



Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi

Patoloji Anabilim Dalı

Laringeal skuamöz hücreli karsinomda Human
Papillomavirüs varlığı, p53 ekspresyonu ve Ki-67 ile
hücrel proliferasyonun değerlendirilmesi

Dr. İnci BUĞDAY

Uzmanlık Tezi

Van, 2016

Laringeal skuamöz hücreli karsinomda Human Papillomavirüs varlığı, p53 ekspresyonu ve Ki-67 ile hücresel proliferasyonun değerlendirilmesi

Dr. İnci BUĞDAY

Danışman

Yar. Doç. Dr. Remzi ERTEN

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi

Patoloji Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2015-TF-U085 No'lu proje olarak desteklenmiştir.

Van, 2016

KISALTMALAR:

A	Adenin
AJCC	American Joint Committe on Cancer
C	Sitozin
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CIS	Karsinoma in situ
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
EBV	Ebstein barr virüs
G	Guanin
GFAP	Glial fibriler asidik protein
HPV	Human Papillomavirüs
HSIL	High grade skuamöz intraepitelyal lezyon
H&E	Hematoksilen-Eozin
IHK	İmmünhistokimya
mRNA	Messenger Ribonükleik asit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Rb	Retinoblastom
SCC	Squamous cell carcinoma
SHK	Skuamöz hücreli karsinom
SNP	tek nükleotit polimorfizmi
T	Timin
Tm	Erime sıcaklığı

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, en yoğun zamanlarında bile beni geri çevirmeyip ilgilenen ve her konuda destek olan tez danışmanım sayın Yar. Doç. Dr. Remzi ERTEN ve Yar. Doç. Dr. Gülay BULUT'a,

Asistanlığım süresince beraber çalışma şansına eriştiğim değerli hocalarım; Prof. Dr. İrfan BAYRAM ve Prof. Dr. Mustafa KÖSEM'e;

Tez çalışmamın istatistiksel değerlendirmeleri aşamasında yardımını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Sıddık KESKİN'e,

Her daim destekçilerim, mesai arkadaşlarım ve dostlarım; Dr. Deniz YILMAZ, Dr. Ayşe ALMALI, Dr. İbrahim ARAS, Dr. Funda ŞENKÖY, Dr. Zehra İLİK ve Dr. Yusuf YALSIZ'a;

Patoloji laboratuvarındaki ekip arkadaşlarımız olan teknisyenlerimiz, sekreterlerimiz ve yardımcı personelimize;

Beni yetiştiren ve bugünlere getiren sevgili aileme;

Eşime ve gözümün nuru biricik kızım Zeyneb'ime

Sonsuz TEŞEKKÜRLER...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Larinks Anatomisi, Embriyolojisi, Histolojisi, Fizyolojisi	2
2.1.1. Larinks Anatomisi	2
2.1.2. Larinks Embriyolojisi	3
2.1.3. Larinks Histolojisi	4
2.1.4. Larinks Fizyolojisi	5
2.2. Larinksin Tümörleri ve Tümör Benzeri Lezyonları	6
2.2.1. Papillom ve Papillomatozis	6
2.2.2. İntraepitelyal Proliferatif Lezyonlar	7
2.2.2.1. Keratozis	7
2.2.2.2. Displazi/karsinoma insitu (CIS)	7
2.2.3. İnvaziv Karsinom	9
2.2.3.1. Genel Özellikler	9
2.2.3.2. Larinksin Diğer Tümörleri	10
2.2.3.3. Larinks tümörlerinin lokalizasyonlarına göre tipi, yayılımı ve tedavisi	12
2.2.3.4. Larinks Tümörlerinde Evreleme	13
2.3. Human Papillomavirüs	15
2.3.1. Human Papillomavirüsün Karsinogenezdeki Rolü	15
2.3.1.1. Erken Proteinler	16
2.3.1.2. Geç Proteinler	16
2.3.1.3. E5 Protein	18

2.3.1.4. E6 Protein	18
2.3.1.5. E7 Protein	19
2.4. P53 Geni	19
2.5. Ki-67	22
2.6. Real time PCR	23
2.6.1. Özgöl Olmayan Belirleme Sistemi	24
2.6.2. Özgöl Belirleme Sistemi	25
2.6.3. Moleküler Boncuk Yöntemi	25
2.6.4. Hibridizasyon Prob Yöntemi	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Olgu Seçimi	27
3.2. Histopatolojik İnceleme	27
3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	27
3.4. Real time PCR inceleme	28
3.5. İstatistiksel analiz	28
4. BULGULAR	29
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ	46
7. KAYNAKLAR	47

ÖZET

Amaç: Günümüzde 200 civarında Human papillomavirüs (HPV) tipi belirlenmiştir ve bunların yaklaşık olarak 40'ı anogenital epiteli infekte etmektedir. Diğer tipler vücutta pek çok hastalık ve kanser ile ilişkili görülmektedir. Bunlardan biri de orofaringeal yerleşimli skuamöz hücreli karsinom (SHK)'dur. Bu bağlamda biz de Van yöresinde gelişen laringeal SHK'larda HPV'nin etyolojideki yerini saptamak ve bunların p53 ve Ki-67 immünohistokimyasal (IHK) belirteçlere yanıtlarını gözlemlemek, boyanma yoğunluklarının SHK'nin diferansiyasyon ve HPV pozitifliği ile ilişkisi olup olmadığını araştırdık.

Gereç ve yöntem: Larinkste SHK tanısı almış 100 vakada p53 ve Ki-67 immünohistokimyasal boyaları uygulandı ve real time polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) metodu ile HPV Deoksiribonükleik asit (DNA) varlığı araştırıldı.

Bulgular: Yüz olgudan beşi erkek biri kadın olmak üzere altısında HPV pozitifliği saptandı. P53 ile olguların %42'si skor 1, %7'si skor 2, %7'si skor 3 ve %44'ü skor 4 olarak boyandı. Ki-67 ile olguların %12'si skor 1, %16'sı skor 2, %18'i skor 3 ve %54'ü skor 4 olarak boyandı.

Sonuç: Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler ışığında Van bölgesinde larinkste SHK tanısı alan vakaların %6'sında HPV pozitifliği saptanmıştır. Bu oran literatürdeki benzer çalışmaların sonuçlarından farklı idi. Bu bölgedeki laringeal skuamöz hücreli karsinomların etyopatogenezinde HPV'nin dünya genelindekinden daha az oranda payı olduğu görüldü. Yapılan p53 ve Ki-67 IHK'sal boyaları arasında korelasyon saptandı fakat HPV-DNA pozitifliği, yaş, cinsiyet, lokalizasyon ve tümör derecesi arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık görülmedi.

Anahtar Kelimeler: HPV, Ki-67, p53, larinks, skuamöz hücreli karsinom.

ABSTRACT

Objectives: Today, approximately 200 types of Human Papilloma Virus (HPV) have been identified and nearly 40 of them infect the anogenital epithelium. The other types seem be associated with many diseases of the body and cancer. One of them is squamous cell carcinoma (SCC) with oropharyngeal localization. In this context, we investigated whether staining intensities were associated with the SCC differentiation and HPV positivity in order to determine the role of HPV in the etiology of laryngeal SCCs that develop in the area of Van and observe their responses to the immunohistochemical (IHC) markers of p53 and Ki-67.

Material and method: The p53 and Ki-67 immunohistochemical stains were applied in 100 cases diagnosed with laryngeal SCC and the presence of HPV deoxyribonucleic acid (DNA) using the real-time polymerase chain reaction (PCR) method.

Findings: HPV positivity was identified in six (five male and one female) out of a hundred cases. The result of p53 staining was score 1 in 42%, score 2 in 7%, score 3 in 7% and score 4 in 44% of the cases. The result of Ki-67 staining was score 1 in 12%, score 2 in 16%, score 3 in 18% and score 4 in 54% of the cases.

Conclusion: In the light of the data we obtained from our study, 6% of the cases diagnosed with SCC in the area of Van were identified to have HPV positivity. This ratio was different from the results of similar studies in the literature. It was seen that the role of HPV in the etiopathogenesis of squamous cell carcinomas in this area was lower than the globally applicable figure. A correlation was identified between the p53 and Ki-67 stains that were applied; however, no statistically significant correlations were seen among HPV-DNA positivity, age, sex, localization and tumor grade.

Keywords: HPV, Ki-67, p53, larynx, squamous cell carcinoma.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Larinks kanseri tüm malign tümörlerin % 2-3'ünü oluşturur (1). Larinks kanserlerinin % 95'den fazlası SHK'lardır (2). Bu kanserlerin gelişmesinde en önemli risk faktörleri alkol ve sigara kullanımıdır (3). Larinksin SHK'larının etyolojisinde HPV'nin de rol alabileceği şimdiye kadar yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (3). Özellikle serviks kanserlerinin etyopatogenezinde de rol oynayan yüksek riskli HPV tip 16, 18 ve orta derecede riskli tip 31 ve 33'ün, larinks kanserli hastalarda da araştırılması farklı popülasyonlarda farklı sonuçlar vermektedir (1).

TP53 geninde meydana gelen mutasyonlar insan tümörlerinde en sık rastlanan genetik değişikliklerdendir (4-7). İnsanlarda görülen tüm tümörlerin % 50'sinden fazlasında TP53 geninde mutasyon saptanmıştır. TP53 tümör süpresör bir gen olup gen ürünü p53 olarak bilinir. İlk tanımlandığı zaman sadece bir onkogen olarak görev yaptığı düşünülen bu genin, daha sonraki yıllarda sadece mutant formunun anormal hücre büyümesinde rol oynadığı, normal TP53 geninin ise tümör oluşumunu baskılayıcı görev yaptığı saptanmıştır (4-12).

Ki-67 çoğalan hücrelerde görülen bir çekirdek proteini olup esasen G1, S, M ve G2 fazında görülmesine rağmen G0 fazında yoktur. Hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi gösteren bir protein olup, mitotik indeks ve tümör derecelendirilmesinde sıklıkla kullanılır (13).

Bu çalışmada larinksin SHK'larında; HPV varlığının saptanması, pozitif olguların alt tiplerinin belirlenmesi, tümör progresyonu için önemli olan p53 proteini ve proliferasyon indeksi olarak kullanılan Ki-67 oranının saptanması, tüm sonuçların birbirleriyle ve klinikopatolojik değişkenlerle ilişkisini saptamak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Larinks Anatomisi, Embriyolojisi, Histolojisi, Fizyolojisi

2.1.1. Larinks Anatomisi

Larinks, boynun ön tarafında 3-6. boyun vertebraları hizasında, dil kökü ile trakea arasında bulunur. Larinks arkada farenksin alt parçası ile komşudur ve burada farenksin ön duvarını yapar. Önde orta kısımda yalnızca fasya ve deri ile örtülüdür. Önde ve yanlarda sternohiyoid, sternotiroid, omohiyoid, tirohiyoid kasları, damar-sinir paketi, sternokleidomastoid kas ve tiroid glandı ile komşudur. Yukarıda hiyoid kemiğine tirohiyoid kası ve ligamanlar ile bağlıdır. Bundan dolayı larinks özellikle yutma esnasında hiyoid kemiğin hareketlerini izler.

Larinksin en üst kısmını oluşturan epiglot, mukozal plikalar ve bağ dokusu ile dil köküne komşudur. Larinks aşağıda trakea ile devam eder. Larenksin üst deliği solunum yolunu daraltabilecek ve gereğinde tamamen kapatabilecek özelliktedir. Bu mekanizma sesin oluşumu ve yabancı cisimlerin solunum yoluna kaçmaması için gereklidir. Larenksin iskeletini oluşturan kıkırdaklar üçü çift, üçü tek olmak üzere dokuz tanedir. Çift olan kıkırdaklar; aritenoid, kuneiform, kornukulat; tek olanları tiroidea, krikoid ve epiglottur.

Epiglot fenestrasyonlar içeren elastik kıkırdak, diğerleri hyalen tipte kıkırdaktır. Tiroid ve krikoid kıkırdağın kalsifikasyonu erkekte yirmili yaşlarda, kadında ise erkeğe göre daha geç yaşlarda başlar. Hyalen kıkırdak kanser yayılımına dirençli olduğundan, tümörler bu tipte kıkırdaklara ancak kalsifikasyon sonrası yayılabilirler.

Vokal ligamanlar önde tiroid kıkırdağa, arkada aritenoid kıkırdakların prosesus vokalislerine yapışır.

Larinksin ekstrensek kasları olan omohiyoid, sternohiyoid, tirohiyoid kasları komşu yapılardan köken alarak tiroid, krikoid veya hiyoid kıkırdaklar üzerine yapışarak çiğneme sırasında bir bütün halinde hareket ederler.

Larinksin intrensek kasları 5 tane olup: krikotiroid, krikoaritenoides posterior, krikoaritenoides lateralis, tiroaritenoides kasları çift, aritenoid kas ise tektir. Larinks kaslarının iki önemli görevi vardır; yabancı cisimlerin solunum yollarına geçişini engellemek ve larinks kıkırdaklarının durumunu değiştirerek ses plikalarını ses oluşturacak şekle sokmaktır.

Larinksin motor ve duyusal sinirleri n.vagus'tan gelir.

Larinks arterlerini superior ve inferior tiroid arterden alır. Aynı isimli venler arterleri izler (14).

Larinksin lenf damarları iki ayrı sistemden oluşur: Mukozal (yüzeyel) ve submukozal (derin) sistem. Mukozal sistem tüm mukoza boyunca yayılırken submukozal sistem birbirinden bağımsız kompartmanlara ayrılmıştır. Bu durum kanser metastazlarının aranmasında veya metastaza göre kanserin larinksin hangi bölgesinde olduğunu saptamak açısından önemlidir.

Gerçek kordun lenfatik kanalları az sayıda olduğu için glottik karsinomun metastazı enderdir. Krikotiroid membranı delerek servikal lenfatiklere ulaşır. Supraglottik alan lenfatiklerden zengin olup tirohiyoid membranı delerek üst servikal ve anterosüperior lenf nodlarına dökülürler.

Piriform sinüslerde de bol lenfatik bulunur. Lateralde çoğu derin servikal lenf nodlarına bazen de paratrakeal lenf nodlarına dokülürler. Subglottik alanın lenf sıvısı prelaringeal, paratrakeal, pretrakeal ve supraklaviküler lenf nodlarına drene olur (14, 15).

Larinks başlıca üç bölümde incelenir:

A. Supraglottik bölüm: Epiglotun ucundan gerçek korda kadar uzanır. Epiglot, ventriküler bandlar (yalancı kordlar), ariepiglottik plikalar, aritenoid kıkırdaklar ve ventriküller bu bölümde yer alır.

B. Glottik bölüm: Bu bölüm vokal kordlar ve onları önde birleştiren anterior komissürü kapsar.

C. Subglottik bölüm: Gerçek kordların alt sınırı ile birinci trakea kıkırdağı arasında yer alan bölümdür (15,16).

2.1.2. Larinks Embriyolojisi

Bocca ve arkadaşları larinksin; süperior ve inferior olmak üzere iki ayrı hemilarinksten oluştuğunu ve bu kısımların embriyolojik kökenlerinin farklı ve lenfatik dolaşımlarının birbirinden bağımsız olduğunu göstermişlerdir.

Supraglottik kısım 3. ve 4. brankiyal arklardan köken alır ve oral kaviteyle orofarenksin gelişimi ile ilişkilidir. Glottis ve subglottis ise akciğer ve trakea ile birlikte

6. arktan gelişir. Kanseri her bir hemilarinkste birbirinden bağımsız gelişir ve kanserin hemilarinksler arasındaki yayılımı bu embriyolojik demarkasyon ile sınırlıdır (17).

Larinksin epitelyal döşemesi laringotrakeal tübün kranyal ucunun endoderminden gelişir.

Larinksin kıkırdakları 4. ve 6. faringeal yay çiftlerindeki kıkırdaklardan gelişir. Laringeal kıkırdaklar, nöral krista hücrelerinden köken alan mezenkimden gelişirler. Laringotrakeal tübün kranyal ucundaki mezenkim hızla çoğalarak aritenoid şişkinlik çiftlerini meydana getirir.

Dile doğru gelişen bu şişkinlikler, yarık şeklindeki (glottis primitiva-ilkel dil), T harfi biçimli laringeal giriş ve gelişmekte olan laringeal lümeni dar bir yarığa dönüştürür.

Laringeal epitelin hızla çoğalması geçici olarak laringeal lümenin tıkanmasıyla sonuçlanır. Onuncu haftaya kadar larinks rekanalize olur. Rekanalize olma işlemi sırasında laringeal ventriküller oluşur.

Bu girintiler plica vocalis (ses tellerini) ve plica vestibularis (vestibuler kalıntıları) oluşturan müköz membran kalıntıları ile sınırlanır.

Epiglottis 3. ve 4. faringeal yayların ventral ucunda mezenkim çoğalmasıyla meydana gelen hipobrankiyal kabartının kaudal kısmından gelişir. Bu kabartının rostral kısmı dilin orta 1/3'lük kısmı olan faringeal kısmı oluşturur.

Laringeal kaslar faringeal yayların 4. ve 6. çiftlerindeki miyoblastlardan geliştiği için, bu yayları destekleyen nervus vagusun laringeal dalları ile inerve olurlar. Larinks ve epiglottisin büyümesi doğumdan sonraki ilk üç yılda hızlıdır. Bu zaman içinde epiglottis yetişkin şeklini kazanır (18).

2.1.3. Larinks Histolojisi

Yenidoğanda yapılan çalışmalara göre vokal kord dışındaki alanlarda larinks başlangıçta silialı epitelle, altıncı ayda yalancı vokal kord skuamöz epitelle döşelidir. Dil ve epiglotun anterioru da stratifiye skuamöz epitelle örtülüdür.

Normal larinksin epiteli stratifiye skuamöz epitel ile respiratuar tip silli epitelyum arasında değişir:

Larinks:

Supraglottik alan.....Respiratuar tip

GlottisStratifiye skuamöz

İnfraglottik alan.....Respiratuar tip

Epiglot:

Epiglotun lingual (ön) yüzü.....Stratifiye skuamöz epitel

Epiglotun larengeal (arka) yüzü.....Stratifiye skuamöz epitelden
respiratuar tipe doğru değişir.

İki tip epitel arasındaki geçiş ya keskin olur veya 1-2 mm'lik bir transizyonel zon içerir.

Sigara içmeyen erişkinlerin yarısında supra ve infraglottik bölgelerde, silyalı respiratuar tip epitelin içinde skuamöz epitel yamaları vardır. Sigara içenlerde larenksin respiratuar epiteli tamamen skuamöz epitelle yer değiştirebilir.

Larinksin çoğu alanında serömüsinöz glandlar bulunur. Bu glandlarda 8 yaşından sonra onkositik metaplazi başlar.

Gerçek vokal kordların L. propria'sına 'Reinke alanı' adı verilir. Bu alan stratifiye skuamöz epitel ile vokal ligamanlar arasında kalır ve lenfatik içermediği için ödem ve poliplerin en sık geliştiği bölgedir (16,18).

2.1.4. Larinks Fizyolojisi

Larinksin çok önemli fonksiyonları vardır. Bu nedenle larinks cerrahisi esnasında tümörün tamamen çıkarılmasının yanısıra organın fonksiyonlarının korunması ya da en azından postoperatif dönemde rehabilitasyon şansı verecek bir cerrahi operasyonun planlanması hastanın yaşam kalitesini arttırmak için son derece önemlidir (19). Larinksin görevleri:

A. Sfinkter fonksiyonu: Yutma esnasında larinksin kapatılarak akciğerlerin sıvı ve katı gıdaların girişinden korunması larinks fizyolojisinin en önemli kısmıdır. Larinksin kapanması üç basamakta gerçekleşmekte olup bu basamaklar; rima glottisin kapanması, larinks vestibülünün kapanması ve epiglotun larinks lümenine doğru eğilmesidir. Erişkinde epiglot düz, kalkan gibi olup bu sayede yutulan gıda yanlardan

piriform sinüslere geçer ve böylece yiyeceklerin larinks girişinden uzaklaştırılmasına yardım eder. Ancak epiglotun cerrahi olarak çıkarılması bu organın larinksin korunmasında hayati rolü olmadığını göstermiştir. Larinksi döşeyen titretilmiş tüylü epitel, üzerinde bulunan yabancı parçacıkları mukusla beraber ağza doğru süpürür.

Larinksin sfinkterik fonksiyonu üç kas katının koruyucu adduksiyonu sonucunda oluşur. Bunlar yukarıdan aşağıya doğru; epiglot, ariepiglot plikalar, ventriküler bandlar ve vokal kordlardır. Larinksin sfinkter görevinin başlayabilmesi için iki taraflı olarak superior laringeal sinirin uyarılması gerekir. Glottik refleksin uzamasıyla oluşan laringospazm sonucu ölüm görülebilir.

B. Solunum fonksiyonu: Beyinde solunum merkezi medulla oblongatadadır. İnspirasyonun başlaması için n. laringeus inferiorun uyarılmasıyla glottis açılmaya başlar. Glottisin açılması m.krikoaritenoid posterior tarafından sağlanır. Sonrasında frenik sinirin uyarılmasıyla diyafragma aşağı iner ve inspirasyon oluşur.

