin klinik ve histopatolojik karakteristiklerinin daha agresif olduğu gösterilmiştir [10].

İmmüsupresif mekanizmalarda rol oynayan regülatuar T lenfositlerin, tümör immün mikroçevresinde periferik kana göre daha yoğun oranda bulunduğu malign melanom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, mide kanseri ve over kanseri gibi bazı kanserlerde gösterilmiştir. Periferik kanda CD4+ lenfositlerin %5-10'unu teşkil ederken, tümör mikroçevresinde ise CD4+ lenfositlerin %20-50'sini oluşturduğu gözlemlenmiştir [13]. Yüksek oranda Treg infiltrasyonunun melanom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, renal hücreli kanser, karaciğer, pankreas, meme, mide kanserinde kötü prognozla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [13]. Sitotoksik T lenfosit markerı olan CD8'in, regülatuar T lenfosit (Treg) markerı olan FoxP3'e oranının daha yüksek olması daha iyi prognozla ilişkilendirilmektedir [4]. Baş boyun kanserlerinde de tümördeki Treg infiltrasyonunun yüksek olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur.

Tümör infiltre eden lenfositler üzerinde eksprese edilen bazı markerların bu lenfositlerin aktivitelerinin sınırlandırılmasında ve inhibisyonunda rol oynadığı bilinmektedir. İmmün yanıtın sınırlandırılması normal şartlarda bir gereklilik iken, kanser mikroçevresinde gerçekleşen bu mekanizma kanser hücrelerinin immün sistemden kaçışını sağlamaktadır. Bunda rol oynayan moleküllere immune checkpoint markerlar adı verilir. Şu an için bunların en ön plana çıkanları PD-1 ve CTLA-4 iken, yeni yeni gündeme gelen diğer iki önemli marker da TIM-3 ve LAG-3'tür [6].

TIM-3 (T Cell Immunoglobulin and Mucin Domain-3), CD8+ T lenfositler üzerinde PD-1 ile birlikte aktivitenin azalmaya başladığının bir göstergesi olarak ortaya çıkmaktadır [14]. Bunun yanı sıra immüsupresif etkisi daha fazla olan Treg'ler

de yine daha fazla TIM-3 eksprese etmektedir [15]. Baş boyun kanseri hayvan çalışmalarında TIM-3 blokajının T lenfosit aktivitesini arttırarak tümöre karşı immün yanıtı güçlendirdiği gösterilmiştir [16].

LAG-3 (Lymphocyte Activation Gene-3), aktive CD4+ ve CD8+ T lenfositler üzerinde eksprese edilen bir inhibitör bir immune checkpoint molekülüdür. LAG-3'n Treg'ler üzerinde yüksek oranda eksprese edildiğini ve LAG-3 blokajının Treg'lerin supressör etkisini ortadan kaldırarak hayvan modellerinde tümöre karşı immün yanıtı arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur [15, 17].

Tümör immün mikroçevresi üzerine çalışmalar giderek artmaktadır. Tümör infiltre eden lenfositlerin alt gruplarının dağılımı; CD8+ T lenfosit yoğunluğu, CD4+ T lenfosit yoğunluğu, reglatuar T lenfosit infiltrasyonu ve bunların prognostik faktörlerle ilişkisi üzerinde durulmaktadır. Tümörün immün sistemden kaçışının temelinde yatan mekanizmalar da bu noktada ön plana çıkmaktadır. Bu mekanizmalarda rol oynayan TIM-3 ve LAG-3 zerine belli başlı bazı kanserlerde çalışmalar mevcut olup larenks kanserlerinde yeterli düzeyde çalışma bulunmamaktadır. Biz de bu nedenle larenks kanserlerinde tümör immün mikroçevresinin, reglatuar T lenfosit yoğunluğunun, TIM-3 ve LAG-3 ekspresyonlarının prognostik faktörler üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Larenks Anatomisi, Histolojisi, Embriyolojisi ve Fizyolojisi

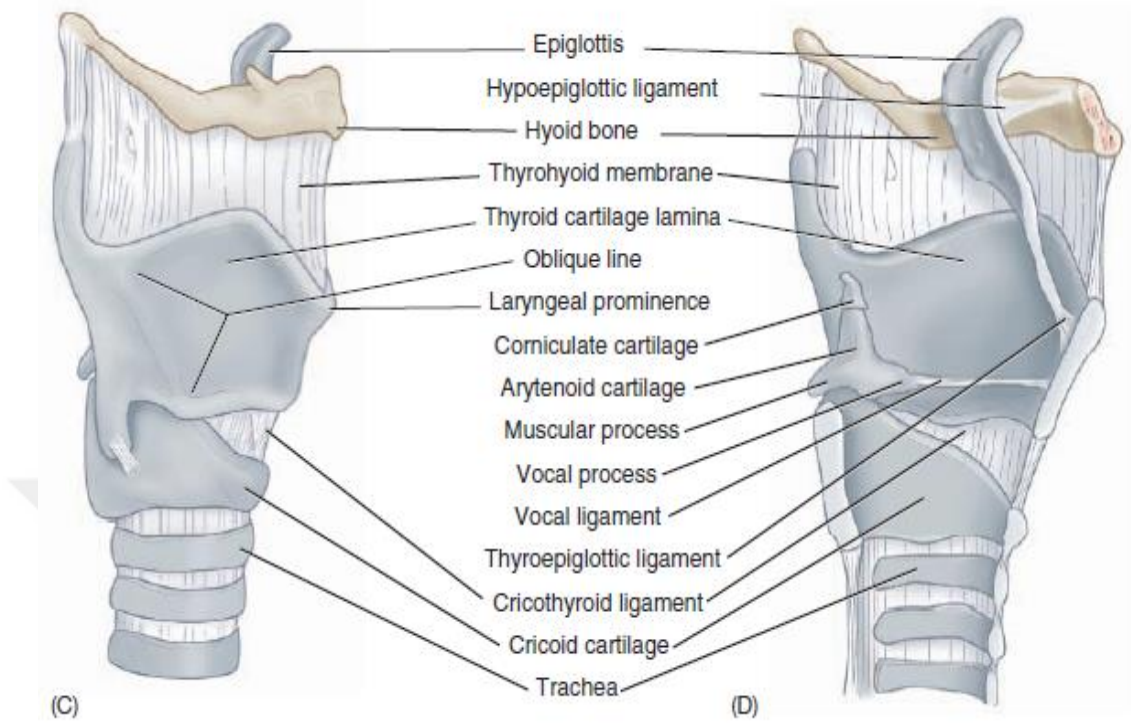
Larenks, embriyolojik olarak supraglottis bukkofaringeal tomurcuktan, glottis ve subglottis ise trakeobronşiyal tomurcuktan olmak üzere iki ayrı taslaktan gelişir. Bu ayırım tümörün invazyon ve yayılım paternini öngörmede değer taşımaktadır [18].

2.1.1. Larenks Kartilajları

- a) **Tiroid kartilaj:** En büyük larenks kartilajıdır. İnferiorda krikoid kartilaj ile eklem yapar [19]. Broyle Ligamanının bulunduğu alan hariç iç ve dış yüzü perikondrium ile örtülüdür. Bu kısım kanser invazyonu açısından önemlidir (*Şekil 2-1*) [20].
- b) **Krikoid kartilaj:** En kalın larenks kartilajıdır. Tam bir halka şeklindedir. Tiroid ve aritenoid kartilajlar ile eklem yapar (*Şekil 2-1*) [19].
- c) **Epiglot:** Petiolus adı verilen sapı aracılığı ile ön kommisürün yukarısında tiroid laminaya yapışır [20].
- d) **Aritenoid kartilajlar:** Krikoid kartilaj ile birlikte larenksin en önemli fonksiyonel alt ünitesini oluşturur. Vokal prosese vokal kordlar tutunurken, musküler prosese larenks kasları tutunur (*Şekil 2-1*) [19].
- e) **Kornikulat ve kuneiform kartilajlar:** Sırasıyla Santorini ve Wrisberg kartilajları da denilen bu küçük kartilajlar pasif destek fonksiyonları görürler [20].

2.1.2. Larenks Eklemleri

- a) **Krikotiroid eklem:** Tiroid kartilaj inferior kornusu ile krikoid kartilaj arasındadır. Sesin perdesinin değiştirilmesinde rol alır [21].
- b) **Krikoaritenoid eklem:** Vokal kordların abduksiyon ve adduksiyon hareketini sağlar, böylece fonasyondan büyük oranda sorumlu olan eklemdir [19].



Şekil 2-1: Larenksin lateral görüntüsü. Larenks sagittal olarak orta hattın kesildiğinden krikoid ve aritenoid kıkırdaklar arasındaki ilişki görülmektedir. [Seikel JA, King DW, Drumright DG. Anatomy ve Physiology for Speech, Language and Hearing. 4. Baskı].

2.1.3. Larenks Kasları

- a) Ekstrensik kaslar:** Larenksin bir bütün halinde hareketini sağlarlar. Suprahyoid kaslar (geniohyoid, mylohyoid, stilohyoid ve digastrik) larenksi anteriora ve superiora; infrahyoid kaslar (omohyoid, sternohyoid, sternotiroid, tirohyoid) ise inferiora çeker [20].
- b) İntrensik kaslar:** Larenks fonksiyonlarından esas sorumlu kaslardır. Tek abdüktör posterior krikoaritenoid kas, en önemli addüktör lateral krikoaritenoid kas, diğer addüktörler ise tiroaritenoid ve interaritenoid kaslardır. Krikotiroid kas ve internal tiroaritenoid kas (m. vocalis) vokal kordların gerginliğinin ayarlanmasında rol oynarlar [19].

2.1.4. Larenksin Vaskülarizasyonu, Lenfatik Drenajı ve İnnervasyonu

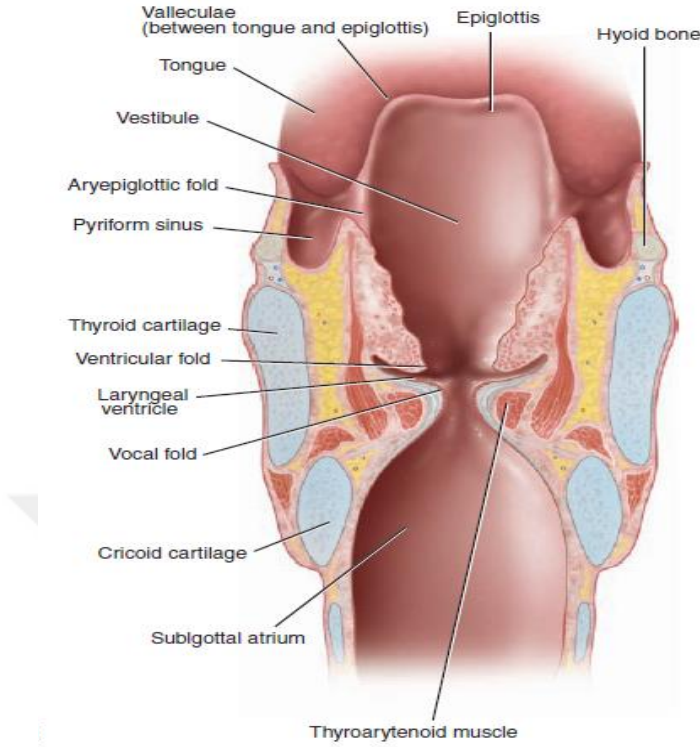
Superior tiroid arterin dalı olan superior larengeal arter, supraglottik larenksi; inferior tiroid arterin dalı olan inferior larengeal arter ise glottis ve subglottisi kanlandırır. Venöz drenaj süperior ve inferior larengeal venler ile internal juguler vene olur [19]. Lenfatiklerden en zengin bölge olan supraglottik bölge üst ve orta derin servikal zincire; subglottik bölge önce prelarengeal ve pretrakeal, sonra da orta derin servikal zincire drene olmaktadır [19]. Glottik bölgenin lenfatik drenajı çok fakirdir. İnnervasyon n. vagus'un dalları ile gerçekleşir. Superior larengeal sinirin eksternal dalı krikotiroid kası innerve ederken; internal dalı, supraglottisin duysal innervasyonunu sağlar. Rekürren larengeal sinir ise diğer tüm intrinsik kasların innervasyonu ve glottis ile subglottisin duysal innervasyonundan sorumludur [22].

2.1.5. Larenksin Alt Bölgeleri

- a) **Supraglottis:** Epiglot superiorundan larengeal ventrikül tabanına kadar uzanan; epiglot, preepiglottik bölge, ariepiglottik plikalar, aritenoidler, ventrikül ve yalancı kordları (band) içeren bölgedir [19].
- b) **Glottis:** Lateralde vokal kordlar, önde ön komissür ve arkada arka komissür tarafından sınırlanan bölgedir. İnfierior sınırı apeksin 1 cm altından geçen horizontal düzlemdir. Arka komissür aritenoid kartilajlar, interaritenoid kas ve krikoid posterior laminası tarafından sınırlandırılır [19].
- c) **Subglottis:** Glottis alt sınırından krikoid kartilaj alt sınırına uzanan bölgedir [19].

2.1.6. Larenks Histolojisi

Larenks mukozasının çoğunluğu silyalı çok katlı kolumnar epitel ile; epiglotun suprahypoid kısmı, ariepiglottik kıvrımların üst yüzeyi ve vokal kordların serbest kenarları çok katlı yassı epitel ile kaplıdır. Vokal kordlar, histolojik olarak non-keratinize çok katlı skuamöz epitel, lamina propria (yüzeyel tabakası Reinke boşluğunu; orta ve derin tabakası ise vokal ligamanı oluşturur) ve vokalis kası olmak üzere 3 katmandan oluşur (*Şekil 2-2*) [19].



Şekil 2-2: Koronal kesitte larenks boşluğunun posteriordan görüntüsü. [Seikel JA, King DW, Drumright DG. Anatomy ve Physiology for Speech, Language and Hearing. 4. Baskı].

2.1.7. Laringeal Membranlar ve Boşluklar:

Konus elastikus (Kriko-vokal ligaman): Vokal ligamandan başlayıp krikoid kartilaj iç yüzünde sonlanan fibröz yapıdır. Üst ucu vokal ligamanı oluşturur.

Kuadrangüler membran: Epiglot lateralinden başlayıp posteriorda aritenoid kartilajlarda sonlanan fibröz yapıdır. Alt ucu yalancı kordu oluşturur.

Prepiglottik Boşluk: Superiorda hyoepiglottik ligaman, inferiorda tiroepiglottik ligaman, posteriorda epiglot, anteriorde tirohyoid membran ve tiroid kartilajla sınırlıdır. Epiglottan kaynaklanan tümörler preepiglottik boşluğa invaze olabilir [19].

Paraglottik Boşluk: Glottik bölgenin iki yanında yer almaktadır. Medialde kuadrangüler membran, ventrikül ve konus elastikus; lateralde tiroid kartilaj ve krikotiroid membranla sınırlıdır. Tümörlerin transglottik ve ekstralaringeal yayılımı açısından önemlidir [19].

2.2. Larenks Kanserleri

2.2.1. Epidemiyoloji

Larenks kanseri erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülmektedir (sırasıyla 5.8/100,000 ve 1.2/100,000) [23]. Hastaların yaklaşık %60'ı ileri evrede tanı almaktadırlar. 5 yıllık sağ kalım oranı geçen 40 yıl içinde azalan birkaç kanser türünden bir tanesidir. Toplam insidansı azalmasına rağmen 5 yıllık sağ kalım %66'dan %63'e düşmüştür [23]. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı verilerine göre en sık görülen kanserler sıralamasında 7.7/100,000 ile 6. Sırada gelmektedir. Hastalık çoğunlukla 6.-7. dekatta ortaya çıkmaktadır. %95'i yassı hücreli karsinomdur [24].

2.2.2. Etiyoloji

Tütün ve Alkol: Larenks kanseri için en önemli iki risk faktörüdür. Süresine ve miktarına bağlı olarak risk artmaktadır. Beraber kullanıldıklarında sinerjistik etki göstermektedir. Alkol supraglottik, tütün ise glottik karsinomlarla daha ilişkilidir [25].

Diğer Toksinler: Asbest, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, sülfirik asit, hardal gazı, metal tozları, asfalt ve tekstil tozları risk faktörüdür [26].

Diyet: Sebze, meyve ağırlıklı beslenme riski azaltırken, kırmızı et ve yağ ürünlerinin fazla tüketimi baş boyun kanserleri açısından riski arttırmaktadır [27].

Human Papilloma Virüs (HPV): Larenks kanseri hastalarının %28'inde HPV saptanmıştır, genellikle tip 16 tespit edilmektedir [28] [29]. Erken evre tümörlerde, geç evre tümörlere; glottik tümörlerde, supraglottik tümörlere kıyasla daha yüksek HPV pozitifliği saptanmıştır [30].

Laringofarengeal Reflü: Sigara ve alkol tüketimi olmayan hastalarda ön plana çıkmaktadır. Larenks kanseri riskini orta derecede yükselttiği belirtilmiştir [31].

2.2.3. Klinik Prezantasyon

Glottik kanserler erken bulgu verirler ve esas semptom ses kısıklığıdır. İlerleyen dönemde dispne ve stridor ortaya çıkabilir. Glottik tümörler, doğal bariyerlerden ve lenfatiklerin azlığından dolayı uzun süre sınırlı kalırlar [32]. Supraglottik tümörlerde

disfoni, disfaji, odinofaji, stridor, dispne, otalji ve hemoptizi görülebilir. Larengeal semptomlar olmaksızın boyunda kitle ile gelebilirler. Subglottik tümörler ise çoğunlukla ileri evrede dispne ve stridor ile tanı alırlar [33].

2.2.4. Tanı ve Değerlendirme

Fizik Muayene: Palpasyonda larenkste hassasiyet, larenks iskeletinde genişleme ve dolgunluk tespit edilebilir. Bunlar tümörün ekstralarengeal olarak yayıldığına göstergeleridir. Dil kökü ve lenf nodu metastazı için boyun palpe edilmelidir [22].

Endoskopik larenks muayenesi: Tanının ilk basamağıdır. Tümörün yeri, yayılımı, görünümü, vokal kordların hareketliliği değerlendirilir. Ancak anterior komissür, subglottik bölge, preepiglottik bölge, paraglottik bölge ve kartilaj invazyonlarının değerlendirilmesinde yeterli olmayabilir [19].

Mikroskopik laringoskopi ve biyopsi: Genel anestezi altında, tümörün yeri ve yaygınlığı değerlendirilir. Ventrikül ve piriform sinüs gibi standart endoskopik muayenede görülemeyen bölgelerin açılı endoskoplarla değerlendirilmesine olanak tanır. Kesin tanı için biyopsi alınır. Biyopsi tümörün tipi ve differansiasyon derecesi gibi histopatolojik özelliklerinin belirlenmesini sağlar [19].

Görüntüleme: Kartilaj ve kemik yapıların değerlendirilmesinde BT, yumuşak doku yayılımının değerlendirmesinde ise MRG değerlidir [34] [35]. PET, bölgesel ve uzak metastazları tespit ederek evreleme, primeri bilinmeyen tümörlerin ve senkron tümörlerin tespiti, radyoterapi uygulanmış hastalarda rezidüel/rekürren hastalık tespiti açısından önemlidir [22]. Primer tümörün evrelemeyi belirleyen bazı özelliklerinin (preepiglottik boşluk, paraglottik boşluk, tiroid veya krikoid kartilaj, ekstralarengeal dokular, prevertebral fasya, mediastinal yapılar ve karotis invazyonu) tespiti açısından görüntüleme yöntemleri önem taşımaktadır [34].

2.2.5. Larenks Kanserlerinde Evreleme

Malign tümörlerin evrelemesinde, AJCC (American Joint Committee on Cancer) ve Union for International Cancer Control (UICC), 1943 yılında Pierre

Denoix tarafından geliştirilen Tümör Nod Metastaz (TNM) sınıflamasını kullanmaktadır. TNM sınıflaması primer tümörün yayılımını (T), bölgesel lenf nodlarının varlığını veya yokluğunu ve yayılımını (N) ve uzak metastaz olup olmadığını (M) değerlendirerek yapılan bir evrelemedir. Larenks kanserlerinin sınıflamasında 2018 yılında güncellenen AJCC/UICC TNM sınıflama sistemi kullanılmaktadır (**Tablo 2-1, Tablo 2-2, Tablo 2-3**) [36]. Tümörler klinik olarak (kTNM) ve patolojik (pTNM) olarak ayrı ayrı evrelenmektedir (**Tablo 2-4**).

Tablo 2-1. TNM sınıflamasına göre larenks kanserlerinde T evresi

TNM sınıflaması	
Primer tümör (T)	
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümöre ait herhangi bir bulgu yok
Tis	Karsinoma in situ
Supraglottis	
T1	Normal vokal kord hareketleriyle birlikte supraglottisin bir alt ünitesine sınırlı tümör
T2	Larenks fiksasyonu olmaksızın supraglottisin birden fazla alt bölgesine veya glottise ya da supraglottis dışında bir bölgeye (Dil kökü, valleküla, priform sinüs, vb) invaze tümör
T3	Vokal kord fiksasyonu ile birlikte larenkse sınırlı ve/veya postkrikoid alan, preepiglottik boşluk, paraglottik boşluktan herhangi birine ve/veya tiroid kartilajın iç perikondriumuna invaze tümör
T4a	Orta düzeyde lokal ileri hastalık Tiroid kartilaj ve/veya larenks dışında herhangi bir dokuya (trakea, dilin ekstrasik kasları dahil boyun yumuşak dokusu, strap kası, tiroid veya özefagus vb) invaze tümör
T4b	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık Prevertebral fasyaya invaze veya karotid arteri sarmış tümör

Glottis	
T1	Normal vokal kord hareketleriyle beraber vokal kord(lar)a sınırlı (anterior veya posterior komissürü tutabilir) tümör
T1a	Bir vokal korda sınırlı tümör
T1b	Her iki vokal kordu tutmuş tümör
T2	Supraglottis ve/veya subglottise uzanan tümör ve/veya vokal kord hareketinde kısıtlılık
T3	Vokal kord fiksasyonu ile birlikte larenkse sınırlı ve/veya paraglottik boşluğa invaze ve/veya tiroid kartilajın iç perikondriumuna invaze tümör
T4a	Orta düzeyde lokal ileri hastalık Tiroid kartilaj dış korteksine ve/veya larenks dışında herhangi bir dokuya (trakea, dil, strap kaslar, tiroid gland veya özefagus vb) invaze tümör
T4b	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık Prevertebral fasyaya invaze veya karotid arteri sarmış tümör
Subglottis	
T1	Subglottise sınırlı tümör
T2	Tümör vokal korda uzanıyor ve vokal kord hareketleri normal ya da kısıtlı
T3	Vokal kord fiksasyonu ile birlikte larenkse sınırlı tümör
T4a	Orta düzeyde lokal ileri hastalık Krikoid veya tiroid kartilaja ve/veya larenks dışında herhangi bir dokuya (trakea, dil, strap kaslar, tiroid gland veya özefagus vb) invaze tümör
T4b	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık Prevertebral fasyaya invaze veya karotid arteri sarmış tümör

Tablo 2-2. TNM sınıflamasına göre bölgesel lenf nodu (pN) evresi

Bölgesel Lenf Bezleri (N)	
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemedi
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Tek ipsilateral lenf nodu metastazı, 3 cm veya daha küçük ve ENY negatif
N2	Tek ipsilateral lenf nodu metastazı, 3cm veya daha küçük ve ENY pozitif; veya 3 cm'den büyük 6 cm'den küçük ve ENY negatif; veya multipl ipsilateral lenf nodu metastazı, hepsi 6 cm'den küçük ve ENY negatif; veya bilateral/kontralateral lenf nodu metastazı, hepsi 6 cm'den küçük ve ENY negatif
N2a	Tek ipsilateral veya kontralateral 3 cm'den küçük lenf nodu metastazı ve ENY pozitif; veya tek ipsilateral lenf nodu 3 cm'den büyük 6 cm'den küçük ve ENY negatif
N2b	Multipl ipsilateral lenf nodu metastazı, hepsinin çapı 6 cm'den küçük ve ENY negatif
N2c	Bilateral veya kontralateral lenf nodu metastazı, hepsinin çapı 6 cm'den küçük ve ENY negatif
N3	6 cm'den büyük lenf nodu metastazı ve ENY negatif; veya tek ipsilateral lenf nodu, 3 cm'den büyük ve ENY pozitif; veya multipl ipsilateral, kontralateral/bilateral ENY pozitif lenf nodu metastazları
N3a	6 cm'den büyük lenf nodu metastazı ve ENY negatif
N3b	Tek ipsilateral lenf nodu, 3 cm'den büyük ve ENY pozitif; veya multipl ipsilateral, kontralateral/bilateral ENY pozitif lenf nodu metastazları
*ENY: Ekstra-Nodal Yayılım	

Tablo 2-3. TNM sınıflamasına göre uzak metastaz (M) evresi

Uzak Metastaz (M)	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

Tablo 2-4. Laringeal kanserlerin evreleri

Laringeal Kanserlerin Evreleri			
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre 1	T1	N0	M0
Evre 2	T2	N0	M0
Evre 3	T3	N0	M0
	T1, T2 veya T3	N1	M0
Evre 4a	T4a	N0, N1, N2	M0
	T1, T2, T3	N2	M0
Evre 4b	T4b	Herhangi N	M0
	Herhangi T	N3	M0
Evre 4c	Herhangi T	Herhangi N	M1

2.2.6. Larenks Kanserlerinde Tedavi

Cerrahi ve radyoterapi (RT) tedavinin iki önemli unsurudur. Erken evre larenks kanserlerinde (Evre 1-2) tek tedavi modalitesi (cerrahi veya radyoterapi), ileri evre larenks kanserlerinde (Evre 3-4) ise kombine tedavi (cerrahi sonrası adjuvan RT/KRT veya primer KRT/RT sonrası kurtarma cerrahisi) uygulanmaktadır [19].

2.2.6.1. Glottik Kanserlerde Tedavi

Erken evre glottik kanserlerde boyuna okkült metastaz oranı düşük olduğundan, boynun elektif tedavisine gerek olmadan primer cerrahi veya RT ile tedavi edilir. Eksternal yaklaşımla yapılan açık cerrahi teknikler laringofissür kordektomi, vertikal parsiyel hemilarenjektomi ve frontolateral vertikal larenjektomidir. Günümüzde ise ekspozisyon açısından sıkıntı olmadığı takdirde genellikle transoral lazer kordektomiler tercih edilmektedir [22]. Transoral lazer mikrocerrahinin kontrol oranı %80-94, larenks koruma oranı %94 olarak Ambrosch tarafından ortaya konulmuştur [19, 22]. Radyoterapi de erken glottik kanserlerin tedavisinde tek başına etkin bir yöntem olarak kabul edilir. T1 glottik tümörlerde primer RT sonucu 5 yıllık sağkalım %81-90; T2 tümörlerde %64-87 arasında bildirilmektedir [19, 22].

İleri evre glottik kanserlerde konservasyon cerrahisi için bulunması gereken en küçük birim bir adet sağlam krikoaritenoid ünitedir. Suprakrikoid parsiyel larenjektomi (SKPL), en sık tercih edilen parsiyel larenjektomi yöntemlerinden biridir. Epiglotun korunduğu durumda krikohyoidoepiglottotomi (KHEP), epiglot çıkartıldığında ise krikohyoidotomi (KHP) ile larenks rekonstrüktif edilir [19, 22]. Total larenjektomi ise larenkse yönelik en radikal cerrahi girişimdir. RT veya KRT cerrahi sonrası adjuvan tedavi olarak uygulanmaktadır. T3-T4 tümörlerde okült metastaz oranı yüksektir (%20-65) [37]. Bu nedenle 2-4. bölgeleri içerecek şekilde elektif boyun diseksiyonu gerekir. Subglottik uzanımı olan vakalarda ipsilateral tiroidektomi ve 6. bölge diseksiyonu da yapılmalıdır [19].