C. Fonasyon fonksiyonu ve konuşmadaki rolü: Larinksin en ileri ve en karmaşık fonksiyonudur. Konuşma fonksiyonu jeneratör sistem, vibratör sistem ve rezonatör sistemin kombine şekilde çalışmasıyla oluşur.

D. Yutmaya yardımcı rolü: Yutma esnasında kasların sfinkter etkisiyle larinks girişi kapanır, epiglotun yanlarından lokmanın özofagusa kayması sağlanır. Ayrıca yutma esnasında larinksin yükselmesi lokmanın özofagusa girişine yardımcı olur. Larinks girişinin dil kökü altında kalmasıyla lokma özofagusa gider. Öksürme, doğum ıkınması, miksiyon, kusma ve defekasyon gibi durumlarda rima glottisin kapanmasıyla toraks içine hava hapsedilir. İstemli yapılan bu kapatma işlemiyle mekanik bir yardım sağlanmış olur (20).

2.2. Larinksin Tümörleri ve Tümör Benzeri Lezyonları

2.2.1. Papillom ve Papillomatozis

Erişkinlerde (adult tip) ve çocuklarda (juvenil tip) görülen soliter veya multipl olabilen, papiller yapıda iyi huylu tümörlerdir. Genellikle gerçek vokal kordu tutar. Ancak epiglottise, yabancı vokal korda, supraglottik ve subglottik bölgeye, çok nadir olarak da trakea ve bronşlara yayılabilir (21). Hava yollarında tıkanıklık ve ölüme yol

açabilir. Yapılan çalışmalarda laringeal papillomatozisin viral etyolojisi olduğu gösterilmiştir. İmmünohistokimyasal çalışmalar ve in situ hibridizasyon ile de HPV antijeni tespit edilmiştir. Hastalarda aktif hastalık varken; lezyonu içermeyen bölgelerde ve remisyondaki hastalarda da HPV'ye ait DNA bulunmuştur (20). Laringeal papilloma eşlik eden HPV tipleri çoğunlukla düşük riskli HPV tipleri olan HPV 11 ve HPV 6'dır. Nadiren HPV 16, 18, 31, 33, 35 ve 39 ile de papillom oluşabilir. Bu lezyonlardaki epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin yüksek düzeylerde saptanması HPV tiplerinin artmış proliferatif aktiviteden sorumlu olabileceklerini düşündürmektedir (20,22). Papillomlarda skuamöz mukozada fibrovasküler koru olan parmak benzeri papiller ya da akantotik büyüme paterninden oluşan mikroskopik görünüm vardır (23). Mitotik aktivite, nükleer atipi ve değişik derecelerde koilositoz görülür (20,22,24). Bu tümörlerde ilerleyen yıllarda tekrarlama oranı yüksektir (1). Rekürrensler nadiren trakeostomi ağzı ve yumuşak dokuya da yayılabilir, hatta karotid arterin etrafını sarabilir. Bu süreç "invazif papillomatozis" olarak adlandırılır (20,22,24,25). Laringeal papillomatozisi olan olgularda özellikle de yüksek riskli HPV varlığında malign transformasyon gelişebilir ve ilginç olarak bu olgular daha önceden papillom nedeniyle radyoterapi alan vakalardır (21). Yapılan bir çalışmada laringeal papillomatozisli olgularda malign dönüşüm oranı % 3-7 olarak bildirilmiştir (26). Juvenil başlangıçlı respiratuar papillomatozisli vakalarda daha sonra pulmoner skuamöz hücreli karsinom geliyorsa bu vakalarda tümörün HPV 11 ile birlikteliği gösterilmiştir (21,20,24).

2.2.2. İntraepitelyal Proliferatif Lezyonlar

2.2.2.1. Keratozis: "Lökooplaki, basit hiperplazi, skuamöz hiperplazi, epitelyal hiperplazi" olarak da adlandırılır. En fazla gerçek kordları ve interaritenoid bölgeyi tutar. Şarkıcılarda, sesini kötü kullananlarda ve sigara içenlerde daha sıklıkla görülür. Ses kısıklığı şikayetiyle gelen hastaların laringoskopik muayenelerinde keratotik alanlarda beyaz renkte kalınlaşma görülür. Şayet kızarıklık da görülüyorsa bu durum klinisyeni, önemli bir lezyonun olabileceği (karsinoma insitu ya da displazi gibi) konusunda uyarmalıdır. Mikroskopik olarak lezyonlar atipi olmaksızın hiperkeratotik epitel ve akantozla karakterizedir (20).

2.2.2.2. Displazi/karsinoma in situ (CIS): Değişik derecelerde hücresel atipi, stratifikasyon kaybı ve normal epitelde matürasyon kaybıyla karakterizedir. Hafif, orta

veya şiddetli olarak displazi derecelendirilir. Derecelendirme yapılırken nükleer özellikler ile birlikte matürasyon ve stratifikasyonun kaybolduğu epitel seviyesi dikkate alınır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün tanımladığı derecelendirme sistemi aşağıdaki gibidir:

A. Hafif Displazi: Nükleer anomaliler hafiftir ve epitelin bazal 1/3 tabakasına sınırlıdır. Daha üst tabakalarda hücreler matürasyon ve stratifikasyon gösterir ve nükleer anomaliler minimal düzeydedir. Parabazal tabakada az sayıda mitoz olabilir fakat atipik mitoz yoktur. Keratoz ve kronik iltihap genellikle eşlik eder.

B. Orta Derecede Displazi: Nükleer anomaliler hafif displazidekinden daha fazladır. Nükleoller belirginleşme eğilimindedir. Bu değişiklikler epitel tabakasının alt 2/3 bölümündedir. Orta derecedeki nükleer anomaliler yüzeye kadar çıkabilir. Fakat epitel tabakasının üst kısmında hücreler matürasyon ve stratifikasyon korunmuştur. Parabazal ve intermedier tabakalarda mitoz görülebilir ancak atipik mitoz görülmez. Lezyonla birlikte keratozis de görülebilir.

C. Şiddetli Displazi: Epitel tabakasının 2/3'ünden fazlasında nükleer anomaliler ve matürasyon kaybı görülür. Pleomorfizm ve nükleer hiperkromazi belirgindir. Arada bizar nükleuslu hücreler de görülebilir. Nükleoller belirginleşme eğiliminde olup mitoz görülür. Atipik mitoz izlenebilir. Hücreler in situ karsinomda olduğu kadar kalabalık olmayıp bir miktar matürasyon ve stratifikasyon varlığıyla karsinoma in situ'dan ayrılır. Lezyona sıklıkla keratozis eşlik eder.

D. Karsinoma in situ: Skuamöz epitelin tam kat tutulduğu lezyonlardır. Stromaya invazyon görülmez. DSÖ'nün yeni sınıflamasında şiddetli displazi ile CIS farklı kategorilerde ele alınmıştır. Diğer birçok sınıflamada birbirinden ayırım oldukça zor olduğundan bu iki durum aynı gruba alınmıştır.

Kullanılmakta olan bir başka sınıflandırma sistemi de Ljubljana Klasifikasyonu'dur. Bu klasifikasyonda 4 ayrı kategori vardır:

A. Basit Hiperplazi,

B. Bazal-parabazal hücre hiperplazisi,

C. Atipik hiperplazi ("risky" tehlikeli hiperplazi),

D. Karsinoma in situ.

Bu sınıflandırmaya göre ilk iki kategori benign, üçüncü kategori potansiyel malign ve dördüncü kategori gerçek malign olarak kabul edilmiştir. Ancak bu sınıflamanın DSÖ klasifikasyonu ile arasındaki önemli bir fark; karsinoma in situ ile daha hafif lezyonlar arasındaki ayırımı yüzeydeki keratin tabakasının varlığının söz konusu olmamasıdır. Ljubljana klasifikasyonu, DSÖ sistemine kolayca dönüştürülecek özellikte değildir.

Displazi ve CIS'in derecesi ile anöploidi arasında ve yine displazi ve CIS'in derecesi ile Epidermal Büyüme Faktör reseptörü, hücre proliferasyon belirleyicileri (Ki-67) ve p53 ekspresyonu arasında pozitif bir ilişki mevcuttur. Displazili hastalarda invaziv SHK gelişme riski yüksek değildir (22).

2.2.3. İnvaziv Karsinom

2.2.3.1. Genel Özellikler

Larinks kanseri insandaki tüm malign tümörlerin % 2-3'ünü oluşturur. Laringeal karsinomlar baş-boyun bölgesinde en sık görülen malign davranışlı tümörler olup yaklaşık olarak % 25 oranında görülürler (1). Larinks kanserlerinin % 95'den fazlası SHK'lardır (2). Sigara, alkol ve HPV enfeksiyonu en önemli risk faktörleridir (3). Genellikle 5. dekad veya daha sonrasında görülür ancak genç hastalarda da bildirilen vakalar vardır. Erkekler hastaların % 96'sını oluşturur. Ses kısıklığı glottik bölgeyi tutan tümörlerde en önemli belirtidir. Laringeal karsinomu olan hastalarda ikinci bir tümör (üst gastrointestinal sistem ve akciğer başta olmak üzere) gelişme riskinin arttığı gösterilmiştir (22). SHK varyantları:

A. Klasik tip yassı epitel hücreli karsinom: Skuamöz diferansiasyon gösteren keratin oluşumu ve/veya interselüler köprülerin varlığıyla karakterize, malign davranışlı epitelyal tümördür. İyi, orta, ve kötü diferansiye olmak üzere üç grup olarak derecelendirilir. Derecelendirmede mitotik aktivite ve hücresel pleomorfizm esas alınır. Çoğunluğu glottik ve supraglottik yerleşimli tümörler olup, iyi ve orta derecede diferansiyedirler. Subglottik bölgedeki karsinomlarsa genellikle orta ve kötü diferansiyedir. Genel olarak tümör boyutu küçük ise diferansiasyon daha iyi olmaktadır.

B. Mikroinvaziv yassı epitel hücreli karsinom: Bazal membranın hemen altında dağılmış hücrelerden ya da küçük tümör adacıklarından oluşur (22).

C. Papiller tip yassı epitel hücreli karsinom: Fokal invazyon odağı içeren, egzofitik büyüme paterni sergileyen, yassı epitel hücreli karsinom varyantıdır. Sitolojik atipisi ile verrüköz karsinomdan ayrılır. Klasik epidermoid karsinom vakalarına göre daha fazla HPV ile birlikteliği söz konusudur. Prognozu iyidir (22).

D. Verrüköz karsinom: Yassı epitel hücreli karsinomun sık olmayan, polipoid görünümlü ve oldukça iyi diferansiye bir varyantıdır. Yaygın lokal invazyon olmasına rağmen, pratikte hemen hemen hiç metastaz yapmaz. Mitoz nadirdir. Tümörde ve tümöre komşu alanlarda HPV varlığı gösterilmiştir. Verrüköz karsinom verrüköz hiperplaziden ayırt edilmelidir. Ancak bu; küçük biyopsilerde mümkün değildir. Ayırıcı tanıda esas olan invazyon varlığı olduğundan rezeke edilen materyalin tümünün incelenmesi gerekir (22).

2.2.3.2. Larinksin Diğer Tümörleri

A. Küçük hücreli (nöroendokrin) karsinom: Bütün vakaların % 0,5'inden daha azını oluşturur. Sigara içen kişilerde 6. ve 7. dekatta görülür. Mikroskopik görüntü akciğer yerleşimli olanlarla eşdeğer olup küçük, yuvarlak, oval veya iğsi hücrelerden oluşur. Nekroz, mitoz ve lenfovasküler invazyon sıktır. İçerdikleri bir miktar sekretuar granül, nöral ve nöroendokrin belirleyicilerle immünreaktif boyanır. Bölgesel ve uzak metastaz çok sık olup agresif seyirlidir. Atipik karsinoid/Büyük hücreli nöroendokrin karsinomdan ayırıcı tanısı mutlaka yapılmalıdır (22).

B. Bazaloid karsinom: Oldukça malign bir laringeal tümördür. Aşırı sigara içenlerde daha sık görülür. Dar sitoplazmalı, hiperkromatik nükleuslu, periferik palizatlanma içeren, hiyalinize stromalı hücrelerden oluşur. Nekroz yaygındır. Bez yapısı benzeri yapılanmalar ve mukoid materyal içeren küçük kistik boşluklar görülebilir. Adenoid kistik karsinomun solid varyantından ayırımı zordur (22).

C. Lenfoepitelyoma-benzeri karsinom: Andiferansiye karsinom benzeri alanlar ve arada reaktif lenfoplazmositik hücrelerden oluşur. Sıklıkla servikal lenf nodu

metastazı da eşlik eder. Epstein barr virüs (EBV) ile ilişkisi bulunamamıştır. Agresif seyirlidir (22).

D. Adenokarsinom: Adenokarsinomlar larinkste çok nadir görülür. Çoğunlukla supraglottik veya infraglottik bölgede yerleşir. Bazıları müsinöz tiptir (22).

E. Sarkomatoid karsinom (iğsi hücreli karsinom, karsinosarkom): Gastrointestinal sistem ve üst solunum yoluna yüksek derecede ilgi gösteren bir tümördür. Polipoid yapılanma gösterir ve bu yüzden laringeal polibe benzerler. Çoğu supraglottik bölge yerleşimlidir. Mikroskopik olarak iki komponenti vardır. Yassı hücreli karsinom komponenti çoğu zaman siliktir, belirgin olduğu durumlarda ise in situ karsinom odakları tarzında saptanır. Tümörün büyük bir kısmını iğsi hücrelerden oluşan pleomorfik sarkom komponenti oluşturur. Sarkomatoid komponentin görünümü granülasyon dokusu gibi selim görünümde olabileceği gibi, osteosarkom ya da malign fibröz histiositomda görülen oldukça atipik bizar hücrelerden de oluşabilir (22).

F. Larinksin tükrük bezi tümörleri: Adenoid kistik karsinom en sık görülen tipidir. Yavaş büyürler fakat ölümcüldürler. Hızlı ilerleyen bazaloid yassı epitel hücreli karsinomdan ayırıcı tanısı yapılmalıdır. Bu kategorideki diğer neoplaziler, pleomorfik adenom, mukoeypidermoid karsinom, myoepitelyoma ve asinik hücreli karsinomdur (22).

G. Karsinoid tümör: Morfolojik, IHK'sal ve ultrastrüktürel olarak bronşial yerleşimli karsinoidlere benzerler. Genellikle iyi prognozludurlar. En fazla supraglottik bölge özellikle de aritenoid kıkırdak ve ariepiglottik folda yerleşirler. Larinks, büyük hücreli nöroendokrin karsinom ve atipik karsinoid tümör (orta derecede diferansiye nöroendokrin karsinom) için daha sık görülen bir lokalizasyondur. Bu tümörlerin her ikisi de tümör pleomorfizm, mitotik aktivite ve nekrozla karakterizedir.

Ultrastrüktürel çalışmalarda nörosekretuar granüllerin varlığı, argirofili, ve Kromogranin ile immünreaktif boyanma bu tümörlerde kuraldır. İleri yaştaki erkeklerde ve özellikle de aşırı sigara içicilerde daha sıklıkla görülür. Uzak metastaz ve lenf nodu metastazı yapması nedeniyle agresif seyirlidirler (22).

H. Paraganglioma: Supraglottik bölgede genelde lokalize olup aynı taraflı ariepiglottik folda yayılım gösterir. Çoğunluğu non-fonksiyoneldir. Daha çok nestlerin

periferinde yerleşen ve tanısal açıdan önemli olan sustentaküler hücreler S100 proteini ve Glial fibriler asidik protein (GFAP) ile immünreaktivite gösterirler (22).

I. Larinksin Az Görülen Tümörleri

Rabdomyosarkom, rabdomyom, hemanjiyom, anjiyosarkom, malign melanom, granüler hücreli tümör, lenfoid tümörler, myofibromatozis, leiomyom, kıkırdak tümörleri, osteosarkom, liposarkom, malign fibröz histiyositomdur (22).

2.2.3.3. Larinks tümörlerinin lokalizasyonlarına göre tipi, yayılımı ve tedavisi

Larinks tümörleri lokalizasyonlarına göre 4 gruba ayrılır:

A. Glottik: Glottik bölge vokal kordlar, ön ve arka kommissurdan oluşur. Bütün vakaların % 60-65'i bu bölgede görülür. En sık olarak da glottisin ön 1/3'ünü tutar. Lenfatik damarların azlığı ve etrafını çevreleyen kıkırdak duvar nedeniyle bu bölgedeki tümörler uzun süre lokalize kalırlar. Zaman içerisinde; süperiordan supraglottik bölgeye, inferiordan subglottik alana, anteriordan tiroid kıkırdağa, posteriordan aritenoid, ön komissürden karşı korda penetrasyon gerçekleşebilir. Erken lezyonlarda radyasyon tedavisiyle oldukça başarılı sonuçlar alınır. Cerrahi tedavi radyasyon tedavisinin başarılı olmadığı durumlarda uygulanır. Profilaktik lenf nodu diseksiyonu yapılması gerekmez. Endoskopik olarak kordektomi ile gerçek kordun yüzeysel invaziv yassı epitel hücreli karsinomları tedavi edilebilir. İleri evrelerdeki olgularda tedavi larenjektomidir (22).

B. Supraglottik: Supraglottik bölge epiglot, ariepiglottik fold, preepiglottik boşluk, ventriküler bandlar, aritenoid bölge, suprahoid ve infrahyoid bölgeden oluşur. Tüm vakaların % 30-35'ini oluştururlar. Preepiglottik mesafeye yayılma eğilimi belirgindir. Orofarinks kalın hyoepiglottik ligament tarafından korunur. Bu tümörlerin sadece % 1'i glottis invazyonu yapar. Nadir olarak kıkırdak invazyonu görülür. Supraglottik bölge lenfatik ağdan zengin olduğundan lenf nodu metastazları fazladır. Vakaların ortalama %40'ı lenf nodu metastazı yapar. Larenjektomi ve radyasyon tedavisi uygulanır (22).

C. Subglottik: Tüm vakaların % 5'inden azı bu bölgeyi tutar. Üst sınır gerçek vokal kordların serbest kenarının 0,5 cm aşağısından başlar. Bu kısım da lenfatiklerden zengin olup krikoid kıkırdağa lateral yayılım kuralıdır. Sık olarak zayıf intertirokrikoid membranın tümörle destrüksiyonu, prelaringeal duvarın tümör tarafından invazyonu ve tiroid glandın invazyonu sıklıkla görülür. Trakeaya yayılım sık olduğundan, mümkün olduğunca distalden rezeksiyon yapılmalıdır. Paratrakeal lenf nodu metastazı %50, servikal lenf nodu metastazı % 15-20 oranında görülür. Bu sebeple radikal lenf nodu diseksiyonu yapılmalıdır (22).

D. Transglottik: Bütün vakaların % 5'inden daha azını oluşturur. Laringeal ventrikülü dikey olarak tutan tümörlerdir. Lenf nodu metastazının (% 52) en yüksek olduğu gruptur. Diğer bölgelere nazaran daha agresif seyirlidir. Total larenjektominin yanı sıra elektif lenf nodu diseksiyonu da yapılmalıdır (22).

2.2.3.4. Larinks Tümörlerinde Evreleme

American Joint Committee on Cancer (AJCC)'in 2002 yılında modifiye etmiş olduğu tümörün yerleşimini, uzanımını ve metastaz yaptığı alanları tam tarif edebilmek için anatomik yayılımı baz alan, kanserin klinik ve biyolojik özelliklerini içermeyen evreleme kullanılmaktadır (23).

Primer tümör (T)

Tx: Tümör değerlendirilemedi

T0: Primer tümör yok (klinik, radyolojik ve patolojik tetkikler yapılmış ve tümör bulunamamış)

Tis: Karsinoma in situ

Supraglottik tümör

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

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

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

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

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

Glottik tümör

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

T1a: Tümör tek bir vokal korddadır.

T1b: Her iki vokal korda da tümör mevcuttur.

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

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

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

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

Subglottik tümör

T1: Tümör subglottise sınırlıdır.

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

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

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

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

Bölgesel lenf nodları (N)

Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilememektedir.

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yoktur.

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

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

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

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

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

Uzak metastazlar (M)

Mx: Uzak metastazlar değerlendirilememektedir.

M0: Uzak metastaz yoktur.

M1: Uzak metastaz vardır.

Evreleme

Evre 0: Tis N0 M0

Evre 1: T1 N0 M0

Evre 2: T2 N0 M0

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

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

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

Evre 4c: Herhangi T / Herhangi N M1

Larinks karsinomlarında 5 yıllık ortalama yaşam oranı; supraglottik tümörlerde %65-75, glottik tümörlerde %80-85, transglottik tümörlerde %50 ve subglottik tümörlerde %40'tır (23).

2.3. Human Papillomavirüs

HPV mukozalarda (ağız içi ve vajina mukozası gibi) ve rahim ağzında enfeksiyon yapıp kondilom adı verilen siğil şeklinde kitlelerin oluşumuna yol açan bir virüstür. Vücuda girdikten sonra hücreler içine yerleşip kişinin vücudunun zayıf düştüğü zamanlarda (stres, uykusuzluk, beslenme bozukluğu gibi) enfeksiyonun üzerinden yıllar geçmiş olsa bile alevlenerek rahim ağzı kanserinin gelişiminde ana etken olarak rol oynar. HPV; gerek erkeklerde gerekse kadınlarda, cinsel temas yoluyla bulaşan en yaygın hastalıklardan biridir. Bu nedenle HPV enfeksiyonunun erken teşhis edilmesi çok önemlidir. HPV oldukça bulaşıcı bir virüs olup cinsel yolla bulaşır. Özellikle de çok sayıda cinsel partneri olan kişilerde yaygın olarak görülür. Virüs, oral ve anal cinsel ilişki ile de yayıldığından toplumdaki cinsel yönden aktif pek çok kişiye bulaşabilir.

HPV'nin saptanmasında kullanılan yöntemler:

1- Smear testi

2- Hibrid capture HPV DNA testi (pap-smear testi gibi ucu pamuklu bir çubuk ile rahim ağzından sürüntü alınır ve laboratuvarında bir DNA testi ile servikal hücrelerde ve dokularda HPV DNA'sını yakalamaktadır. Bu HPV testi görülebilir hücre değişiklikleri olmadan bile HPV'nin varlığını gösterebilir ve mevcut HPV tipini düşük risk veya yüksek risk olarak tanımlayabilir).

3- Kolposkopik muayene

Tedavide virüs yok edilemez, sadece oluşturduğu lezyonlar tedavi edilebilir. Son dönemde HPV aşılı da uygulanmaktadır (24).

2.3.1. Human Papillomavirüsün Karsinogenezdeki Rolü

Son yıllarda yapılan araştırmalarla birlikte 200'e yakın HPV tipi saptanmıştır (24). Serviks kanserinin etyolojisinde % 100'e yakın oranlarda HPV enfeksiyonu suçlanmaktadır (25-28). Orofaringeal kanserlerinse % 20'sinde HPV saptanmıştır. Son

dönemde yapılan çalışmalarda, derinin SHK'larında da HPV'nin rol oynamasının mümkün olabileceği vurgulanmıştır (25).

HPV; papova virüs ailesinden küçük, zarfsız, ikozahedral DNA virüsüdür. Skuamöz epitel hücrelerinin nükleusunda çoğalır ve çift zincirli DNA'ya sahiptir (29). HPV genomu 6.500-8.000 baz çiftinden oluşmakta olup sekiz adet açık okuma çerçevesi (open reading frame) içermektedir. Bunlar E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1, L2'dir. E grubu erken (early), L grubu ise geç (late) fonksiyonlardan sorumludurlar (30,31).

2.3.1.1. Erken Proteinler: Yapısal olmayıp, içlerinde transkripsiyon düzenleyicilerinin de bulunduğu proteinlerdir. Hücrel transformasyon, DNA replikasyonu ve transkripsiyonu düzenlerler. Görevleri;

E 1: Genom replikasyonu

E 2: Viral transkripsiyon

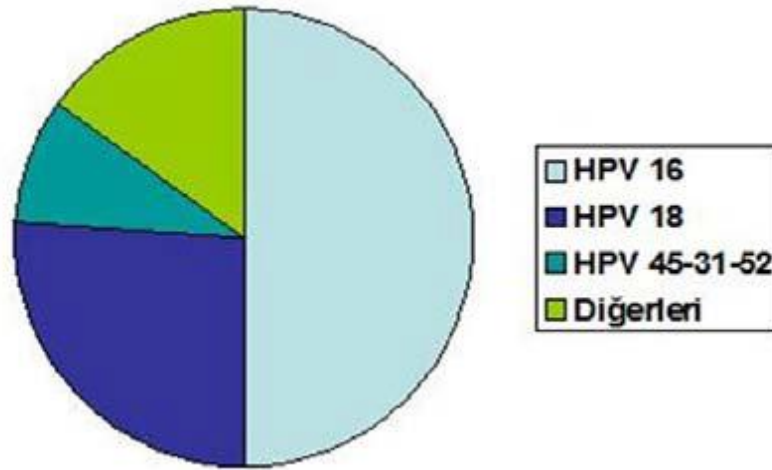
E 4: Virüs salınımı

E 5: Epidermal büyüme faktörü reseptör aktivasyonu

E 6 ve E 7: E6 proteini p53'ü, E7 ise Rb genini inaktive etmek suretiyle malign transformasyona sebep olur. Bu nedenle HPV aşılı HPV 16 ve 18'in onkojenik potansiyelden sorumlu olan E 6 ve E 7 proteinlerine karşı geliştirilmiştir.

2.3.1.2. Geç Proteinler: Majör kapsid proteini (L1) ve minör kapsid proteini (L2) olup, 72 kapsomerden oluşan virüsün ikozahedral kapsidini oluştururlar (30,31).

HPV'nin, farklı genotipe sahip çok sayıda alt tipi vardır. Bütün tanımlanan tipler epiteliotropik olup deri, orofaringeal ve anogenital epitel hücrelerini enfekte ederler. Nedeni henüz bilinmemekte birlikte; şimdiye kadar gastrik, ileojejunal ve kolonal mukozada HPV saptanmamıştır (25). HPV'nin en sık maligniteden sorumlu alt tipleri HPV16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, 58 ve 69'dur (Şekil 1) (26).

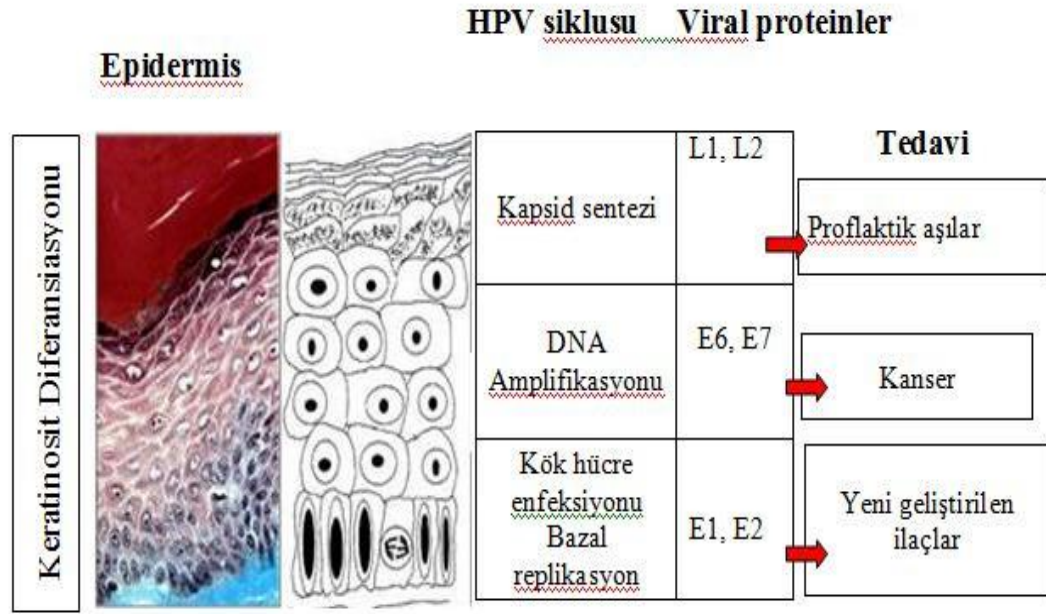


Şekil 1: Serviks kanserlerinde HPV tiplerinin görülme sıklığı (26)

Bu tipler “yüksek riskli” HPV tipleridir. Servikal ve anogenital kanserlerin gelişiminde rol oynarlar. HPV 6 ve 11 ise “düşük riskli” tipler olup, malign lezyonlarda nadiren saptanırlar. Çoğunlukla genital siğillerde ve laringeal papillomlarda saptanırlar (1,2,3). Son yıllarda yapılan çalışmalarla HPV’nin indüklediği ölümsüz hücrelerin oluşması (immortalization) ve karsinogenezin moleküler mekanizmasıyla ilgili yeni verilere ulaşılmıştır (25,27,28,32). Kanser gelişimi sürecinde viral DNA konak hücre DNA’sına entegre olur. E2 açık okuma çerçevesinden başlayarak viral halka açılır. E6 ve E7 onkoproteinleri p53 ve Rb tümör supresör proteinleri inaktive edip HPV 16 ve 18 gibi yüksek riskli genotip varlığında malignitenin ortaya çıkmasına neden olurlar. HPV enfeksiyonu için epidermal veya mukozal epitelyal hücrelerin prolifer olma yeteneğinin olması yani bazal tabakasının bulunması gerekir. İlk önce HPV’nin “erken” viral genleri eksprese edilir (E5, E6, E7 gibi).

Suprabazal tabakaya girişten sonra “geç” viral gen ekspresyonu başlar. Sirküler viral genom çoğalır ve yapısal proteinler oluşmaya başlar. Komplet viral partiküller epidermis veya mukozanın üst tabakalarında toplanır ve açığa çıkar (28,29,34). Enfeksiyonun oluşabilmesi için bazal tabakadaki hücrelerinin uygunluğu yani deri veya mukozada mikrolezyonlar olması gereklidir. Enfekte olan hücreler bölünür ve popülasyon lateral olarak yayılır. Yavru hücrelerin bir kısmıya diferansiye olan suprabazal tabakaya göç ederler. Burada viral genler aktive olur. Viral DNA replikasyonu ve kapsid proteinlerin oluşumu sonrasında ise viral partiküller oluşur. Bu partiküller yüzeyden salınır ve başka dokuları enfekte ederler. Yüksek riskli HPV

tipleri; transforme edici ve büyüme stimüle edici özelliklere sahip en az üç protein kodlarlar: E5, E6, E7 (25,34). (Şekil 2) (33).



Şekil 2: HPV'nin etki mekanizması (33)

2.3.1.3. E5 Protein: Endoplazmik retikulum ve golgi aparatında bulunan hidrofobik bir proteindir (35). Enfeksiyonun erken döneminde eksprese olur. Epitel hücre proliferasyonu ve apoptozisin önlenmesinde rol oynar (30,31). HPV ile enfekte lezyon servikal kansere ilerlerken epizomal viral DNA sıklıkla konak hücrenin DNA'sına integre olur, bu sırada E5 ve bazı genler kaybolur. Bu nedenle HPV aracılı karsinogenezin geç safhalarında ve malign fenotipin kazanılmasında E5 proteininin rolü olmadığı söylenebilir.

2.3.1.4. E6 Protein: E6 ve E7 proteinleri birçok hücrede ölümsüzlüğe sebep olarak malignite gelişimine zemin hazırlamaktadır. E6 proteini p53 genine yüksek derecede afinite gösterir ve E6 ilişkili proteine bağlanıp p53 yıkımını sağlar. p53 geninin inaktive olmasıyla siklin B tekrar düzenlenir. Siklin B, siklin bağımlı kinaz (CDK)1'e bağlanarak "mitoz ilerletici faktör" ü oluşturur. High grade skuamöz intraepitelyal lezyon (HSIL) ve invaziv kanserlerde Siklin B ve CDK1'in düzeyinde artış saptanmıştır. E6 proteini ayrıca yabancı DNA'nın konak hücreye girişine de yardımcı olur (25,27,29,34).

2.3.1.5. E7 Protein: E7 proteininin en önemli görevi Rb genini fosforile ederek yıkımına sebep olmaktır. Bunun sonucunda E2F ailesine ait transkripsiyon faktörleri açığa çıkar ve hücre siklusu aktivasyonu sağlanır. Yüksek riskli HPV tiplerinin E6 ve E7 proteinleri maligniteye zemin hazırlayabiliyorken, düşük riskli tiplerin E6 ve E7 proteinleri ile malign değişim izlenmez. HPV'nin diğer "erken" proteinlerinin (E1, E2, E4) malign değişime katkısı gösterilememiştir (30,31).

2.4. P53 Geni

İlk defa 1979 yılında Lane ve Crawford, bunların hemen arkasından da Linzer ve Levine tarafından p53 geni tanımlanmıştır. David Lane immunhistokimyasal yöntemlerle insan tümörlerinde p53 genini göstermiştir (36-39). p53 proteini 53 kilodalton (k-Da) ağırlığında, DNA tamiri, hücre siklus kontrolü, hücre diferansiyasyonu ve apoptozda görevli nükleer fosfoproteindir (10). Genomda mutasyonların oluşmasını engelleyerek genom stabilitesini koruyan bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. Bu sebeple p53'e "genomun gardiyanı" da denir. P53 geni 17. kromozomun kısa kolu üzerinde 17p13-1 pozisyonunda bulunan bir tümör süpresör gendir, 16-20 kb uzunluğunda olan bu gen 11 eksondan oluşmaktadır. 2. ve 11. eksonlarda bulunan DNA kısmı 8-10 kb uzunluğundadır ve kodlama yapamaz (32,33). P53 geninin iki tipi vardır: **Wild tip** normal fonksiyonel olan tiptir. Ömrü 6-20 dakika kadar olup kısa ömürlüdür (4,5,40). Dokularda saptanması da zordur (38,41,42,43). Diğer tip **mutant tip** olup ömrü 3-6 saat civarındadır. İmmunhistokimyasal olarak dokularda kolayca gösterilebilir. P53 genindeki mutasyonlar insan tümörlerindeki en sık rastlanan genetik değişikliklerdir (4,5,6,7). İnsanlarda görülen tümörlerin % 50'sinden daha fazlasında p53 geninde mutasyon gösterilmiştir. İlk tanımlandığı yıllarda bir onkogen olarak görev yaptığı düşünülen p53 geninin daha sonraları sadece mutant formunun anormal hücre büyümesinde rol oynadığı, normal p53 geninin ise tümör oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir. Akciğer, mesane, endometrium, kolon, meme gibi birçok organın epitelyal tümörleri yanı sıra lenfoid, mezenkimal ve nöronal kökenli çeşitli tümörlerde p53 geninin homozigot kaybı gösterilmiştir (4,6,40,43). İlk defa Vogelstein, kolorektal kanserlerde 17. kromozomdaki p53 geninin mutasyona uğradığını göstermiştir (44,45). Çeşitli mutasyonlar sonucu normal hücrelerden salınan p53 geninin iki allelinden biri kaybolmaktadır (43-45). p53 gen kaybı nokta mutasyon,

rearranjman, delesyon, insersio ile olabilmektedir. p53 geninde en sık görülen mutasyon şekli nokta mutasyondur (45). Gen mutasyonları DNA'ya spesifik bağlanma bölgeleri olan 100-300. aminoasit bölgeleri arasında özellikle oluşur (45). P53 genini diğer tümör baskılayıcı genlerden ayıran en önemli özellik, tek bir allelin inaktivasyonunun tümör baskılayıcı fonksiyonunun kaybı için yeterli olmasıdır. Bunun nedeni bazı mutant p53 proteinlerinin hücresel heat shock protein “hsc 70” ile bağlanması, normal p53 proteininde bunlara bağlanıp uzun yarı ömürlü ve fonksiyon göremeyen kompleksler oluşturmasıdır. Sonuçta mutant p53 proteini, normal p53 proteinini de inaktive etmiş olur ve bir mutant ve bir normal allel taşıyan hücre hiç fonksiyonel p53 proteini yokmuş gibi davranır. Bu şekildeki mutasyonlara “dominant negatif” mutasyon denir. Çünkü mutant allel dominant olarak davranıp normal allelin fonksiyonunu engeller (4,38,39,45). Nokta mutasyon sonucunda konfirmasyon değişikliğine uğrayan p53 proteininin yarı ömrü 3-6 saate kadar uzar ve bu sebeple normal p53'den farklı olarak IHK'sal olarak saptanır (37,38). Normal koşullarda p53 proteini hücrede bazal seviyede ve inaktif haldedir. Fizyolojik şartlar altındaki yaşam süresi 20 dakika gibi oldukça kısadır ve sonuçta ubiquitin aracılığıyla proteolize uğrar. Hücre bölünmesine veya hücrenin hayatını sürdürmesine müdahale etmez. P53 seviyesini bazal ve sabit seviyede tutan MDM2 proteindir (4,37,40). MDM2 proteini p53'ü inaktive ederek onkogen olarak davranır. Onkogenler, ısı şoku, nitrik okside maruz kalma, hipoksi, DNA hasarı, düzensiz büyüme sinyalleri gibi çeşitli stres koşulları p53'ü aktive eder. Özellikle DNA hasarına hızla tepki veren p53 DNA'nın tamirini sağlayan mekanizmaları aktive eder. P53 miktarı stres koşullarında hızla artar ve aktifleşir. p53 miktarının artırılması hem yüksek oranda p53 messenger Ribonükleik asit (mRNA)'sından protein translasyonu yapılması ile hem de p53'ün yarı ömrünün artırılması sayesinde sağlanır. P53'ün en önemli iki temel etkisi; hücre siklusunun bloke edilerek büyümenin durdurulması ve apoptozisin başlatılmasıdır (4,38).

P53'ün ana mekanizması p16, CyclinD, CDK4 ve Rb'den oluşan ve hücre bölünmesi esnasında G1'den S fazına geçişi kontrolünü sağlayan mekanizmadır. Tüm kanserlerin %25'inde bu dört proteinden birinde mutasyon saptanmaktadır. Rb proteini görevi DNA'ya bağlanarak, hücre siklusunu devam ettirmek için gerekli olan siklin ve CDK'lerin mRNA'larının üretimini sağlamak olan E2F proteinine bağlanarak, DNA'ya bağlanmasını engeller. Dolayısı ile Rb hücre bölünmesini engelleyici bir protein olarak

görev yapar. CDK4'ün göreviyse Rb'ye bağlanarak Rb'nin E2F'ye bağlanmasını engelleyerek Rb'yi inhibe etmektir. CDK4'e etki eden üç protein vardır; bunlar p16, p21 ve siklinD'dir. p21, p53 tarafından aktive edilip CDK4'ü inhibe eden bir proteindir. p53 stres anında p21'in üretimini arttırarak hücre siklusunu durdurur. Bu duruma hücrenin G1 fazında tutuklanması adı verilir. p21 yüksek miktarda üretildiğinde PCNA adlı proteine de bağlanması yoluyla, PCNA'nın DNA'nın polimerizasyonundaki görevini inhibe eder. PCNA'nın diğer bir göreviyse DNA tamirinde aldığı roldür, fakat bu p21 tarafından inhibe edilemez. p53'ün G2 fazında da hücrenin tutuklanmasında rol oynayabileceğine dair bir takım veriler mevcuttur.

Hücre bölünmesi sırasında kromozomların yavru hücrelere eşit bir şekilde dağıtılmasından sorumlu mekanizmada aksaklık olması durumunda p53 aktive olur ve bölünme bu aşamada durdurularak eksik ya da ekstra kromozumlu hücrelerin üretilmesini engeller. Bu da p53'e "genomun gardiyanı" denilmesini destekleyen başka bir hücreyi koruma mekanizmasıdır (4,38,40,46,47). Sonuç olarak; DNA'daki hasarı p53 bilinmeyen mekanizmalarla hissedip DNA tamir genlerini aktive eder, böylece meydana gelen hasarın tamirini sağlamış olur ve siklus kaldığı aşamadan devam eder. DNA'sı zarar görmüş ve bunu tamir edemeyen hücre ise p53 tarafından apoptoza gönderilir.(4,38,43,46)

P53'ün homozigotik kaybında hasar görmüş DNA tamir edilemez ve hücre içerisindeki mutasyonlar sabitlenir. Böylece hücre malign transformasyona doğru giden, geri dönüşü olmayan yola girmiş olur.

Hipoksi ile de p53 aktive olabilir. Hipoksiye giren tümör hücrelerinin şayet normal p53 genleri varsa apoptoza giderler. Ancak p53 genleri mutasyona uğramışsa o durumda hipoksik tümör hücreleri apoptoza dirençli hale gelir.

Kalıtımsal ve somatik mutasyonların yanı sıra p53 genini inaktif hale getiren başka mekanizmalar da vardır. Rb proteini gibi, bazı DNA virüslerini transforme eden proteinler, p53'e bağlanarak p53'ün parçalanmasına sebep olabilirler. MDM2 proteini normalde p53'e bağlanarak aktivitesini azaltır. Bazı yumuşak doku sarkomalarında p53'e bağlanan MDM2 proteini gen amplifikasyonu sonucu çok miktarda üretilir ve p53'ün hızla parçalanmasına sebep olarak bir onkogen olarak davranır (36-38,46).