2.2.6.2. Supraglottik Kanserlerde Tedavi

Erken evre supraglottik kanserlerde cerrahi seçenekleri lazer veya açık supraglottik parsiyel larenjektomi (SGPL) ve suprakrikoid parsiyel larenjektomidir. SGPL'nin kontrol oranı %80-100 arasında raporlanmaktadır [38]. Aynı endikasyonlarla bu cerrahi transoral olarak da yapılabilir. Glottik uzanımı olan T2 supraglottik kanserlerde SKPL (KHP ile) tercih edilebilir. Kontrol oranları %90 dolaylarındadır. Cerrahi grupta 5 yıllık hastalıksız sağ kalım %88, RT grubunda %76 raporlanmıştır. Bu nedenle supraglottik tümörlerde kontraendikasyon yoksa primer tedavi olarak cerrahi düşünülmelidir [38].

İleri evre supraglottik kanserlerde açık supraglottik veya suprakrikoid larenjektomi yapılabilir. Postkrikoid bölge veya krikoid kartilaj tutulumu varsa ya da RT başarısızlığı söz konusuysa total larenjektomi tercih edilir [19]. N0 boyundaki okült metastaz oranı %30 olduğundan elektif boyun diseksiyonu yapılmalıdır [39].

2.2.6.3. Subglottik Kanserlerde Tedavi

Primer subglottik kanserler, tüm larenks kanserlerinin sadece %4'ünü oluşturur. Tedavisi total larenjektomi ve postoperatif RT'yi içermektedir. Ayrıca ipsilateral tiroidektomi ve paratrakeal lenf nodu diseksiyonu önerilmektedir. Mortalite %40'tır [40].

2.3. Kanser Tedavisinde Paradigma Değişikliği

Son 50 yıldır kansere karşı mücadele dünya genelinde giderek yoğunlaşmakta, yeni tanı ve tedavi metodlarının geliştirilmesine çalışılmakta, ancak buna rağmen bazı istisnalar dışında genele bakıldığında kanser mortalitesinde belirgin bir azalma sağlanamamaktadır [2]. Mevcut paradigma olan somatik mutasyon modeli, kanserin temel oluşum mekanizmasını hücrelerde oluşan belirli mutasyonlara ve bunların zaman içerisinde birikmesine dayandırmaktadır. Ancak insan hayatındaki en fazla mutasyonun konsepsiyondan matürasyona kadarki sürede gerçekleşmesine rağmen bu dönem kanser sıklığının en az olduğu dönemdir [41]. Otopsi çalışmalarında neredeyse popülasyonun tamamına yakınında aslında kanser bulunmasına rağmen, dünya genelinde bir kişinin kanser tanısı alma oranı %30'dur, yani %70 gibi bir kesimde prekanseröz veya kanseröz lezyonlar oluşmuş olmasına rağmen bir nedenle bunlar semptomatik olacak kadar ilerlememiştir [42]. Hatta yenidoğanların bile %20'sinde kanseröz mutasyonlar ve premalign lezyonlar saptanmış olmasına rağmen, 15 yaş altında kanser sıklığı bu orandan 100 kat daha azdır [42]. Bu gibi örnekler kanser patogenezinde karsinogenik mutasyonların varlığının tek başına yeterli açıklamayı sağlamadığı fikrinin oluşmasına yol açmıştır. Ayrıca AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) hastalarında ve organ transplantı geçirmiş hastalarda çeşitli kanserlerin sıklığının artması; immün sistemin en güçlü olduğu çocukluk ve ergenlik döneminde kanser sıklığı en düşükken, immün sistemin zayıf olduğu yaşlı popülasyonda kanser sıklığının artış göstermesi immün sistemin kanser etyopatogenezinde oynadığı role dikkat çekmektedir [43]. Ek olarak immün sistemin daha aktif olduğu bilinen kadınlarda kanser sıklığının erkeklere göre daha az olması, aşırı aktif bir immün sistemin bulunduğu allerji hastalarında kanser sıklığının normal popülasyona göre daha az oluşu; sigara, alkol, yüksek doz radyasyona maruziyetin immün sistemi baskıladığı ve kanser sıklığının bu popülasyonda daha yüksek olması gibi bulgular da bu açıdan anlamlıdır [2]. İmmün sistemin kanserli hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını engelleyerek kanserin ortaya çıkmasının önüne geçtiği ve böylece kanseri sınırlandırdığı bilinmektedir [3]. Bütün bu bulgular doğrultusundan günümüzde kanser etyopatogenezinde kabul geren mekanizma somatik mutasyon modelinden immün süpresyon modeline doğru kaymaktadır. Kanser immünojisi,

kanserde immün mikroçevre ve immünoterapi alanlarındaki farkındalık ve araştırmalar git gide artmaktadır. Hatta immünoterapi bazı kanser türlerinde tedavi seçenekleri arasına girmiştir.

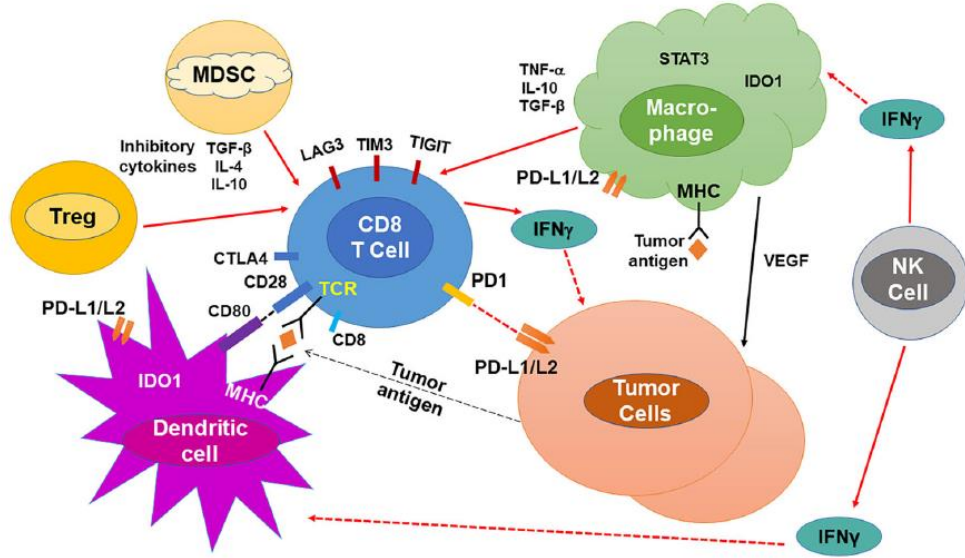
Baş boyun kanserlerinde de güncel bakış açısında, immün sistemin efektör hücrelerinin ve antijen sunum fonksiyonlarındaki anormalliklerin yanı sıra immünsupressif hücrelerin etkinliğindeki artışla birlikte bir immünsupressif hastalık paradigması görüşü geçerlilik kazanmaktadır [44].

2.4. Kanser İmmünolojisi

Vücuda giren her yabancı antijene olduğu gibi karsinojenik özellikler taşıyan hücrelere karşı da immün sistem yanıtı oluşur. Bu yanıtın ilk aşaması doğal immün yanıtın elemanları olan dendritik hücre veya makrofaj gibi antijen sunucu hücreler (Antigen Presenting Cell: APC) tarafından gerçekleştirilir. Bu hücreler yabancı hücrelerin antijenlerini membran yüzeylerindeki MHC II (Major Histocompatibility Complex) üzerinde henüz antijenle karşılaşmamış naif T hücrelerine ikincil lenfoid organlar olan lenf nodları veya dalakta sunarlar [45, 46]. İkincil lenfoid organlarda antijene karşı duyarlı hale gelen ve aktiveleşen T lenfositleri inflamasyon alanına, ya da kanser söz konusu ise tümöral dokuya yönelirler. T hücreleri üzerinde bulunan TCR (T Cell Receptor) ve CD3 (Cluster of Differentiation) kompleksi MHC II ve antijen kompleksi ile etkileşime geçer ve antijen tanınır. Bunun yanı sıra ko-stimulator moleküller olan CD80 (B7-1) ve CD86 (B7-2) ile CD28'in de birbirleriyle etkileşmesi gerekir, aksi takdirde T lenfosit aktivasyonu gerçekleşmez [47].

T lenfositlerde CD28 yerine CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4) ekspresyonunun artması, CD80 veya CD86 ile bağlanması durumunda ise T lenfositlerde aktivasyon değil inhibisyon gerçekleşir [48]. Programmed cell death protein 1 (PD-1) de yine aktive T lenfositler üzerinde eksprese edilen bir moleküldür. Ligandı, APC'lerde eksprese edilen programmed death-ligand 1 (PD-L1 veya B7-H1) ile etkileştiğinde aktive T lenfositlerin aktivitesini sınırlayıcı etki göstermektedir [49]. Birçok kanser türünde tümör hücrelerinin de PD-L1 eksprese ettiği ve bu sayede immün sistem yanıtını baskıladığı gösterilmiştir (*Şekil 2-3*) [50].

CTLA-4/CD80-86 yolağı ve PD-1/PD-L1 yolağı immün checkpointler olarak adlandırılan yollardan iki tanesidir. Bu yollar normal bir immün sistemde aşırı immün yanıtın sınırlandırılmasından sorumlu iken kanser immünolojisinden kanser hücrelerinin immün tolerans oluşturarak immün sistemden kaçış yollarını teşkil etmektedirler. Bu nedenle günümüzde kanser tedavisinde bu immün checkpointleri hedef alan monoklonal antikorlar ile immünoterapi metodu git gide yaygınlaşmaktadır.



Şekil 2-3: Anti-tümoral immün yanıt ile ilişkili hücrelerin ve tümör mikroçevresindeki immüno-supresif mekanizmaların şematik gösterimi. [Chen SMY, Krinsky AL, Woolaver RA, Wang X, Chen Z, Wang JH. Tumor immune microenvironment in head and neck cancers. Mol Carcin. 2020;59(7):766-774. doi:10.1002/mc.23162]

2.5. Kanserlerde İmmün Mikroçevre

Kanser hücreleri tümördeki hücrelerin ancak % 30'luk bir kısmını oluşturur ve çoğunlukla otonom özellikte değildir yani hayatta kalmak ve çoğalmak için stromal hücrelere ihtiyaç duyarlar. İntratümöral hücreler, tümörün doğal yaşamında olumlu veya olumsuz etki ederek çeşitli roller oynayabilir. Bu durum da kanser mikroçevresi kavramını ortaya çıkarmaktadır [4].

Kanser hücrelerinin çevre doku ve immün sistem hücreleri ile birlikte oluşturduğu ortama mikroçevre veya immün mikroçevre adı verilir. Bu mikroçevre fibroblastlar, T lenfositler, B lenfositler, nötrofiller, makrofajlar, myeloid hücreler ve natural killer hücrelerden oluşur. Bu mikroçevreyi oluşturan hücreler ve kanser hücrelerinin bu mikroçevre unsurları ile reseptör düzeyindeki etkileşimleri immün sistemden kaçış yollarının temelini oluşturur. İmmün sistem unsurlarının kanser hücrelerini tanımasını sağlayacak moleküllerin ekspresyonunda azalma ve bu unsurları inhibe eden moleküllerin ekspresyonundaki artış bunlardan bazılarıdır [5, 6].

Baş boyun kanserleri immün infiltrasyonun yoğun olarak görüldüğü ve immün tolerans mekanizmaların kanser progresyonu üzerinde rol oynadığı gösterilen kanserlerdendir [8].

2.5.1. Tümör İnfiltrate Eden Lenfositler (TIL)

İmmün mikroçevreyi oluşturan unsurlardan bir tanesi lenfositlerdir. Tümör dokusu içerisinde bulunan ve tümöre karşı immün yanıtta sorumlu olan bu lenfositler tümör infiltrate eden lenfositler (TIL) olarak adlandırılır ve büyük çoğunluğunu T lenfositler teşkil etmektedir. İlk kez 1986'da ortaya atılan bu kavramın o zamandan bu yana birçok tümör için önemli bir prognostik belirteç olduğu gösterilmiştir [51].

2.5.1.1. T Lenfositler

TCR ve CD3 eksprese eden lenfositler T lenfosit olarak sınıflanır. Adaptif hücresel immün yanıtın temel hücreleri olan bu lenfositler kanser hücrelerine karşı olan immün reaksiyonların merkezinde yer alırlar [52]. Melanom, over kanseri, mesane kanseri ve diğer bazı solid kanserlerde T lenfosit infiltrasyonun fazla olmasının olumlu bir prognostik faktör olduğu gösterilmiştir [4]. Solid tümörlerde TIL önemini değerlendiren bir meta-analiz çalışmasında CD3 pozitif hücre yoğunluğunun fazla olmasının sağkalım üzerinde olumlu etki gösterdiği ortaya konmuştur [7]. Bir yandan over kanserinde T lenfosit infiltrasyonu yüksek olan tümörlerde 5 yıllık sağkalım sonuçlarının daha iyi olduğu gösterilmişken [53], renal hücreli karsinom için bunun tam tersini gösteren çalışmalar mevcuttur [54]. Bu da tümör infiltrate eden lenfositlerin alt tiplerinin dağılımının bu farklılığı açıklayabileceği görüşünü doğurmaktadır [4].

2.5.1.1.1. Sitotoksik T Lenfositler

Sitotoksik T lenfositler tüm T lenfositlerde eksprese edilen TCR ve CD3 yanı sıra CD8 eksprese eden hücrelerdir. Edinilmiş hücrel immün yanıtın elemanları olarak özellikle viral enfeksiyonlara ve kanser hücrelerine karşı geliştirilen immün yanıtta rol alırlar. Tümör hücreleri üzerinde bulunan MHC I üzerinde sunulan yabancı antijenleri tanıyarak bu hücreleri hedef alırlar. Sitotoksik T hücrelerinin tümör hücrelerini eliminasyonu doğrudan perforin ve granzyme yoluyla hücrenin öldürülmesi şeklinde olabileceği gibi; IFN- γ (Interferon- γ) ve TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) gibi sitokinlerin salgılanması ile diğer immün sistem elemanlarının ortama çekilmesi ve aktifleştirilmesi ile dolaylı yoldan da gerçekleşir (*Şekil 2-4*) [4].

Bu lenfositlerin tümör hücrelerinin eliminasyonundan temel olarak sorumlu olduğu ortaya konulmuştur [55]. Bu açıdan tümör infiltre eden lenfositler arasında CD8+ T lenfosit oranı daha yüksek olan baş boyun kanserlerinin daha iyi klinik parametrelerle veya daha iyi prognozla ilişkili olduğunu gösteren çalışmaların varlığı sürpriz değildir [9, 10]. Baş boyun kanserlerinde tümör immün mikroçevresinde CD4+ T lenfositlerin, CD8+ T lenfositlere oranı 0.745 olarak bulunmuş olup, aynı çalışmada bu oranın daha yüksek olduğu tümörlerin daha büyük ve daha ileri evre tümörler olduğu gösterilmiştir [10].

CD8+ T lenfositlerinin, CD4+ T lenfositlerine kıyasla işlev açısından daha basit olarak nitelendirilebilir. Ancak, baskılayıcı CD8 T hücrelerinin tanımlandığı unutulmamalıdır. Kanser hastalarında normale oranla daha yüksek oranda tarif edilen bu supressör CD8+ T lenfositlerin varlığı mevcut durumun karmaşıklığına katkıda bulunmaktadır. Ancak henüz bu supressör özellikteki CD8+ T lenfositlerin ayırt edilmesini sağlayacak immunohistokimyasal yöntemler tanımlanmış değildir [4, 56].

2.5.1.1.2. Yardımcı T Lenfositler

Yardımcı T lenfositler tüm T lenfositlerde eksprese edilen TCR ve CD3 yanı sıra CD4 eksprese eden hücrelerdir. Edinilmiş immün yanıtın elemanları olup bu hücre grubu genellikle immün yanıtın modülasyonunu sağlarlar. Sitotoksik T lenfositler

başta olmak üzere immün sistem elemanlarının aktivasyonunu veya bazı durumlarda inhibisyonunu sağlayan sitokinlerin salgılanmasından sorumludurlar [4].

Antijenik uyarana yanıt olarak, naif CD4 + T hücreleri, efektör yardımcı T lenfositler olan yardımcı tip 1 (Th1) veya tip 2 (Th2) hücrelere farklılaşabilir. Th1 hücreleri, hücrel immüniteyi aktive eden IFN- γ (Interferon- γ), IL-2 (Interleukin-2) ve TNF- β (Tumor Necrosis Factor) salgılayarak; Th2 hücreleri, IL-4, IL-5 ve IL-10 salgılayarak humoral ve alerjik immün yanıtlarda rol oynar [57, 58]. CD4+ T lenfositlerin alt grubu olan Th1 hücreler kansere karşı immün yanıtta özellikle başta IL-2 olmak üzere salgıladıkları sitokinler aracılığı ile ortama sitotoksik T lenfositleri çekerek ve bunların aktive olmasını sağlayarak etki gösterirler [59]. IL-2'nin tümör infiltrate eden lenfositlerin antijene spesifik olarak klonal çoğalmasından sorumlu sitokin olduğu bilinmektedir [60].

CD4+ T lenfositlerin kanser immünolojisindeki rolü CD8+ T lenfositlere göre karmaşıktır. CD4+ T lenfositlerin anti-tümör özellik gösterebileceği gibi pro-tümör özellikte olabileceklerini gösteren çalışmalar mevcuttur [11, 12]. CD4+ hücre infiltrasyonu yüksek olan tümörlerde prognoz daha iyi olduğunu öne süren yayınlar olduğu gibi, CD4+ T lenfositlerin CD8+ T lenfositlere oranı daha yüksek olan tümörlerin klinik ve histopatolojik karakteristiklerinin daha agresif olduğu da gösterilmiştir[10]. Bu konudaki araştırmalar da CD4+ T lenfositlerin özellikle immün sistemi baskılayan bir alt grubunun ortaya çıkarılmasına yol açmıştır. Bunlar CD4+CD25+FoxP3+ regülatur T lenfositlerdir (Treg). Bu hücre grubu diğer yardımcı T lenfositlerin aksine anti-tümör immüniteyi baskılayıcı etki göstermektedir [51].

2.5.1.1.3. Regülatur T Lenfositler (Treg)

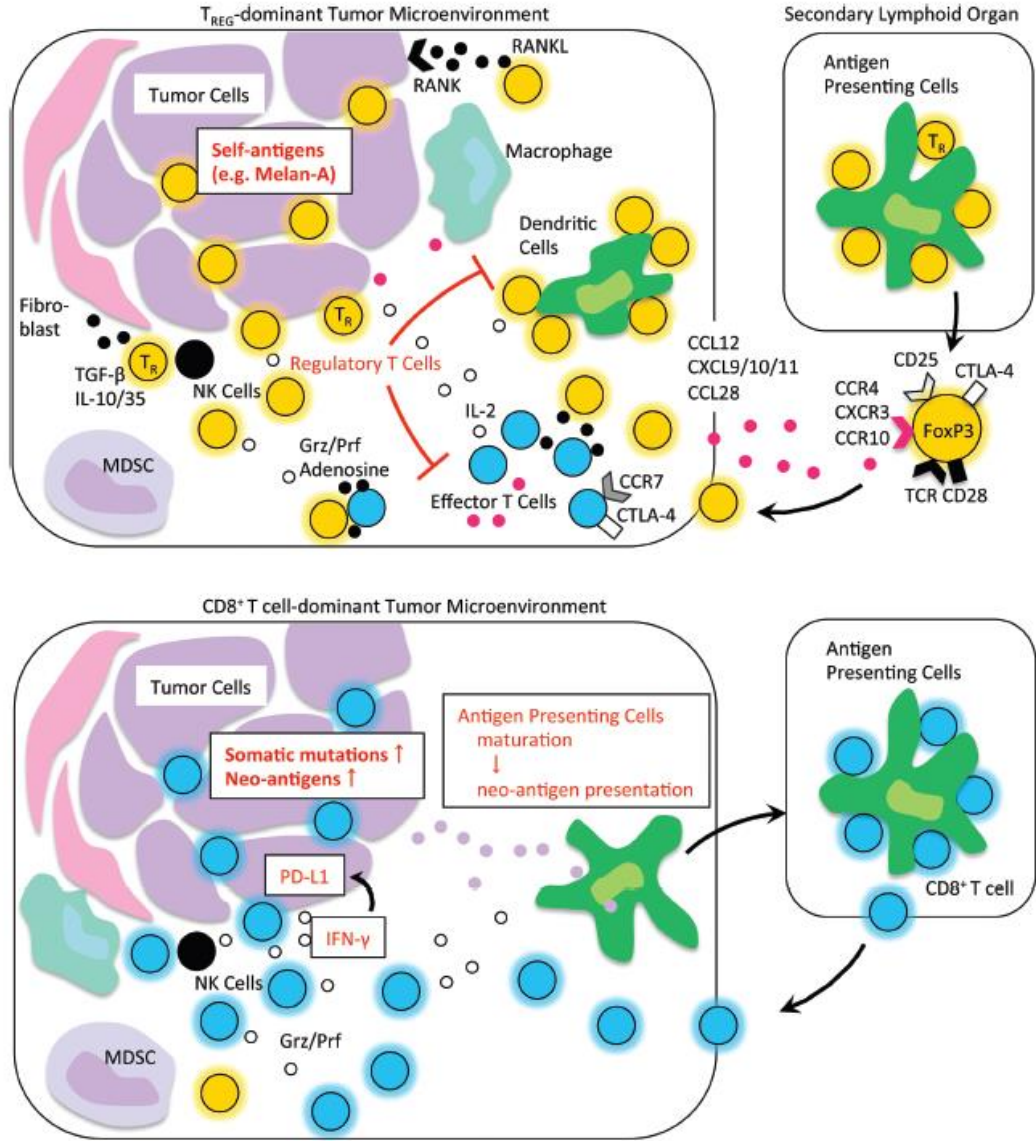
Yardımcı T lenfositlerin özellikli bir alt grubu olarak regülatur T lenfositler CD4 ekspresyonunun yanı sıra CD25 (Interleukin 2 Receptor Alfa) ve FoxP3 (Forkhead box P3) ekspresyonu gösteren hücreler olarak tanımlanmışlardır [61]. CD25 bir aktivasyon markeri olarak diğer T lenfositlerde de bulunabileceğinden Treg'lerin saptanması için ek markerların kullanılması gerekmektedir [62]. Bu açıdan Treg'lerde ana düzenleyici molekül olarak görev yaptığı ortaya konulan FoxP3 ekspresyonunun da saptanması gerekmektedir [63]. Diğer CD4+ T lenfositlerden farklı olarak inhibitör

bir rol üstlenmektedirler [64]. İlk kez Sakaguchi [65] tarafından tarif edilen ve immün sistemin dengesinden sorumlu oldukları ortaya konulan bu hücrelerin, aşırı immün yanıtın sınırlandırılmasını, böylece alerjik ve otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasını engelledikleri ortaya konmuştur. Öte yandan, kanser immün mikroçevresinde fazla bulunmasının ise kansere karşı immün yanıtı baskılayabileceği ve bu şekilde daha agresif bir seyre sebep olabileceği düşünülmektedir. [66, 67, 68].

Treg'lerin bu immünsupresif etkilerinde kullandıkları birçok mekanizma tanımlanmıştır (**Şekil 2-4**). Bunlardan en çok bilinenleri CTLA-4 ve CD25 aracılığı ile olanlarıdır [65]. CTLA-4, APC ile sitotoksik T lenfosit arasındaki ko-stimulator yolak olan B7-1/2 ile CD28 etkileşimini, B7-1/2'yi CD28'den daha yüksek affinite ile bağlayarak engeller. Böylece sitotoksik T lenfositte uyarıcı sinyal yerine inhibe edici sinyal gitmesine sebep olur [69]. İkinci bir mekanizma ise Treg'lerin tanımlanmasında da kullanılan CD25 molekülü aracılığıyla gerçekleşir. IL-2 reseptör alfa olarak da adlandırılan bu molekül, sitotoksik T lenfositler için uyarıcı etki gösteren IL-2'yi bağlayarak ortamdan uzaklaştırır. Böylece sitotoksik T lenfosit aktivasyonu gerçekleşmemiş olur [65]. FoxP3'ün Treg'lerde CTLA-4 ve CD25 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [70]. Üçüncü bir mekanizma ise inflamatuvar yanıtı baskılayıcı etki gösteren TGF- β (Transforming Growth Factor- β) ve IL-10 gibi sitokinlerin salgılanmasıdır [58, 65]. Treg'lerin immünsupresif etkilerinde rol oynadığı son zamanlarda gösterilen bir diğer molekül de PD-1'dir ve PD-1 ekspresyonu yüksek olan Treg'lerin supresif etkilerinin PD-1 eksprese etmeyen Treg'lere göre daha fazla olduğu gösterilmiştir [71].

Tümör immün mikroçevresinde periferik kana göre daha yoğun oranda Treg bulunduğu malign melanom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, mide kanseri ve over kanseri gibi bazı kanserlerde gösterilmiştir. Periferik kanda CD4+ lenfositlerin %5-10'unu teşkil ederken, tümör mikroçevresinde ise CD4+ lenfositlerin ise %20-50'sini oluşturduğu gözlemlenmiştir [13]. Yüksek oranda Treg infiltrasyonunun melanom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, renal hücreli kanser, karaciğer, pankreas, meme, mide kanserinde kötü prognozla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [13]. Bunun tam tersine, bazı çalışmalarda, mesane, kolon ve baş-boyun kanserlerinde yüksek oranda FoxP3+ T lenfosit varlığının iyi prognozla ilişkili bulan

çalışmalar da mevcuttur [72]. Baş boyun kanserlerinde de tümördeki Treg infiltrasyonunun yüksek olduğu bilinmektedir. Bu nedenlerle kanser tedavisinde Treg'leri ve onların immünsupresif etkilerinde rol oynayan molekülleri hedef alan immünoterapi ajanları araştırılmaktadır.



Şekil 2-4: Kansere karşı immün yanıtta regülatuar T lenfositlerin (Treg) rolü. Treg baskın mikroçevrede immünsupresyon nedeni ile kanser progresyonu daha belirgin olurken, CD8⁺ T lenfosit (sitotoksik T lenfosit) baskın ortamda ise tümör progresyonu baskılanır. [Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol.* 2016;28(8):401-409. doi:10.1093/intimm/dxw025].

2.5.1.2. B Lenfositler

CD20 pozitif lenfositler olup, humoral adaptif immüitenin elemanları olarak kanda serbest dolaşan antijenlere karşı antikor üretiminden sorumlu olup kansere karşı immün yanıtta bilindiği kadarıyla belirgin bir rol oynamamaktadırlar. Ancak kanser immün mikroçevresinde bulunmaktadırlar ve hatta CD20+ hücre infiltrasyonunun orofarenks kanserlerinde iyi prognozla ilişkili olduğunu gösteren yayınlar da mevcuttur [73].

2.5.2. İmmün Checkpoint Mekanizmalar

Tümör infiltre eden lenfositler üzerinde eksprese edilen bazı markerların bu lenfositlerin aktivitelerinin sınırlandırılmasında ve inhibisyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Aşırı immün yanıtın sınırlandırılması sağlıklı bir insanda gereklilik iken, kanser mikroçevresinde gerçekleşen bu inhibisyon kanser hücrelerinin immün sistemin etkilerinden kaçışını sağlamaktadır. Bunda rol oynayan moleküllere immune checkpoint adı verilir. Bunların en ön plana çıkanları PD-1 ve CTLA-4 iken, yeni gündeme gelen diğer iki önemli marker da TIM-3 ve LAG-3'tür (*Şekil 2-5*) [6].

Aktive T lenfositler üzerinde eksprese edilen programmed cell death protein 1 (PD-1) ve APC'lerin bazen ise tümör hücrelerinin üzerinde eksprese edilen ligandı programmed death-ligand 1 (PD-L1 veya B7-H1) yolağı ile aktive T lenfositler etkisiz hale getirilir [49]. Bir diğer immune checkpoint ise CTLA-4 aracılığıyla gerçekleşir. T lenfositlerde CD28 yerine CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4) ekspresyonunun artması ve bu molekülün CD80 veya CD86 ile daha yüksek affinitede bağlanıyor olması sonucunda T lenfositlerde aktivasyon değil inhibisyon gerçekleşir [48]. Mekanizmaları iyi ortaya konmuş bu iki immune checkpoint molekül dışında, immünsupresif etki, immün tolerans ve Treg hücre fonksiyonları ile ilişkilendirilen; ancak mekanizmaları tam olarak ortaya konmamış olan TIM-3 ve LAG-3 ise bu çalışmada değerlendirilen iki molekül olacaktır.

2.5.2.1. T Cell Immunoglobulin and Mucin Domain (TIM-3)

Aktive T lenfositler üzerinde eksprese edilen ve HAVCR2 olarak da adlandırılan bu molekülün ligandları galectin-9 ve Ceacam-1 (Carcinoembryonic Antigen Cell Adhesion Molecule 1) olarak tanımlanmıştır [74] [75].

TIM-3 Th1 ve sitotoksik T lenfositler için negatif regülatör olarak etki etmektedir [76]. CD8+ T lenfositler üzerinde PD-1 ile birlikte aktivitenin azalmaya başladığının bir göstergesi olarak ortaya çıkmaktadır [14]. Bunun yanı sıra Treg'ler üzerinde de yine TIM-3 ekspresyonunun olduğu, TIM-3 ekspresyonu yüksek olan Treg'lerin immünsupresif etkilerinin daha fazla olduğu ve immün yanıtı baskılayan CTLA-4, PD-1 molekülleri daha fazla eksprese ettiği gösterilmiştir [15][77]. Tümör modellerinde, muhtemelen IL-10 üretiminin artması nedeniyle, Tim-3- FoxP3+ Treg popülasyonundan daha immünosupresif olan Tim-3+ FoxP3+ Treg popülasyonunun varlığı gösterilmiş ve bu modellerde, Tim-3+ FoxP3+ Treg hücrelerinin CD8+ TIL'lerde işlevsiz bir fenotip proliferasyonuna yol açtığı ortaya konulmuştur [78].

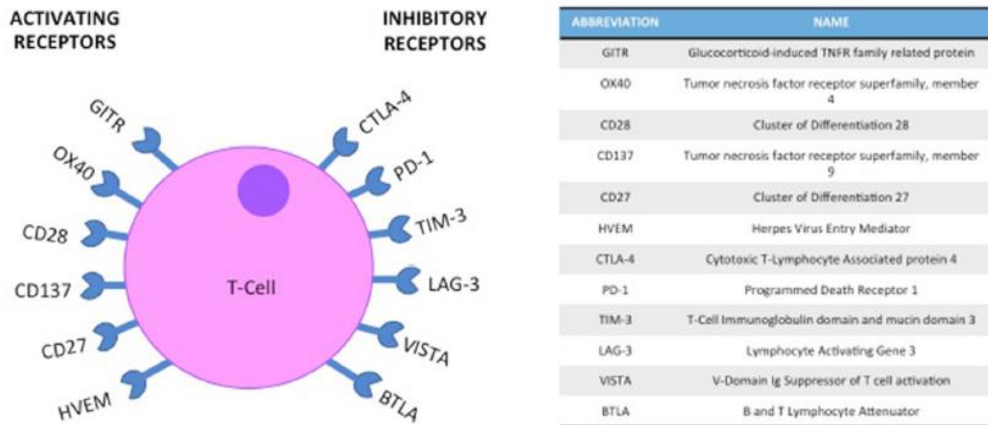
TIM-3 ekspresyonunun farklı kanser türlerinde kötü prognoz ile ilişkili olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur. Bu kanserler arasında prostat kanseri, kolorektal kanser, renal hücreli kanser, mesane kanseri, serviks kanseri, hepatoselüler karsinom ve over kanseri bulunmaktadır [79][80]. Preklinik çalışmalar baş boyun kanseri hayvan modellerinde TIM-3 blokajının T lenfosit aktivitesini arttırarak tümöre karşı immün yanıtı güçlendirdiği gösterilmiştir [16]. Bu nedenle özellikle PD-1'e karşı monoklonal antikorla uygulanan immünoterapinin başarısızlığı ile TIM-3 ekspresyonunun ilişkili bulunması nedeni ile; TIM-3 de immünoterapide yeni bir hedef molekül olarak ön plana çıkmaktadır [81].

2.5.2.2. Lymphocyte Activation Gene -3 (LAG-3)

CD223 olarak da bilinen bu molekül aktive CD4+ ve CD8+ T lenfositler ile NK hücreler üzerinde eksprese edilir. Ko-inhibitör bir immune checkpoint molekülüdür ve ligandı MHC II'dir [17]. MHC II'yi CD4'ten daha yüksek bir affinite ile bağladığından antijen sunma sürecini bloke eder. L-selectin'in de aynı zamanda bu reseptörün ligandı olduğu gösterilmiştir [82].

LAG-3'ün fonksiyonunu kaybetmiş CD4 ve CD8 hücreler üzerinde de eksprese edildiği gösterilmiştir [83]. CD4 hücrelerde LAG-3 ekspresyonunun artışı hücrenin aktivitesini kaybetmeye başladığının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir ve CD4/MHC-II etkileşimi bu lenfositlerin çoğalmasını ve sitokin salgılamasını baskılamaktadır [84]. Bunun yanı sıra LAG-3'ün CD4+CD25+FoxP3+ hücreler, yani Treg'ler üzerinde yüksek oranda eksprese edildiğini ve LAG-3 blokajının Treg'lerin supressör etkisini ortadan kaldırarak hayvan modellerinde tümöre karşı immün yanıtı arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur [15, 17]. LAG-3'ün aynı zamanda Treg'lerin çoğalmasını arttırdığı, LAG-3 blokajının ise Treg proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir [85]. LAG-3 eksprese eden Treg'lerin de immün yanıtı baskılayan IL-10 ve TGF- β gibi sitokinleri daha fazla salgıladıkları gösterilmiştir [86].

Kolorektal kanser, renal hücreli kanser, lenfoma, baş boyun kanserleri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, melanom ve meme kanseri gibi birçok malignitede LAG-3 ekspresyonunun kötü prognostik faktörlerle ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [86] [87]. Bu açıdan LAG-3'ü hedef alacak monoklonal antikorlar ile immünoterapi açısından çalışmalar devam etmektedir. PD-1 ve CTLA-4'ten sonra LAG-3 de immünoterapide bir hedef molekül olarak düşünülmektedir.



Şekil 2-5: : Ko-inhibitör ve ko-stimülatör checkpoint moleküller. [Forster MD, Devlin MJ. Immune checkpoint inhibition in head and neck cancer. Front Oncol. 2018;8(AUG). doi:10.3389/fonc.2018.00310].

2.6. İmmünoterapi

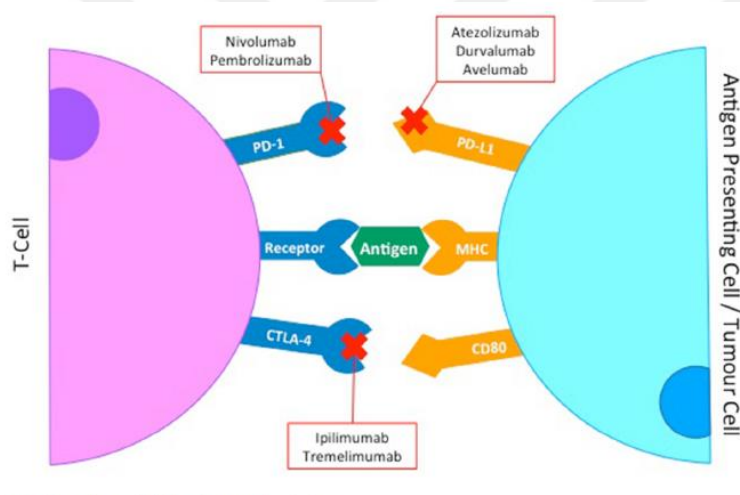
İmmünoterapinin ilk örneği 1890'da immünoterapinin babası olarak kabul edilen William Coley tarafından verilmiştir [88]. Coley toksini olarak da bilinen *Streptococcus pyogenes* toksininin inoperabl 1000 sarkom hastasına enjeksiyonu sonrası normalde 5 yıllık survisi %20 olan bu hasta grubunun, %10'unda tam remisyon gözlenmesi enfeksiyonla indüklenen immün sistemin kanser tedavisindeki etkinliğine dikkat çekmiştir. 1950'lerde Medawar ve Burnet [89], kanser hücrelerinin normal hücelere olan benzerliklerinin fazla olduğu durumda immün sistemin bu hücelere karşı duyarsız hale geldiğini hayvan deneyleri ile göstermiş ve bunun moleküler mekanizmaları 25 yıl sonra anlaşılacak olsa da immün tolerans kavramının temelini atmışlardır. Yine bu dönemde otoimmün hastalık kavramının ortaya çıkmaya başlamasıyla oto-reaktif hücrelerin bu immün toleranstan kaçabileceği görülmüş ve kanser tedavisinde bu immün toleransın ortadan kaldırılarak immün sistemin kanser hücrelerine karşı etkinliğinin arttırılabileceği anlaşılmıştır [52]. Bu üç önemli dönüm noktası kanserde immünoterapinin temel çıkış noktasını oluşturmuştur.

T lenfosit inhibisyonunda rol oynayan CTLA-4'ün blokajı T lenfositlerin aktivasyonunu ve tümöre karşı immün yanıtın artışı sağlayacağından, CTLA-4 monoklonal antikoru olan ipilimumab geliştirilmiştir [90]. Benzer şekilde yine T lenfosit inhibisyonundan sorumlu, kanser hücreleri tarafından immün yanıttan kaçmak için bir araç olan PD-1 ve PD-L1 moleküllerinin blokajı da kanser tedavisinde bir seçenek olarak ortaya çıkmış ve PD-1 monoklonal antikoru olan nivolumab, pembrolizumab ve PD-L1 monoklonal antikoru olan atezolizumab geliştirilmiştir (*Şekil 2-6*) [91].

Şu an için baş boyun kanserlerinde FDA (Food and Drug Administration) onaylı tek immünoterapi ajanı EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) monoklonal antikoru cetuximab'dır [92]. Sık olarak kullanıldığı kolorektal karsinomdaki etki mekanizmasından farklı olarak, aynı zamanda tümöre karşı immün yanıtı arttırdığı ve baş boyun kanserlerindeki etki mekanizmasının bu olduğu gösterilmiştir [93]. Ancak ilk onaylandığı 2006'dan bu yana yapılan çalışmalarda cetuximab'ın sağkalım üzerine

belirgin bir etkisinin olmadığına gösterilmesi, başka immunoterapi ajanlarının bu ajanların hedef alabileceği moleküllerin araştırılmasını gerekli kılmıştır [94] [95].

İmmün checkpoint inhibitörü olarak şu ana kadar baş boyun kanserlerinde onaylanmış bir immunoterapi ajanı bulunmamaktadır. Anti-PD-1, anti-PD-L1, Anti-CTLA-4 ile yapılan klinik çalışmalar devam etmektedir [96]. Birçok kanserde kullanıma giren bu immünoterapi ajanlarının her zaman istenilen etkiyi yapmıyor oluşu, özellikle baş boyun kanserlerinde etkinliğinin düşük olduğunun görülmesi başka immün checkpoint mekanizmaların araştırılmasına yol açmıştır [97]. Bu noktada TIM-3 ve LAG-3 gibi immün checkpoint markerlar giderek daha fazla kanser türünde araştırılmaktadır.



Şekil 2-6: İmmunoterapide kullanılan monoklonal antikorlar ve hedef aldıkları immün checkpointler (Forster MD, Devlin MJ. Immune checkpoint inhibition in head and neck cancer. Front Oncol. 2018;8(AUG). doi:10.3389/fonc.2018.00310).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: 34821, Proje Kodu TTU-2020-34821'dir. Çalışma öncesinde İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan Etik Kurul Onay Formu alınmıştır (08/08/2019 tarihli 122461 sayılı yazı).

İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda 2016-2018 yılları arasında larenks skuamöz hücreli karsinomu tanısı almış ve açık cerrahi yöntem ile parsiyel veya total larenjektomi yapılan 50 hasta çalışmaya alınmıştır. Hastalara tümörün yerleşimine, lenf nodu tutulumuna göre lateral boyun diseksiyonu da yapılmıştır. Daha önce kemoterapi veya boyuna radyoterapi almış hastalar, seroloji pozitif hastalar, başka bir malignite öyküsü olan hastalar çalışmaya alınmamıştır. Bütün hastalardan cerrahi öncesi aydınlatılmış onam formu alınmıştır.

Hastaların histopatolojik karakteristikleri incelenmiş ve AJCC TNM evrelemesi 8. edisyona göre patolojik evrelemeleri yapılmıştır. Patoloji spesmenleri tek bir ekip tarafından incelenmiştir.

Hastalarda aşağıdaki parametreler değerlendirilmiştir:

1. Cinsiyet
2. Yaş
3. Tümör yerleşimi
4. Yapılan cerrahinin şekli
5. Patolojik T evresi
6. Patolojik N evresi
7. TNM evresi

8. Histolojik grade
9. Kan damarı invazyonu
10. Lenfatik invazyon
11. Perinöral invazyon
12. Kartilaj invazyonu
13. Perinodal invazyon
14. Nüks varlığı
15. Metastaz varlığı
16. Ölüm ve hastalığa bağlı ölüm varlığı
17. Ortalama sağkalım süresi
18. Hastalığa özgü sağkalım süresi
19. Hastalıksız sağkalım süresi
20. Rekürrenssiz sağkalım süresi
21. Tümör dokusunda inflamatuvar yanıt yoğunluğu
22. Tümör dokusunda tümör infiltre eden lenfositlerin dağılımı (CD3, CD4, CD8, CD20)
23. Tümör infiltre eden lenfositlerde CD25 ekspresyonu
24. Tümör infiltre eden lenfositlerde FoxP3 ekspresyonu
25. Tümör infiltre eden lenfositlerde TIM-3 ekspresyonu
26. Tümör infiltre eden lenfositlerde LAG-3 ekspresyonu

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Işık Mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japonya)

Otomatik Preparat Boyama Cihazı (Ventana Benchmark XT, Tuscon, AZ, ABD)

Derin Dondurucu (-20) (Arçelik, TÜRKİYE)

Derin Dondurucu (-80) (Sanyo, JAPONYA)

Etüv (Hybaid, İNGİLTERE)

Otoklav (Hirayama, JAPONYA)

Distile Su Cihazı (Nüve, TÜRKİYE)

Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich, ALMANYA)

Hassas Terazi (Shimadzu, JAPONYA)

Otomatik Mikropipetler (Eppendorf, ABD)

3.1.3. Kullanılan Ticari Kitler

1. CD3 Monoklonal Antikor: CD3 (T3) [Clone:LN10] RTU Bond 7 ml (LEICA/Novocastra, Illinois, ABD)
2. CD20 Monoklonal Antikor: CD20 (B1) [Clone:L26] RTU Bond 7 ml (LEICA/Novocastra, Illinois, ABD)
3. CD4 Monoklonal Antikor: CD4 (T4) [Clone:4B12] RTU Bond 7 ml (LEICA/Novocastra, Illinois, ABD)
4. CD8 Monoklonal Antikor: CD8 (T8) [Clone:4B11] RTU Bond 7 ml (LEICA/Novocastra, Illinois, ABD)
5. CD25 Monoklonal Antikor: CD25 (Interleukin-2 Receptor) [Clone:4C9] RTU Bond 7 ml (Leica/Novocastra, Illinois, ABD)
6. FOXP3 Monoklonal Antikor: FOXP3 [Clone:EP340] Conc. 0.1 mL (1:100-200) (Eptomics, Nanterre, Fransa)
7. TIM-3 Monoklonal Antikor: TIM-3 [Clone:D5D5R] Conc. 0.1 mL (1:400) (CellSignaling, Massachusetts, ABD)
8. LAG-3 Monoklonal Antikor: LAG-3 (CD223) [Clone:EP294] Conc. 0.1 mL (1:100-200) (Eptomics, Nanterre, Fransa)
9. İmmünohistokimya Kiti: UltraView Universal DAB Detection Kit [250 Test] (Roche/Ventana, Basel, İsviçre)

- a. DAB Detection Kit.
- b. Deparafinizasyon solüsyonu
- c. Yıkama solüsyonu
- d. Yüksek ısıya uygun buffer (tampon solüsyonu)
- e. Yüksek ısıya uygun likid kaplama solüsyonu
- f. Antijen retrieval solüsyonları
- g. Lamları etiketlemek üzere barkod etiketi
- h. Enzim kullanılacak teknikler için protease
- i. Sinyal güçlendirilmesinin istendiği vakalar için amplification kit
- j. Zıt boyama için Hematoxylin
- k. Anti-zıt boyama için Bluing Reagent

3.1.4. Kullanılan Sarf Malzemeler

1. Lam: Lam, pozitif yüklü [72/PK] (Epiglass, İstanbul, Türkiye)
2. Lamel: Lamel, 24x50 mM [100/PK] (Epiglass, İstanbul, Türkiye)
3. Mikrotom Bıçağı: Mikrotom bıçağı, Patho Cutter-II [50 Adet] (Erma, Tokyo, Japonya)

3.2. Yöntem

3.2.1. İmmünohistokimya boyaması

Vakalara ait Hematoksilen-Eosin boyalı lamalar ışık mikroskopu altında değerlendirildikten sonra, her vaka için yeterli tümör dokusu bulunan, immunhistokimyasal çalışma için uygun nitelikte 1'er adet parafin blok seçildi. İmmunhistokimyasal boyanma özelliklerinin saptanması için, seçilen parafin bloklardan 2 mikronluk kesitler halinde 7'şer adet pozitif şarjlı lama alındı. Pozitif şarjlı lam üzerine alınmış 2 mikronluk kesitler 2 saat 56 derece ayarlı etüvde bekletildi. İmmunhistokimyasal analiz için otomatik preparat boyama cihazı (Ventana Benchmark XT, Tuscon, AZ, USA) kullanıldı. İşlem için cihaza uygun biyotinsiz HRP multimer bazlı hidrojen peroksit ve 3,3-diaminobenzidin tetraklorit (DAB) kromojeni içeren hazır kit (Ventana) kullanıldı. CD3 (T3) [LN10], CD4 (T4) [4B12], CD8 (T8) [Clone:4B11], CD20 (B1) [L26], CD25 (IL2R.1) [4C9], FOXP3 [EP340], LAG-3 (CD223) [D2G4O] ve TIM-3 [D5D5R] antikoları lamlara uygulandı. Karşıt boyama, boyama cihazında Hematoksilen solüsyon ile yapıp, dehidratasyon ve ksilen aşamalarından sonra işlem tamamlandı. Lam entellan ile kapatılarak ışık mikroskobunda değerlendirmeye hazır hale getirildi.

3.2.2. İmmünohistokimya preparatlarının değerlendirilmesi

Öncelikle her hasta için, hematoxylin-eosin ile boyanmış tümör preparatları üzerinden selülaritenin %70'den fazla, nekrozun minimal ve tümör parankiminin %50'den fazla olduğu 5 alan seçildi. CD3, CD4, CD8, CD20, CD25, FoxP3, TIM-3 ve LAG-3 monoklonal antikoları ile immunohistokimya işlemine tabi tutulmuş olan preparatların da aynı alanları belirlendi. Değerlendirmeler ışık mikroskobunda (Olympus, Tokyo, Japonya) 200x büyütme altında (20x objektif lensi), yukarıda sayılan boyalar ile boyanan tümör infiltre eden lenfositlerin (TIL), baş boyun kanserleri patolojisi alanında tecrübeli patolog tarafından, manuel olarak sayılması ile gerçekleştirildi. Sonuçları daha iyi yansıttığı daha önce gösterilmiş olduğundan [98], sadece tümör parankimini infiltre eden lenfositler değerlendirmeye alındı. Sadece B lenfositler (CD20+ hücreler) tümör parankimini genellikle infiltre etmediği için stromadaki B lenfositler sayıldı.

3.2.2.1. Tümör infiltre eden lenfositlerin sınıflandırılması

Yukarıda belirtildiği şekilde seçilen 5 adet 200x büyütme alanındaki CD3+, CD4+, CD8+, CD20+, CD25+ ve FoxP3+ TIL'ler ayrı ayrı sayılarak her biri için bu 5 alandaki sayının ortalaması alındı. Ek olarak CD4/CD8 ve FoxP3/CD8 oranları alındı. Bu alanda yapılmış olan benzer çalışmalarda da olduğu üzere [99] [100], ortalama değerler hesaplandıktan sonra her marker için ayrı ayrı olacak şekilde ortalamanın altında olanlar düşük, üstünde olanlar yüksek grup olarak sınıflandırılarak ikişer grup oluşturuldu. Kıyaslamalar tek tek markerlar için oluşturulan bu gruplar arasında yapıldı.

3.2.2.2. TIM-3 ve LAG-3 ekspresyonu

Her iki marker için de literatürde henüz tanımlanmış ve kabul görmüş bir değerlendirme kriteri bulunmamaktadır. Çalışmamızda, daha önce birçok çalışmada da etkinliği gösterilmiş olan, kombine pozitif skor algoritması kullanılmıştır [101] [102] [103]. Bu skorlamaya göre bir tümör alanındaki TIM-3 veya LAG-3 pozitif tümör hücresi ve tümör infiltre eden lenfosit sayısının toplamının toplam tümör hücresi sayısına oranının 100 ile çarpılması olarak ifade edilmektedir. $KPS \geq 1$ ise pozitif, aksi takdirde negatif kabul edilmektedir. Buna göre hem TIM-3, hem de LAG-3 için pozitif ve negatif olmak üzere 2'şer hasta grubu oluşturularak sonuçlar bu şekilde karşılaştırıldı.

3.2.3. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

İstatistiksel analiz için SPSS 19.0 programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler, sayısal veriler için ortalama, standart sapma, median değer, minimum ve maksimum değer olarak verilirken; kategorik veriler için sayı ve yüzde olarak belirtildi. Gruplar arası kategorik değişkenlerin kıyaslanması Pearson Ki Kare Analizi ile yapıldı. Normal dağılım koşulunu sağlayan sayısal değişkenler için kıyaslamalar bağımsız iki grupta Mann Whitney U Testi kullanılarak, bağımsız ikiden fazla grupta Kruskal Wallis Testi ile analiz edildi. İstatistiksel alfa anlamlılık seviyesi $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Sayısal değişkenler arası korelasyon analizinde parametrik test koşulu sağlanamadığından Spearman Korelasyon Analizi kullanıldı.

Sağkalım parametreleri olan ortalama sağkalım (OS: Overall Survival), hastalığa özgü sağkalım (DSS: Disease Specific Survival), hastalıksız sağkalım (DFS: Disease Free Survival) ve rekürrenssiz sağkalım (RFS: Recurrence Free Survival) Kaplan-Meier Yöntemi ile değerlendirilirken Breslow (Generalized Wilcoxon) Yöntemi ile hesaplanan p değeri $<0,05$ ise anlamlı kabul edildi. Hazards Ratio, Cox Regression Analizi ile hesaplandı ve yine $p<0,05$ değeri anlamlı olarak alındı.



4. BULGULAR

Bu çalışma 2016-2018 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda larenks skuamöz hücreli karsinomu nedeniyle açık cerrahi yöntemle total ve parsiyel larenjektomi yapılan 50 hasta üzerinde retrospektif kohort olarak yapılmıştır. Hastaların yaşları 45 ile 84 arasında değişmekte olup ortalama $62,46 \pm 8,79$ 'dur. Hastaların 48'i (%96) erkek; 2'si (%4) kadındır (**Tablo 4-1**).

Tablo 4-1: Hastaların demografik özellikleri

		Sayı (n: 50)	Yüzde (%)
Yaş (yıl)	Ortalama: $62,46 \pm 8,79$		
	Minimum: 45		
	Maksimum: 84		
Cinsiyet	Erkek	48	96
	Kadın	2	4

Tümör yerleşimi 12 (%24) hastada glottik, 19 (%38) hastada supraglottik olup, 19 (%38) hastada ise transglottik tümör söz konusudur. Hiçbir hastada daha önce larenks karsinomu nedeni ile primer radyoterapi öyküsü mevcut değildir. 32 (%64) hastaya parsiyel larenjektomi; 18 (%36) hastaya total larenjektomi operasyonu yapılmıştır. 44 (%88) hastada bilateral lateral boyun diseksiyonu, 6 (%12) hastada unilateral lateral boyun diseksiyonu yapılmıştır. 46 (%92) hastada tedaviye postoperatif adjuvan radyoterapi de eklenmişken, 4 (%8) hasta radyoterapi almamıştır. 15 (%30) hasta radyoterapiye ek olarak postoperatif dönemde kemoterapi de almıştır, 35 (%70) hastada ise kemoterapi öyküsü bulunmamaktadır (**Tablo 4-2**).

Tablo 4-2: Hastaların tümör bölgesi, operasyon tipi, boyun disseksiyonu türü, postoperatif adjuvan radyoterapi ve kemoterapi öykülerine göre dağılımı

	Sayı (n: 50)	Yüzde (%)
Tümör yerleşimi		
Glottik	12	24
Supraglottik	19	38
Transglottik	19	38
Operasyon tipi		
Parsiyel larenjektomi	32	64
Total larenjektomi	18	36
Boyun disseksiyonu		
Bilateral	44	88
Unilateral	6	12
Radyoterapi		
Var	46	92
Yok	4	8
Kemoterapi		
Var	15	30
Yok	35	70

Histopatolojik inceleme sonrası patolojik T evresine bakıldığında 1 (%2) hasta T1, 8 (%16) hasta T2, 15 (%30) hasta T3 ve 26 (%52) hasta T4 evresindedir. Erken evre (T1 ve T2) hasta sayısı 16; ileri evre (T3 ve T4) hasta sayısı 34'tür. Patolojik N evresine bakıldığında 27 hasta N0 (%54), 8 (%16) hasta N1, 5 (%10) hasta N2 ve 10 (%20) hasta N3'tür. Hastaların 23'ünde (%46) lateral boyunda lenf nodu metastazı mevcuttur. Tanı anında uzak organ metastazı hiçbir hastada görülmemiştir. TNM

sınıflamasına göre hastalık evresi 1 (%2) hastada evre 1, 8 (%16) hastada evre 2, 6 (%12) hastada evre 3 ve 35 (%70) hastada evre 4'tür. 9 (%18) hasta evre 1-2 (erken evre) hastalığa sahipken, 4 (%82)1 hasta evre 3-4 (ileri evre) hastalığa sahiptir (**Tablo 4-3**).

Tümörün differansiyon derecesine (grade) bakıldığında; 2 (%4) hastada grade 1 (iyi differansiye) , 30 (%60) hastada grade 2 (orta differansiye), 18 (%36) hastada grade 3 (az differansiye) tümör mevcuttur. Diğer önemli histopatolojik karakteristiklerden kan damarı invazyonu 26 (%52) hastada, lenfatik invazyon 42 (%84) hastada, perinöral invazyon 21 (%42) hastada, tiroid kartilaj invazyonu ise 23 (%46) hastada izlenmiştir. Boyunda lenf nodu metastazı olan hastalar incelendiğinde 10 (%20) hastada perinodal invazyon görülmüştür (**Tablo 4-3**).