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyasyon tedavisi; tümör hücrelerinin DNA'sında hasar yaparak tümör hücrelerinin apoptozise gitmelerini

amaçlar. Fakat bunun gerçekleşebilmesi için o hücrelerde normal p53 geninin bulunması gerekir. Yani normal p53 geni taşıyan tümörler, mutant p53 geni taşıyan tümörlere göre radyoterapi ve kemoterapiye daha hassastır. Örneğin; çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisi ve testis teratokarsinomu normal p53 geni taşıdığından radyoterapi ve kemoterapiye cevap verirken akciğer ve kolon karsinomları sıklıkla p53 mutasyonu taşıdığından radyoterapi ve kemoterapiye dirençlidir (48-50).

p53'ün bulunuşundan bu yana yaklaşık 40 yıl geçmesine rağmen yakın zamana kadar hem yapısal hem de fonksiyonel olarak p53 türünün tek örneği olarak biliniyordu. 1997'nin sonlarına doğru p73 geninin bulunuşuyla bu durum değişmiş oldu. p73 geni 1p36'da lokalize olup p53'e birçok yönden benzeyen DNA bağlanma bölgesine sahiptir. 1p36 lokasyonunun delesyonu; kolon, meme, renal pelvis, üreter ve over tümörlerinde, nöroblastom ve hepatoselüler karsinomda bulunmuştur. p73 de p53'e benzer şekilde uygun koşullar altında hücre siklusunun durdurulması ve apoptozise sebep olabilir (48).

2.5. Ki-67

Ki-67 proteini ilk defa 1983 yılında Gerdes ve arkadaşları tarafından kobayı Hodgkin lenfoma hücreleriyle immünize etmeleri sonucunda çoğalan tüm hücrelerde izlendiği fakat dinlenme durumundaki hücrelerde izlenmediği tarif edilmiştir. Daha sonra hücre popülasyonunun büyüyen kısmını değerlendirmede kullanılan önemli bir marker olmuştur (51). Ki-67 proteinine karşı antikorların mikroyenjeksiyonu sonrasında hücre bölünmesinde azalma izlenmesi nedeniyle Ki-67'nin hücre proliferasyonunda önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır (52). Ki-67'nin santral bölgesinde izlenen 16 tekrarlayıcı elementin varlığı (Ki-67 tekrarları) yapısında bilinen tek antite olup yaklaşık 122 aminoasit kalıntısından oluşur. Ki-67 tekrarları %43-62 oranında birbirine benzer aminoasit kalıntıları paylaşırlar. Tekrarlayan elementlerin içinde ilk bulunan Ki-67 antikor tarafından tanınan epitopu (F K E L) içeren Ki-67 motif denilen bir bölge bulunur. Tekrarlanan bölgenin tümü Ki-67 geninin 13.'cü ekzonu tarafından kodlanır (52,53). Proteinin temel yapısında 10 nükleer hedefleyici dizi, protein kinaz c için 143 potansiyel fosforilasyon bölgesi, casein kinaz II için 89 bölge, cdc2 kinaz için 8 bölge, tirozin kinaz için 2 bölge mevcuttur. İki nükleer dizi ve sekiz potansiyel nükleer dizi proteinin interfazdaki hücrelerin çekirdeklerinin içindeki özel lokalizasyonunu açıklar (52,53). Ki-67 proteinin fosforilasyonu ile defosforilasyonu *in vivo* olarak hücrelerin

mitoza geçişiyle aynı zamana rastlar. Bu işlemler düzenleyici kompleks olan siklin B/cdc2 tarafından kontrol edilir. Tarif edilmesinden on yıl sonra 1993 yılında Ki-67'yi kodlayan bütün cDNA serisi Schlüter ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Proteinin mRNA ile tek genden kopyalanan iki protein yapıda izoformu tarif edilmiş, bunların molekül ağırlıkları 320 ve 359 kD olarak saptanmış. Ucuca eklenmiş bu iki mRNA dizesi Ki-67'nin ekzon 7 tarafından kodlanan bölgesinin olup olmamasına göre ayrılırlar (54). Mitoz sırasında belirgin olarak Ki-67'nin tekrar bir dağılımı izlenir. Mitoz; sitoplazmik komplekslerin Ki-67 pozitif olarak izlendiği tek dönemdir. Ki-67 proteini profaz sırasında tekrar organize olur ve yoğunlaşmış kromatinle beraber izlenmeye başlanır. Metafazda kromozomların yüzeyini kaplamış halde parlak Ki-67 antijen boyanması izlenir. Metafaz sırasında en yüksek oranda boyanma oranı izlenir. Çekirdek zarının yırtılmasını takiben protein diffüz olarak sitoplazmada izlenmeye başlanır. Mitoz sonunda (anafaz ve telofaz) antijen tanecikli boyanma özelliği gösterir. Ayrıca anafaz ve telofaz sırasında boyanma düşmeye başlar. Telofazda küçük nükleer yapılar içinde lokalize hal alır (52,53). Özetle Ki-67 çoğalan hücrelerde görülen bir çekirdek proteini olup esasen G1, S, M ve G2 fazında görülür, G0 fazında yoktur. Hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi bir şekilde gösteren bir protein olup, mitotik indeks ve tümör gradelemesinde rutinde sıkça kullanılır (50).

2.6. Real time PCR

Real-time PCR DNA'nın çoğaltımı işlemini ve ürünlerini tek bir tüp içerisinde belirlemeyi mümkün kılan popüler bir metoddur (55). Geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi bu metodun kullanımıyla birleştirilmiştir. Bu yöntemde floresan işaretli prob ve boyalar kullanılarak PCR çoğaltımı görünür hale getirilip ve monitorize edilir ve floresan, oluşan DNA ile doğru orantılı olarak artar. Birçok isimlendirilme yapılan bu teknoloji yabancı yayınlarda “kinetik PCR”, “homojen PCR”, “kantitatif Real-time PCR” gibi farklı adlarla da isimlendirilmektedir (56). Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını belirleme ve mRNA'nın miktarını sayısal olarak belirleme en fazla kullanıldığı alanlardır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, tek nükleotit polimorfizmi (SNP) analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları vardır (57). Bugün birçok araştırma ve tanı

laboratuvarlarında kullanılan real-time PCR cihazı vardır. Bu cihazlar reaksiyon sayısı kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıkları, hızları ve kanal sayıları ile birbirlerinden ayrılırlar. Ticari olarak satılanlar; “Smart Cycler”, “RotorGene”, “LightCycler”, “Stratagene M x 3000p, M x 3005p ve M x 4000”, “Applied Biosystems 7300 ve 7500” ve “Chromo4” en sık kullanılanlardır (58).

2.6.1. Özgül Olmayan Belirleme Sistemi: Spesifik olmayan çift zincirli DNA’nın çoğaltımında “SYBR Green I” yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA’ya bağlanabildiğinden çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak “real-time” PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı biçimde artar. “SYBR Green I” en fazla kullanılan boya çeşididir, 497 nm dalga boyunda yükseltgenip ve 520 nm dalga boyunda indirgenme özelliğine sahiptir. Çift sarmallı DNA’nın küçük oluşuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrasında aktivitesinin sadece % 6’sını kaybeder (57).

Çoğaltımın başındaki reaksiyon karışımında “SYBR Green I” boyası, primerler ve çift zincirli DNA molekülü bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az miktarda floresan ışımaya yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA’nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Baştaki döngü boyunca sinyal zayıftır; fakat ürün miktarı arttıkça floresan miktarı da hızla artar ve bu artış “real-time” cihazının monitöründen görülebilir (57). Optimize edilmiş PCR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile bu yöntem kullanılarak çok fazla sayıda hedef gen çoğaltılabilir. Floresan işaretli problemlere ihtiyaç olmadığından maliyeti de ucuzdur. Yöntemin dezavantajları da vardır. Floresan istenmeyen PCR ürünlerinin çoğalmasında da açığa çıkacağından her zaman istediğimiz DNA’nın çoğaldığını göstermez, yani yanlış pozitif sonuç almak mümkündür. Yine ortamda hedef DNA dizisi bulunmadığında primerlerin birbiriyle bağlanıp “primer dimer”leri olarak adlandırılan çift zincirli DNA bölgelerinin oluşturup floresan ışımaya yapabilir. DNA’ların erime eğrisi analizleri (“melting curve”, “dissociation”) yapılması çoğaltılan DNA’nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için gerekmektedir. Bu işlem için cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtır, çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature= T_m) floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşmüş olur. Her bir DNA’nın belli bir erime sıcaklığı (T_m) derecesi vardır. Bu değer çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği Guanin-Sitozin/

Adenin-Timin (GC/AT) oranına bağlıdır. Spesifik olmayan ürünlerin çoğalması durumunda (primer dimer'lerinde) aradığımız DNA parçasının Tm derecesi ile arasında farklılık olacaktır. Bu fark her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi içermesinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle Tm sıcaklığı her ürün için özeldir. Bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde bu yöntem güvenilir bir şekilde kullanılabilir (59).

2.6.2. Özgül Belirleme Sistemi: DNA parçasının çoğaltılmak istenen bölgesi özel bir bölgeyse bu bölgenin saptanması için floresan işaretli problar kullanılır. Bu tekniklerin başında “Light-up” prob, hibridizasyon prob, “Molecular beacon”, “TaqMan” prob ve “Scorpion” primer gibi floresan işaretli problar kullanılarak yapılanlar gelmektedir. “TagMan® probe” yöntemi “Double-Dye Oligonucleotide”, “dual labeled probe” veya “5' nuclease probe” olarak da adlandırılmaktadır. “TagMan® probe” yöntemi çoğaltılmak istenilen DNA'ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda “fluorophore” (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda “quencher” (6- karboksitetrametil-rodamin=TAMRA) bulunur. 3' uçtaki basılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmalarını engellemektedir. Prob hedef DNA'ya bağlanma durumunda bile floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerler bağlanma bölgeleri arasında “Taq Man” problar bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasından sonra yeni zincir oluşmaya başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3 nükleaz aktivitesiyle FAM'ı probdan ayırır. Böylece serbestleşen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresan da buna paralel olarak artmaya devam eder (60). “TagMan® probe” yönteminde mutasyon tespitiyle birlikte sayısal değerlere de ulaşılabildiğinden araştırmacılar için avantajlıdır. Hem allelik diskriminasyon hem de ekspresyon profilinin çıkarılmasında standart bir protokolü ve kolay bir dizaynı olduğundan, ayrıca çok az bir optimizasyonla gerçekleştiğinden bu yöntem kolaylıkla kullanılır (61).

2.6.3. Moleküler Boncuk Yöntemi: Hem yapı hem de çalışma prensibi bakımından moleküler boncuk yöntemi “TagMan® probe” ve “SYBR Green I” yönteminden çok farklıdır (56,62). Saç tokası şeklindeki yapının yuvarlak uç kısmı

çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içerir. Bu yapının düz olan uç kısımlarında 2 adet florokrom boya bulunur. Bunlardan baskılayıcı florofofor diğer boyanın floresansını engeller. Moleküler boncuk probu solüsyon içerisinde serbest haldeyken ışıma yapmaz. Çoğaltılmak istenilen DNA bölgesi PCR ile çoğalmaya başladığında prob hedef DNA dizisine göre dizayn edildiğinden birbirleri ile karşılaştıklarında konformasyonu değişip düz ve çift zincirli hale geçer. Çünkü bu yapı termodinamik olarak saç tokası şeklinden daha karardır. Moleküler boncuk hedef nükleik asit dizisi ile hibridize olduğu anda boncuk molekülünün yapısı değiştiğinden ve boyalarda birbirlerinden uzaklaştığından floresan miktarı artar. Sonuçta bu teknik de oluşan floresanın ölçümüne dayanmaktadır (62).

Moleküler boncuk yönteminin en fazla kullanıldığı alanlar; genetik tarama, SNP çalışmaları ve farmakogenetik çalışmalardır. Bu yöntemde prob dizaynı çok önemlidir ve optimal şartlar sağlanmadığında özellikle uygun sıcaklık bulunamamışsa probun saç tokası şeklindeki yapısı değişmeyeceğinden ortamda hedef DNA dizisi bulunsa bile floresan ışıma elde edilemeyebilir (56,62).

2.6.4. Hibridizasyon Prob Yöntemi: Bu yöntem Roche tarafından “LightCycler®” PCR cihazında kullanılmak üzere geliştirilmiştir (63,64). İki farklı prob dizayn edilmiştir. 3’ ucunda floresans işaretli boya (donor), 5’ ucunda alıcı boya (acceptor) bulunmaktadır. PCR reaksiyonu sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). Enerji “donor” boyadan “acceptor” boyaya transfer olur. Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarıyla doğru orantılı olarak artar (63).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgu Seçimi

Ocak 1994 – Ağustos 2011 tarihleri arasında Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı arşivi taranarak laringeal SHK tanısı almış 31 larenjektomi ve 69 laringeal biyopsi uygulanmış toplamda 100 adet olgu çalışmaya dahil edildi.

3.2. Histopatolojik İnceleme

Olgulara ait Hematoksilen-Eozin (H&E) boyalı tüm preparatlar yeniden gözden geçirilerek değerlendirildi. İmmünohistokimyasal inceleme için tümöre ait en uygun ve tümöre komşu normal skuamöz epitel içeren bloklar seçildi.

Yaş, cinsiyet, diferansiyasyon ve lokalizasyona ait bilgiler arşiv kayıtlarından elde edildi. Histolojik derece: Keratinizasyon derecesi, pearl formasyonu, tümör hücreleri arasındaki interselüler köprülerin varlığı dikkate alınarak az, orta ve iyi diferansiye olarak sınıflandırıldı (65). Tümör lokalizasyonu: Tümör, larinksteki yerleşim yerine göre supraglottik, glottik, subglottik ve transglottik olmak üzere gruplara ayrıldı.

3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Olgulara ait seçilen bloklardan IHK'sal inceleme için her vakadan 3-4µ'luk ikişer tane olmak üzere polyisinli lamlara kesit alındı. Primer antikor olarak Ki-67 (SP 6) tavşan monoklonal antikor (dilüsyon: 1/250, anahtar kod: CMC27531030, Cell Marque, ABD) ve p53 (DO7) (dilüsyon: 1/250, anahtar kod: CMC45329022 , Cell Marque, ABD) kullanıldı. Ventana Benchmark XT immünohistokimya otomatik boyama sistemi ve Ventana Ultraview Dab Detection Kit kullanılarak uygun pozitif kontroller eşliğinde boyama yapıldı.

Değerlendirmeler, Olympus BX53F (Olympus, Tokyo, Japan) marka ışık mikroskopunda, değişik büyütmelerde değerlendirme yapıldı.

Ki-67 ve p53 IHK'sal boyaları için kuvvetli nükleer boyanmalar dikkate alınmış olup boyanma yüzdeleri şu şekilde skorlandı:

%5'ten az: 0;

%5–10: +;

%11–20: ++;

%20'den fazla: +++ (66).

Daha sonra Olympus E-330 (Olympus imaging corporation, China) fotoğraf makinası ile fotoğrafları çekildi.

3.4. Real time PCR inceleme

Her olgu için 5-10 mikronluk 10-20 yaprak örnek alınarak Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Real Time PCR yöntemi ile HPV DNA tarama ve genotipleme testi yapılmak üzere gönderildi. Çalışmanın bir kısmı Atheku Qiagen firmasına ait Ankara'daki araştırma laboratuvarında çalışılmıştır.

HPV-DNA izolasyonu: HPV-DNA manyetik parçacık teknolojisi kullanılarak izole edildi. (QIA Symphony SP, Qiagen GmbH, Hilden, Almanya).

HPV RT-PCR: HPV PCR Bosphore HPV Algılama Kit v1 (Anadolu GENWORKS, İstanbul, Türkiye) kullanılarak gerçek zamanlı olarak gerçekleştirildi.

HPV genotiplendirme: Arıtma işlemi amplifiye örneklerde PCR'den sonra High Pure PCR Product Purification Kit kullanılarak yapıldı. Daha sonra, bunlar sekanslama primerleri (sıralama birincilleri) (GP5 veya GP6) ve Sıra Reaktif Mix DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) mevcudiyetinde sıralama reaksiyonuna dahil edildi. Bu amaçla, 0,6µl sekanslama primeri kullanıldı. Sekanslama reaksiyonu 95 °C/20 s, 50 °C/25 s ve 60 °C/2 dk'da 35 döngü koşulları altında gerçekleştirildi.

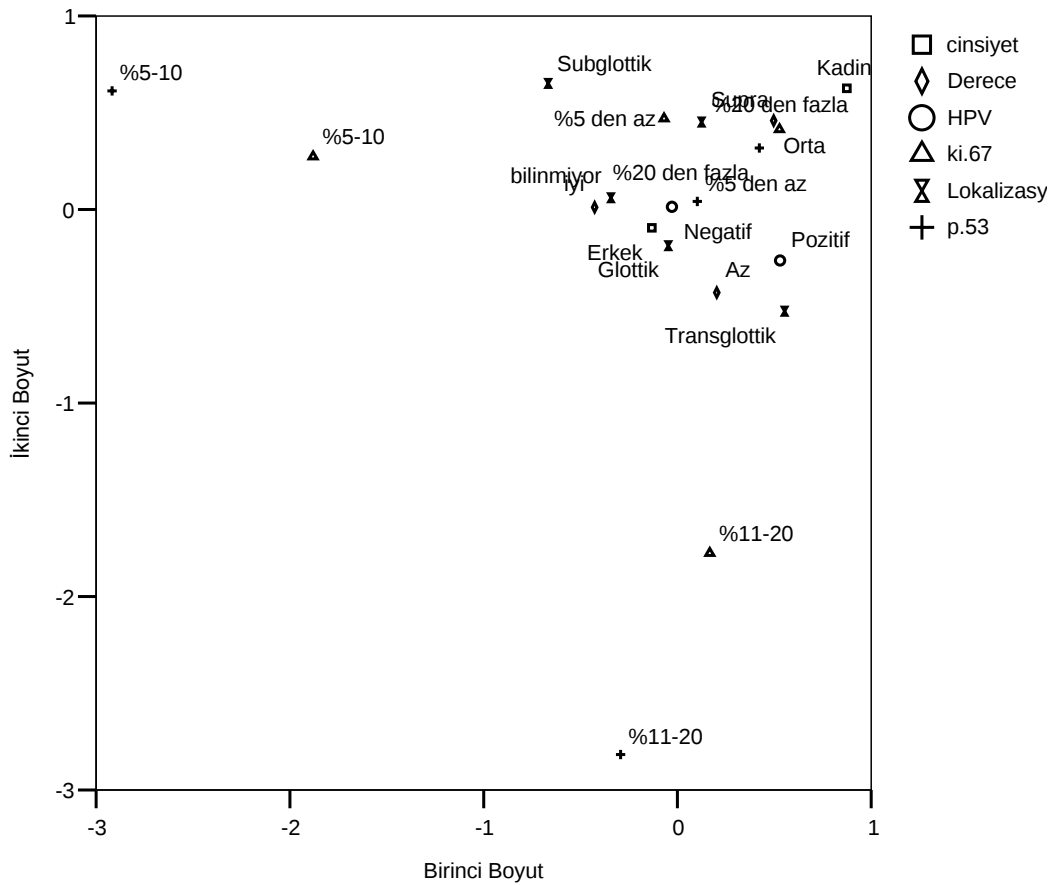
DNA sekanslaması için örnekler ABI Prism 310 Genetik Analiz cihazı (Applied Biosystems Inc., Kaliforniya, ABD)'na yüklendi. Sekanslamanın elektroferogramı Vector NTI v5.1(InforMax, Invitrogen life science yazılım, Frederick, MD 21704, ABD) ile elde edilmiş ve sekans ŞOK analizi (Basic Lokal Hizalama Arama Aracı, BLASTN programı 2.2.25, blast.ncbi.nlm.nih.gov) tarafından tanımlandı.

3.5. İstatistiksel analiz

SPSS 13.0 paket programı verilerin istatistiksel analizi için kullanıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ std. deviasyon şeklinde sunuldu. Gruplar arasındaki fark Ki-Kare testi ile değerlendirildi. P değeri 0.05'ten küçük sonuçlar anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

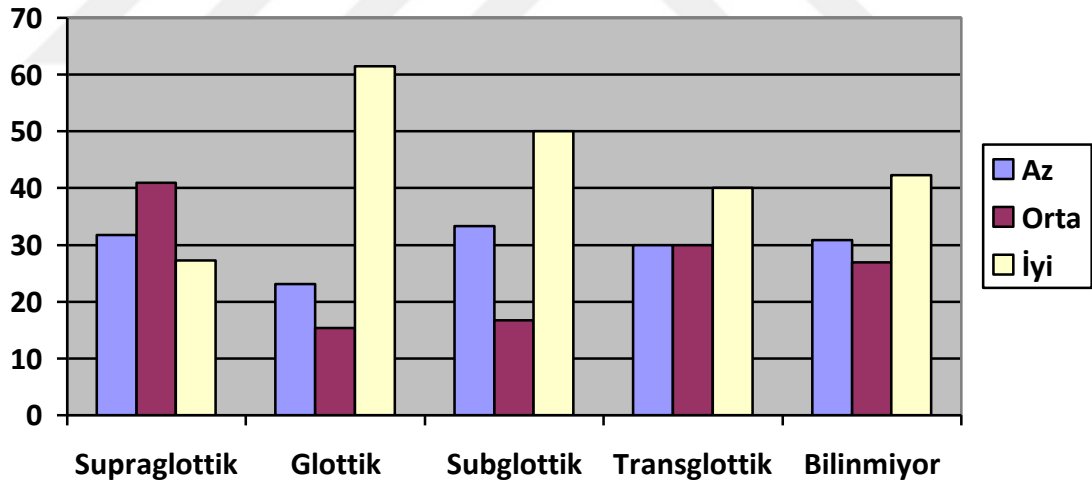
Cinsiyet: Çalışma kapsamına alınan 100 hastanın 13'ü (%13) kadın, 87'si (%87) erkekti. Yapılan istatistiksel incelemede cinsiyetin lokalizasyonla ($p=0,477$); diferansiyasyonla ($p=0,722$); Ki-67 boyanma yoğunluğuyla ($p=0,360$), p53 boyanma yoğunluğuyla ($p=0,365$) ve HPV varlığı ($p=0,633$) ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p > 0,05$). Fakat tablo 1'te de görüldüğü gibi kadınlarda supraglottik; erkeklerde ise glottik yerleşimli tümörler daha fazla görülme eğilimindedir.