Tablo 4-3: Hastalığın TNM evrelemesine ve tümörün histopatolojik özelliklerine göre dağılımı

		Sayı (n: 50)	Yüzde (%)
Patolojik T evresi			
	T1	1	2
	T2	8	16
	T3	15	30
	T4	26	52
Patolojik N evresi			
	N0	27	54
	N1	8	16
	N2	5	10
	N3	10	20
Histopatolojik grade			
	Grade 1	2	4
	Grade 2	30	60
	Grade 3	18	36
Hastalık evresi			
	Evre 1	1	2
	Evre 2	8	16
	Evre 3	6	12
	Evre 4	35	70
Kan damarı invazyonu			
	Var	26	52
	Yok	24	48
Lenfatik invazyon			
	Var	42	84
	Yok	8	16
Perinöral invazyon			
	Var	21	42
	Yok	29	58
Tiroid kartilaj invazyonu			
	Var	23	46
	Yok	27	54
Perinodal invazyon			
	Var	10	20
	Yok	40	80

Hastaların ortalama takip süresi 44,40±16,20 ay (min: 4 ay, maks: 64 ay) olmuştur. Bu süreç içerisinde 10 (%20) hastada nüks gelişmişken, 4 (%8) hastada ise uzak organ metastazı gelişmiştir. Bu uzak organ metastazları bütün hastalarda akciğere olmuştur. 16 (%32) hastada takip süresi içerisinde ölüm gerçekleşmişken bunların 10 (%20) tanesi hastalığa bağlı ölümken, 6 (%12) tanesi mevcut malignite dışındaki sebeplerle gerçekleşen ölümlerdir (**Tablo 4-4**).

Tablo 4-4: Hastaların takip süreleri ve parametreleri

		Sayı (n: 50)	Yüzde (%)
Takip süresi (ay)		Ortalama: 44,40±16,20	
		Minimum: 4	
		Maksimum: 64	
Nüks			
	Var	10	20
	Yok	40	80
Metastaz			
	Var	4	8
	Yok	46	92
Ölüm			
	Var	16	32
	Yok	34	68
Hastalığa bağlı ölüm			
	Var	10	20
	Yok	40	80

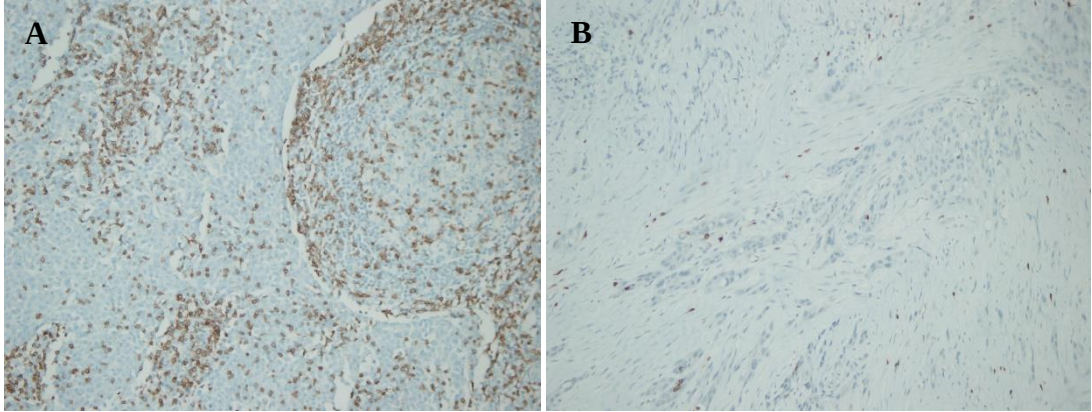
Değerlendirmeye alınan immünolojik parametrelerden tümör karşı geliştirilen inflamatuvar yanıtı bakıldığında, 13 (%26) hastada hafif derece inflamatuvar yanıt, 20 (%40) hastada orta derece inflamatuvar yanıt, 17 (%34) hastada ise yoğun inflamatuvar yanıt gözlenmiştir. Işık mikroskopunda 400x büyütmede (0,05 mm yarıçapındaki alanda) yapılan hücre sayımlarında; CD3+ hücre sayısı (T lenfosit) (*Şekil 4-1*) ortalaması $461,18 \pm 273,73$ (min:60, max:1496), median değeri 443,5 olarak hesaplanmıştır. CD20+ hücre sayısı (B lenfosit) (*Şekil 4-2*) ortalaması $131,18 \pm 145,45$ (min:6, max:612), median değeri ise 63 olarak gözlenmiştir. T lenfosit alt gruplarına bakıldığında; CD4+ hücre sayısı (yardımcı T lenfosit) (*Şekil 4-3*) ortalaması $159,12 \pm 129,01$ (min:12, max:616), median değeri ise 119'dur. CD8+ hücre sayısı (sitotoksik T lenfosit) (*Şekil 4-4*) ortalaması $300,18 \pm 194,60$ (min:42, max:972), median değeri ise 223 olarak hesaplanmıştır. CD25+ hücre sayısı (*Şekil 4-5*) ortalaması $70,36 \pm 49,92$ (min:14, max:188), median değeri ise 52,5'tir. FoxP3+ hücre sayısı (regulatuvar T lenfosit) (*Şekil 4-6*) ortalaması $35,72 \pm 33,16$ (min:6, max:69), median değeri ise 28 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca değerlendirilen CD8/CD4 oranı ortalaması $2,66 \pm 1,73$ (min:0,36, max:8,50), median değeri 2,43; CD8/FoxP3 oranı ortalaması ise $11,13 \pm 7,29$ (min:3,42, max:44,63), median değeri 9,94 olarak gözlenmiştir. Bu hücre sayımlarından elde edilen median değerlere göre her bir parametre için hastalar düşük ve yüksek olmak üzere ikişer gruba ayrılarak her bir parametre için istatistiksel karşılaştırmalar bu gruplar arasında yapılmıştır (*Tablo 4-5*).

TIM-3 ve LAG-3 pozitifliğinin belirlenmesi içinse kombine pozitif skor kullanılmış ve bu skor %1'in üzerinde olan hastalar pozitif kabul edilmiştir. Buna göre 20 (%40) hasta TIM-3 negatif, 30 (%60) hasta TIM-3 pozitif gruba dahil olmuştur (*Şekil 4-7*). Yine LAG-3 için de negatif olan hasta sayısı 20 (%30) pozitif olan hasta sayısı ise 30 (%60) olarak gruplanmıştır (*Şekil 4-8*) (*Tablo 4-5*).

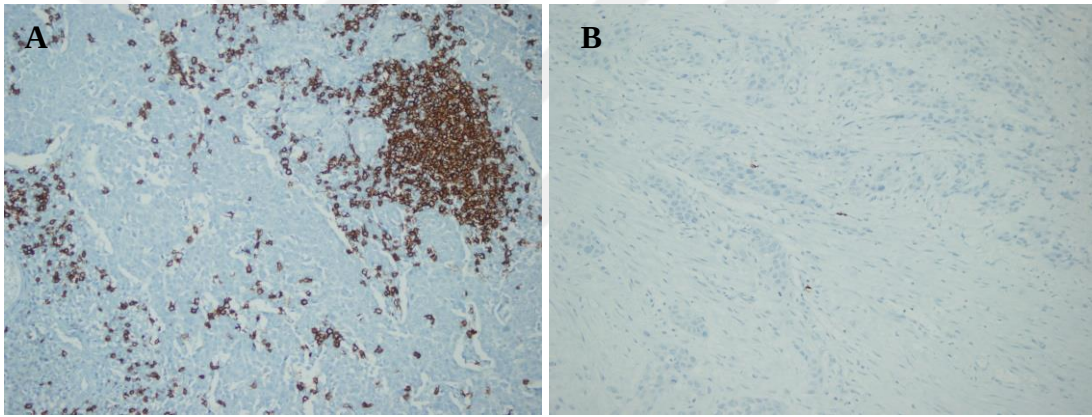
Tablo 4-5: İmmünohistokimya ile değerlendirilen parametrelerin tanımlayıcı verilerinin ve hastalara göre dağılımının özeti

	Sayı (n: 50)	Yüzde (%)
İnflamatuvar yanıt		
Hafif	13	26
Orta	20	40
Yoğun	17	34
CD3+ hücre sayısı (/0,05 mm dia)*	Ortalama: 461,18±273,73 Median: 443,5 Min: 60 Maks: 1496	
CD3		
Düşük	25	50
Yüksek	25	50
CD20+ hücre sayısı (/0,05 mm dia)	Ortalama: 131,18±145,45 Median: 63 Min: 6 Maks: 612	
CD20		
Düşük	27	54
Yüksek	23	46
CD4+ hücre sayısı (/0,05 mm dia)	Ortalama: 159,12±129,01 Median: 119 Min: 12 Maks: 616	
CD4		
Düşük	26	52
Yüksek	24	48
CD8+ hücre sayısı (/0,05 mm dia)	Ortalama: 300,18±194,60 Median: 223 Min: 42 Maks: 972	
CD8		
Düşük	25	50
Yüksek	25	50

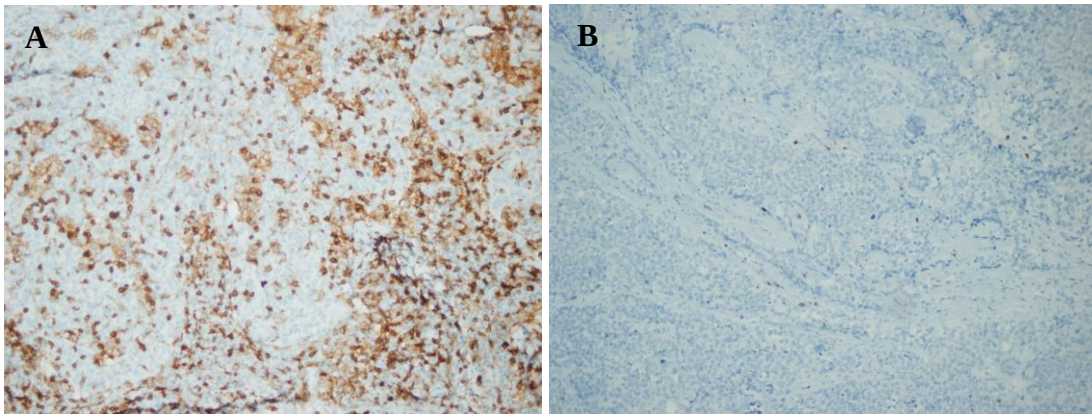
CD25+ hücre sayısı (/0,05 mm dia)		<i>Ortalama: 70,36±49,92</i>	
		Median: 52,5	
		Min: 14 Maks: 188	
CD25			
	Düşük	25	50
	Yüksek	25	50
FoxP3+ hücre sayısı (/0,05 mm dia)		Ortalama: 35,72±33,16	
		Median: 28	
		Min: 6 Maks: 169	
FoxP3			
	Düşük	26	52
	Yüksek	24	48
CD8/CD4 oranı		Ortalama: 2,66±1,73	
		Median: 2,43	
		Min: 0,36 Maks: 8,50	
CD8/CD4 oranı			
	Düşük	25	50
	Yüksek	25	50
CD8/FoxP3 oranı		Ortalama: 11,13±7,29	
		Median: 9,94	
		Min: 3,42 Maks: 44,63	
CD8/ FoxP3 oranı			
	Düşük	25	50
	Yüksek	25	50
TIM-3			
	Negatif	20	40
	Pozitif	30	60
LAG-3			
	Negatif	20	40
	Pozitif	30	60



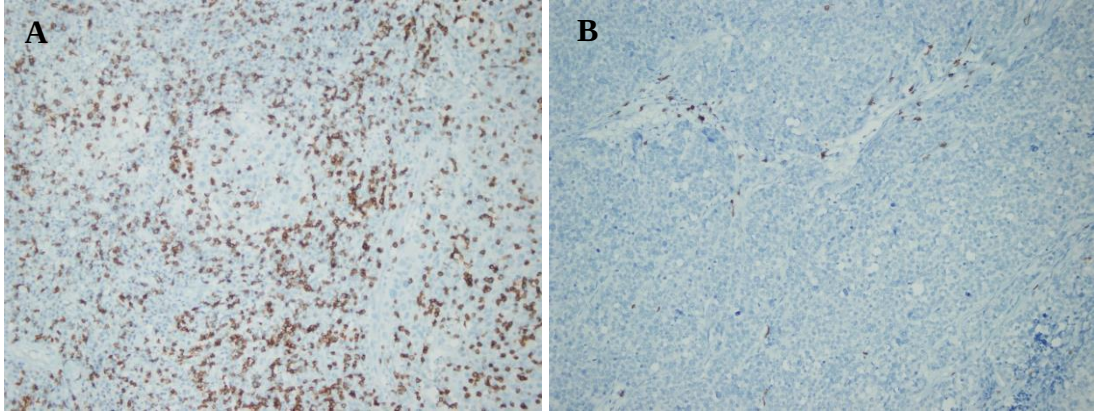
Şekil 4-1: İmmünohistokimya ile CD3+ lenfositlerin (T lenfosit) gösterimi. **A)** CD3 yüksek (200x). **B)** CD3 düşük (200x).



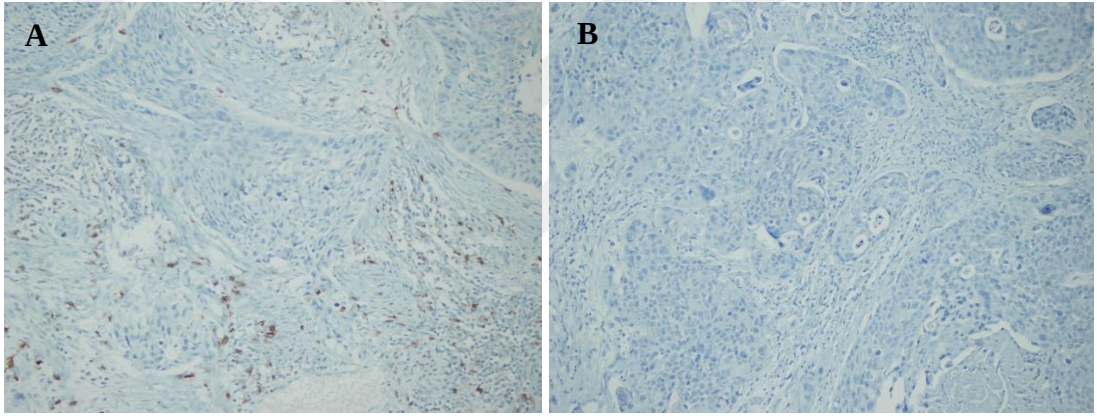
Şekil 4-2: İmmünohistokimya ile CD20+ lenfositlerin (B lenfosit) gösterimi. **A)** CD20 yüksek (200x). **B)** CD20 düşük (200x).



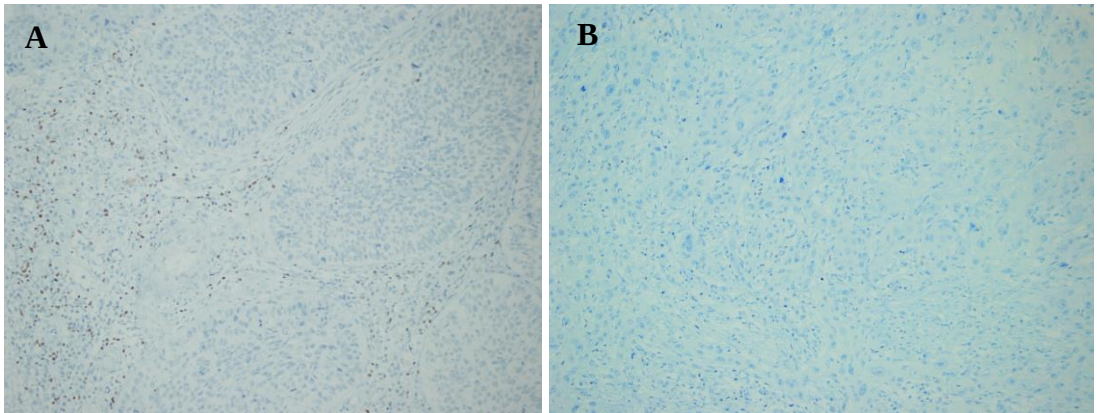
Şekil 4-3: İmmünohistokimya ile CD4+ lenfositlerin (yardımcı T lenfosit) gösterimi. **A)** CD4 yüksek (200x). **B)** CD4 düşük (200x).



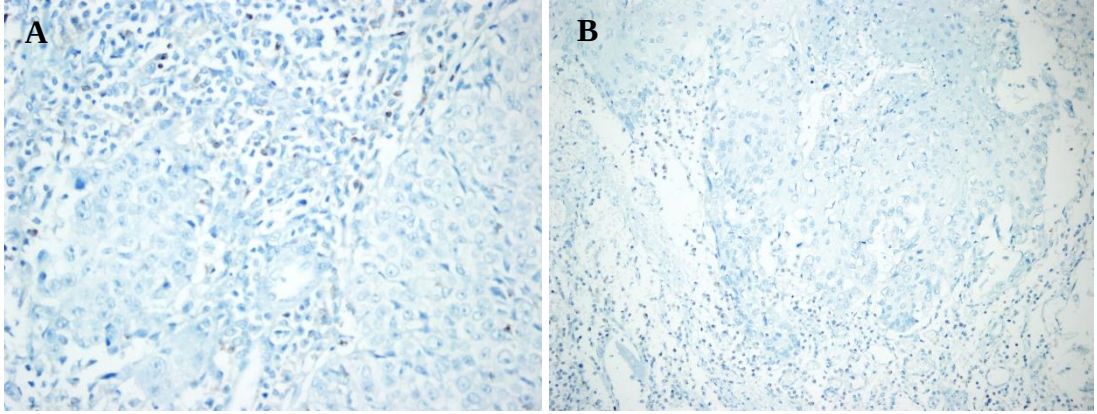
Şekil 4-4: İmmünohistokimya ile CD8+ lenfositlerin (sitotoksik T lenfosit) gösterimi. **A)** CD8 yüksek (200x). **B)** CD8 düşük (200x).



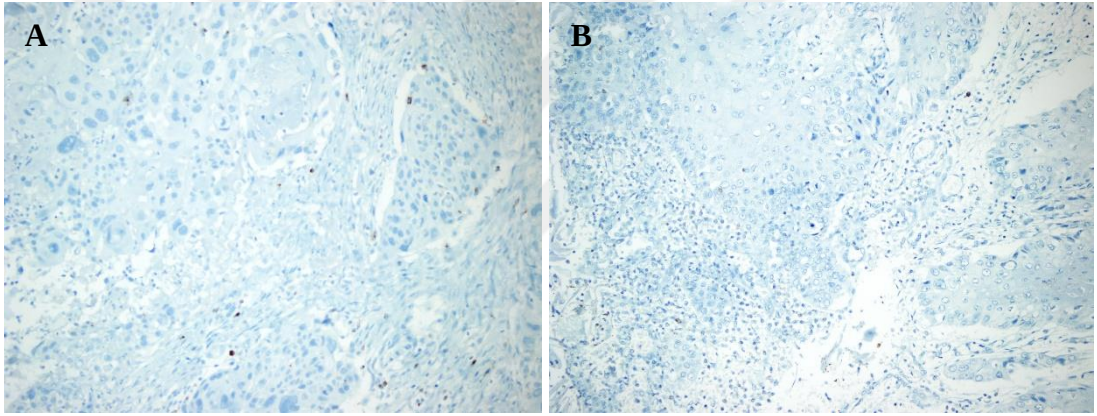
Şekil 4-5: İmmünohistokimya ile CD25+ lenfositlerin gösterimi. **A)** CD25 yüksek (200x). **B)** CD25 düşük (200x).



Şekil 4-6: İmmünohistokimya ile FoxP3+ lenfositlerin (regulator T lenfosit) gösterimi. **A)** FoxP3 yüksek (200x). **B)** FoxP3 düşük (200x).



Şekil 4-7: İmmünohistokimya ile TIM-3 ekspresyonunun gösterimi. **A)** TIM-3 pozitif (400x). **B)** TIM-3 negatif (200x).



Şekil 4-8: İmmünohistokimya ile LAG-3 ekspresyonunun gösterimi. **A)** LAG-3 pozitif (200x). **B)** LAG-3 negatif (200x).

İmmünohistokimya yöntemi ile tespit edilen CD3, CD20, CD4, CD8, CD25 ve FoxP3 pozitif lenfosit infiltrasyonlarıyla birlikte TIM-3 ve LAG-3 ekspresyonlarının tümörün histopatolojik özellikleri ve hasta takibinde önemli olan nüks, metastaz ve hastalığa bağlı ölüm parametreleri ile arasındaki ilişkiler değerlendirilmiştir.

CD3 (T lenfosit) infiltrasyonu yüksek olan hasta grubunda, düşük olanlara kıyasla tümördeki perinöral invazyon anlamlı derecede daha düşük izlenmiş ve CD3 infiltrasyonunun perinöral invazyon varlığı ile negatif korelasyon gösterdiği saptanmıştır ($p = 0,010$; $r = -0,365$). Yine CD3 yüksek olan hastalarda nüks ve hastalığa bağlı ölüm anlamlı derecede düşük izlenmiştir ($p = 0,005$; $r = -0,400$). CD20 (B lenfosit)

infiltrasyonu yüksek olan hasta grubunda ise kan damarı invazyonu daha az oranda izlenmiştir ($p=0,005$; $r=-0,405$). Tümörün histolojik differansiasyon derecesine bakıldığında az differansiye tümörlerde CD20'nin anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür ($p=0,049$; $r=-0,274$). Yine CD3 gibi CD20'de de yüksek olan grupta nüks ve hastalığa bağlı ölüm daha az meydana gelmiştir ($p=0,011$; $r=-0,361$). Bunlar dışındaki histopatolojik ve klinik parametreler ile CD3 ve CD20 infiltrasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (**Tablo 4-6**).

Tablo 4-6: CD3 ve CD20 ile histopatolojik ve klinik parametreler arasındaki ilişki.

	CD3		<i>P</i> <i>değeri</i> ¹	CD20		<i>P</i> <i>değeri</i> ¹
Histopatolojik ve klinik parametreler	<i>Düşük</i>	<i>Yüksek</i>	<i>R</i> <i>değeri</i> ²	<i>Düşük</i>	<i>Yüksek</i>	<i>R</i> <i>değeri</i> ²
Patolojik T evresi			<i>P=</i>			<i>P=</i>
T1-3	11	14	0,389	11	16	0,204
T4	13	12	<i>R=</i> -0,060	13	10	<i>R=</i> -0,157
Histolojik grade			<i>P=</i>			<i>P=</i>
1-2	14	11	0,189	14	13	0,049
3	18	7	<i>R=</i> -0,167	18	5	<i>R=</i> -0,274
Kan damarı invazyonu			<i>P=</i>			<i>P=</i>
Var	10	16	0,078	9	17	0,005
Yok	15	9	<i>R=</i> -0,240	18	6	<i>R=</i> -0,405
Lenfatik invazyonu			<i>P=</i>			<i>P=</i>
Var	5	3	0,351	5	23	0,448
Yok	20	22	<i>R=</i> 0,109	22	20	<i>R=</i> 0,074

Perinöral invazyon			P= 0,010			P= 0,107
Var	10	19	R=	13	16	R=
Yok	15	6	-0,365	14	7	0,216
Tiroid kartilaj invazyonu			P= 0,285			P= 0,270
Var	12	15	R=	13	14	R=
Yok	13	10	-0,120	14	9	-0,127
Patolojik N evresi			P= 0,285			P= 0,270
N0	12	13	R=	13	14	R=
N+	15	10	-0,120	14	0	-0,127
Perinodal invazyon			P= 0,363			P= 0,474
Var	19	21	R=	21	19	R=
Yok	6	4	-0,100	6	4	-0,060
Nüks			P= 0,005			P= 0,011
Var	16	24	R=	18	22	R=
Yok	9	1	-0,400	9	1	-0,361
Metastaz			P= 0,055			P= 0,076
Var	21	25	R=	23	23	R=
Yok	4	0	-0,295	4	0	-0,272
Hastalığa bağlı ölüm			P= 0,005			P= 0,011
Var	16	24	R=	18	22	R=
Yok	9	1	-0,400	9	1	-0,361
¹ Pearson ki kare testi ile hesaplanan anlamlılık düzeyi P değeri						
² Spearman korelasyon testi ile hesaplanan R değeri						

T lenfositlerin alt gruplarına bakıldığında; CD8 (sitotoksik T lenfosit) infiltrasyonunun histopatolojik ve klinik özelliklerle anlamlı bir ilişkisi bulunamamıştır. CD4 (yardımcı T lenfosit) infiltrasyonuna bakıldığında ise CD4 yüksek grupta yine perinöral invazyon ve kan damarı invazyonu daha az izlenmiş, aralarında negatif korelasyon saptanmıştır (sırasıyla $p=0,002$; $r=-0,042$ ve $p=0,019$; $r=-0,319$). CD4 yüksek grupta da, CD3 ve CD20’de de olduğu gibi nüks ve hastalığa bağlı ölüm daha az izlenmiş ve aralarında anlamlı derecede negatif korelasyon bulunmuştur ($p=0,008$; $r=-0,380$) (**Tablo 4-7**).

Tablo 4-7: CD4 ve CD8 ile histopatolojik ve klinik parametreler arasındaki ilişki

	CD4		<i>P</i> <i>değeri</i> ¹	CD8		<i>P</i> <i>değeri</i> ¹
Histopatolojik ve klinik parametreler	Düşük	Yüksek	<i>R</i> <i>değeri</i> ²	Düşük	Yüksek	<i>R</i> <i>değeri</i> ²
Patolojik T evresi						
T1-3	12	14	$P=0,504$	12	13	$P=0,611$
T4	12	12	$R=-0,038$	12	13	$R=0,000$
Histolojik grade						
1-2	14	12	$P=0,103$	16	9	$P=0,616$
3	18	6	$R=-0,220$	16	9	$R=0,000$
Kan damarı invazyonu						
Var	8	18	$P=0,002$	13	13	$P=0,611$
Yok	18	6	$R=-0,442$	12	12	$R=0,000$
Lenfatik invazyonu						
Var	4	4	$P=0,601$	6	2	$P=0,123$
Yok	22	20	$R=-0,017$	19	23	$R=0,218$

Perinöral invazyon			P= 0,019			P= 0,126
Var	11	18	R=	12	17	R=
Yok	15	16	-0,331	13	8	-0,203
Tiroid kartilaj invazyonu			P= 0,603			P= 0,500
Var	14	13	R=	14	13	R=
Yok	12	11	-0,003	11	12	0,040
Patolojik N evresi			P= 0,603			P= 0,500
N0	14	12	R=	14	11	R=
N+	13	11	-0,003	13	12	0,040
Perinodal invazyon			P= 0,582			P= 0,363
Var	21	19	R=	21	19	R=
Yok	5	5	0,020	4	6	0,100
Nüks			P= 0,008			P= 0,363
Var	17	23	R=	19	21	R=
Yok	9	1	-0,380	6	4	-0,100
Metastaz			P= 0,065			P= 0,305
Var	22	24	R=	22	24	R=
Yok	4	0	-0,283	3	1	-0,147
Hastalığa bağlı ölüm			P= 0,008			P= 0,363
Var	17	23	R=	19	21	R=
Yok	9	1	-0,380	6	4	-0,100
¹ Pearson ki kare testi ile hesaplanan anlamlılık düzeyi P değeri						
² Spearman korelasyon testi ile hesaplanan R değeri						

Regulator T lenfositlerde eksprese edilen CD25 ve FoxP3'e bakıldığında; CD25 yüksek ve FoxP3 yüksek grupların her ikisinde de perinöral invazyon anlamlı derecede az izlenmiş, aralarında negatif korelasyon olduğu gözlenmiştir (sırasıyla $p=0,042$; $r=-0,284$ ve $p=0,019$; $r=-0,331$). Bunun dışında CD25 ve FoxP3 ile diğer histopatolojik karakteristikler ve klinik değerlendirme parametreleri arasında bir ilişki tespit edilememiştir (**Tablo 4-8**).

Tablo 4-8: CD25 ve FoxP3 ile histopatolojik ve klinik parametreler arasındaki ilişki

Histopatolojik ve klinik parametreler	CD25		P değeri ¹ R Değeri ²	FoxP3		P değeri ¹ R Değeri ²
	Düşük	Yüksek		Düşük	Yüksek	
Patolojik T evresi						
T1-3	14	11	$P=0,198$ $R=$	12	14	$P=0,504$ $R=$
T4	10	15	$0,160$	12	12	$-0,038$
Histolojik grade						
1-2	15	10	$P=0,384$ $R=$	17	9	$P=0,532$ $R=$
3	17	8	$-0,083$	15	9	$0,030$
Kan damarı invazyonu						
Var	11	15	$P=0,198$ $R=$	13	13	$P=0,496$ $R=$
Yok	14	10	$-0,160$	13	11	$-0,042$
Lenfatik invazyonu						
Var	5	3	$P=0,351$ $R=$	5	3	$P=0,399$ $R=$
Yok	20	22	$0,109$	21	21	$0,092$
Perinöral invazyon						
Var	11	18	$P=0,042$ $R=$	11	18	$P=0,019$ $R=$
Yok	14	7	$-0,284$	15	6	$-0,331$

Tiroid kartilaj invazyonu			P= 0,128			P= 0,603
Var	16	11	R=	14	13	R=
Yok	9	14	0,201	12	11	-0,003
Patolojik N evresi			P= 0,285			P= 0,603
N0	15	10	R=	14	12	R=
N+	12	13	0,120	13	11	-0,003
Perinodal invazyon			P= 0,363			P= 0,582
Var	21	19	R=	21	19	R=
Yok	4	6	0,100	5	5	0,020
Nüks			P= 0,145			P= 0,179
Var	18	22	R=	19	21	R=
Yok	7	3	-0,200	7	3	-0,180
Metastaz			P= 0,305			P= 0,336
Var	22	24	R=	23	23	R=
Yok	3	1	-0,147	3	1	-0,136
Hastalığa bağlı ölüm			P= 0,145			P= 0,179
Var	18	22	R=	19	21	R=
Yok	7	3	-0,200	7	3	-0,180
¹ Pearson ki kare testi ile hesaplanan anlamlılık düzeyi P değeri						
² Spearman korelasyon testi ile hesaplanan R değeri						

Tüm hasta popülasyonu genelinde bakıldığında TIM-3 ekspresyonunun histopatolojik ve klinik parametrelerle arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. LAG-3 ekspresyonu değerlendirildiğinde ise LAG-3 pozitif grupta nükslerin anlamlı derecede daha fazla olduğu ve bu açıdan aralarında pozitif korelasyon bulunduğu izlenmiştir ($p=0,031$; $r=-0,336$) (**Tablo 4-9**).

Tablo 4-9: Tüm hasta popülasyonunda TIM-3 ve LAG-3 ekspresyonları ile histopatolojik ve klinik parametreler arasındaki ilişki

	TIM-3		<i>P</i> <i>değeri</i> ¹	LAG-3		<i>P</i> <i>değeri</i> ¹
Histopatolojik ve klinik parametreler	<i>Negatif</i>	<i>Pozitif</i>	<i>R</i> <i>değeri</i> ²	<i>Negatif</i>	<i>Pozitif</i>	<i>R</i> <i>değeri</i> ²
Patolojik T evresi						
T1-3	12	8	$P=0,136$	12	8	$P=0,136$
T4	12	18	$R=0,196$	12	18	$R=0,196$
Histolojik grade						
1-2	11	9	$P=0,217$	11	9	$P=0,217$
3	21	9	$R=-0,153$	21	9	$R=-0,153$
Kan damarı invazyonu						
Var	11	15	$P=0,477$	11	15	$P=0,477$
Yok	9	15	$R=0,049$	9	15	$R=0,049$
Lenfatik invazyonu						
Var	4	4	$P=0,401$	2	6	$P=0,297$
Yok	16	26	$R=0,089$	18	24	$R=-0,134$
Perinöral invazyon						
Var	11	18	$P=0,475$	12	17	$P=0,525$
Yok	9	12	$R=-0,050$	8	12	$R=0,033$

Tiroid kartilaj invazyonu			$P=0,058$			$P=0,163$
Var	14	13	$R=$	13	14	$R=$
Yok	6	17	0,262	7	16	0,180
Patolojik N evresi			$P=0,343$			$P=0,163$
N0	12	8	$R=$	13	7	$R=$
N+	15	15	0,098	14	16	0,180
Perinodal invazyon			$P=0,635$			$P=0,365$
Var	16	24	$R=$	17	23	$R=$
Yok	4	6	0,000	3	7	0,102
Nüks			$P=0,365$			$P=0,031$
Var	17	23	$R=$	19	21	$R=$
Yok	3	7	0,102	1	9	0,306
Metastaz			$P=0,528$			$P=0,528$
Var	18	28	$R=$	18	28	$R=$
Yok	2	2	-0,060	2	2	-0,060
Ölüm			$P=0,635$			$P=0,139$
Var	16	24	$R=$	18	22	$R=$
Yok	4	6	0,000	2	8	0,204
¹ Pearson ki kare testi ile hesaplanan anlamlılık düzeyi P değeri						
² Spearman korelasyon testi ile hesaplanan R değeri						

Tümöre karşı düşük immün reaksiyon izlenen hasta grubu (n=33) kendi içerisinde ayrı olarak da değerlendirmeye alınmıştır. TIM-3 pozitif hastalarda tiroid kartilaj invazyonu ve dolayısıyla da T4 tümör daha yüksek oranda görülmüş ve her iki parametreyle de aralarında pozitif korelasyon izlenmiştir (sırasıyla $p=0,011$; $r=0,454$ ve $p=0,013$; $r=0,448$). Benzer şekilde LAG-3 pozitifliği de yine tiroid kartilaj invazyonu ve T4 tümör varlığı ile anlamlı derecede ilişkili bulunmuş ve aralarında pozitif korelasyon tespit edilmiştir (sırasıyla $p=0,050$; $r=0,343$ ve $p=0,017$; $r=0,434$) (**Tablo 4-10**).

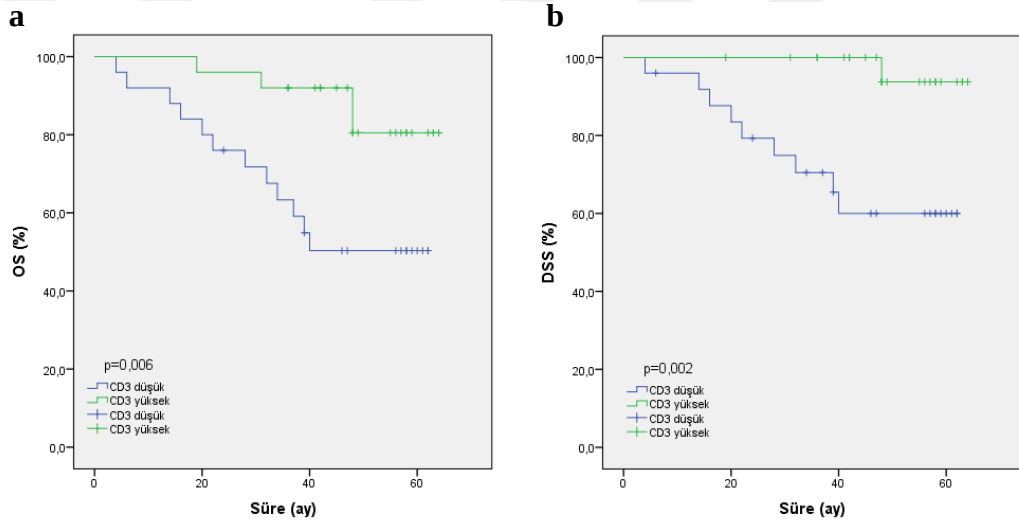
Tablo 4-10: Tümöre karşı immün yanıtı düşük olan grupta TIM-3 ve LAG-3 ekspresyonları ile histopatolojik ve klinik parametreler arasındaki ilişki

Histopatolojik ve klinik parametreler	TIM-3		<i>P</i> değeri ¹	LAG-3		<i>P</i> değeri ¹
	Negatif	Pozitif	<i>R</i> değeri ²	Negatif	Pozitif	<i>R</i> değeri ²
Patolojik T evresi			<i>P</i> =			<i>P</i> =
T1-3	10	4	0,013	8	6	0,017
T4	5	14	0,448	3	16	0,434
Histolojik grade			<i>P</i> =			<i>P</i> =
1-2	8	13	0,224	5	16	0,125
3	7	5	<i>R</i> =	6	6	<i>R</i> =
			-0,196			-0,267
Kan damarı invazyonu			<i>P</i> =			<i>P</i> =
Var	8	7	0,211	5	6	0,547
Yok	6	12	<i>R</i> =	9	13	<i>R</i> =
			0,201			0,043
Lenfatik invazyonu			<i>P</i> =			<i>P</i> =
Var	4	13	0,116	2	9	0,550
Yok	1	15	<i>R</i> =	3	19	<i>R</i> =
			0,293			0,060

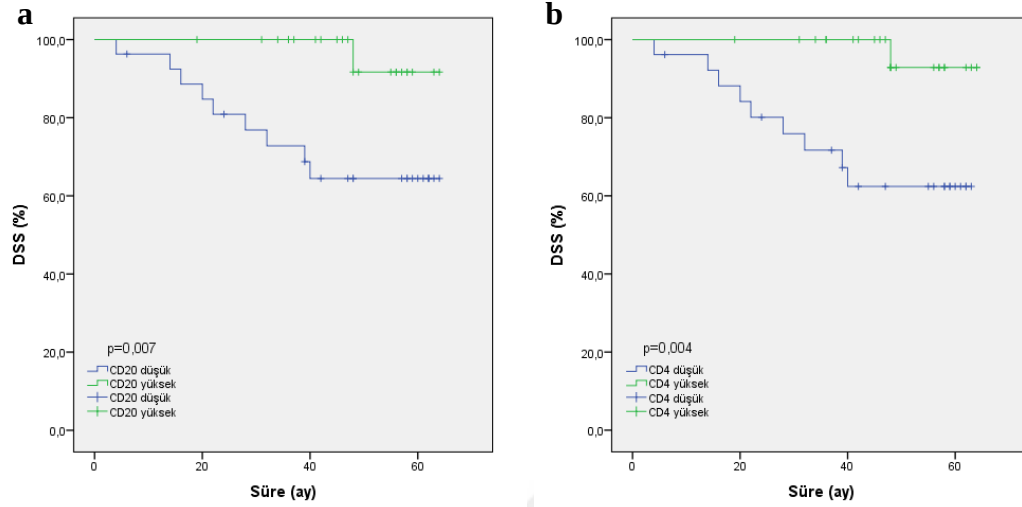
Perinöral invazyon			$P=$ $0,412$			$P=$ $0,355$
Var	6	9	$R=$	6	5	$R=$
Yok	9	9	$-0,100$	9	13	$0,129$
Tiroid kartilaj invazyonu			$P=$ $0,011$			$P=$ $0,050$
Var	11	4	$R=$	8	3	$R=$
Yok	5	13	$0,454$	8	14	$0,343$
Patolojik N evresi			$P=$ $0,437$			$P=$ $0,195$
N0	8	8	$R=$	7	9	$R=$
N+	7	10	$0,089$	4	13	$0,214$
Perinodal invazyon			$P=$ $0,459$			$P=$ $0,158$
Var	12	3	$R=$	10	1	$R=$
Yok	13	5	$0,090$	15	7	$0,250$
Nüks			$P=$ $0,105$			$P=$ $0,013$
Var	13	2	$R=$	11	0	$R=$
Yok	11	7	$0,286$	13	9	$0,433$
Metastaz			$P=$ $0,626$			$P=$ $0,407$
Var	13	2	$R=$	9	2	$R=$
Yok	16	2	$-0,034$	20	2	$-0,131$
Hastalığa bağlı ölüm			$P=$ $0,324$			$P=$ $0,104$
Var	12	3	$R=$	10	1	$R=$
Yok	12	6	$0,149$	14	8	$0,289$
¹ Pearson ki kare testi ile hesaplanan anlamlılık düzeyi P değeri						
² Spearman korelasyon testi ile hesaplanan R değeri						

Kaplan-Meier yöntemi ile yapılan sağkalım analizinde her bir immünolojik parametrenin; ortalama sağkalım (OS), hastalığa özgü sağkalım (DSS), hastalıksız sağkalım (DFS) ve rekürrenssiz sağkalım (RFS) üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Ortalama sağkalım üzerinde anlamlı derecede olumlu etkisi olan tek faktörün CD3 yüksekliği olduğu görülmüştür ($p=0,006$)(*Şekil 4-9a*). Hastalığa özgü sağkalıma bakıldığında ise CD3 ($p=0,002$)(*Şekil 4-9b*) ile birlikte CD20 ($p=0,007$)(*Şekil 4-10a*) ve CD4 ($p=0,004$)(*Şekil 4-10b*) yüksekliğinin de anlamlı derecede olumlu prognostik faktörler olduğu gözlenmiştir.

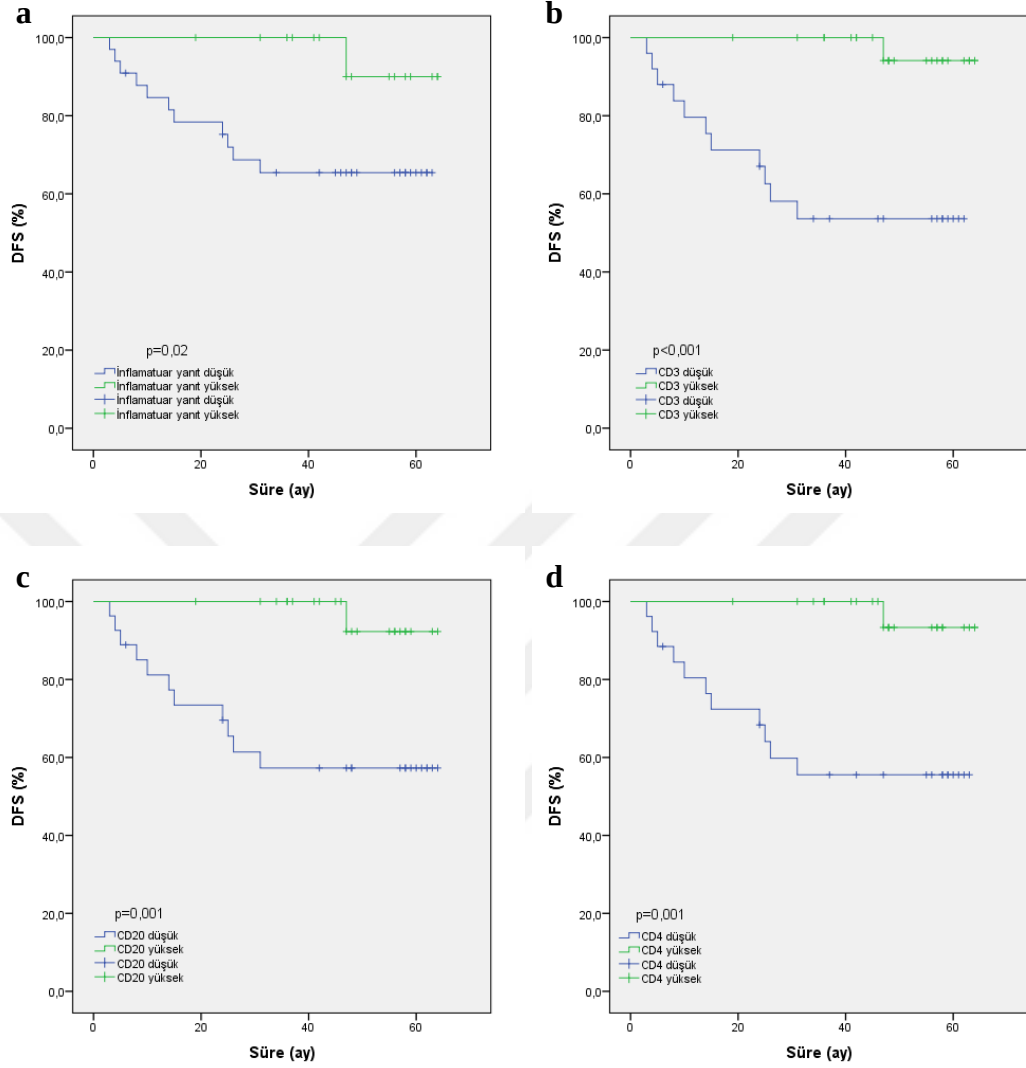


Şekil 4-9: CD3 ile **a)** ortalama sağkalım (OS) ve **b)** hastalığa özgü sağkalım (DSS) arasındaki ilişkinin Kaplan-Meier grafikleri ile gösterimi.

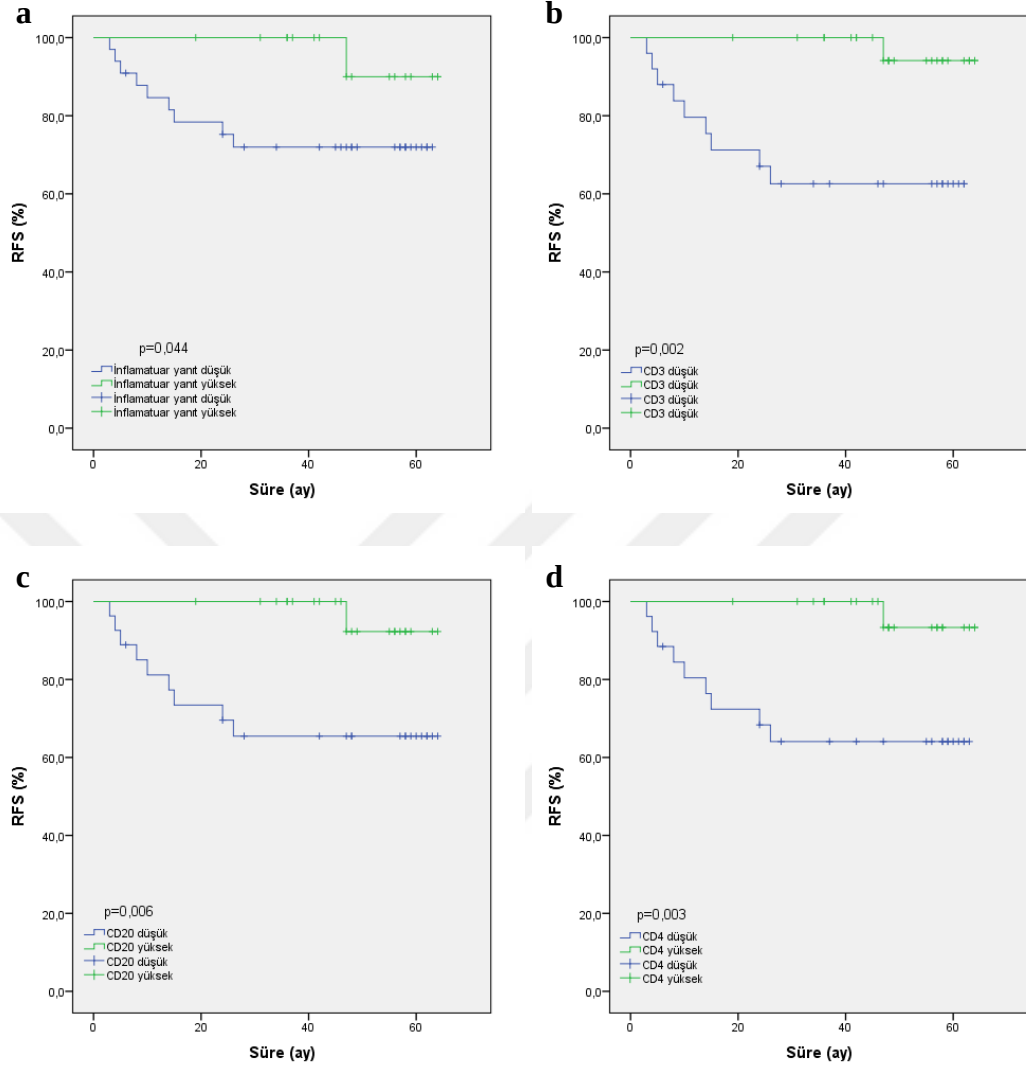


Şekil 4-10: Hastalığa özgü sağkalım (DSS) ile **a)** CD20 ve **b)** CD4 ile arasındaki ilişkinin Kaplan-Meier grafikleri ile gösterimi

Tümör dokusundaki inflamatuvar yanıtın ise ortalama sağkalım ve hastalığa özgü sağkalım üzerine anlamlı bir ilişkisi bulunamasa da; hastalıksız sağkalım ($p=0,02$) (**Şekil 4-11a**) ve rekürrenssiz sağkalım ($p=0,044$) (**Şekil 4-12a**) açısından olumlu bir prognostik faktör olduğu görülmüştür. Hastalıksız sağkalımı anlamlı derecede yükselten diğer faktörler CD3 ($p<0,001$), CD20 ($p=0,001$), ve CD4 ($p=0,001$) yüksekliği olarak ortaya çıkmıştır (**Şekil 4-11b, c, d**). CD3, C20 ve CD4 yüksekliği yine rekürrenssiz sağkalım açısından da olumlu prognostik faktörler olarak ön plana çıkmaktadır (**Şekil 4-12b, c, d**). CD8, CD25 ve FoxP3 ekspresyonu yüksek olan hasta gruplarında, düşük olan gruba kıyasla sağkalım parametreleri açısından her ne kadar daha iyi sağkalıma doğru bir eğilim mevcut olsa da bu farklılık anlamlılık düzeyine ulaşmamaktadır.

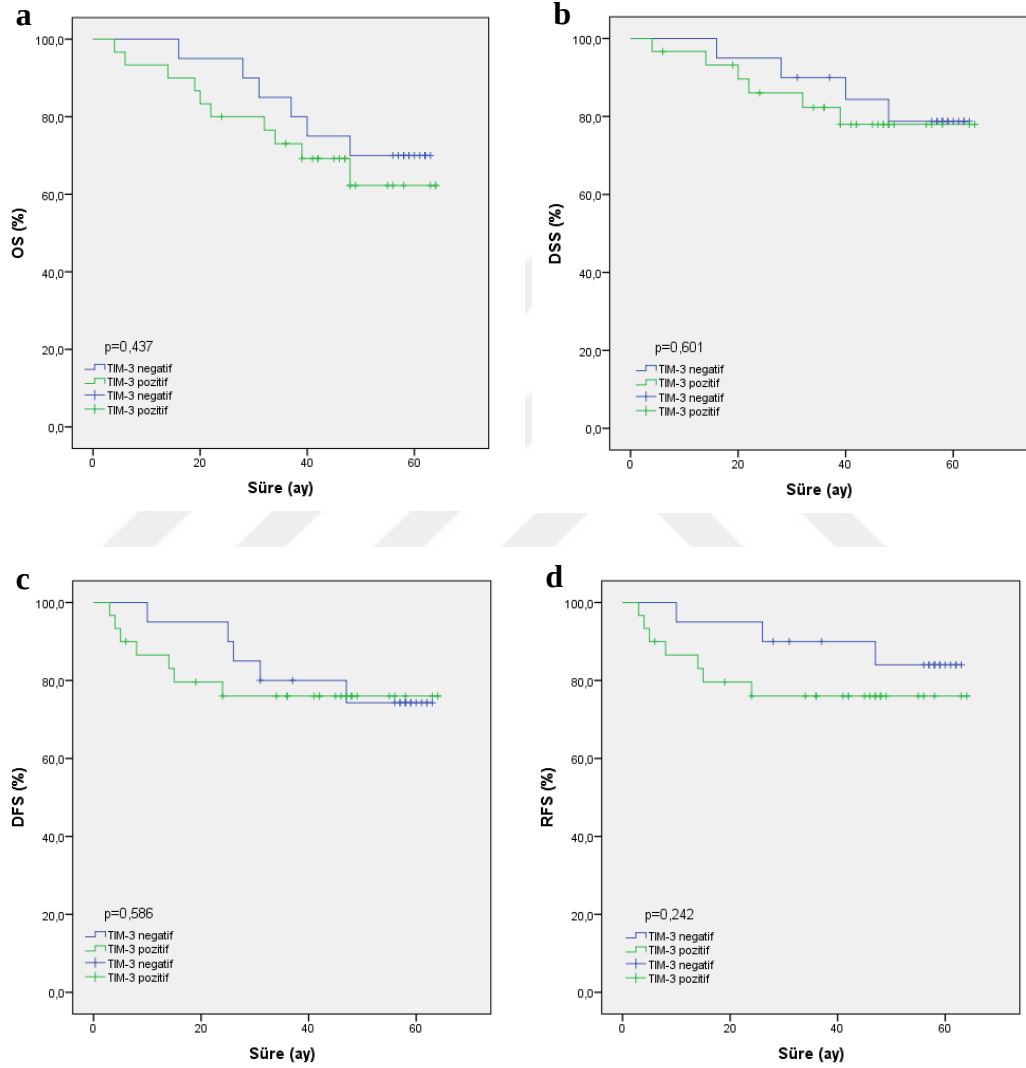


Şekil 4-11: Hastalıksız sağkalım (DFS) ile **a)** inflamatuvar yanıt yoğunluğu, **b)** CD3, **c)** CD20 ve **d)** CD4 ilişkisinin Kaplan-Meier grafikleri ile gösterimi



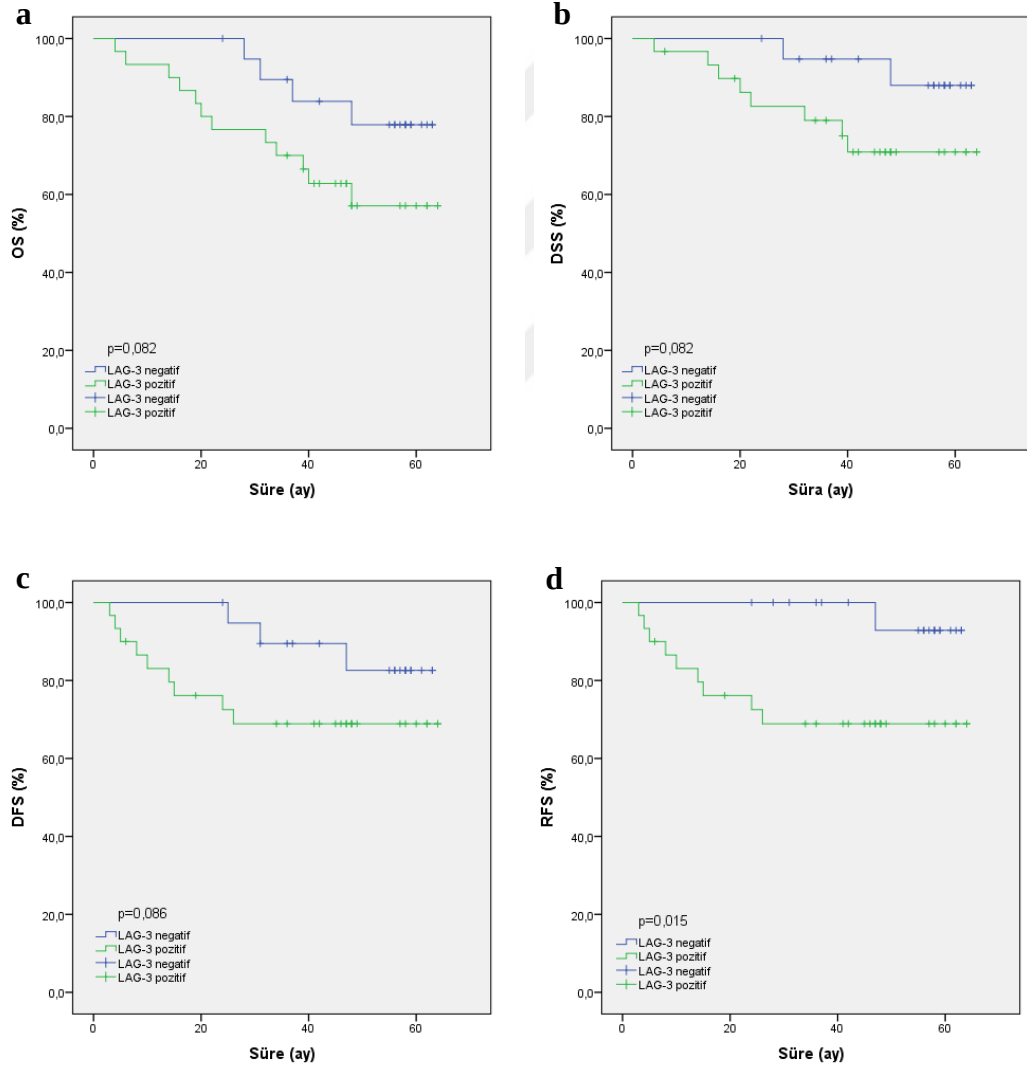
Şekil 4-12: Rekürrensiz sağkalım (RFS) ile **a)** inflamatuvar yanıt yoğunluğu, **b)** CD3, **c)** CD20 ve **d)** CD4 ilişkisinin Kaplan-Meier grafikleri ile gösterimi.