Tablo 1: Cinsiyet, derece, lokalizasyon, Ki-67 ve p53 boyaları ile HPV-DNA varlığına ilişkin çoklu uyum analizi grafiği

Yaş: Olgular 27-87 yaşları arasında olup, yaş ortalaması 57.96'ydı. Yapılan istatistiksel incelemede yaşın lokalizasyonla ($p=0,395$); diferansiyasyonla ($p=0,436$); Ki-67 boyanma yoğunluğuyla ($p=0,913$), p53 boyanma yoğunluğuyla ($p=0,838$) ve HPV varlığı ($p=0,420$) ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p > 0,05$). Yaşı en küçük HPV pozitif vakamız 46 yaşında iken en yaşlı HPV pozitif vaka 87 yaşında idi.

Tümör lokalizasyonu: Olgulardan 22 tanesi (%22) supraglottik, 26'sı (%26) glottik, 6'sı (%6) subglottik, 20'si (%20) transglottik tümör olup 26 tanesinin (%26) lokalizasyonuna arşiv bilgilerine ulaşılamadı. Bu olgular bilinmiyor şeklinde kodlandı. Yapılan istatistiksel incelemede tümör lokalizasyonunun diferansiyasyonla ($p=0,538$); Ki-67 boyanma yoğunluğuyla ($p=0,304$), p53 boyanma yoğunluğuyla ($p=0,079$) ve HPV varlığı ($p=0,479$) ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p > 0,05$). Tablo 2'de görüldüğü üzere lokalizasyon bilgisine ulaşabildiğimiz vakalardan en çoğu glottik yerleşimli iken bunu supraglottik ve transglottik yerleşimliler izlemektedir.

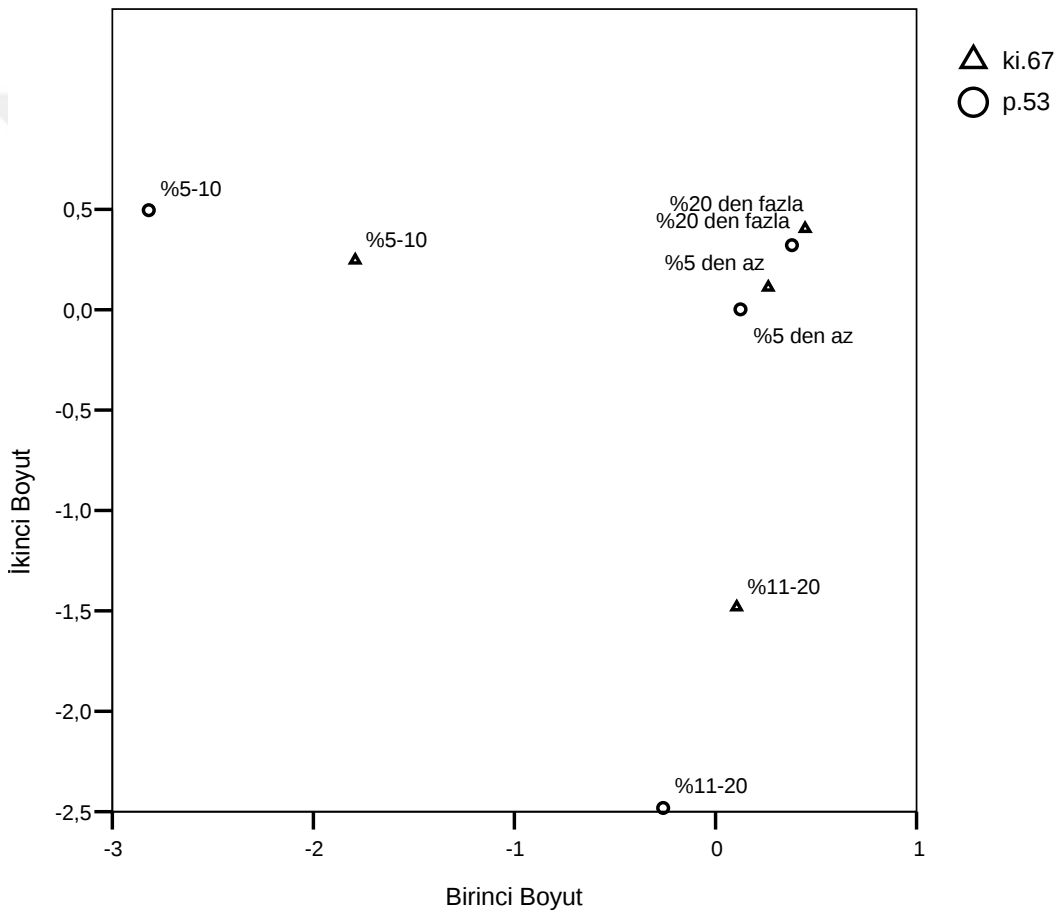


Tablo 2: Lokalizasyon ve tümör diferansiyasyonu dağılım grafiği

Histolojik derece: Tümörlerin 44'ü (%44) iyi, 27'si (%27) orta ve 29'u (%29) kötü diferansiye idi (Resim 1-6). Yapılan istatistiksel incelemede histolojik derecenin Ki-67 boyanma yoğunluğuyla ($p=0,151$), p53 boyanma yoğunluğuyla ($p=0,522$) ve HPV varlığı ($p=0,846$) ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p > 0,05$). Bununla birlikte tablo1'de görüldüğü üzere iyi ve az diferansiye tümörler daha

çok erkeklerde izlenirken, orta derecede diferansiye tümörler daha çok kadınlarda görülme eğilimindedir.

Ki-67: Olguların %16'sı 1+, %18'i 2+ ve %54'ü 3+ boyanırken %12'sinde boyanma izlenmedi. Yapılan istatistiksel incelemede tablo 3'te de görüldüğü üzere Ki-67 boyanma yoğunluğunun p53 boyanma yoğunluğuyla ($p=0$) istatistiksel olarak anlamlı boyandığı görüldü (Resim 7-14). Yani olgular her iki boya ile de benzer yoğunlukta boyanmışlardır. Ki-67 boyanma yoğunluğu ile HPV varlığı ($p=0,435$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p > 0,05$).



Tablo 3: Ki-67 ve p53 boyalarının uyum analizi grafiği

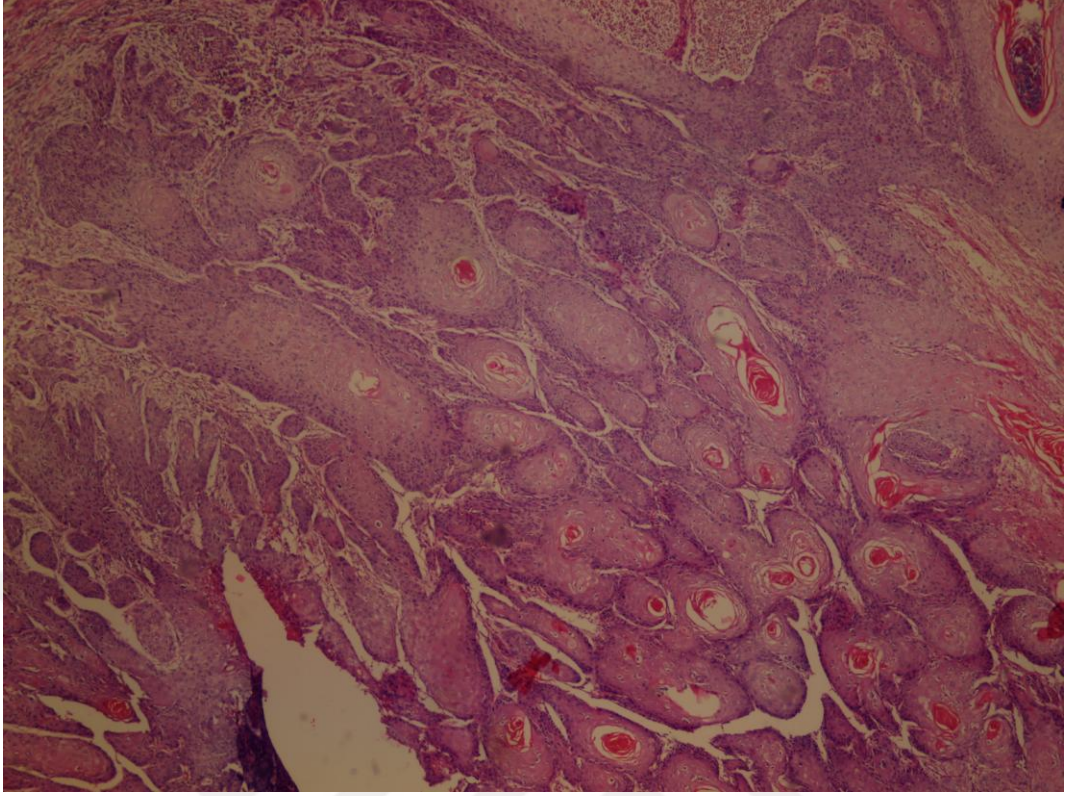
P53: Olguların %7'si 1+, %7'si 2+ ve %44'ü 3+ boyanırken, %42'sinde boyanma izlenmedi. Yapılan istatistiksel incelemede p53 boyanma yoğunluğunun HPV varlığı ile ($p=0,762$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p > 0,05$).

HPV DNA: Olguların beşi erkek, biri kadın olmak üzere 6'sında (%6) HPV pozitifliği saptandı. Bu pozitif olgulardan bir tanesi High Risk grubundan Tip 33 olup,

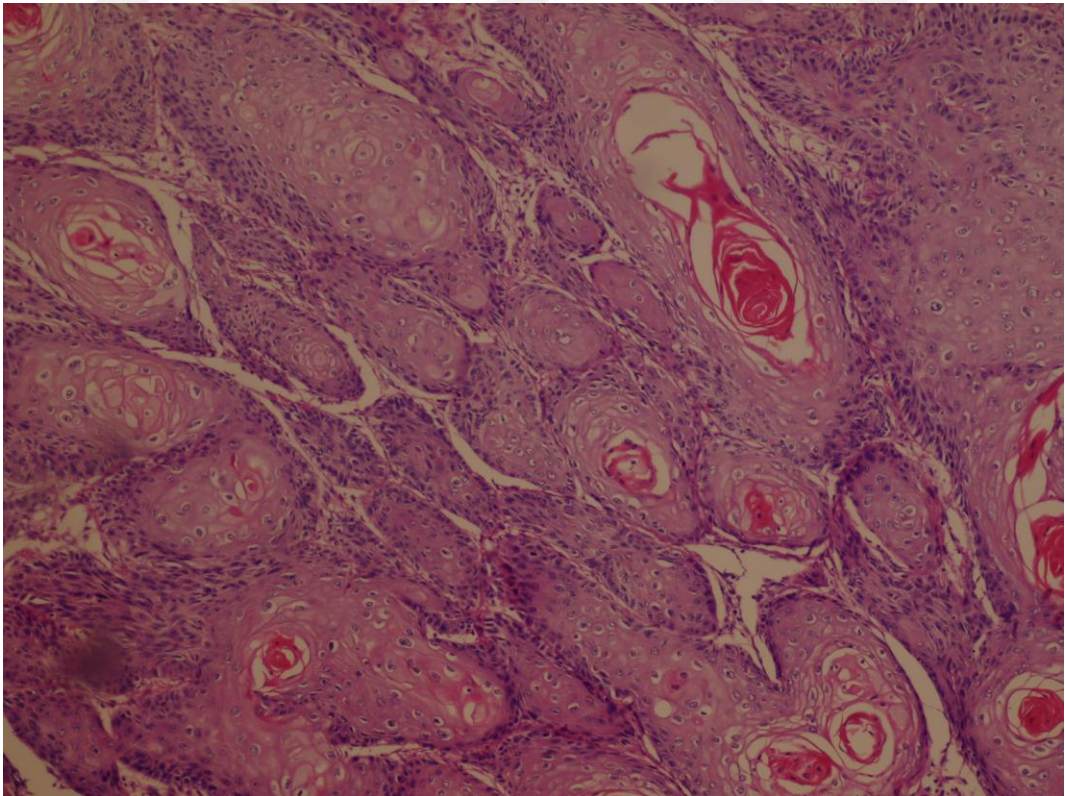
diğerleri Low Risk grubundan iki tane Tip 6 ve her birinden birer tane olmak üzere Tip 11, Tip 81 ve Tip 40 olarak saptandı. HPV pozitif vakaların dördünün tümörü iyi diferansiye iken ikisinin tümörü az diferansiyedir (Tablo 4).

Vaka numarası	HPV Tip	Cinsiyet	Yaş	Yerleşim	Diferansiyasyon
H5	Tip 6	Erkek	59	Bilinmiyor	İyi
H30	Tip 6	Erkek	87	Bilinmiyor	İyi
H40	Tip 11	Erkek	63	Subglottik	İyi
H69	Tip 33	Erkek	60	Glottik	İyi
H70	Tip 81	Kadın	46	Supraglottik	Az
H88	Tip 40	Erkek	55	Transglottik	Az

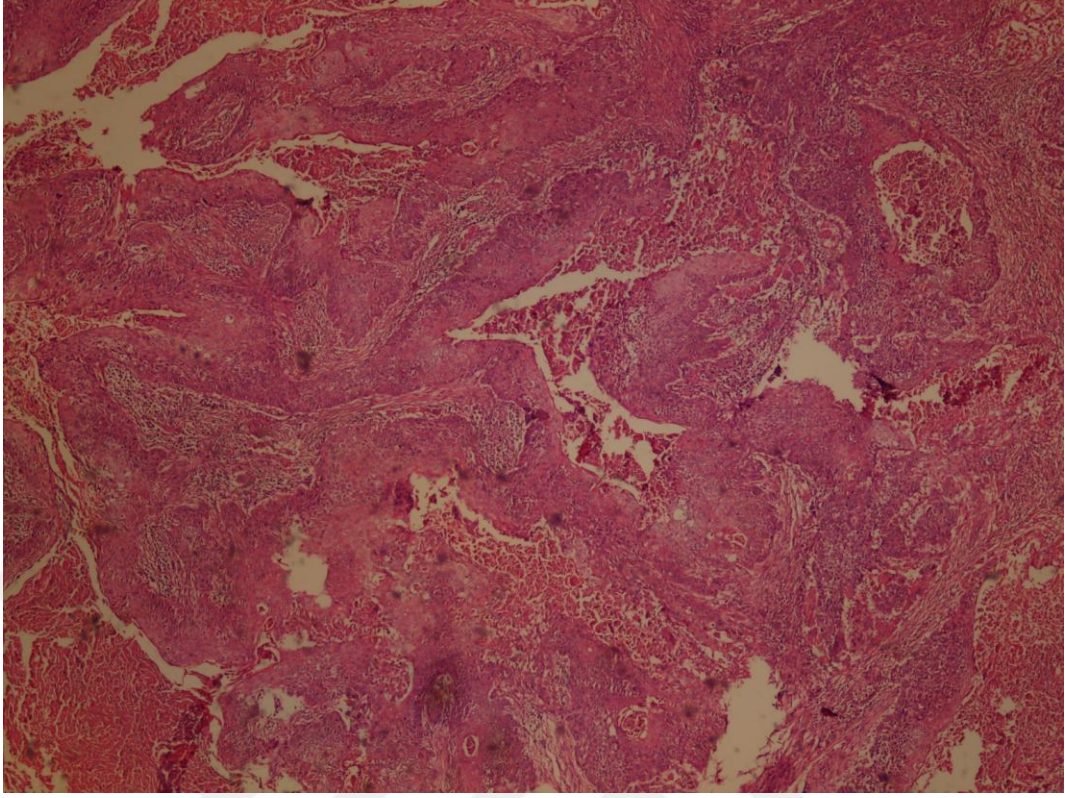
Tablo 4: HPV pozitif vakalar ve HPV tipleri



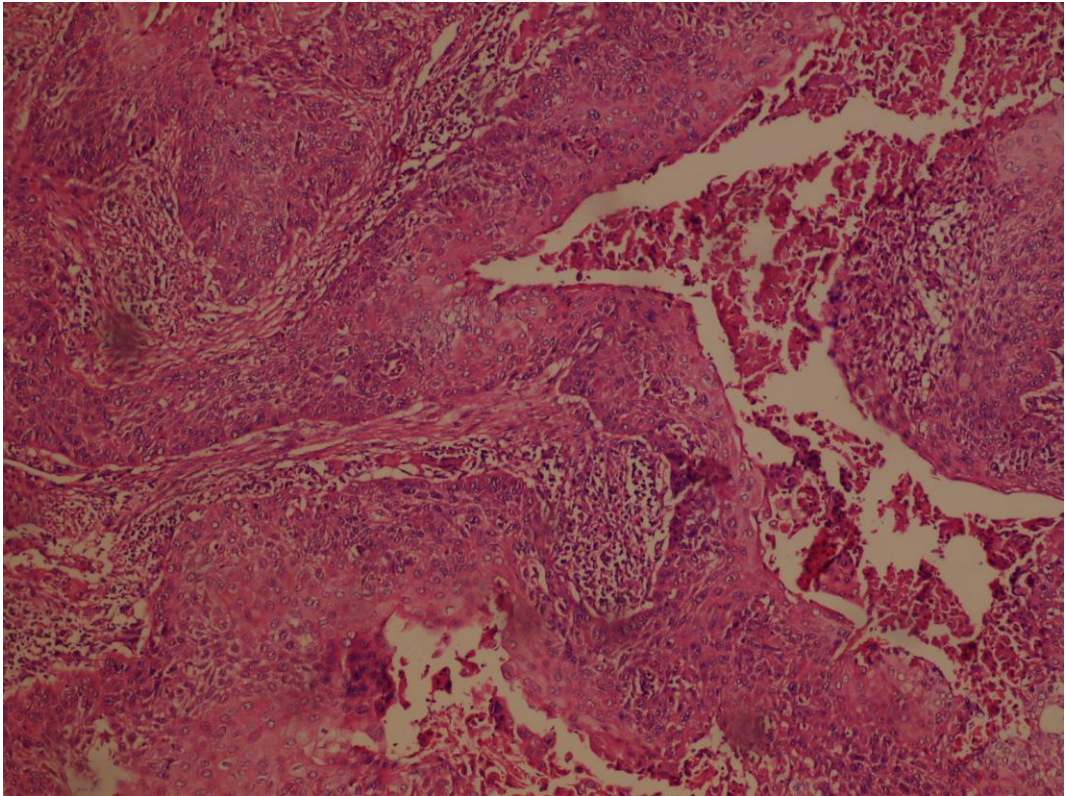
Resim 1: İyi diferansiye SHK (H&E x100)



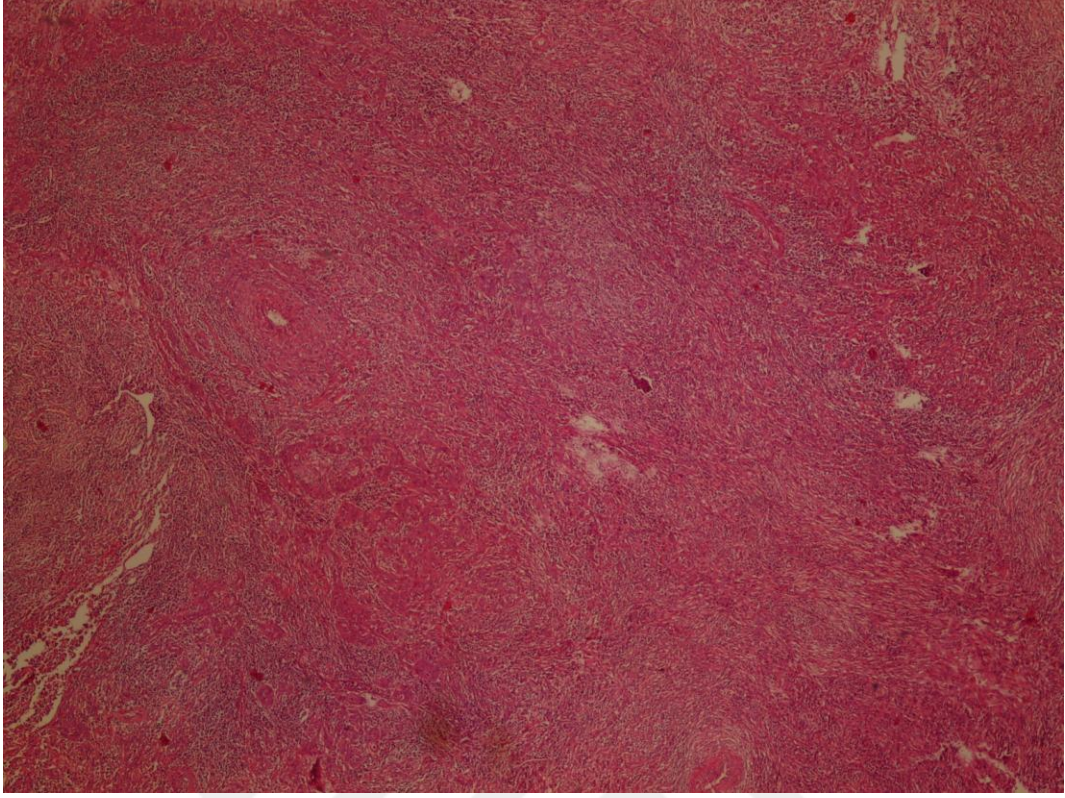
Resim 2: İyi diferansiye SHK (H&E x400)