Tüm hasta popülasyonu bir arada değerlendirildiğinde TIM-3 pozitif grubun TIM-3 negatif gruba göre; ortalama sağkalım ($p=0,437$), hastalığa özgü sağkalım ($p=0,601$), hastalıksız sağkalım ($p=0,586$) ve rekürrensiz sağkalım ($p=0,242$) açısından anlamlı derecede bir dezavantajı saptanamamıştır (*Şekil 4-13*).



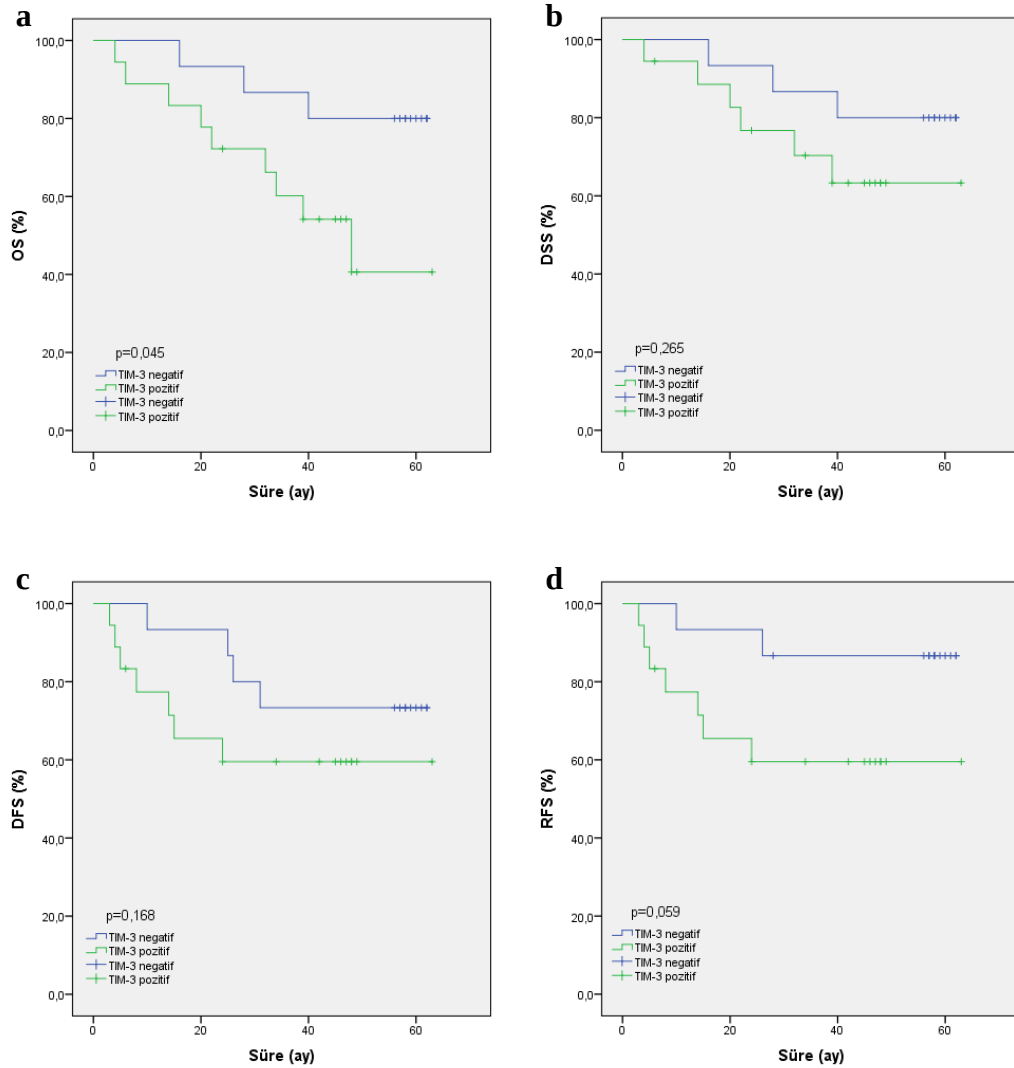
Şekil 4-13: Tüm hasta popülasyonunda TIM-3 ekspresyonunun sağkalım parametreleri ile ilişkisinin Kaplan-Meier grafikleri ile gösterimi. **a)** ortalama sağkalım (OS), **b)** hastalığa özgü sağkalım (DSS), **c)** hastalıksız sağkalım (DFS), **d)** rekürrensiz sağkalım (RFS).

Tüm hasta popülasyonunda LAG-3 ekspresyonu değerlendirildiğinde ise tüm sağkalım parametrelerinde LAG-3 pozitif grubun belirgin olarak dezavantajlı olduğu görülmüştür. Ancak bu farklılık ortalama sağkalım ($p=0,082$), hastalığa özgü sağkalım ($p=0,082$) ve hastalıksız sağkalım ($p=0,086$) parametrelerinde anlamlılık düzeyine yaklaşmışken ama ulaşamamışken; rekürrensiz sağkalımdaki ($p=0,015$) fark istatistiksel olarak da anlamlı saptanmıştır (*Şekil 4-14*).



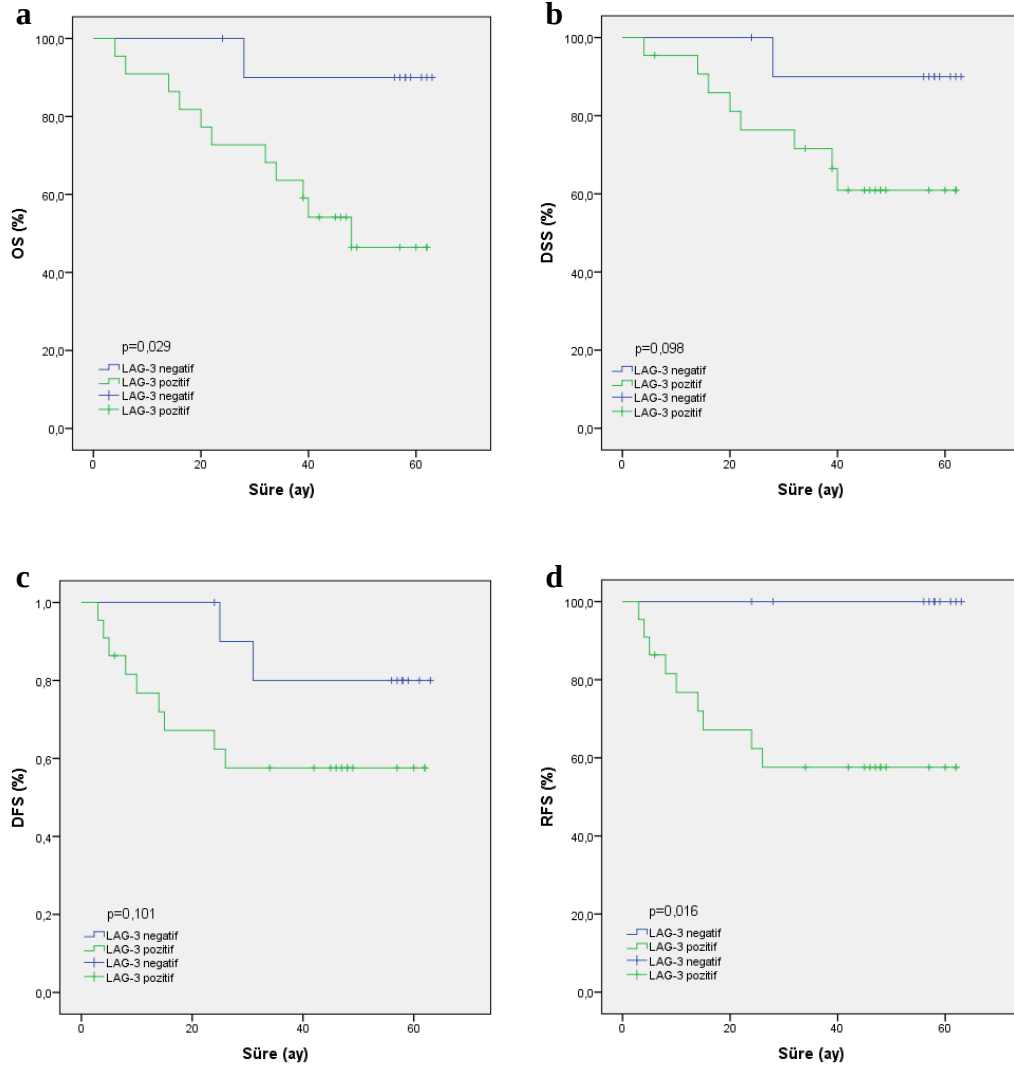
Şekil 4-14: Tüm hasta popülasyonunda LAG-3 ekspresyonunun sağkalım parametreleri ile ilişkisinin Kaplan-Meier grafikleri ile gösterimi. **a)** ortalama sağkalım (OS), **b)** hastalığa özgü sağkalım (DSS), **c)** hastalıksız sağkalım (DFS), **d)** rekürrensiz sağkalım (RFS).

Tümöre karşı immün yanıtı düşük olan hastalar (n=33) kendi içerisinde ayrıca değerlendirildiğinde ise TIM-3 pozitifliğinin ortalama sağkalım üzerine anlamlı derecede negatif etkisi olduğu görülmüştür ($p=0,045$). Hastalığa özgü sağkalım ($p=0,265$) ve hastalıksız sağkalımda ($p=0,168$) ise yine TIM-3 pozitif grubun sağkalımı daha kötü olma eğiliminde olmasına rağmen bu istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamıştır. Rekürrenssiz sağkalımda ise bu farklılık anlamlılık düzeyine yaklaşmıştır ($p=0,059$) (*Şekil 4-15*).



Şekil 4-15: Tümöre karşı immün yanıtı düşük olan grupta TIM-3 ekspresyonunun sağkalım parametreleri ile ilişkisinin Kaplan-Meier grafikleri ile gösterimi. **a)** ortalama sağkalım (OS), **b)** hastalığa özgü sağkalım (DSS), **c)** hastalıksız sağkalım (DFS), **d)** rekürrenssiz sağkalım (RFS).

Aynı şekilde tümöre karşı immün yanıtı düşük olan hastalarda (n=33) LAG-3 ekspresyonu değerlendirildiğinde; LAG-3 pozitifliğinin ortalama sağkalım üzerine anlamlı derecede negatif etkisi olduğu görülmüştür ($p=0,029$). Hastalığa özgü sağkalım ($p=0,098$) ve hastalıksız sağkalımda ($p=0,101$) ise LAG-3 pozitif grubun sağkalım grafikleri LAG-3 negatif gruba kıyasla daha kötü olma eğiliminde olmasına rağmen bu farklılık istatistiksel anlamlılığa düzeyine ulaşmamıştır. Rekürrenssiz sağkalımda açısından ise LAG-3 pozitif grupta sağkalım istatistiksel olarak anlamlı düzeyde LAG-3 negatif gruba göre düşük izlenmiştir ($p=0,016$) (*Şekil 4-15*).



Şekil 4-16: Tümöre karşı immün yanıtı düşük olan grupta LAG-3 ekspresyonunun sağkalım parametreleri ile ilişkisinin Kaplan-Meier grafikleri ile gösterimi. **a)** ortalama sağkalım (OS), **b)** hastalığa özgü sağkalım (DSS), **c)** hastalıksız sağkalım (DFS), **d)** rekürrenssiz sağkalım (RFS).

5. TARTIŞMA

Baş boyun kanserleri, dünya genelinde görülen en sık 6. malignite olup, 5 yıllık sağkalımı %50-60, nüks oranı %30 olan yüksek morbidite ve mortaliteye sahip kanserlerdir. En sık baş boyun kanseri olan larenks kanserinde de birçok kanserde olduğu gibi günümüzdeki gelişmelere rağmen sağkalım, mortalite ve morbiditede belirgin gelişme sağlanamamıştır [104]. Son yıllarda diğer solid tümörlerde tümör immün mikroçevresi ve immune checkpoint mekanizmalar üzerine çalışmalar giderek artmaktadır. Tümör immün mikroçevresi, TIM-3 ve LAG-3 moleküllerinin ekspresyonlarının baş boyun kanserleri özelinde de araştırıldığı çalışmalar giderek artmaktadır. Kanser immünolojisi alanındaki çalışmaların büyük çoğunluğu tümördeki lenfosit dağılımının, sağlıklı bireylerle ve periferik kandakiyle farklılık gösterip göstermediği ve bu dağılımdaki farklılıkların tümör prognozuna etkisinin olup olmadığı üzerine yoğunlaşmıştır.

Solid tümörlerde tümör infiltre eden lenfositlerin önemini değerlendiren bir meta-analiz çalışmasında CD3+ hücre, yani T lenfosit, yoğunluğunun fazla olmasının sağkalım üzerinde olumlu etki gösterdiği ortaya konmuştur [7]. Yine over kanserinde T lenfosit infiltrasyonu yüksek olan tümörlerde 5 yıllık sağkalım sonuçlarının daha iyi olduğu gösterilmişken [53], renal hücreli karsinom için bunun tam tersini gösteren çalışmalar mevcuttur [54]. Oral kavite kanserlerinde düşük lenfosit infiltrasyonunun yüksek rekürrens oranları ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur [105]. Çalışmamızda da, larenks kanserlerinde CD3 infiltrasyonu değerlendirilen immünohistokimyasal parametreler arasında en önemli olumlu prognostik faktörlerden biri olarak ön plana çıkmaktadır. CD3 infiltrasyonu yüksek olan hasta grubunda tümörde perinöral invazyon daha az izlenmiş, nüks ve hastalığa bağlı ölümler daha az meydana gelmiştir. Ortalama sağkalım ($p=0,006$), hastalığa özgü sağkalım ($p=0,002$), hastalıksız sağkalım ($p<0,001$) ve rekürrenssiz sağkalım ($p=0,002$) olmak üzere bütün sağkalım paramterelerinin CD3 yüksek grupta anlamlı derecede daha iyi olduğu ortaya konulmuştur.

Baş boyun kanserlerinde tümördeki CD3+ lenfosit yoğunluğunun değerlendirildiği bir çalışmada, "immün skoru yüksek" (yüksek CD3+ ve CD8+ hücre

infiltrasyonuna sahip) tümörlerde (n = 5), tümör içerisinde CD3+ hücre sayısı $551/\text{mm}^2 \pm 215/\text{mm}^2$ ve CD8+ hücre sayısı $318/\text{mm}^2 \pm 127/\text{mm}^2$ olarak bulunmuştur. İnvazyon hattında ise bu sayıların anlamlı derecede daha yüksek olduğu gösterilmiştir. (sırasıyla $1117 / \text{mm}^2 \pm 188 / \text{mm}^2$ ve $784 / \text{mm}^2 \pm 66 / \text{mm}^2$). Buna karşılık, "immün skoru düşük" (düşük CD3+ ve CD8+ hücre infiltrasyonuna sahip) tümörlerde (n = 6) tümör içerisinde CD3+ hücre sayısı $173/\text{mm}^2 \pm 160/\text{mm}^2$, CD8 + hücre sayısı $50/\text{mm}^2 \pm 22/\text{mm}^2$ olarak bulunmuştur. İnvazyon sınırında ise yine bu oran anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla $621/\text{mm}^2 \pm 327/\text{mm}^2$ vs. $247/\text{mm}^2 \pm 151/\text{mm}^2$) [106]. Ancak bu çalışmanın en önemli eksiği hasta sayısının oldukça düşük olması ve baş boyun kanserlerinin alt gruplarına göre değerlendirilmemiş olmasıdır. Biz ise sadece larenks kanserli 50 hasta üzerinde yaptığımız çalışmamızda, tümör infiltre eden lenfositlerden, CD3+ hücre sayısını $461,18 \pm 273,73$, CD20+ hücre sayısını $131,18 \pm 145,45$, CD4+ hücre sayısını $159,12 \pm 129,01$ ve CD8+ hücre sayısını ise $300,18 \pm 194,60$ olarak bulduk. Bu açıdan bulgular literatürde ifade edilen sayılar ile uyumluluk göstermekte idi.

Baş boyun kanserleri de immün infiltrasyon yoğunluğu fazla olan, bu nedenle de immünolojik çalışmaların sıklıkla yapıldığı kanserlerdendir. Özellikle NK hücre ve Treg yoğunluğunun diğer kanserlere oranla daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. HPV durumundan bağımsız olarak baş boyun kanserleri, tümör mikroçevresindeki lenfosit infiltrasyonu ve Treg yoğunluğu yüksek kanserlerdir [107]. HPV pozitif kanserlerde bu immün infiltrasyon daha yoğunken, HPV negatif kanserlerde ve yoğun sigara kullanım öyküsü olan hastalarda tümördeki immün infiltrasyonun daha az olduğu ve bunun da kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir. The Cancer Genome Atlas (TCGA)'tan alınan RNA gen dizilimleri üzerinden yapılan bir çalışmada tümördeki immün infiltrasyon yoğunluğunun daha iyi prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir [108]. Bu iki çalışmada da yöntem benzer olup baş boyun kanserleri genel olarak değerlendirmeye alınmış ve larenks kanseri özelinde bir veri sunulmamıştır. Bizim çalışmamızda ise larenks kanserlerinde immün infiltrasyonun yoğunluğu immünohistokimya yöntemiyle değerlendirilmiş ve immün infiltrasyonun yoğun olduğu grupta özellikle hastalıksız sağkalım ve rekürrenssiz sağkalımın anlamlı derecede daha iyi olduğu gözlenmiştir (sırasıyla $p=0,02$ ve $p=0,044$).

Baş boyun kanseri hastalarında periferik kandaki T lenfositlerin dağılımının flow sitometri ile değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde, Chikamatsu ve ark. [58], baş boyun kanserli hastalarda periferik kandaki CD4+ T lenfosit oranının sağlıklı kontrollere göre azaldığını, CD4+CD25+ T lenfosit, yani regülatuar T lenfosit oranının ise arttığını ve bu artışın da CD8+ T lenfosit sayısı ile ters orantı gösterdiğini ortaya koymuştur. Ancak bu çalışmada tümör infiltrate eden lenfositler değerlendirilmemiştir. Periferik kandaki lenfosit dağılımı ile tümör mikroçevresindeki lenfosit dağılımını kıyaslayan başka bir çalışmada, CD4+ T lenfosit oranının tümör mikroçevresinde periferik kana kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiştir ($54.7 \pm 19.6\%$ vs. $66.6 \pm 15.9\%$). CD8+ T lenfosit oranının ise bir farklılık göstermediği bulunmuştur ($30.9 \pm 18.7\%$ vs. $24.6 \pm 9.9\%$) [106].

Tümör dokusundaki lenfositler değerlendirilirken sadece tümör parankimini infiltrate eden lenfositlerin değerlendirmeye katılmasının sonuçlarla daha iyi korelasyon gösterdiği belirtilmektedir. Bu nedenle, her ne kadar iki yöntemin sonuçlarının paralellik gösterdiğini ifade eden yayınlar olsa da [106], tümörün parçalanması ile elde edilen süspansiyonun flow sitometri ile değerlendirilmesi spesimendeki toplam lenfosit yoğunluğunu vereceğinden ve dolayısıyla dokudaki periferik vasküler yapılar içerisindeki lenfositler de bu sayıma dahil olacağından, tam anlamıyla TIL değerlendirilemeyecektir [105] [109]. Biz de bu nedenle çalışmamızda yukarıda bahsi geçen çalışmalardan farklı olarak flow sitometri yerine immünohistokimya boyama ile mikroskopik değerlendirmeyi tercih ettik. Böylece sadece tümör parankimini infiltrate eden lenfositleri ve gerçek anlamıyla tümör immün mikroçevresini incelemiş olduk.

Tümör infiltrate eden lenfositler arasında CD8+ T lenfosit oranı daha yüksek olan baş boyun kanserlerinin daha iyi klinik parametrelerle veya daha iyi prognozla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [9] [10]. Örneğin; serviks kanserinde CD8/CD4 ve CD8/Treg oranının yüksekliği, lenf nodu metastaz yokluğu ile ilişkili olarak bulunmuştur [110]. Baş boyun kanserlerinde tümör immün mikroçevresinde CD4+ T lenfositlerin, CD8+ T lenfositlere oranı 0.745 olarak bulunmuş olup, bu oranın daha yüksek olduğu tümörlerin daha ileri evre olduğu gösterilmiştir [10]. Keck ve ark. [111] ise, ileri evre baş ve boyun kanserlerinde, daha yüksek CD8+ TIL seviyelerinin daha uzun sağkalım ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Rekürren

larengeal kanserlerde retrospektif olarak, immünohistokimya yöntemi ile yapılan bir çalışmada, CD8+ lenfosit sayısı yüksek olan hastalarda hastalıksız sağkalım ve hastalığa özgü sağkalımın anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur [112]. İlginç bir şekilde bütün bu çalışmaların bulgularının aksine, Wolf ve ark. [105] tarafından, oral kavite kanserlerinde yapılan bir immün mikroçevre çalışmasında ise CD8+ hücre sayısı fazla olan tümörlerde rekürrens oranları daha yüksek bulunmuştur. Yine hipofarenks kanserlerinde CD8 infiltrasyonu daha yüksek olan grupta ortalama sağkalım, hastalıksız sağkalım ve hastalığa özgü sağkalımın daha iyi olduğu gözlemlenmiştir [51]. Ancak biz çalışmamızda literatürde yaygın olarak tarif edilen bu ilişkiyi gözlemleyemedik. CD8 infiltrasyonunun ne tümörün histopatolojik özellikleriyle ne de sağkalım parametreleriyle arasında istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşan bir ilişki ortaya koyamadık.

CD4+ T lenfositlerin anti-tümör özellik gösterebileceği gibi pro-tümör özellikte olabileceklerini gösteren çalışmalar mevcuttur [11] [12]. Örneğin meme kanserlerinde yüksek CD4+ lenfosit oranı daha agresif tümörlerle ilişkili olduğu gösterilmişken [113]; bir yandan da yüksek CD4, düşük CD8 infiltrasyonunun azalmış sağkalımla bağlantılı olduğu ortaya konulmuştur [114]. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde de CD8/CD4 oranının yüksekliği metastaz yokluğu ve daha iyi sağkalım ile ilişkili bulunmuştur [115]. Benzer şekilde kolorektal kanserlerde ve over kanserlerinde de CD8/CD4 oranının yüksek olmasının daha iyi prognozla ilişkili olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur [100] [116].

CD4+ T lenfosit infiltrasyonu yüksek olan baş boyun kanserlerinde prognozun daha iyi olduğunu gösteren çalışmalar olduğu gibi [117]; CD4/CD8 oranı daha yüksek olan tümörlerin klinik ve histopatolojik karakteristiklerinin daha agresif özellikler taşıdığını gösteren çalışmalar da mevcuttur [10]. Baş boyun kanserlerinin değerlendirildiği bir çalışmada ise hem CD8+ T lenfosit hem de CD4+ T lenfosit yoğunluğunun ortalama sağ kalım ve hastalıksız sağkalım üzerine olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir [9]. Yine sadece larenks kanserlerinin değerlendirildiği bir çalışmada CD4+ T lenfosit sayısı fazlalığının hastalıksız sağkalım ve hastalığa özgü sağkalım üzerinde anlamlı derecede olumlu etkisi olduğu ancak ortalama sağkalımı etkilemediği gösterilmiştir [112]. Wansom ve ark. [109], HPV durumundan bağımsız

olarak baş boyun kanserlerinde yüksek oranda CD4+ ve CD8+ TIL'lerin varlığının ortalama sağkalım ve hastalıksız sağkalımı olumlu etkilediğini göstermiştir. Wang ve ark. [51] tarafından, hipofarenks kanserlerinde yapılan bir çalışmada ise CD4+ T lenfosit infiltrasyonunun sağkalım açısından bağımsız bir prognostik faktör olmadığı bulunmuştur. Biz ise tümörün histopatolojik karakteristiklerinden kan damarı invazyonunun ve perinöral invazyonun CD4 infiltrasyonu yüksek olan hasta grubunda anlamlı derecede daha düşük izlendiğini ve yine bu grupta nüks ve hastalığa bağlı ölümlerin daha az oranda görüldüğünü ortaya koyduk. Öyle ki yine CD4 yüksek grubun hastalığa özgü sağkalım ($p=0,004$), hastalıksız sağkalım ($p=0,001$) ve rekürrensiz sağkalım ($p=0,002$) açısından CD4 düşük gruba kıyasla anlamlı derecede daha avantajlı olduğunu gördük.

Hoesli ve ark. [112] tarafından yürütülen ve larenks kanserleri özelinde yapılmış olan az sayıdaki immün mikroçevre çalışmalarından birinde; yaş, cinsiyet, tümör yerleşimi, sigara/alkol kullanımı, tümörün evresi gibi klinik değişkenler ile CD4+ ve CD8+ hücre sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gösterilememiştir. Oral kavite kanserlerinde yapılan bir çalışmada ise düşük CD4+ T lenfosit sayısının ve düşük CD4/CD8 oranının kötü differansiasyon ile ilişkili olduğu bulunmuştur [105]. Ancak literatürdeki daha yaygın kanı bunun aksinedir. Tam tersi şekilde oral kavite kanserlerinde CD8/CD4 oranının yüksekliğinin düşük grade, metastaz yokluğu ve daha iyi prognoz ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar ağırlıktadır [108, 109]. Hipofarenks kanserlerinde yüksek CD8/CD4 oranının daha iyi hastalıksız sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [51]. Baş boyun kanserleri genelinde de CD8/CD4 oranının yüksekliğinin kısa vadede daha iyi sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [120]. Biz ise çalışmamızda CD4 infiltrasyonunun tek başına önemli olumlu bir prognostik faktör olduğunu gözlemlemiş olsak da, CD8 infiltrasyonu ve CD8/CD4 oranı açısından bu anlamlılığı saptayamadık.