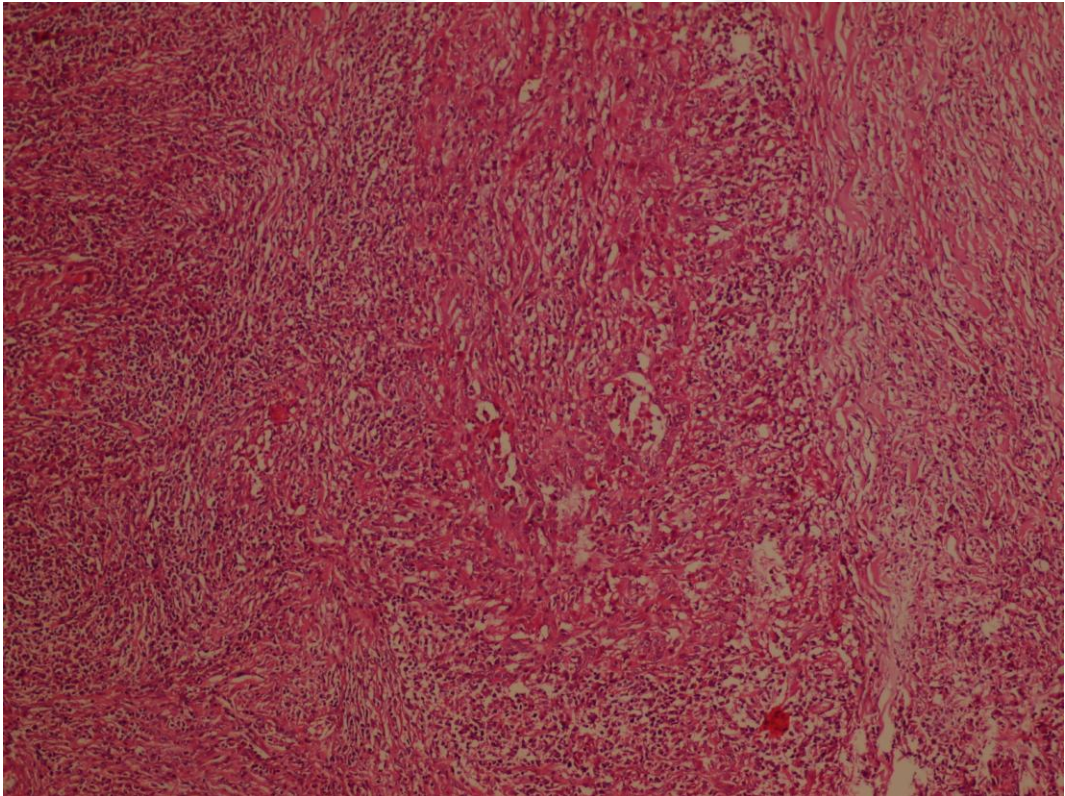
Resim 3: Orta derecede diferansiye SHK (H&E x100)



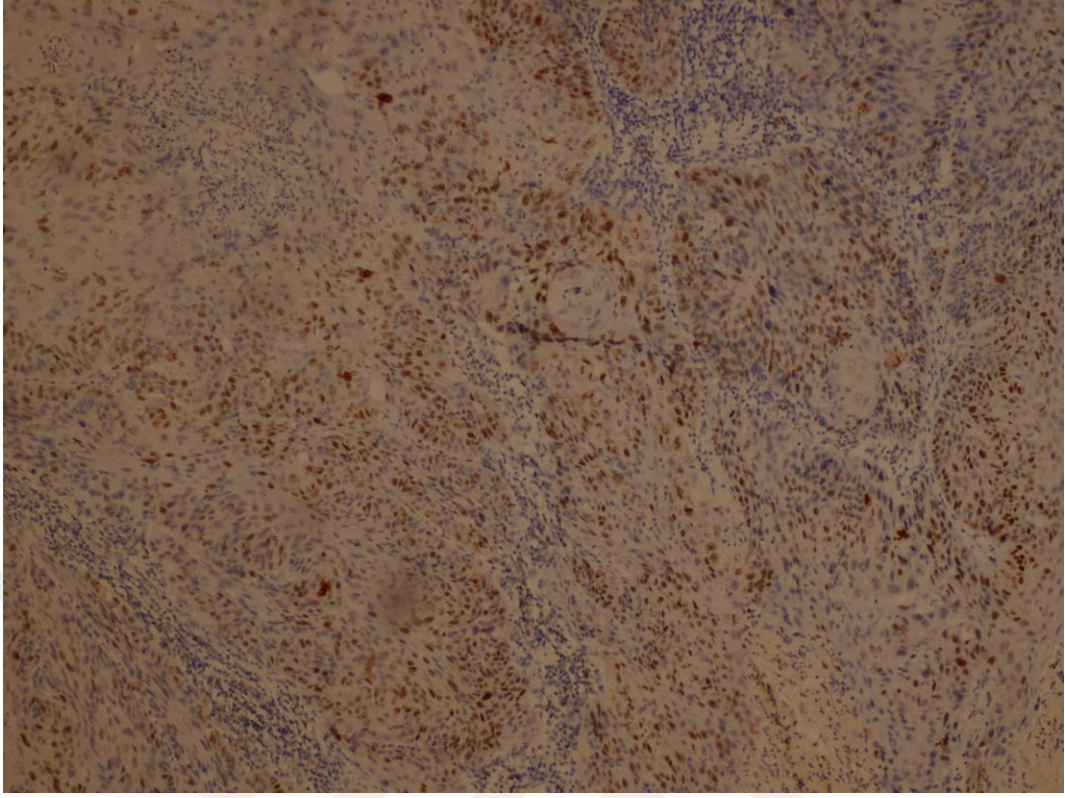
Resim 4: Orta derecede diferansiye SHK (H&E x400)



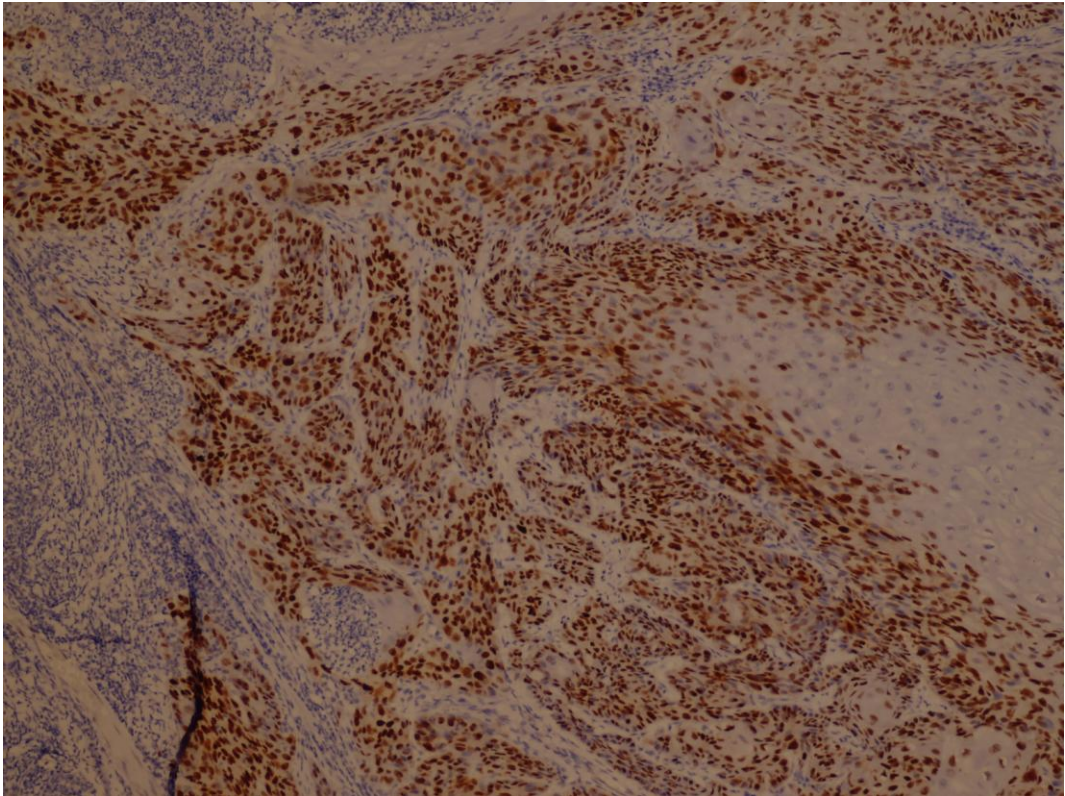
Resim 5: Az diferansiye SHK (H&E x100)



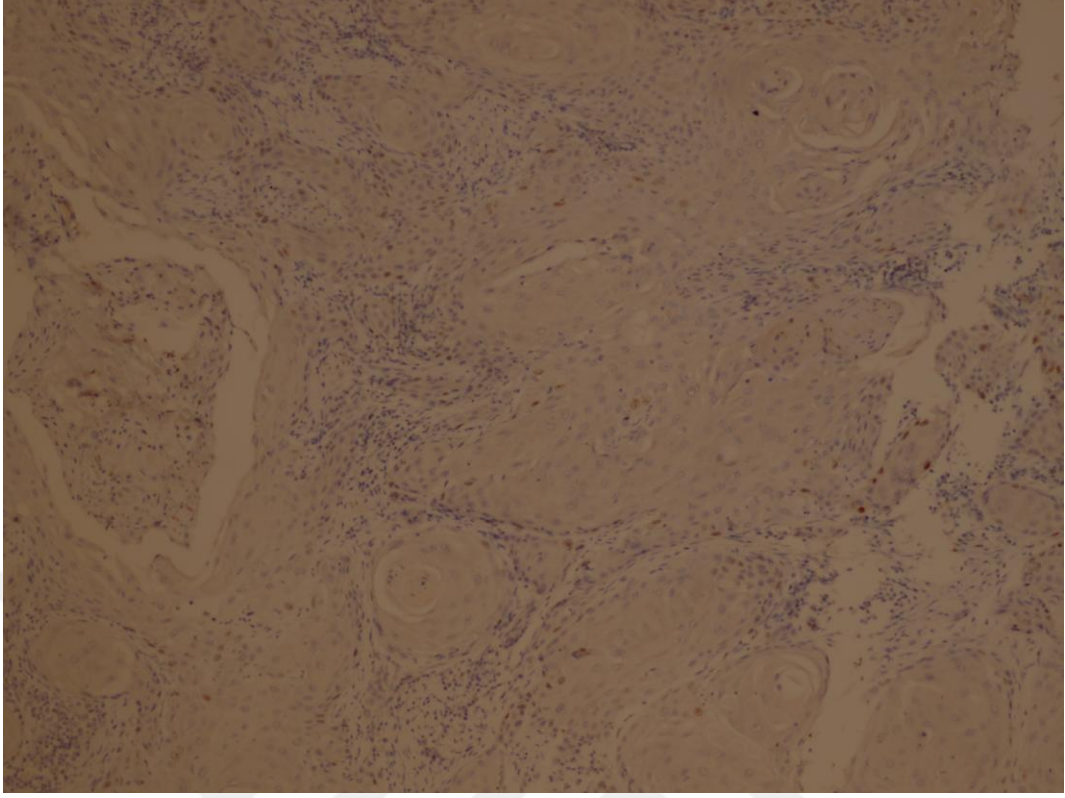
Resim 6: Az diferansiye SHK (H&E x400)



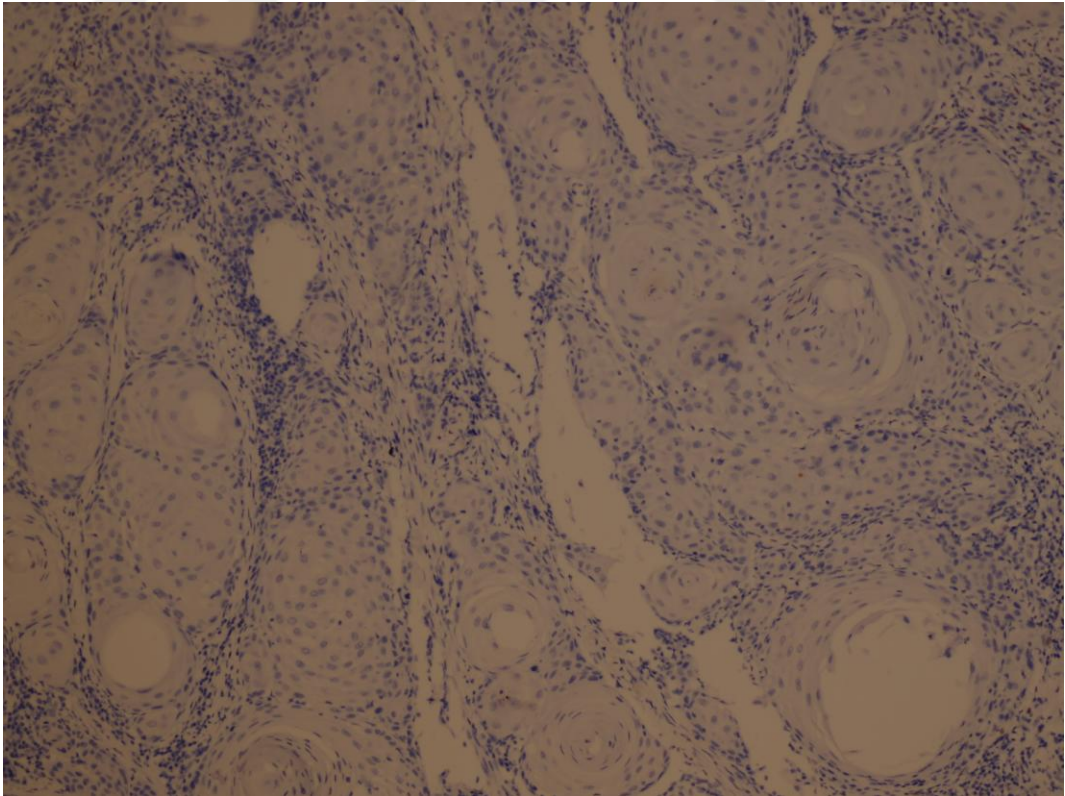
Resim 7: 3+ boyanma gösteren iyi diferansiye SHK (Ki-67x400)



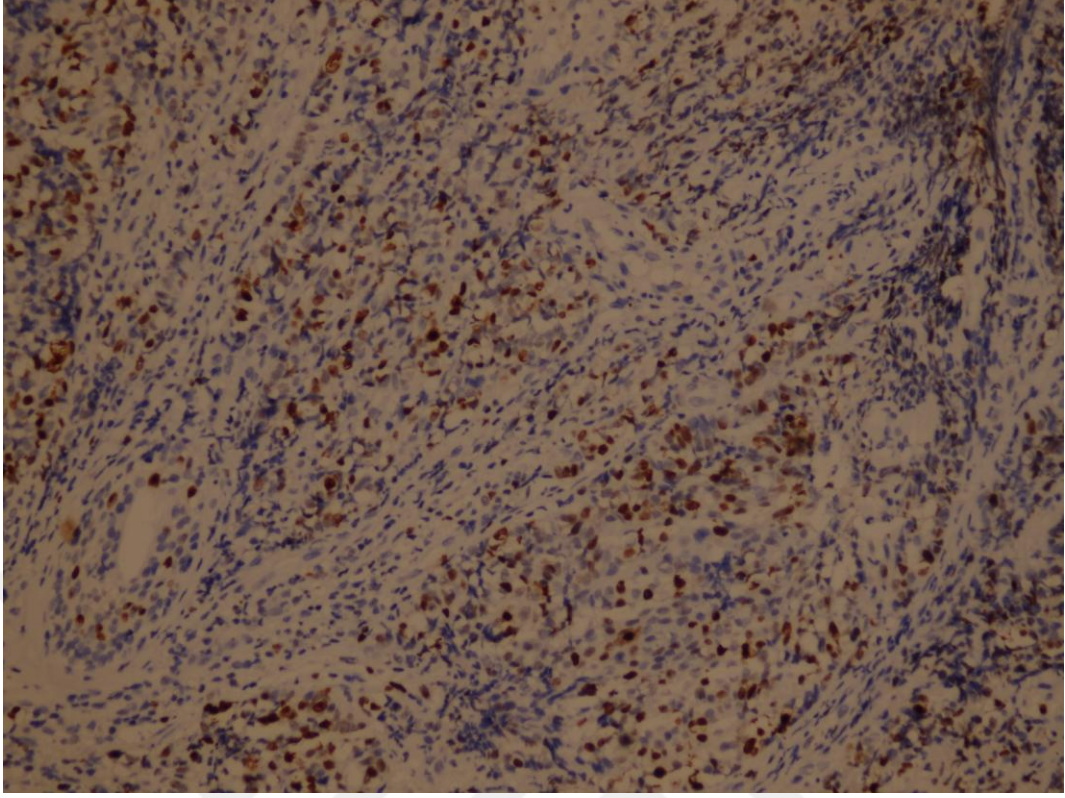
Resim 8: 3+ boyanma gösteren iyi diferansiye SHK (p53x400)



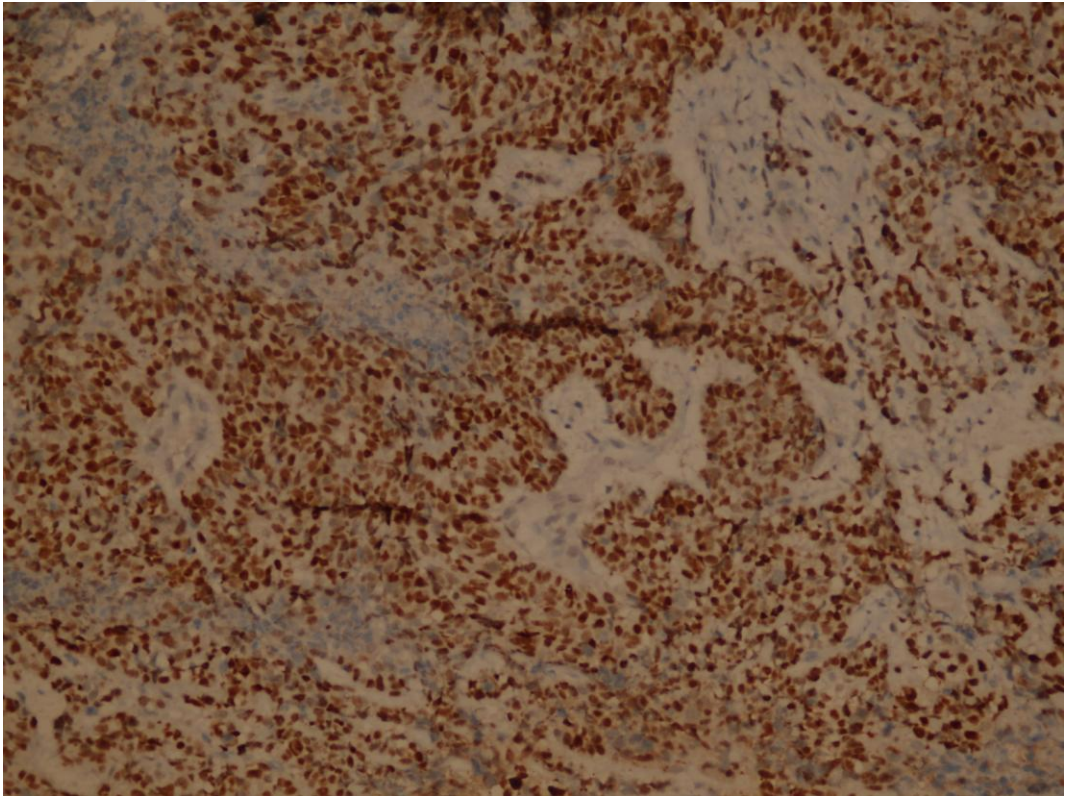
Resim 9: Boyanma göstermeyen (% 5' ten az boyanan) iyi diferansiye SHK (Ki-67x400)



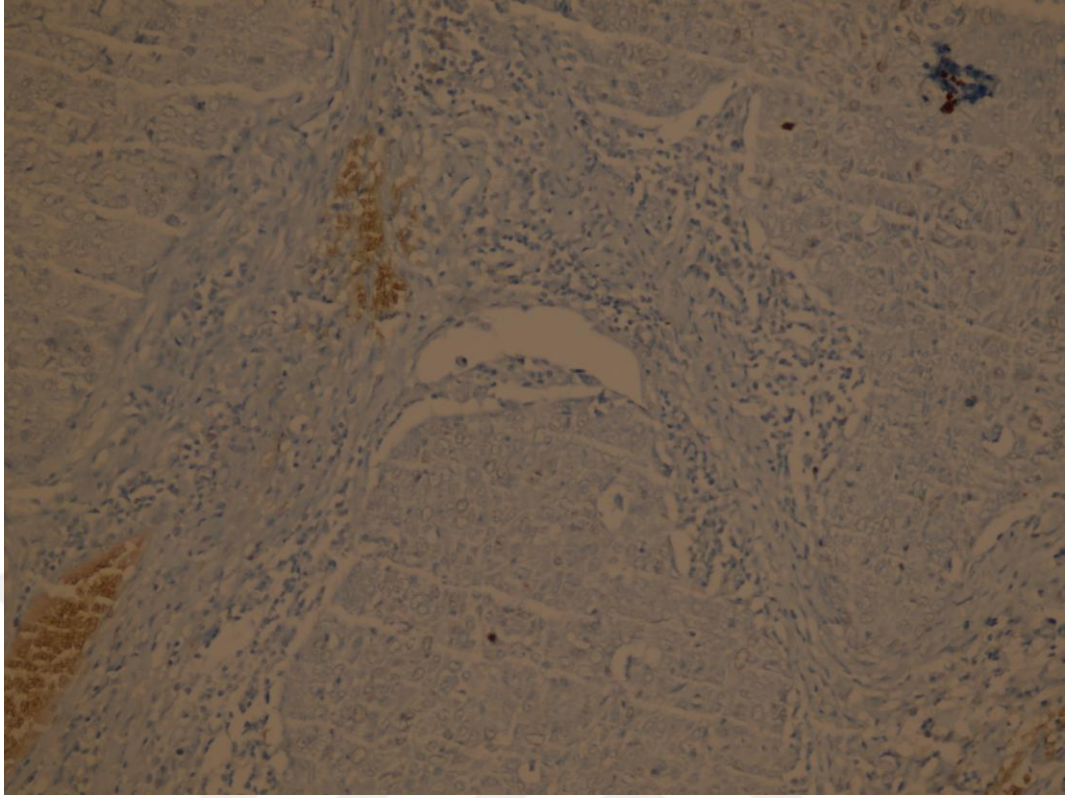
Resim 10: Boyanma göstermeyen (% 5' ten az boyanan) İyi diferansiye SHK (p53x400)



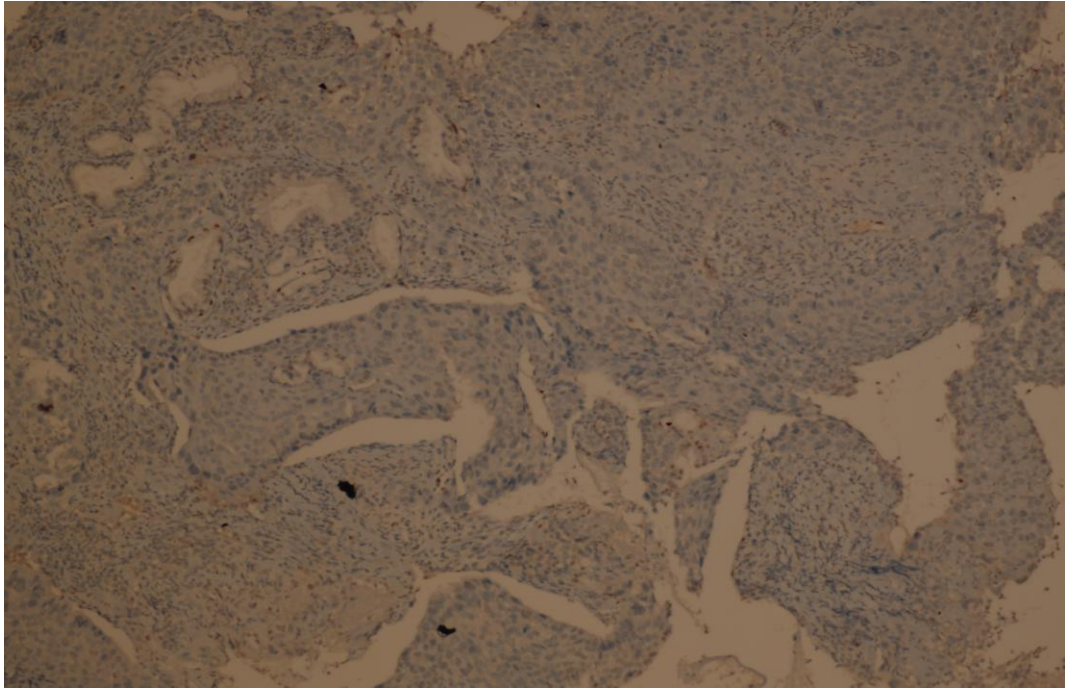
Resim 11: 3+ boyanma gösteren az diferansiye SHK (Ki-67x400)



Resim 12: 3 + boyanma gösteren az diferansiye SHK (p53x400)



Resim 13: Boyanma göstermeyen (% 5' ten az boyanan) az diferansiye SHK (Ki-67x400)



Resim 14: Boyanma göstermeyen (% 5' ten az boyanan) az diferansiye SHK (p53x400)

5. TARTIŞMA

Larinks karsinomları tüm malign tümörlerin % 2-3'ünü oluşturur (1). Baş-boyun bölgesinin en sık görülen malign tümörleri olup yaklaşık % 25 oranında görülür (1). Larinks karsinomlarının % 95'den fazlası SHK'lardır (2). Bu nedenle larinks yerleşimli SHK'lar önemli bir sağlık sorunudur ve etyopatogenezini aydınlatmaya yönelik literatürde çok sayıda araştırma mevcuttur. Biz de çalışmamızda Van yöresinde gelişen laringeal skuamöz hücreli karsinomlarda HPV'nin etyolojideki yerini saptamak ve bunların p53 ve Ki-67 IHK'sal belirteçlere yanıtlarını gözlemleyip, boyanma yoğunluklarının SHK'nin diferansiyasyon ve HPV pozitifliği ile ilişkisi olup olmadığını araştırdık.

Bu tümörler, genellikle hayatın 5. dekadında veya daha ileri yaşlarda görülür ancak daha genç yaşta bildirilen olgular da vardır (23). Bizim çalışmamızdaki en genç olgu 27 yaşında olup, ortalama yaş 57,96 idi. Laringeal karsinomlar erkeklerde daha fazla görülür. Hastaların % 96'sı erkektir (23). Bizim çalışmamızda bu oran % 87 idi.

Papillomaviridae ailesi üyeleri orofaringeal ve anogenital kanserler gibi insanda görülen malignitelerin gelişiminde önemli rol oynamaktadır (67,68).

HPV, hem erkeklerde hem kadınlarda yakın temas ile bulaşan sık görülen virüslerden biridir. Saptanan farklı HPV tiplerinin sayısı gün geçtikçe artmaktadır ve son yapılan bazı araştırmalarda ise 200'e yakındır (25,69). Servikal kanserlerin etyolojisinde % 100'e yakın oranlarda HPV tipleri suçlanmıştır (26-29).

Günümüzde penil, anal, genital ve vulvar kanserlerin yanı sıra orofaringeal, oral ve laringeal karsinomların etyolojisinde de HPV varlığı gösterilmiştir. Bu konuyla ilgili yapılan araştırmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır (27,31,70-74).

HPV'nin yüksek ve düşük riskli tipleri olup düşük riskli tipler laringeal papillomatozis ve genital siğil benzeri benign lezyonlarda rol oynarken, yüksek riskli tipler malign lezyonlarda karşımıza çıkabilir (3).

Yüksek riskli HPV tiplerine ait E6 ve E7 proteinleri maligniteye zemin hazırlarlar ancak düşük riskli tiplerin E6 ve E7 proteinleri ile malign değişim izlenmemiştir (31,32). Bu nedenle servikal kanserler için geliştirilen aşılar öncelikli olarak en sık görülen ve yüksek riskli olan HPV tiplerinin E6 ve E7 proteinlerini hedef alarak hazırlanmıştır (31,32,70).

Deilson ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 110 adet laringeal SHK incelenmiş ve bunların % 37,3'ünde yüksek riskli HPV tipi saptanmıştır. Bu yüksek riskli olguların % 37'sinde HPV 16, % 44'ünde ise HPV 18 saptanmıştır (2). Olguların % 78,2'sinde ise P53 pozitifliği izlenmiş ve bu olguların aynı zamanda yüksek dereceli oldukları ve yüksek Ki-67 indeksine sahip oldukları dikkati çekmiştir. Bu araştırmada glottik tümörlerin düşük dereceli, supraglottik tümörlerin ise yüksek dereceli olduğu bildirilmiş ve supraglottik tümörlerde lenf nodu metastazına daha sık rastlandığı belirtilmiştir. Supraglottik bölgede lenfatik damar ağının en yoğun şekilde bulunması bu metastazların asıl sebebi olarak öngörülmektedir. Yine aynı çalışmada glottik tümörlerde HPV pozitifliği daha yüksek oranda bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da altı olguda (% 6) HPV varlığı saptandı. Bunlardan sadece bir tanesi yüksek risk grubundan olup diğerleri düşük risk grubundandır. Çalışmamızda tümör lokalizasyonu ile tümör derecesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamasına rağmen supraglottik tümörler orta derecede, transglottik tümörler ise daha çok az diferansiye tümörlerdir.

Ayrıca HPV pozitifliği ile tümör lokalizasyonu ve tümör derecesi arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. P53 pozitifliği ile tümör derecesi arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki izlenmedi.

Miller ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada oral SHK'da HPV pozitifliği % 46,5, verrüköz karsinomda % 29,9, intraepitelyal neoplazilerde % 26,2, lökoplakide % 22,2 ve normal oral mukozada % 10,0 olarak bulunmuştur (75).

Herrero ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada orofarinks ve oral kavite kanserlerinde birden fazla cinsel eşi olan ya da oral seks yapanlarda HPV pozitifliği daha fazla saptanmıştır. Bu çalışmada orofarinks kanserlerindeki HPV pozitifliği oranı % 18,3 iken, oral kavite kanserlerinde oran % 3,9'dur (27). Brandwein'in 40 olgudan oluşan larinks karsinomu çalışmasında 30 farklı HPV tipi çalışılmış ve bu olguların yalnızca üçünde (% 8) HPV pozitifliği saptanmıştır (76). Almadori ve arkadaşlarının çalışmasında 45 larinks karsinomlu olgunun dokuzunda (% 20) ve 29 normal laringeal mukozanın dördünde (% 14) HPV pozitif bulunmuştur (77). Gorgoulis ve arkadaşlarının çalışmasında ise 154 larinks olgusunda 20 (% 13) HPV pozitifliği saptanmıştır. HPV pozitifliği saptanan olguların 19'u larinks karsinomu iken, bir tanesi hafif displazili vakadır. Karsinomu olan 12 olguda HPV 16 (% 13,2), iki olguda HPV 18 (% 2,2), bir

olguda HPV 6 (% 1,1), bir olguda HPV 33 (% 1,1) ve birer olguda HPV 6/33, HPV 16/33 ve HPV 6/18 ko-enfeksiyonu saptanmıştır (78).

Toplumda oral seks alışkanlığının yaygın olması oral lezyonlardaki HPV artışının nedeni olabilir (27,70,79). HIV pozitif homoseksüel erkeklerde dirençli HPV enfeksiyonları sıklıkla görülmektedir. Bu hastalarda HPV ilişkili oral, anal ve penil lezyonlara daha sıklıkla rastlanmaktadır (80).

SahebJamee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 22 adet oral SHK olgusu ve yaş ve cinsiyeti uyumlu 20 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunun tükürüklerinde HPV varlığı araştırılmıştır. Karsinomu olan olguların %40,9'unda ve kontrol grubunun % 25'inde HPV pozitif olarak saptanmıştır. Yapılan alt tiplendirme çalışmasında ise HPV pozitif karsinom olgularının % 27,3'ünde ve kontrol grubunun % 20'sinde HPV 16 pozitif olarak saptanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda hasta grup ve kontrol grubu arasındaki HPV görülme oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ve tükürükteki HPV varlığının oral SHK gelişmesi için tanısal bir değeri olmadığı saptanmıştır (71).

Ülkemizde de HPV enfeksiyonu ve larinks kanserleri arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar yapılmıştır. Öktem ve arkadaşlarının çalışmasında 20 adet larinks ve iki adet hipofarinks yerleşimli kanser hastasında PCR yöntemiyle HPV varlığı araştırılmış ve olguların tamamından negatif sonuç alınmıştır (81). Güvenç ve arkadaşlarının çalışmasında total ya da parsiyel larenjektomi uygulanan laringeal SHK'lı 40 adet olgunun 5'inde (% 12,5) ve verrüköz karsinomlu iki olgunun her ikisinde PCR yöntemiyle HPV pozitifliği bulunmuştur (82). Bu sonuçları ve bizim çalışmamızı da göz önüne alarak coğrafik populasyon farklılıklarının da HPV görülme sıklığını etkilediği söylenebilir.

Bizim çalışmamızda HPV pozitifliği %6'dır. Literatürde laringeal karsinomlarda HPV pozitiflik oranı % 8-54 olarak belirtilmiştir. Sonuçlarımız literatürdeki oranlardan daha düşük görünmektedir (27,75,76,81). Bunun nedenleri; coğrafi farklılıklar, popülasyondaki hijyen alışkanlığı ve cinsel davranış farklılıkları ile kullanılan PCR yönteminin duyarlılığı olabilir. Bu anlamda daha geniş serilerde cinsel davranış, hijyen alışkanlığı ve coğrafi farklılıkları gözeten çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

Bir tümör süpresör gen olan TP53, 17. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan 17p13-1 pozisyonunda bulunur. TP53'ün fonksiyonunu kaybetmesi, baş-boyun

kanserlerinde erken bir moleküler olay olup hastalığın ilerlemesiyle ilişkili görünmektedir (8-10). TP53 tümör süpresör geninin ürünü p53 proteinidir. İki tip p53 proteini vardır. İlki “wild tip p53”tür. Bu, normal hücre döngüsünde görev alan ve apoptozis ile de ilişkili p53’tür. İkinci tip ise mutant tip p53 olup tümörögeneziste rol alır (4,6,7,47). İnsan kanserlerinin yaklaşık %50’sinde p53 mutasyonuna rastlanmaktadır (9,10).

Jacob ve arkadaşları 2002 yılında, 44 laringeal SHK’lı, 16 papillomlu ve 8 normal laringeal dokudan oluşan seride yaptığı çalışmada papillomlu vakaların 13’ünde ve karsinomu olan vakaların 15’inde HPV pozitifliği saptamıştır. HPV enfeksiyonu ile artmış p53 ekspresyonu arasında da istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğunu rapor etmişlerdir (83). Laringeal karsinogenezis oluşumunda; HPV ile indüklenen onkogenezis ve genetik anormallikler nedeniyle oluşan TP53 fonksiyon bozukluğu, bağımsız etkenler olabilir. Özellikle de HPV 16 pozitif baş-boyun kanserleri farklı bir genetik anomali paterni ve TP53 mutasyonu göstermektedirler (84).

Jin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 83 adet SHK vakası incelenmiştir. Bu çalışmada p53’ün tümör hücrelerinin % 75’inden fazlasında pozitif olması, tümör boyutunun 3 cm’den büyük olması, lenf nodu metastazının varlığı, ektranodal yayılım ve evre 4 hastalığı olanlarda hastalığın daha kötü seyirli olduğu ifade edilmiştir. IHK’ sal olarak vakaların % 71’inde p53 pozitif, % 29’unda p53 negatif boyanmıştır. p53 pozitif olguların boyanma oranı % 5-95 (ortalama % 75) arasında değişmekte olup buna göre olgular üç gruba ayrılmıştır. Düşük dereceli grup tümör hücrelerinin % 20’den azında, orta dereceli grup hücrelerin % 20-75’inde ve yüksek dereceli grup % 75’den fazlasında pozitif boyandığı olgular olarak sınıflandırılmıştır. Bu çalışmadaki olguların p53 ile düşük, orta ve yüksek dereceli boyanma şiddeti olarak sırası ile % 17, % 36 ve % 47 olarak belirlenmiştir. p53’ün yüksek derecede pozitif boyandığı olgularda yaşam süresinin, istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı saptanmıştır (p;0,001) (8).

Olshan ve arkadaşları baş-boyun kanserli 33 adet hastanın % 42’sinde P53 mutasyonu tespit etmişlerdir (10). Boyle ve arkadaşlarının makalesinde ise 102 baş-boyun skuamöz hücreli karsinom olgusu incelenmiş ve invaziv lezyonların % 43’ünde, preinvaziv lezyonların ise % 19’unda p53 mutasyonu saptamışlardır. Bu nedenle p53 mutasyonunun invazyonu düşündüğü sonucuna varmışlardır (9).

Bizim çalışmamızda p53 boyanması ile HPV pozitifliği ve tümör derecesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 1).

Ki-67 proteini orijinal olarak ilk defa Gerdes ve arkadaşları tarafından 1983 yılında tarif edilmiş olup çoğalan bütün hücrelerde izlenmiştir. Araştırılan hücre popülasyonunun büyüyen bölümünü değerlendirmede kullanılan önemli bir marker olmuştur (52). İnsan Ki-67 proteinine karşı antikorların mikroenjeksiyonu işlemi sonrasında hücre bölünmesinde azalma izlenince Ki-67'nin hücre proliferasyonunda önemli rol oynadığı saptanmıştır (53).

Son yıllarda Ki-67 kullanılarak IHK'sal olarak proliferatif durumun gösterilmesi meme (85), akciğer (86), özofagus (87) ve böbrek karsinomları (88) ile non Hodgkin lenfoma (89)'da önemli bir prognostik gösterge olarak belirtilmiştir. Baş ve boyun kanserleriyle ilgili yapılan yayınların çelişkili sonuçları olsa da genel olarak Ki-67 proliferasyon indeksi ile prognoz arasında hiçbir korelasyon gösterilememiştir (90).

Izawa ve arkadaşları 67 SHK'lı ve 22 skuamöz displazili hastadan oluşan araştırmalarında Ki-67 ekspresyonunun kötü diferansiye tümörlerde iyi diferansiye lezyonlarla karşılaştırıldığında belirgin olarak yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir ($P < 0.01$) (91). Krecicki ve arkadaşları 25 normal-hiperplastik larinks epiteli, 21 displastik epitelyal lezyon ve 154 laringeal SHK içeren retrospektif analizlerinde malign lezyonlar ile premalign lezyonlar, normal-hiperplastik epitel arasında Ki-67 skorunun belirgin farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir (92). Yazarlar Ki-67 ekspresyonu ile laringeal lezyonun ciddiliğinin korele olduğunu belirtmişlerdir. Acikalin ve arkadaşları 63 laringeal SHK'lı olgudan oluşan çalışmalarında ortalama Ki-67 proliferasyon indeksi ve tümör evresi ($P < 0.05$), lenf nodu metastazı ($P = 0.001$) ve rekürrens ($P < 0.001$) arasında belirgin korelasyon bildirmişlerdir (93). Ayrıca Kaplan–Meier hayatta kalma eğrileri, yüksek Ki-67 proliferasyon indeksinin kısa hastalıksız sağ kalım süresiyle korele olduğunu göstermektedir ($P < 0.0001$). Ortalama Ki-67 proliferasyon indeksi ile tümör yerleşimi ve histolojik grade arasında belirgin ilişki saptanmamıştır. Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise baş boyun kanserli biyopsi vakalarında Ki-67 ile boyanan tümör hücrelerinin lenf nodu metastazlarının tesbitinde prediktif değeri olduğu saptanmıştır (94).

Mirza ve arkadaşları histolojik olarak laringeal mukozal displazisi olan 80 olguda Ki-67 için IHK'sal test yapmış ve boyanma yoğunluğuna göre 0 ve 4 arasında

skalada kategorize etmiştir. Hastalar takip edilmiş ve 20 tanesinde malign karsinom geliştiği görülmüş. Yazarlar Ki-67'nin maksimum ekspresyon değerlerinin (Ki-67 skoru 3 ve 4 olan displazili vakalar) laringeal SHK için yüksek spesifik (%80) olduğu sonucuna varmışlardır (95).