Tümör immün mikroçevresinde periferik kana oranla Treg yoğunluğunun daha fazla olduğu malign melanom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, mide kanseri ve over kanseri gibi kanserlerde gösterilmiştir. Periferik kanda CD4+ lenfositlerin %5-10'unu teşkil ederken, tümör mikroçevresinde ise %20-50'sini oluşturmaktadır [13]. Baş boyun kanserlerinde de Treg oranının yine tümör içerisinde periferik kana kıyasla

daha yüksek oranda olduğu ortaya konmuştur ($10.3 \pm 6.3\%$ vs. $3.7 \pm 2.0\%$) [106]. Bunun doğal sonucu olarak tümör dokusunda CD8/Treg oranı da periferik kana göre daha düşüktür (4.4 ± 4.5 vs. 7.8 ± 6.4) ve bu durum tümör içerisindeki immünsupresyonun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir [106]. Bunun yanı sıra periferik kandaki Treg oranının baş boyun kanseri hastalarında normal popülasyona kıyasla daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur [58] [121]. Hatta orofarenks kanserleri için yapılan bir çalışmada periferik kandaki Treg fazlalığının daha iyi prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur [109]. Ayrıca başka bir çalışmada tümör dokusunda bulunan Treg'lerin CTLA-4, TIM-3, LAG-3 gibi immünsupressif etkilerden sorumlu molekülleri, periferik kandaki Treg'lere oranla daha yüksek oranda eksprese ettiği ve dolayısıyla da daha immünsupressif nitelikte olduğu gösterilmiştir [15].

Yoğun Treg infiltrasyonunun melanom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, renal hücreli kanser, karaciğer, pankreas, meme, mide kanserinde kötü prognozla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [13, 103]. Ancak bunun tam tersine, bazı çalışmalarda, yine küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, mesane, meme, kolon ve baş boyun kanserlerinde yüksek oranda FoxP3+ T lenfosit varlığının daha iyi prognozla ilişkili olduğu da gösterilmiştir [122] [123] [124]. Baş boyun kanserlerinde FoxP3+ hücre infiltrasyonunu kötü prognozla ilişkili bulan çalışmalar da mevcuttur [125].

Treg yoğunluğunun iyi prognozla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da olmakla birlikte [126], çoğu çalışmada kötü prognozla ve azalmış sağkalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir [127]. Ancak TCGA'dan alınan RNA gen sekanslarının incelenmesi ile yapılan bir baş boyun kanserleri immün mikroçevre çalışmasında, Treg infiltrasyonu daha iyi sağkalım ile ilişkili bulunmuştur. Bu bulgu, Treg infiltrasyonundaki artışın tümör içerisindeki sitotoksik aktiviteyi dengelemenin doğal bir sonucu olduğu bu nedenle de sitotoksik T lenfosit ve NK hücre infiltrasyonundan bağımsız bir prognostik faktör olmadığı yönünde yorumlanmıştır [107]. Bu çalışmada baş boyun kanserlerinin alt grupları belirtilmemiş ve larenks kanseri özelinde bir veri sunulmamıştır.

Sitotoksik T lenfositleri olarak karakterize edilen CD8 infiltrasyonu, çoğunlukla olumlu prognozla ilişkilendirilirken, FoxP3 infiltrasyonunu iyi prognozla da kötü prognozla da ilişkilendiren çalışmalar mevcuttur. Benzer şekilde baş boyun kanserlerinde daha iyi sağkalım genellikle CD8+ T lenfosit infiltrasyonu ile ilişkilirken, intratümöral FoxP3+ hücre yoğunluğunun sağkalım üzerine pozitif ve negatif etkisinin gösterildiği çalışmalar mevcuttur [9] [128]. FoxP3 yoğunluğunun fazla olduğu tümörlerin daha kötü prognozla ilişkili bulunduğunu destekleyen yayınlar nedeni ile FoxP3'ün pro-tumor özellikte olduğu öne sürülmektedir [129] [130]. Bizim çalışmamızda ise FoxP3+ hücre infiltrasyonu, yani intratümöral Treg yoğunluğu, herhangi bir kötü prognostik faktör ile ilişkili bulunmamıştır. Hatta tam tersi, perinöral invazyonun FoxP3 yüksek grupta daha az olduğu ve ortalama sağkalım, hastalığa özgü sağkalım, hastalıksız sağkalım ve rekürrensiz sağkalım parametrelerinde de istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmasa da daha iyi sağkalıma doğru bir eğilim olduğu görülmektedir. Yine tümördeki CD3 ve CD4 infiltrasyonları ile FoxP3 infiltrasyonunun korelasyon gösterdiği göz önünde bulundurulduğunda ($p<0,001$) yoğun Treg infiltrasyonunun tümöre karşı geliştirilen yoğun immün yanıtın doğal bir sonucu olarak ortaya çıktığı yorumunu yapabiliriz.

Baş boyun kanserlerinde tek tek CD8, CD4 ve FoxP3'ü olumlu prognoz, daha iyi genel ve hastalıksız sağkalım ile ilişkilendiren yayınlar mevcuttur; ancak spesifik olarak, bunların birbirlerine oranları, tümör mikroçevresinde hangi T hücresi alt tipinin baskın olduğu ve bunun klinik sonuçlarla korelasyonu belirsizliğini korumaktadır. Kantitatif oranların muhtemelen tümör immün mikroçevresinde daha önemli olduğu düşüncesiyle özellikle CD8/FoxP3 ve CD8/CD4 oranlarının klinik sonuçlarla ilişkisine odaklanılması gerektiğini vurgulayan yazarlar mevcuttur [51].

Oral kavite kanserlerinde 52 hasta ile yapılan bir çalışmada erken evre (T1, T2) kanserlerde FoxP3+ hücre infiltrasyonunun, ileri evre (T3, T4) kanserlere göre daha yüksek oranda olduğu bulunmuştur [105]. Yine aynı çalışmada FoxP3/CD8 oranının düşüklüğü ileri T evresi ile ilişkili bulunmuştur. Bu yayındaki bulgular, CD8+ hücre infiltrasyonunun iyi prognostik faktörlerle, FoxP3+ hücre infiltrasyonunun ise kötü prognostik faktörlerle ilişkili olduğunu ortaya koyan diğer yayınlar ile ters düşmektedir. Çoğu yayında, CD8/FoxP3 oranının yüksekliği pozitif prognostik faktör

olarak değerlendirilmektedir [4]. Baş boyun kanserleri genelinde yapılan bir çalışmada ise FoxP3+ hücre infiltrasyonunun daha iyi sağkalımla ilişkili olduğu ortaya konulmuştur [117]. Yine sinonazal skuamöz hücreli karsinomda yüksek FoxP3+ hücre infiltrasyonu daha iyi prognozla ilişkili bulunmuştur [131]. Hipofarenks kanserlerinde 132 hasta ile yapılan bir çalışmada ise, FoxP3, CD4 ve CD8 infiltrasyonunun düşük histopatolojik grade ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca FoxP3 infiltrasyonunun daha iyi ortalama ve hastalıksız sağkalım ile ilişkili olmakla birlikte; yüksek CD8/FoxP3 oranının da yine daha iyi hastalıksız sağkalım ilişkili olduğu ortaya konmuştur [51]. Tonsil kanserlerinde ve dil kanserlerinde de ayrı ayrı çalışmalarda CD8/FoxP3 oranının yüksekliğinin benzer şekilde daha iyi hastalıksız sağkalım ilişkili olduğu gösterilmiştir [132] [133]. Fridman ve ark. [72] tarafından yürütülen ve 33 çalışmanın dahil edildiği geniş çaplı bir meta-analizde ise CD8/FoxP3 oranının sağkalım açısından diğer lenfosit parametrelerinden daha anlamlı olduğu ortaya konulmuştur. Biz ise çalışmamızda CD8/FoxP3 oranının tümörün histopatolojik karakteristikleri ve sağkalım parametreleri ile arasında anlamlı bir ilişkisini gösteremedik.

CD25 (IL-2 Reseptör- α), birçok lenfositte eksprese edilebiliyor olsa da özellikle Treg'ler için önemli bir reseptördür. Bu nedenle doğal olarak CD25 yoğunluğu Treg infiltrasyonu ile korelasyon gösterecektir. Loose ve ark. [134] baş boyun kanserlerinde CD25 infiltrasyonunun prognozla ilişkisini incelemiş ve daha yüksek oranda CD25 infiltrasyonunu daha iyi lokorejyonel kontrol ve sağkalım ile ilişkili olduğunu bulmuştur. Badoual ve ark. [117] da 84 baş boyun kanseri hastasında tümör infiltre eden CD4+ CD25+ T hücrelerinin prognostik etkisini araştırmış ve her ne kadar istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmasa da yüksek CD25 pozitifliği gösteren hastalarda daha uzun sağkalım ve daha iyi lokorejyonel kontrol yönünde bir eğilim olduğunu bildirmiştir. Bu iki çalışmadan ilkinde CD25 pozitifliği için sınır değer en iyi prediktif değere göre belirlenmişken, ikincisinde median değere göre pozitif negatif ayrımı yapılmıştır; ikinci çalışmada bulguların istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamasının sebebi bu olarak değerlendirilebilir. Biz de çalışmamızda median değere göre ayırım yaparak iki grubu değerlendirdiğimizde sağkalım parametreleri açısından anlamlılık düzeyine ulaşmasa da, tüm parametrelerde CD25 yüksek grubun

daha iyi sağkalım eğiliminde olduğunu gözlemledik. Ayrıca CD25'in doğal olarak bir diğer regülatuar T lenfosit belirteci olan FoxP3 düzeyi ile ve CD4 düzeyi ile anlamlı korelasyon gösterdiği de çıkan sonuçlar arasındaydı ($p<0,001$). Bu açıdan da FoxP3 için yaptığımız yorumu CD25 için de yaparak, yoğun immün infiltrasyonun doğal bir sonucu olarak eksprese edildiğini ve bu açıdan da daha iyi prognozla ilişkilendirilebileceğini öne sürebiliriz.

B lenfositler CD20 pozitifliği ile diğer lenfositlerden ayrılır ve humoral immün sistemin elemanları olarak antitümoral immün yanıt mekanizmalarında tariflenmiş çok fazla rolleri bulunmamaktadır. Bununla birlikte Fucikova ve ark. [135] over kanserlerinde CD20 infiltrasyonunun iyi prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir. Yine Hladíková ve ark. [73] çalışmalarında CD20+ lenfositlerin ve CD8+ T lenfositlerin, tümör dokusunda agregatlar oluşturduğunu ve yüksek tümör infiltre eden B lenfosit yoğunluğunun orofarenks kanserlerinde çok iyi prognozla ilişkili olduğunu bulmuştur. Biz de benzer şekilde tümördeki B lenfosit infiltrasyonunun özellikle agregatlar oluşturacak şekilde gerçekleştiğini ve hastalığa özgü sağkalım ($p=0,007$), hastalısız sağkalım ($p=0,001$), rekürrensiz sağkalım ($p=0,006$) açısından CD20 yüksek grubun çok daha iyi durumda olduğunu gördük. Bunun yanı sıra CD20 yüksekliğinin tümörün histopatolojik özelliklerinden grade ve kan damarı invazyonu varlığı için negatif korelasyon gösterdiği de bir diğer bulgumuzdu (sırasıyla $p=0,049$; $r=-0,274$ ve $p=0,05$; $r=-0,405$).

PD-1 (Programmed Cell Death 1) ve CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen) en çok çalışılan ve immünoterapide en çok hedef alınan immün checkpoint inhibitörleridir [44]. Bu iki molekülden sonra özellikle fonksiyonunu kaybetmeye başlayan T lenfositler üzerinde eksprese olan TIM-3 ve LAG-3 ön plana çıkmaya başlamıştır [136]. TIM-3 ve LAG-3 ekspresyonunun da birbiriyle ve artık immünoterapide yaygın olarak hedef molekül olarak kabul gören PD-1 ekspresyonuyla korelasyon gösterdiği de bilinmektedir [102] [137] [138]. Baş boyun kanserlerinde TIM-3 ve LAG-3'ün özellikle CD4+CD25+FoxP3+ hücreler, yani regülatuar T lenfositler, üzerinde eksprese edildiği gösterilmiştir [15].

TIM-3 (T-Cell Immunoglobulin and Mucin Domain 3), CD8+ T lenfositler üzerinde PD-1 ile birlikte aktivitenin azalmaya başladığının bir göstergesi olarak ortaya çıkmaktadır [14]. CD4+ hücreler içerisinde TIM-3 ekspresyonu en fazla olan hücre grubunun FoxP3+ olan Treg'ler olduğu gösterilmiştir [139]. TIM-3 eksprese eden Treg'lerin periferik kana kıyasla kanser dokusunda daha yoğun olarak bulunduğu bilinmektedir [15]. Bunun yanı sıra immünsupresif fonksiyonu daha fazla olan Treg'ler üzerinde TIM-3 ekspresyonunun daha fazla olduğu da gösterilmiştir [140].

Birçok solid tümörde TIM-3 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkisi ortaya konulmuştur [141]. Medüller tiroid karsinomunda TIM-3 ekspresyonunun ileri evre kanserlerde artış gösterdiği ve rekürrensle ilişkili olduğu gözlemlenmiştir [102]. Over kanserlerinde yapılan bir çalışmada da TIM-3 ekspresyonunun sağkalım açısından negatif prognostik faktör olduğu belirtilmiştir [135]. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde yapılan bir çalışmada ise TIM-3 ekspresyonu ile tümörün klinik ve patolojik karakteristikleri arasında bir ilişki saptanamamış ve sağkalım üzerinde de anlamlı bir etkisi gösterilememiştir [137]. Meme kanserinde yapılan bir çalışmada ise TIM-3 ekspresyonunun, yüksek grade, yüksek Ki67 proliferasyon indeksi, hormon reseptör negatifliği ve erken yaşta prezentasyon gibi kötü klinikopatolojik faktörlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir [142]. Ancak ilginç bir şekilde aynı çalışmada TIM-3+ TIL varlığının erken evre meme kanserlerinde iyi prognostik faktör olduğu da ifade edilmiştir. Bununla TIM-3 ekspresyonunun yoğun TIL infiltrasyonunun ve tümöre karşı immün yanıtın dolaylı bir göstergesi olduğu ile açıklanabileceği belirtilmektedir [142].

Baş boyun kanserlerine daha yakın olarak değerlendirilebilecek olan özofageal kanserde de diğer klinikopatolojik karakteristiklerle olmasa da kan damarı invazyonu ile TIM-3 ekspresyonu arasındaki ilişki gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada TIM-3+PD-1+CD8 düşük hasta grubunun en kötü hastalıklı ve ortalama sağkalıma sahip iken; TIM-3-PD-1-CD8 yüksek hasta grubunun ise en iyi hastalıklı ve ortalama sağkalıma sahip olduğu ortaya konulmuştur [143]. Shan ve ark. [144] tarafından yine özofageal kanserlerde yapılan bir çalışmada, TIM-3 ekspresyonunun TNM evresi, lenf nodu metastazı ve invazyon derinliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bir önceki

çalışmaya benzer şekilde, TIM-3 ekspresyonu fazla olan grupta daha kötü sağkalım izlenmiştir.

Preklinik çalışmalar baş boyun kanseri hayvan modellerinde TIM-3 blokajının T lenfosit aktivitesini arttırarak tümöre karşı immün yanıtı güçlendirdiği gösterilmiştir [16]. Yine hayvan modellerinde PD-1/PD-L1 blokajının ve radyoterapinin TIM-3 ekspresyonunu arttırdığı ve bunun da tedavi direnci ile ilişkili olduğu; TIM-3 blokajı tedaviye eklendiğinde ise tümör progresyonunun durdurulabildiği ortaya konmuştur.[145]. Baş boyun kanserlerinde tümör dokusundan ayrıştırılan Treg'lerin TIM-3+ olanlarının daha immünsupresif nitelikte olduğu gösterilmiştir [140].

Baş boyun kanserlerinde yapılan klinik çalışmalarda da cetuximab ile tedavi sonrası tümör infiltre eden lenfositlerde PD-1 ve TIM-3 ekspresyonunun arttığı ve bu artışın cetuximab tedavisinin klinik sonuçları ile negatif korelasyon gösterdiği ortaya konulmuştur [81]. Bu çalışmada TIM-3'ün CD8+ T lenfositlerin granzyme ve perforin üzerinden sağladıkları sitotoksik etkiyi baskıladıkları gösterilmiştir. Baş boyun kanserlerinde anti-PD-1 tedavisine yanıtın değerlendirildiği başka bir çalışmada ise tedaviye yanıtızsız grupta TIM-3 ekspresyonunun anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir [138]. Oral kavite kanserlerinde yapılan başka bir çalışmada ise nimotuzumab tedavisi sonrası TIM-3 ekspresyonu değerlendirilmiş ve yine tedavi sonrası artış olduğu gözlenmiştir. Nimotuzumab tedavisine yanıt vermeyen popülasyonda TIM-3 ekspresyonunun daha fazla olduğu gözlemlenmekle beraber tüm hasta popülasyonuna bakıldığında TIM-3'ün ortalama sağkalımla bir ilişkisi gösterilememiştir. Aynı çalışmada tümörün histopatolojik özellikleri ile TIM-3 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır [146]. Oral kavite kanserlerinde yapılan başka bir çalışmada ise TIM-3 ekspresyonunun lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [136].

TIM-3 ekspresyonunun larenks kanserleri özelinde değerlendirildiği bir çalışma, şu anki bilginiz dahilinde, henüz yoktur. Ancak yukarıda özetlendiği üzere başka birçok kanser türünde araştırılmış ve sağkalım üzerine gerek olumlu gerek olumsuz etkileri ortaya konulduğu gibi etkisiz olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmuştur. Çalışmamızda TIM-3 ekspresyonunun tüm hasta popülasyonumuz genel olarak

değerlendirildiğinde sağkalım açısından anlamlı bir etkisinin olmadığını gördük. Ancak TIM-3 pozitifliğinin yoğun lenfosit infiltrasyonu ile korelasyon göstermesinden yola çıkarak, tümöre karşı immün yanıt düşük ve orta düzeyde olan hasta popülasyonu (n=33) ayrı olarak da değerlendirmeye alınmıştır. Bu durumda TIM-3 pozitifliğinin sağkalım üzerindeki negatif etkisi daha belirgin hale gelmiş ve özellikle ortalama sağkalım üzerinde anlamlılık düzeyine ulaşmıştır (p=0,045). Yine bu grupta TIM-3 pozitifliği ile tiroid kartilaj invazyonu ve T4 tümör varlığı arasında korelasyon izlenmiştir (sırasıyla p=0,011; r=0,454 ve p=0,013; r=0,448).

CD223 olarak da bilinen LAG-3 (Lymphocyte Activation Gene 3) aktive CD4+ ve CD8+ T lenfositler ile NK hücreler üzerinde eksprese edilir. Ko-inhibitör bir immune checkpoint molekülüdür ve ligandı MHC II'dir [17]. L-selectin'in de aynı zamanda bu reseptörün ligandı olduğu gösterilmiştir [82]. LAG-3'ün CD4+CD25+FoxP3+ hücreler, yani Treg'ler üzerinde yüksek oranda eksprese edildiğini ve LAG-3 blokajının Treg'lerin supressör etkisini ortadan kaldırarak hayvan modellerinde tümöre karşı immün yanıtı arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur [15] [17]. Over ve prostat kanserlerinde LAG-3 blokajının CD8+ T lenfositlerinin sayısını ve etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir [147] [148].

Kolorektal kanser, renal hücreli kanser, lenfoma, baş boyun kanserleri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, melanom ve meme kanseri gibi birçok malignitede LAG-3 ekspresyonunun kötü prognostik faktörlerle ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [86]. Medüller tiroid kanserlerinde yapılan bir çalışmada ise LAG-3 ekspresyonunun rekürrens ve sağkalımla bir ilişkisi gösterilememiştir [102]. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde de TIM-3 ekspresyonunun değil ama LAG-3 ekspresyonunun özellikle anti-PD-1 tedaviye yanıtı olumsuz etkilediği ve sağkalımı azalttığı gösterilmiştir [137]. Yine küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde yapılan bir çalışmada LAG-3 ekspresyonunun PD-1 ekspresyonuyla birlikte, azalmış hastalıksız sağkalım ve ortalama sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [87]. Baş boyun kanserlerinde ise yine anti-PD-1 tedavisine yanıtızlığın LAG-3 ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [138]. Bu bulguların tam aksine meme kanserinde yapılan bir çalışmada ise LAG-3 ekspresyonunun fazlalığı özellikle

östrojen reseptörü negatif olan grupta daha iyi hastalıksız ve ortalama sağkalım ile ilişkili bulunmuştur [149].

TCGA (Tissue Cancer Genome Atlas) verileri üzerinden yapılan bir çalışmada LAG-3 ekspresyonunun baş boyun kanserlerinde yüksek olduğu görülmüştür. İmmünohistokimya yöntemi ile de normal mukozaya kıyasla baş boyun kanserlerinde LAG-3 ekspresyonunun daha fazla olduğu konfirme edilmiştir. Bunun yanı sıra LAG-3 ekspresyonunun grade, lenf nodu metastazı varlığı, tümör boyutu ve rekürrens ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur [17]. Sağkalım açısından bu çalışmada LAG-3'ün anlamlı olmasa da negatif yönde bir etkisi olduğu söylenmektedir ve bu etkisi sadece lenf nodu metastazı olmayan hastalar değerlendirildiğinde anlamlılık düzeyine ulaşmaktadır.

LAG-3'ün oral kavite kanserlerinde bağımsız bir prognostik faktör olduğu göstermiştir [17]. Wang ve ark. [146] tarafından 36 oral kavite kanserli hastada yapılan bir çalışmada LAG-3 ekspresyonu ile tümörün histopatolojik özellikleri arasında bir ilişki gözlenmemekle beraber ortalama sağkalım ile arasında anlamlı derecede negatif korelasyon olduğu ortaya konulmuştur. Aynı çalışmada nimotuzumab tedavisi sonrası TIM-3 ekspresyonunda olduğu gibi LAG-3 ekspresyonunun da arttığı gösterilmiştir. Bunun tedavi başarısızlığının bir sebebi olabileceği öne sürülmüş ve baş boyun kanserlerinde immünoterapide immün checkpoint mekanizmalarda rol oynayan moleküllerin hedef alınması gerektiği vurgulanmıştır [146].

Çalışmamız LAG-3 ekspresyonunun larenks kanserlerinde değerlendirildiği, bilindiği kadarıyla, ilk çalışmadır. LAG-3 pozitif hasta grubunda rekürrenssiz sağkalım anlamlı derecede daha düşük izlenmiştir ($p=0,015$). Bunun yanı sıra istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmasa da yine LAG-3 pozitif grupta ortalama sağkalım, hastalığa özgü sağkalım ve hastalıksız sağkalım daha kötü olma eğilimindedir. TIM-3 ekspresyonunda olduğu gibi LAG-3 ekspresyonu açısından da intratümöral immün yanıtı düşük grup ($n=33$) ayrıca değerlendirildiğinde ortalama sağkalımın ve yine rekürrenssiz sağkalımın LAG-3 pozitif grupta daha düşük olduğu görülmüştür (sırasıyla $p=0,029$ ve $p=0,016$). Ayrıca yine bu grupta LAG-3

ekspresyonunun da tiroid kartilaj invazyonu ve T4 tümör varlığı açısından negatif bir faktör olduğunu gözlemledik (sırasıyla $p=0,017$; $r=0,434$ ve $p=0,05$; $r=0,343$). Birçok çalışmada belirtildiği gibi biz de TIM-3 ve LAG-3 ekspresyonlarının birbirleri ile anlamlı derecede ilişkili olduğunu tespit ettik ($p<0,001$); bu nedenle birlikte eksprese edilen bu belirteçlerin kötü prognostik faktörlerle olan ilişkisi de göz önünde bulundurulduğunda immünoterapide önemli hedefler olabilecekleri fikrindeyiz.

Larenks kanserleri özelinde immün mikroçevreyi, immün checkpoint mekanizmaları ve bunların prognostik faktörlerle ilişkisini değerlendiren çalışmaların sayısı oldukça azdır. Bu nedenle çalışmamız alanında önemli bir değerlendirme sunmaktadır. Bununla birlikte, flow sitometri metodunun da kullanılmış olması her ne kadar tümör infiltre eden lenfositlerin dokudaki diğer lenfositlerden ayrımını mümkün kılmasa da hücre izolasyonu açısından daha kantitatif bir metod olması nedeniyle çalışmaya ek değer katabilirdi. Hasta sayısının azlığı da bazı istatistiksel değerlendirmelerde bir dezavantaj olarak ortaya çıkmakla birlikte, baş boyun kanserleri genelinde olsa da larenks kanserleri özelinde bu sayıdaki hasta ile dahi yapılmış çalışmaların sayısı azdır.

6. SONUÇ

Larenks kanserleri, birçok kanser gibi, son yıllardaki gelişmelere rağmen sağ kalımı düşen hastalıklardan bir tanesidir. Günümüzde çalışmalar çoğu malignitede olduğu gibi baş boyun kanserlerinde de kanser immünolojisi alanına doğru kaymaktadır. Özellikle tümör mikroçevresi ve immün checkpoint mekanizmalar bu açıdan ön plana çıkmaktadır.

Çalışmamızda tümör infiltre eden lenfositler değerlendirilmiş; özellikle CD3 (T lenfosit), CD20 (B lenfosit) ve CD4 (yardımcı T lenfosit) infiltrasyonunun tüm sağkalım parametreleri açısından olumlu prognostik faktörler olduğu ortaya konulmuştur. İmmün checkpoint mekanizmalarda ve tümör hücrelerinin immün yanıttan kaçışında rol oynadığı düşünülen iki belirteç olan TIM-3 ve LAG-3 ayrıca değerlendirmeye alınmıştır. TIM-3 ekspresyonu tüm hasta popülasyonu değerlendirildiğinde anlamlı bir prognostik faktör olmasa da, intratümöral immün yanıtı düşük olan hasta popülasyonu ayrı olarak değerlendirildiğinde sağkalımı etkileyen önemli bir negatif prognostik belirteçtir. LAG-3 ise yine gerek tüm hasta popülasyonunda gerekse intratümöral immün yanıtı düşük grupta sağkalım parametrelerini olumsuz etkileyen bir belirteç olarak ön plana çıkmaktadır. Bu açıdan immünoterapide yeni hedef moleküller olarak umut vaat etmektedirler.

7. KAYNAKLAR

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [2] Doss M. Changing the Paradigm of Cancer Screening, Prevention, and Treatment. *Dose-Response* 2016;14:1–10. <https://doi.org/10.1177/1559325816680539>.
- [3] Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 2007;450:903–7. <https://doi.org/10.1038/nature06309>.
- [4] Hadrup S, Donia M, Thor Straten P. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron* 2013;6:123–33. <https://doi.org/10.1007/s12307-012-0127-6>.
- [5] Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-Ad V, Pribitkin E, et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Oncol* 2014;41:217–34. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.03.003>.
- [6] Chen SMY, Krinsky AL, Woolaver RA, Wang X, Chen Z, Wang JH. Tumor immune microenvironment in head and neck cancers. *Mol Carcinog* 2020;59:766–74. <https://doi.org/10.1002/mc.23162>.
- [7] Gooden MJM, De Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: A systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer* 2011;105:93–103. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.189>.
- [8] Tong CCL, Kao J, Sikora AG. Recognizing and reversing the immunosuppressive tumor microenvironment of head and neck cancer. *Immunol Res* 2012;54:266–74. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8306-6>.

- [9] Nguyen N, Bellile E, Thomas D, McHugh J, Rozek L, Virani S, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2016;38:1074–84. <https://doi.org/10.1002/hed.24406>.
- [10] Cho YA, Yoon HJ, Lee J Il, Hong SP, Hong SD. Relationship between the expressions of PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011;47:1148–53. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.08.007>.
- [11] Sharma MD, Hou DY, Liu Y, Koni PA, Metz R, Chandler P, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3⁺ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood* 2009;113:6102–11. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195354>.
- [12] Vukmanovic-Stejic M, Zhang Y, Cook JE, Fletcher JM, McQuaid A, Masters JE, et al. Human CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest* 2006;116:2423–33. <https://doi.org/10.1172/JCI28941>.
- [13] Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2014;27:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.12.005>.
- [14] Zhou Q, Munger ME, Veenstra RG, Weigel BJ, Hirashima M, Munn DH, et al. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8⁺ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood* 2011;117:4501–10. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-310425>.
- [15] Jie HB, Gildener-Leapman N, Li J, Srivastava RM, Gibson SP, Whiteside TL, et al. Intratumoral regulatory T cells upregulate immunosuppressive molecules in head and neck cancer patients. *Br J Cancer* 2013;109:2629–35. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.645>.

- [16] Liu JF, Ma SR, Mao L, Bu LL, Yu GT, Li YC, et al. T-cell immunoglobulin mucin 3 blockade drives an antitumor immune response in head and neck cancer. *Mol Oncol* 2017;11:235–47. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12029>.
- [17] Deng WW, Mao L, Yu GT, Bu LL, Ma SR, Liu B, et al. LAG-3 confers poor prognosis and its blockade reshapes antitumor response in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* 2016;5. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1239005>.
- [18] Meller SM. Functional anatomy of the larynx. *Otolaryngol Clin North Am* 1984;17:3–12.
- [19] KOÇ C. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi. 2nd ed. 2013.
- [20] Sancak Bedia. Fonksiyonel Anatomi. Baş-Boyun ve İç Organlar. 7th ed. 2013.
- [21] C. K. . Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi 1. Baskı Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti. 2003.
- [22] Flint PW HB. Cummings Otolaryngology Head and Neck Surgery. SIXTH. by Saunders; 2015.
- [23] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics , 2016 2016;66:7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21332>.
- [24] Sağlık Bakanlığı. SAĞLIK İSTATİSTİKLERİ YILLIĞI 2014. 2014.
- [25] Zuo J-J, Tao Z-Z, Chen C, Hu Z-W, Xu Y-X, Zheng A-Y, et al. Characteristics of cigarette smoking without alcohol consumption and laryngeal cancer: overall and time-risk relation. A meta-analysis of observational studies. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* 2017;274:1617–31. <https://doi.org/10.1007/s00405-016-4390-x>.
- [26] Stell PM, McGill T. Asbestos and laryngeal carcinoma. *Lancet (London, England)* 1973;2:416–7.

- [27] Giraldi L, Panic N, Cadoni G, Boccia S, Leoncini E. Association between Mediterranean diet and head and neck cancer. *Eur J Cancer Prev* 2016;1. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000277>.
- [28] Snow AN, Laudadio J. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. *Adv Anat Pathol* 2010;17:394–403. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3181f895c1>.
- [29] Li X, Gao L, Li H, Gao J, Yang Y, Zhou F, et al. Human Papillomavirus Infection and Laryngeal Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Infect Dis* 2013;207:479–88. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis698>.
- [30] Almadori G, Cadoni G, Cattani P, Galli J, Bussu F, Ferrandina G, et al. Human papillomavirus infection and epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:3988–93.
- [31] El-Serag HB, Hepworth EJ, Lee P, Sonnenberg A. Gastroesophageal reflux disease is a risk factor for laryngeal and pharyngeal cancer. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2013–8. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.03934.x>.
- [32] Schultz P. Vocal fold cancer. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* 2011;128:301–8. <https://doi.org/10.1016/j.anorl.2011.04.004>.
- [33] Licitra L, Bernier J, Grandi C, Locati L, Merlano M, Gatta G, et al. Cancer of the larynx 2003;47. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(03\)00017-9](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(03)00017-9).
- [34] Becker M, Burkhardt K, Dulguerov P, Allal A. Imaging of the larynx and hypopharynx. *Eur J Radiol* 2008;66:460–79. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2008.03.027>.
- [35] Adolphs APJ, Boersma NA, Diemel BDM, Eding JEC, Flokstra FE, Wegner I, et al. A systematic review of computed tomography detection of cartilage invasion in laryngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2015;125:1650–5.
- [36] Amin MB. *AJCC Cancer Staging System, 8th Edition: UPDATE*. Springer; 2017.

- [37] Moe K, Wolf GT, Fisher SG, Hong WK. Regional metastases in patients with advanced laryngeal cancer. Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;122:644–8.
- [38] Shah JP. Larynx and Trachea. Jatin Shah's *Head Neck Surg. Oncol.*, n.d., p. 356–425.
- [39] Scola B, Fernández-Vega M, Martínez T, Fernández-Vega S, Ramirez C. Management of cancer of the supraglottis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;124:195–8. <https://doi.org/10.1067/mhn.2001.112202>.
- [40] Stell PM, Tobin KE. The behavior of cancer affecting the subglottic space. *Can J Otolaryngol* 1975;4:612–7.
- [41] Degregori J. Challenging the axiom: Does the occurrence of oncogenic mutations truly limit cancer development with age. *Oncogene* 2013;32:1869–75. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.281>.
- [42] Greaves M. Does everyone develop covert cancer? *Nat Rev Cancer* 2014;14:209–10. <https://doi.org/10.1038/nrc3703>.
- [43] Cobucci RNO, Saconato H, Lima PH, Rodrigues HM, Prudêncio TL, Junior JE, et al. Comparative incidence of cancer in HIV-AIDS patients and transplant recipients. *Cancer Epidemiol* 2012;36. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2011.12.002>.
- [44] Economopoulou P, Kotsantis I, Psyrri A. Checkpoint Inhibitors in Head and Neck Cancer: Rationale, Clinical Activity, and Potential Biomarkers. *Curr Treat Options Oncol* 2016;17. <https://doi.org/10.1007/s11864-016-0419-z>.
- [45] Steinman RM. Dendritic cells: Versatile controllers of the immune system. *Nat Med* 2007;13:1155–9. <https://doi.org/10.1038/nm1643>.
- [46] Bronte V, Pittet MJ. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* 2013;39:806–18. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.010>.

- [47] Vasilevko V, Ghochikyan A, Holterman MJ, Agadjanyan MG. CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) are functionally equivalent in the initiation and maintenance of CD41 T-cell proliferation after activation with suboptimal doses of PHA. *DNA Cell Biol* 2002;21:137–49. <https://doi.org/10.1089/10445490252925404>.
- [48] Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily-CTLA-4. *Nature* 1988;328:267–70. <https://doi.org/10.1038/328267a0>.
- [49] Jin H-T, Ahmed R, Okazaki T. Role of PD-1 in Regulating T-Cell Immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 350, *Curr Top Microbiol Immunol*; 2010, p. 17–37. https://doi.org/10.1007/82_2010_116.
- [50] Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8:793–800. <https://doi.org/10.1038/nm730>.
- [51] Wang J, Tian S, Sun J, Zhang J, Lin L, Hu C. The presence of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) and the ratios between different subsets serve as prognostic factors in advanced hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2020;20. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07234-0>.
- [52] D’Errico G, Machado HL, Sainz B. A current perspective on cancer immune therapy: step- by- step approach to constructing the magic bullet. *Clin Transl Med* 2017;6. <https://doi.org/10.1186/s40169-016-0130-5>.
- [53] Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2003;348:203–13. <https://doi.org/10.1056/nejmoa020177>.
- [54] Geissler K, Fornara P, Lautenschläger C, Holzhausen HJ, Seliger B, Riemann D. Immune signature of tumor infiltrating immune cells in renal cancer. *Oncoimmunology* 2015;4:985082. <https://doi.org/10.4161/2162402X.2014.985082>.

- [55] Harimoto H, Shimizu M, Nakagawa Y, Nakatsuka K, Wakabayashi A, Sakamoto C, et al. Inactivation of tumor-specific CD8+CTLs by tumor-infiltrating tolerogenic dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2013;91:545–55. <https://doi.org/10.1038/icb.2013.38>.
- [56] Andersen MH, Sørensen RB, Brimnes MK, Svane IM, Becker JC, Straten PT. Identification of heme oxygenase-1-specific regulatory CD8+ T cells in cancer patients. *J Clin Invest* 2009;119:2245–56. <https://doi.org/10.1172/JCI38739>.
- [57] Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145–73. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.001045>.
- [58] Chikamatsu K, Sakakura K, Whiteside TL, Furuya N. Relationships between regulatory T cells and CD8+ effector populations in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2007;29:120–7. <https://doi.org/10.1002/hed.20490>.
- [59] Friedman KM, Prieto PA, Devillier LE, Gross CA, Yang JC, Wunderlich JR, et al. Tumor-specific CD4+ melanoma tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunother* 2012;35:400–8. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31825898c5>.
- [60] Junker N, Andersen MH, Wenandy L, Dombernowsky SL, Kiss K, Sørensen CH, et al. Bimodal ex vivo expansion of T cells from patients with head and neck squamous cell carcinoma: A prerequisite for adoptive cell transfer. *Cytotherapy* 2011;13:822–34. <https://doi.org/10.3109/14653249.2011.563291>.
- [61] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2017;198:986–92. <https://doi.org/10.1038/ni904>.

- [62] Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006;203:1693–700. <https://doi.org/10.1084/jem.20060468>.
- [63] Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* 2006;203:1701–11. <https://doi.org/10.1084/jem.20060772>.
- [64] Echarti A, Hecht M, Büttner-Herold M, Haderlein M, Hartmann A, Fietkau R, et al. Cd8⁺ and regulatory T cells differentiate tumor immune phenotypes and predict survival in locally advanced head and neck cancer. *Cancers (Basel)* 2019;11. <https://doi.org/10.3390/cancers11091398>.
- [65] Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3 + regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:490–500. <https://doi.org/10.1038/nri2785>.
- [66] Viguier M, Lemaître F, Verola O, Cho M-S, Gorochov G, Dubertret L, et al. Foxp3 Expressing CD4 + CD25 high Regulatory T Cells Are Overrepresented in Human Metastatic Melanoma Lymph Nodes and Inhibit the Function of Infiltrating T Cells . *J Immunol* 2004;173:1444–53. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.1444>.
- [67] Boucek J, Mrkvan T, Chovanec M, Kuchar M, Betka J, Boucek V, et al. Regulatory T cells and their prognostic value for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Cell Mol Med* 2010;14:426–33. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00650.x>.
- [68] Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol* 2016;28:401–9. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw025>.
- [69] Walker LSK, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol* 2011;11:852–63. <https://doi.org/10.1038/nri3108>.

- [70] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *J Immunol* 2017;198:981–5. <https://doi.org/10.1126/science.1079490>.
- [71] Park HJ, Park JS, Jeong YH, Son J, Ban YH, Lee B-H, et al. PD-1 Upregulated on Regulatory T Cells during Chronic Virus Infection Enhances the Suppression of CD8 + T Cell Immune Response via the Interaction with PD-L1 Expressed on CD8 + T Cells . *J Immunol* 2015;194:5801–11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401936>.
- [72] Fridman WH, Pagès F, Sauts-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012;12:298–306. <https://doi.org/10.1038/nrc3245>.
- [73] Hladíková K, Koucký V, Bouček J, Laco J, Grega M, Hodek M, et al. Tumor-infiltrating B cells affect the progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma via cell-to-cell interactions with CD8+ T cells. *J Immunother Cancer* 2019;7. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0726-6>.
- [74] Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 2005;6:1245–52. <https://doi.org/10.1038/ni1271>.
- [75] Huang YH, Zhu C, Kondo Y, Anderson AC, Gandhi A, Russell A, et al. CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature* 2015;517:386–90. <https://doi.org/10.1038/nature13848>.
- [76] Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 2002;415:536–41. <https://doi.org/10.1038/415536a>.
- [77] Gupta S, Thornley TB, Gao W, Larocca R, Turka LA, Kuchroo VK, et al. Allograft rejection is restrained by short-lived TIM-3 +PD-1 +Foxp3 + Tregs. *J Clin Invest* 2012;122:2395–404. <https://doi.org/10.1172/JCI45138>.

- [78] Sakuishi K, Ngiow SF, Sullivan JM, Teng MWL, Kuchroo VK, Smyth MJ, et al. TIM3+FOXP3+ regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. *Oncoimmunology* 2013;2. <https://doi.org/10.4161/onci.23849>.
- [79] Joller N, Kuchroo VK. Tim-3, Lag-3, and TIGIT. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 410, Springer Verlag; 2017, p. 127–56. https://doi.org/10.1007/82_2017_62.
- [80] Das M, Zhu C, Kuchroo VK. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunol Rev* 2017;276:97–111. <https://doi.org/10.1111/imr.12520>.
- [81] Jie HB, Srivastava RM, Argiris A, Bauman JE, Kane LP, Ferris RL. Increased PD-1+ and TIM-3+ TILs during cetuximab therapy inversely correlate with response in head and neck cancer patients. *Cancer Immunol Res* 2017;5:408–16. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0333>.
- [82] Xu F, Liu J, Liu D, Liu B, Wang M, Hu Z, et al. LSECTin expressed on melanoma cells promotes tumor progression by inhibiting antitumor T-cell responses. *Cancer Res* 2014;74:3418–28. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2690>.
- [83] Yang ZZ, Kim HJ, Villasboas JC, Chen YP, Price-Troska TP, Jalali S, et al. Expression of LAG-3 defines exhaustion of intratumoral PD-1+ T cells and correlates with poor outcome in follicular lymphoma. *Oncotarget* 2017;8:61425–39. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18251>.
- [84] Goding SR, Wilson KA, Xie Y, Harris KM, Baxi A, Akpınarli A, et al. Restoring Immune Function of Tumor-Specific CD4 + T Cells during Recurrence of Melanoma . *J Immunol* 2013;190:4899–909. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300271>.

- [85] Durham NM, Nirschl CJ, Jackson CM, Elias J, Kochel CM, Anders RA, et al. Lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) modulates the ability of CD4 T-cells to be suppressed In Vivo. PLoS One 2014;9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109080>.
- [86] Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM, Okazaki T. LAG-3: from molecular functions to clinical applications. J Immunother Cancer 2020;8. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001014>.
- [87] He Y, Yu H, Rozeboom L, Rivard CJ, Ellison K, Dziadziuszko R, et al. LAG-3 Protein Expression in Non–Small Cell Lung Cancer and Its Relationship with PD-1/PD-L1 and Tumor-Infiltrating Lymphocytes. J Thorac Oncol 2017;12:814–23. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.01.019>.
- [88] Decker WK, Safdar A. Bioimmunoadjuvants for the treatment of neoplastic and infectious disease: Coley’s legacy revisited. Cytokine Growth Factor Rev 2009;20:271–81. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.07.004>.
- [89] Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Pillars Article: “Activity Acquired Tolerance” of Foreign Cells Nature 172: 603-606. J Immunol 2010;184:5–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0990109>.
- [90] Lipson EJ, Drake CG. Ipilimumab: An anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma. Clin Cancer Res 2011;17:6958–62. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1595>.
- [91] Niezgoda A, Niezgoda P, Czajkowski R. Novel approaches to treatment of advanced melanoma: A review on targeted therapy and immunotherapy. Biomed Res Int 2015;2015. <https://doi.org/10.1155/2015/851387>.
- [92] Bann D V., Deschler DG, Goyal N. Novel immunotherapeutic approaches for head and neck squamous cell carcinoma. Cancers (Basel) 2016;8:1–20. <https://doi.org/10.3390/cancers8100087>.

- [93] Srivastava RM, Lee SC, Andrade Filho PA, Lord CA, Jie HB, Davidson HC, et al. Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger tumor antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 2013;19:1858–72. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2426>.
- [94] Burtneess B, Goldwasser MA, Flood W, Mattar B, Forastiere AA. Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: An Eastern Cooperative Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2005;23:8646–54. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.4646>.
- [95] Weidhaas JB, Harris J, Schae D, Chen AM, Chin R, Axelrod R, et al. The KRAS-variant and cetuximab response in head and neck squamous cell cancer a secondary analysis of a randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 2017;3:483–91. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5478>.
- [96] Rancoule C, Vallard A, Espenel S, Guy JB, Xia Y, El Meddeb Hamrouni A, et al. Immunotherapy in head and neck cancer: Harnessing profit on a system disruption. *Oral Oncol* 2016;62:153–62. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.09.002>.
- [97] Forster MD, Devlin MJ. Immune checkpoint inhibition in head and neck cancer. *Front Oncol* 2018;8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00310>.
- [98] Wolf GT, Chepeha DB, Bellile E, Nguyen A, Thomas D, McHugh J, et al. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in oral cavity squamous carcinoma: A preliminary study. *Oral Oncol* 2015;51:90–5. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.09.006>.
- [99] Wang J, Tian S, Sun J, Zhang J, Lin L, Hu C. The presence of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) and the ratios between different subsets serve as prognostic factors in advanced hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2020;20:1–12. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07234-0>.

- [100] Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:18538–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509182102>.
- [101] Bi Y, Ren X, Bai X, Meng Y, Luo Y, Cao J, et al. PD-1/PD-L1 expressions in medullary thyroid carcinoma: Clinicopathologic and prognostic analysis of Chinese population. *Eur J Surg Oncol* 2019;45:353–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2018.10.060>.
- [102] Shi X, Li CW, Tan LC, Wen SS, Liao T, Zhang Y, et al. Immune Co-inhibitory Receptors PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, and TIGIT in Medullary Thyroid Cancers: A Large Cohort Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2021;106:120–32. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa701>.
- [103] Curley J, Conaway MR, Chinn Z, Duska L, Stoler M, Mills AM. Looking past PD-L1: expression of immune checkpoint TIM-3 and its ligand galectin-9 in cervical and vulvar squamous neoplasia. *Mod Pathol* 2020;33:1182–92. <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0433-3>.
- [104] Canning M, Guo G, Yu M, Myint C, Groves MW, Byrd JK, et al. Heterogeneity of the head and neck squamous cell carcinoma immune landscape and its impact on immunotherapy. *Front Cell Dev Biol* 2019;7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00052>.
- [105] Wolf GT, Chepeha DB, Bellile E, Nguyen A, Thomas D, McHugh J, et al. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in oral cavity squamous carcinoma: A preliminary study. *Oral Oncol* 2015;51:90–5. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.09.006>.
- [106] Lechner A, Schlößer H, Rothschild SI, Thelen M, Reuter S, Zentis P, et al. Characterization of tumor-associated T-lymphocyte subsets and immune checkpoint molecules in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2017;8:44418–33. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17901>.

- [107] Mandal R, Şenbabaoğlu Y, Desrichard A, Havel JJ, Dalin MG, Riaz N, et al. The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI Insight* 2016;1:1–18. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89829>.
- [108] Wang Z, Yuan H, Huang J, Hu D, Qin X, Sun C, et al. Prognostic value of immune-related genes and immune cell infiltration analysis in the tumor microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2021;43:182–97. <https://doi.org/10.1002/hed.26474>.
- [109] Wansom D, Light E, Thomas D, Worden F, Prince M, Urba S, et al. Infiltrating lymphocytes and human papillomavirus-16-associated oropharyngeal cancer. *Laryngoscope* 2012;122:121–7. <https://doi.org/10.1002/lary.22133>.
- [110] Piersma SJ, Jordanova ES, Van Poelgeest MIE, Kwappenberg KMC, Van Der Hulst JM, Drijfhout JW, et al. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res* 2007;67:354–61. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3388>.
- [111] Keck MK, Zuo Z, Khattri A, Stricker TP, Brown CD, Imanguli M, et al. Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes. *Clin Cancer Res* 2015;21:870–81. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2481>.
- [112] Hoesli R, Birkeland AC, Rosko AJ, Issa M, Chow KL, Michmerhuizen NL, et al. Proportion of CD4 and CD8 tumor infiltrating lymphocytes predicts survival in persistent/recurrent laryngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2018;77:83–9. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.12.003>.
- [113] Bohling SD, Allison KH. Immunosuppressive regulatory T cells are associated with aggressive breast cancer phenotypes: A potential therapeutic target. *Mod Pathol* 2008;21:1527–32. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.160>.

- [114] DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov* 2011;1:54–67. <https://doi.org/10.1158/2159-8274.CD-10-0028>.
- [115] Kimura H, Matsui Y, Ishikawa A, Nakajima T, Iizasa T. Randomized controlled phase III trial of adjuvant chemoimmunotherapy with activated cytotoxic T cells and dendritic cells from regional lymph nodes of patients with lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2018;67:1231–8. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2180-6>.
- [116] Diederichsen ACP, Hjelmberg JVB, Christensen PB, Zeuthen J, Fenge C. Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:423–8. <https://doi.org/10.1007/s00262-003-0388-5>.
- [117] Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay NEH, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res* 2006;12:465–72. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1886>.
- [118] Pereira JDS, Da Costa Miguel MC, Queiroz LMG, Da Silveira ÉJD. Analysis of CD8+ and CD4+ Cells in oral squamous cell carcinoma and their association with lymph node metastasis and histologic grade of malignancy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2013;22:200–5. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31828df3c9>.
- [119] Boxberg M, Leising L, Steiger K, Jesinghaus M, Alkhamas A, Mielke M, et al. Composition and Clinical Impact of the Immunologic Tumor Microenvironment in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Immunol* 2019;202:278–91. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800242>.

- [120] Krupar R, Hautmann MG, Pathak RR, Varier I, McLaren C, Gaag D, et al. Immunometabolic Determinants of Chemoradiotherapy Response and Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Am J Pathol* 2018;188:72–83. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.09.013>.
- [121] Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL. Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer* 2005;92:913–20. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602407>.
- [122] Ladoire S, Arnould L, Mignot G, Coudert B, Rébé C, Chalmin F, et al. Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2011;125:65–72. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0831-1>.
- [123] Halama N, Michel S, Kloor M, Zoernig I, Benner A, Spille A, et al. Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. *Cancer Res* 2011;71:5670–7. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0268>.
- [124] Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, Sitkauskienė B, Miliauskas S, Bajoriunas V, et al. The prognostic influence of tumor infiltrating Foxp3+CD4+, CD4+ and CD8+ T cells in resected non-small cell lung cancer. *J Inflamm (United Kingdom)* 2015;12. <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0108-x>.
- [125] De Meulenaere A, Vermassen T, Aspeslagh S, Vandecasteele K, Rottey S, Ferdinande L. TILs in Head and Neck Cancer: Ready for Clinical Implementation and Why (Not)? *Head Neck Pathol* 2017;11:354–63. <https://doi.org/10.1007/s12105-016-0776-8>.
- [126] Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman S V., Feng W, Kim D, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med* 2015;21:938–45. <https://doi.org/10.1038/nm.3909>.

- [127] Fridman WH, Pagès F, Sauts-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012;12:298–306. <https://doi.org/10.1038/nrc3245>.
- [128] Näsman A, Romanitan M, Nordfors C, Grün N, Johansson H, Hammarstedt L, et al. Tumor infiltrating CD8 + and Foxp3 + Lymphocytes correlate to clinical outcome and human papillomavirus (HPV) status in Tonsillar cancer. *PLoS One* 2012;7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038711>.
- [129] Hadrup S, Donia M, Thor Straten P. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron* 2013;6:123–33. <https://doi.org/10.1007/s12307-012-0127-6>.
- [130] Badoual C, Hans S, Merillon N, Van Ryswick C, Ravel P, Benhamouda N, et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-Associated head and neck cancer. *Cancer Res* 2013;73:128–38. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2606>.
- [131] Quan H, Yan L, Wang S, Wang S. Clinical relevance and significance of programmed death-ligand 1 expression, tumor-infiltrating lymphocytes, and p16 status in sinonasal squamous cell carcinoma. *Cancer Manag Res* 2019;11:4335–45. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S201568>.
- [132] Näsman A, Romanitan M, Nordfors C, Grün N, Johansson H, Hammarstedt L, et al. Tumor infiltrating CD8 + and Foxp3 + Lymphocytes correlate to clinical outcome and human papillomavirus (HPV) status in Tonsillar cancer. *PLoS One* 2012;7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038711>.
- [133] Ni YH, Zhang X xin, Lu Z yi, Huang XF, Wang ZY, Yang Y, et al. Tumor-Infiltrating CD1a+ DCs and CD8+/FoxP3+ Ratios Served as Predictors for Clinical Outcomes in Tongue Squamous Cell Carcinoma Patients. *Pathol Oncol Res* 2020;26:1687–95. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00701-5>.

- [134] Loose D, Signore A, Bonanno E, Vermeersch H, Dierckx R, Deron P, et al. Prognostic value of CD25 expression on lymphocytes and tumor cells in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Biother Radiopharm* 2008;23:25–33. <https://doi.org/10.1089/cbr.2007.0373>.
- [135] Fucikova J, Rakova J, Hensler M, Kasikova L, Belicova L, Hladikova K, et al. TIM-3 dictates functional orientation of the immune infiltrate in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2019;25:4820–31. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4175>.
- [136] Deng WW, Wu L, Sun ZJ. Co-inhibitory immune checkpoints in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2018;24:120–3. <https://doi.org/10.1111/odi.12746>.
- [137] Datar I, Sanmamed MF, Wang J, Henick BS, Choi J, Badri T, et al. Expression analysis and significance of PD-1, LAG-3, and TIM-3 in human non-small cell lung cancer using spatially resolved and multiparametric single-cell analysis. *Clin Cancer Res* 2019;25:4663–73. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4142>.
- [138] Hanna GJ, Lizotte P, Cavanaugh M, Kuo FC, Shivdasani P, Frieden A, et al. Frameshift events predict anti-PD-1/L1 response in head and neck cancer. *JCI Insight* 2018;3. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98811>.
- [139] J. L, G. S, L. A, H.-B. J, N. G-L, N. S, et al. Tumor-infiltrating Tim-3+ T cells proliferate avidly except when PD-1 is co-expressed: Evidence for intracellular cross talk. *Oncoimmunology* 2016;5.
- [140] Liu Z, McMichael EL, Shayan G, Li J, Chen K, Srivastava R, et al. Novel effector phenotype of TIM-3⁺ Regulatory T cells leads to enhanced suppressive function in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 2018;24:4529–38. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1350>.

- [141] Zhang Y, Cai P, Liang T, Wang L, Hu L. TIM-3 is a potential prognostic marker for patients with solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2017;8:31705–13. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15954>.
- [142] Burugu S, Gao D, Leung S, Chia SK, Nielsen TO. TIM-3 expression in breast cancer. *Oncoimmunology* 2018;7. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1502128>.
- [143] Zhao Y, Chen D, Wang W, Zhao T, Wen J, Zhang F, et al. Significance of TIM-3 Expression in Resected Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2020;109:1551–7. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2019.12.017>.
- [144] Shan B, Man H, Liu J, Wang L, Zhu T, Ma M, et al. TIM-3 promotes the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by targeting epithelial-mesenchymal transition via the Akt/GSK-3 β /Snail signaling pathway. *Oncol Rep* 2016;36:1551–61. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4938>.
- [145] Oweida A, Hararah MK, Phan A, Binder D, Bhatia S, Lennon S, et al. Resistance to radiotherapy and PD-L1 blockade is mediated by TIM-3 upregulation and regulatory T-cell infiltration. *Clin Cancer Res* 2018;24:5368–80. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1038>.
- [146] Wang H, Mao L, Zhang T, Zhang L, Wu Y, Guo W, et al. Altered expression of TIM-3, LAG-3, IDO, PD-L1, and CTLA-4 during nimotuzumab therapy correlates with responses and prognosis of oral squamous cell carcinoma patients. *J Oral Pathol Med* 2019;48:669–76. <https://doi.org/10.1111/jop.12883>.
- [147] Grosso JF, Kelleher CC, Harris TJ, Maris CH, Hipkiss EL, De Marzo A, et al. LAG-3 regulates CD8⁺ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems. *J Clin Invest* 2007;117:3383–92. <https://doi.org/10.1172/JCI31184>.

- [148] Matsuzaki J, Gnjatic S, Mhawech-Fauceglia P, Beck A, Miller A, Tsuji T, et al. Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8⁺ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:7875–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003345107>.
- [149] Burugu S, Gao D, Leung S, Chia SK, Nielsen TO. LAG-3⁺ tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: Clinical correlates and association with PD-1/PD-L1⁺ tumors. *Ann Oncol* 2017;28:2977–84. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx557>.