Diğer taraftan bazı çalışmalar SHK ve Ki-67 indeksi arasında herhangi bir ilişki bulamamıştır. Rodrigues ve arkadaşları altı iyi diferansiye ve 10 orta-kötü diferansiye glottik SHK'li vakadan oluşan çalışmalarında tümör evresi ile Ki-67 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (96). Teppo ve arkadaşları laringeal SHK'si olan 100 olgudan oluşan çalışmalarında Ki-67 ekspresyonunun vakaların prognozu üzerine bir etkisi olmadığı sonucuna varmışlar (97). Benzer şekilde Kumar ve arkadaşları da 52 hastadan oluşan kohortlarında Ki-67 ekspresyonu ile nodal metastaz arasında anlamlı bir ilişki bulamamıştır (98). Bizim çalışmamızda da Ki-67 ekspresyonu ile diferansiyasyon, yerleşim, yaş, cinsiyet ve HPV DNA varlığı arasında anlamlı ilişki saptanmadı. Fakat Ki-67 ile p53 boyanmaları istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0$).

Tümörün ortaya çıkması için çok çeşitli moleküler faktörler arasında karşılıklı ilişkiler olması gerekliliği günümüzde onkogenezis için kabul edilen görüştür. Bu faktörler tümör süpresör genler, bazı viral onkogenler ile hücrel proliferasyon, apoptozis ve diferansiasyonu düzenleyen protoonkogenlerdir. Ancak; hücre tipi, genetik zemin ve hücrel çevre gibi çeşitli faktörler nedeniyle karsinogenezis aktivitesi başladıktan sonraki ilerleme sürecini öngörmek zordur.

Bunun yanı sıra; HPV'nin servikal kanserlerde olduğu gibi larinks kanserlerinde de pozitif saptanması, kadınlarda servikal kanserden korunmak için yerleştirilmeye çalışılan aşı programı benzeri bir programın önümüzdeki yıllarda larinks kanserleri için de uygulanması ihtiyacını doğurabilir.

Tüm bu bulguların eşliğinde çalışmamızın tümör prognozu ve tedavisi konularında yeni yaklaşımlara ve araştırmalara ışık tutabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ

Laringeal skuamöz hücreli karsinom baş-boyun kanserleri arasında en sık görülen tümör olması ve her yıl yeni vakaların sayısında artış olması sebebiyle önemli bir sağlık sorunudur. Etyopatogenezinde sigara ve alkol gibi major faktörlerin etkisinin ispatlanmış olmasına rağmen viral enfeksiyonların etkisi de son zamanlarda araştırılmaktadır. HPV enfeksiyonunun servikal kanserdeki rolünün açığa çıkmasından sonra diğer kanser türlerinde de varlığı araştırılmaktadır.

Ki-67 proliferasyon indeksi ve p53 IHK'sal belirteçleri birçok olguda tanı koyma, malign ve benign lezyonların birbirinden ayrımı noktasında yardımcı olmakla beraber son zamanlarda özellikle Ki-67'nin prognostik faktör olarak kullanılabilirliği araştırılmaktadır. Ayrıca biyopsi spesmenlerinde bu boyaların boyanma yoğunluğu ile tümörün derecesi, yaygınlığı ve bilhassa lenf nodu metastazı varlığı ile korelasyon olup olmadığı yine araştırma konusudur.

Biz de yaptığımız çalışmada arşivimizden çıkardığımız 100 laringeal SHK vakasında real time PCR metoduyla HPV DNA'sı varlığını araştırdık. Pozitif vakaların da alt tipini belirledik. Ayrıca p53 ve Ki-67 IHK'sal boyalarını da uyguladık ve boyanma yoğunluğuna göre vakaları gruplandırdık. Olguların tümör derecesi, tümör yerleşimi, yaş ve cinsiyet özellikleri ile yukarıda bahsettiğimiz parametreler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde p53 ve Ki-67 boyalarının kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gördük. Diğer parametrelerimiz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Literatüre baktığımızda da ülkemizde yapılan benzer çalışmalarda laringeal SHK vakalarındaki HPV yüzdesi bizim çalışmamıza yakın olup dünya ortalamasının çok altındadır. Bunun nedenleri; coğrafi farklılıklar, popülasyondaki hijyen alışkanlığı ve cinsel davranış farklılıkları ile kullanılan PCR yönteminin duyarlılığı olabilir. Bu anlamda daha geniş serilerde cinsel davranış, hijyen alışkanlığı ve coğrafi farklılıkları gözetken çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

KAYNAKLAR:

1. Charles E. Moore, Brian J. Wiatrak, Kenneth D. McClatchey, Charles F. Koopmann, Giovanna R. Thomas, Carol R. Bradford and Thomas E. Carey. High-risk human papillomavirus types and squamous cell carcinoma in patients with respiratory papillomas. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 1999, 120; 5: 698-705.
2. Deilson Elgui de Oliveira, Maura M. Bacchi, Ricardo S.S. Macarenco, José Vicente Tagliarini, Ricardo C. Cordeiro, and Carlos E. Bacchi. Human Papillomavirus and Epstein-Barr Virus Infection, p53 Expression, and Cellular Proliferation in Laryngeal Carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2006,126:284-293.
3. Manjarrez ME, Ocadiz R, Valle L, Pacheco C, Marroquin A, De la Torre C, Selman M and Gariglio P. Detection of human papillomavirus and relevant tumor suppressors and oncoproteins in laryngeal tumors. *Clin Cancer Re* 2006, Dec 1;12(23):6946-51.
4. Levine JA. P53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell* 1997; 88:323-331.
5. Finch CE and Tanzi RE, Genetics of aging, *Science* 1997;278: 407-412.
6. Harris CC, Structure and function of the p53 tumor supressor gene: clues for rational cancer therapeutic strtegies, *Journal of The National Cancer Institue* 1996;88: 1442-1546.
7. Greenbatt MS, Bennett WP, Hollstein M and Harris CC, Mutations in the p53 tumor supressor gene:clues to cancer etiology and moleculer pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4877.
8. Jin YT, Kayser S, Kemp BL, Ordonez NG, Tucker SL, Clayman GL, Goepfert H, Luna MA, Batsakis JG and Elnaggar AK. The prognostic significance of the biomarkers p21WAF1/CIP1, p53, and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1998,82:2159-2165.
9. Boyle JO, Hakim J, Koch W, van de Riet P, Hruban RH, Roa RA, Correo E, Eby YJ, Ruppert JM and Sidransky D. The incidence of p53mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 1993,53:4477- 448.
10. Olshan AF, Weissler MC, Pei H and Conway K. p53 mutations in head and neck cancer: new data and evaluation of mutational spectra. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997, 6: 499-504.
11. Va Den Berg M, Tiggies AE, Schipper ME, Hartog-jager ECA, Kroes WGM and Walboomers JMM. Expression of the nuclear oncogene p53 in colon tumours. *Journal of Pathology* 1989;157:1 93-199.
12. Baker S, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger C, Jessup JM, Van Tuinen P, Ledbetter DH, Barker D, Nakamura Y and Vogelstein B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas, *Science* 1989; 244:217-220.
13. Huisman MA, De Heer E and Grote JJ.Cholesteatoma epithelium is characterized by increased expression of Ki-67, p53 and p21, with minimal apoptosis. *Acta Otolaryngol* 2003;123:377-82.
14. Odar İV. *Anatomi Ders Kitabı*. 2. cilt. 7. baskı. Elif Matbaacılık A.Komandit Şirketi, 1980: 170-188.
15. Kirchner JA and Carter D. Pathology of the larynx. In: *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology*. Ed: Mills SE Volume 2. 4 th ed. Gopson Papers Ltd, Noida, India. 2004:1007-1032.
16. Rosai J. Respiratory tract. In: *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. Volume 1. 9 th ed. Elsevier, China, 2004: 335-359.

17. Mills SE and Fechner RE. Larynx and pharynx. In: *Sternberg SS (Ed) Histology For Pathologists*. 2th ed. Lippincott-Raven, China, 1997: 391-403.
18. Ozcan O. Solunum sistemi. In: *Moore KM, Persaud TVN (Eds). İnsan Embriyolojisi, Klinik Yönleri İle*. Türkçe çeviri. 1th ed. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2002: 259-260.
19. Uğur S. *Total larenjektomi uygulanmış hastalarda kolon transit süresinin değerlendirilmesi ve postoperatif yaşam kalitesi*, Uzmanlık tezi, şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, 2005.
20. Kirchner J A and Carter D, : Pathology of the Larynx, Chapter 22: In *Diagnostic Surgical Pathology*. 3rd ed. Editor Sternberg S S.Lippincot Williams & Wilkins. Philadelphia, Baltimore, Newyork. 1999. p: 925-948.
21. Fouret P, Martin F, Flahault A and Saint-Guily JL. Human papillomavirus infection in the malignant and premalignant head and neck epithelium. *Diagn. Mol. Pathol* 1995; 4: 122-127.
22. Larynx and trachea. In: Rosai J, editor. *Surgical Pathology*. 9th ed. Edinburg London Newyork; 2004. p. 305-358.
23. Barnes L, Eveson JW, Reichart P and Sidransky D. *Pathology and genetics of head and neck tumours*. IARC Pres Lyon 2005: 109-145.
24. Münger K, Baldwin A, Edwards EM and Hayakawa H. Mechanisms of human papillomavirus induced oncogenesis. *J Virol* 2004; 78: 11451-60.
25. Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* 2000; 92: 690-98.
26. Herrero R, Castellsague X and Pawlita M. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The international agency for research on cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 2003; 95(23): 1772-1782.
27. Ringström E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M and Kelsey KT. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical cancer research* 2002; 8: 3187-3192.
28. Lele SM, Pou AM, Ventura K, Gatalica Z and Payne D. Molecular events in the progression of recurrent papillomatosis to carcinoma. *Arch pathol lab med* 2002; 126: 1184-1188.
29. Heilmann V and Kreienberg R. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Current Science Inc* 2002; 2: 27-33.
30. Kubar A. Papillomavirusların genel özellikleri. *XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı* S:231-233.
31. Gerald L.Mandell, John E.Bennat and Raphel Dolin. *Principles and Practice of İnfection Disease*. Fifth Edition, Volume 2, S:1160-71.
32. Yugawa T and Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Viro* 2009 Mar;19(2):97- 113.
33. http://en.citizendium.org/wiki/Human_papillomavirus. Erişim tarihi: 06/07/2016.
34. Hausen H. Papillomavirusus and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Publishing Group* 2002; 2: 342-350.
35. Garcea RL and DiMaio D. *The papillomaviruses*. Springer 2007: p:181.
36. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD, *Molecular Biology of the cell*, 3th Ed.,Garland Pupliching, New york, 1255-1295. , 1994.
37. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD *Molecular Biology of the cell*, 3th Ed.,Garland Pupliching, New york, 865-901, 1994.

38. Levine JA, Momand J and Finlay CA. The p53 Suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 435-455.
39. Nigro MJ, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N and Baylin S. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989; 340: 705-707.
40. Prives C, and Hall PA. An overview of p53 structure and function, *Journal of pathology* 1999;187:112-126.
41. Lane DP. P53, A dieth in the life of p53. *Nature* 1993;358: 15-16.
42. Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Whal GM. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* 1992;70: 923-935.
43. Dowel PS and Hall AP. The p53 tumour suppressor gene and tumour Prognosis: is there a relationship? *Journal of Pathology* 1995;177:221-224.
44. Va Den Berg M, Tiggies AE, Schipper ME, Hartog-jager ECA, Kroes WGM and Walboomers JMM. Expression of the nuclear oncogene p53 in colon tumours. *Journal of Pathology* 1989;157:1 93-199.
45. Baker S, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger C, Jessup JM, Van Tuinen P, Ledbetter DH, Barker D, Nakamura Y and Vogelstein B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas, *Science* 1989; 244:217-220.
46. Cotran RS, Kumar V and Collins T. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6 th Ed., Philadelphia, 1999.
47. Oren M. Regulation of The p53 Tumor Suppressor Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 51: 36031-36034.
48. Sheikh MS and Fornace AJ Jr. Role of p53 family members in apoptosis. *Journal of Cellular physiology* 2000;182:171-181.
49. Timoty F, Burns S and Wafik S. The p53 pathway and apoptosis. *Journal of cellular Physiology* 1999;181:231-239.
50. Mori N, Wada M, Yokota J, Terede M, Okada M, Teramura M, Masuda M and Motoji T. Mutations of the p53 tumorsuppressor gene in hematologic neoplasms. *British Journal of Haematology* 1992;81: 235-240.
51. Gerdes J, Schwab U, Lemke H and Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983 Jan 15; 31: 13-20.
52. Scholzen T and Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000 Mar;182:311-22.
53. Endl E and Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res*. 2000 Jun 15;257:231-7.
54. Duchrow M, Gerdes J and Schluter C. The proliferation-associated Ki-67 protein: definition in molecular terms. *Cell Prolif*. 1994 May;27:235-42.
55. Gibson UE, Heid CA and Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996;6:995- 1001.
56. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169-93.
57. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J and Lind K. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 95-125.
58. Kubista M, A Stalberg A and Bar T. Light-up probe based real-time Q-PCR. In: Raghavachari R, Tan W, eds. *Genomics and Proteomics Technologies*. 1st ed. *Proceedings of SPIE*; 2001.p.53-8.

59. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J and van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003;17:1013-34.
60. Cacherill FR and Uhl JR. Applications and challenges of RealTime PCR for the Clinical Microbiology Laboratory. In: Reischl U, Wittwer C, Cockerill FR, eds. *Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications*. 1st ed. Germany: Heidelberg; 2001. p.11.
61. Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, Pedersen NC and Lutz H. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *J Virol Methods* 1999; 77: 37-46.
62. Tyagi S and Kramer FR. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 303-8.
63. Chaplin BE, Rasmussen RP, Bernard PS and Wittwer CT. LightCycler™ hybridization probes the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection. *Biochemica* 1999;1:5-8.
64. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA and Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22:130-1, 134-8.
65. Barnes L, Eveson JW, Reichart P and Sidransky D. WHO *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours* IARC Press Lyon, 2005: 119.
66. Çetin M, Kahraman N, Kırdar S, Erpek M and Meteoglu İ. Frequency of Human Papillomavirus in Larynx Squamous Cell Carcinoma, Clinicopathological Correlation of p53 and Ki-67 Expressions. *ADU Tıp Fak Derg* 2014; 15(2): 55-61.
67. Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancer. *Appl Pathol* 1987; 5: 19–24.
68. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005; 32S: S59–66.
69. Bernard HU. The clinical importance of nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 2005;32S:S1-6.
70. Chaudhary AK, Singh M, Sundaram S and Mehrotra R. Role of human papillomavirus and its detection in potentially malignant and malignant head and neck lesions: updated review. *Head Neck Oncol* 2009 Jun 25;1(1):22.
71. Saheb Jamee M, Boorghani M, Ghaffari SR, Atarbashi Moghadam F and Keyhani A. Human papillomavirus in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009 Oct 1;14(10):525-8.
72. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L and Campisi G. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol* 2008 Oct;19(10):1681-90. Epub 2008 Jun 16.
73. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P and Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005 Feb;14(2):467-75.
74. Shi W, Kato H, Perez-Ordóñez B, Pintilie M, Huang S, Hui A, O'Sullivan B, Waldron J, Cummings B, Kim J, Ringash J, Dawson LA, Gullane P, Siu L, Gillison M and Liu FF. Comparative Prognostic Value of HPV16 E6 mRNA Compared With In Situ Hybridization for Human Oropharyngeal Squamous Carcinoma. *J Clin Oncol* 2009 Nov 2.

75. Miller CS and Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:622–35.
76. Brandwein MS, Nuovo GJ and Biller H. Analysis of prevalence of human papillomavirus in laryngeal carcinomas. Study of 40 cases using polymerase chain reaction and consensus primers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993 Apr;102(4 Pt 1):309-13.
77. Almadori G, Cadoni G, Cattani P, Posteraro P, Scarano E, Ottaviani F, Paludetti G and Maurizi M. Detection of human papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinoma by polymerase chain reaction. *Eur J Cancer* 1996 May;32A(5):783-8.
78. Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, Kyroudi A, Rassidakis AN, Ikonomopoulos JA, Barbatis C, Herrington CS and Kittas C. Human papilloma virus (HPV) is possibly involved in laryngeal but not in lung carcinogenesis. *Hum Pathol* 1999 Mar;30(3):274-83.
79. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S and Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis* 2009 May 1;199(9):1263-9.
80. Kreuter A and Wieland U. Human papillomavirus-associated diseases in HIV-infected men who have sex with men. *Curr Opin Infect Dis* 2009 Apr;22(2):109-14.
81. Öktem F, Aydın S, Öz F, Toprak M and Ada M. Bas-Boyun kanserlerinde human papillomavirüs enfeksiyonunun rolü. *K.B.B. ve Bas Boyun Cerrahisi Dergisi* 2000, 8 (1): 51-57.
82. Güvenç MG, Midilli K, İnci E, Ergin S, Sar M, Özergil E, Kuşkucu M, Öz B, Özdoğan A ve Altas K. Larenksin primer karsinomlarında human papillomavirüs (HPV) varlığının ve larenks karsinomu ile HPV ilişkisinin araştırılması. *XXVII. Türk Ulusal Otolarengoloji ve Bas Boyun Cerrahisi Kongresi, Kongre Kitabı*. 506.
83. Jacob SE, Sreevidya S, Chacko E and Pillai MR. Cellular manifestations of human papillomavirus infection in laryngeal tissues. *J Surg Oncol* 2002;79:142-150.
84. Roepman P, Wessels LFA, Kettelarij N, Kemerer P, Miles AJ, Lijnzaad P, Tilanus MG, Koole R, Hordijk GJ, van der Vliet PC, Reinders MJ, Slootweg PJ and Holstege FC. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat Genet* 2005;37:182-186.
85. Wintzer HO, Zipfel I, Schulte-Mönting J, Hellerich U and von Kleist S. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer* 1991;67(2):421–428.
86. Tungekar MF, Gatter KC, Dunnill MS and Mason DY. Ki-67 immunostaining and survival in operable lung cancer. *Histopathology* 1991;19(6):545–550.
87. Youssef EM, Matsuda T, Takada N et al (1995) Prognostic significance of the MIB-1 proliferation index for patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 76(3):358–366.
88. Aaltomaa S, Lipponen P, Ala-Opas M, Eskelinen M and Syrjänen K (1997) Prognostic value of Ki-67 expression in renal cell carcinomas. *Eur Urol* 31(3):350–355.
89. Holte H, de Lange Davies C, Beiske K et al (1989) Ki67 and 4F2 antigen expression as well as DNA synthesis predict survival at relapse/tumour progression in low-grade B-cell lymphoma. *Int J Cancer* 44(6):975–980.
90. Cordes C, Münzel AK, Rudolph P, Hoffmann M, Leuschner I and Gottschlich S. Immunohistochemical staining of Ki-67 using the monoclonal antibody Ki-s11 is a

prognostic indicator for laryngeal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2009;29(4):1459–1465.

91. Izawa H, Yonemitsu N, Shin T and Sugihara H. Histopathological analysis of apoptosis, and expression of p53, bcl-2, bax, and Ki-67 in laryngeal squamous cell carcinomas and dysplasia. *Auris Nasus Larynx* 1999;26(3):317–330.

92. Krecicki T, Jelen' M, Zaleska-Krecicka M, Rak J, Szkudlarek T and Jelen'-Krzyszewska J. Epidermal growth factor receptor (EGFR), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in laryngeal epithelial lesions. *Oral Oncol* 1999;35(2):180–186.

93. Acikalin MF, Oner U, Tel N, Pasaoglu O, Cakli H and Colak E. Prognostic significance of Ki-67 expression for patients with laryngeal squamous cell carcinoma primarily treated by total laryngectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009;261(7):376–380.

94. Liu M, Lawson G, Delos M et al. Predictive value of the fraction of cancer cells immunolabeled for proliferating cell nuclear antigen or Ki67 in biopsies of head and neck carcinomas to identify lymph node metastasis: comparison with clinical and radiologic examinations. *Head Neck* 2003;25(4):280–288.

95. Mirza S, Jeannon JP, Soames J and Wilson JA. Is Ki67 a marker for the transformation of laryngeal dysplasia to carcinoma? *Acta Otolaryngol* 2006;126(4):418–421.

96. Rodrigues RB, Motta Rda R, Machado SM et al. Prognostic value of the immunohistochemistry correlation of Ki-67 and p53 in squamous cell carcinomas of the larynx. *Braz J Otorhinolaryngol* 2008;74(6):855–859.

97. Teppo H, Soini Y, Melkko J, Koivunen P and Alho OP. Prognostic factors in laryngeal carcinoma: the role of apoptosis, p53, proliferation (Ki-67) and angiogenesis. *APMIS* 2003;111(4):451–457.

98. Kumar RV, Shenoy AM, Daniel R and Shah KV. Cyclin D1, p53, MIB1, intratumoral microvessel density, and human papillomavirus in advanced laryngeal carcinoma: association with nodal metastasis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131(4):509–513.