

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

LARENGEAL NEOPLAZİLERDE PEPSİN ENZİMİ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Hamdi TAŞLI

Tbp.Kd.Ütđm

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakóltesi'nin
Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Uzmanlık Eđitimi İçin Öngördüğü

TIPTA UZMANLIK TEZİ

olarak hazırlanmıŐtır.

TEZ DANIŞMANI

Ahmet Hakan BİRKENT

Doç. J. Tbp. Alb.

ANKARA

2016

GATA Askeri Tıp Fakóltesi Dekanlığı'na:

"Larengeal neoplazilerde pepsin enzimi varlığının araştırılması" konulu bu çalışma jürimiz tarafından Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Doç. J. Tbp. Alb. Ahmet Hakan BİRKENT ()

Başkan: Prof. Hv. Tbp. Tuğg. Mustafa GEREK ()

Üye: Prof. Dr. Gürsel DURSUN (Ankara Üni. KBB AD.) ()

Üye: (Yd.) Prof. Hv. Tbp. Kd. Alb. Fuat TOSUN ()

Üye: (Yd.) Prof. Dr. Alper CEYLAN (Gazi Üni. KBB AD.) ()

ONAY:

Tbp. Kd. Ütğm Hamdi TAŞLI (2009-24)'nın 30.06.2016 tarihinde savunduğı bu tez Akademi Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve kabul edilmiştir.

Hayati BİLGİÇ

Prof. Tbp. Tüma.

GATA K. Bil. Yrdc.

Askeri Tıp Fakóltesi Dekanı ve

Eğitim Hastanesi Baştabibi

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması Gülhane Askeri Tıp Akademisi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 21.11.2014 tarih ve 3700-460-14/1574-460 sayılı emri ile verilmiş ve çalışmaya başlanmıştır.

Uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde büyük emeği olan Anabilim Dalı Başkanım ve saygıdeğer hocam Prof. Dr. Mustafa GEREK'e, tez çalışmam süresince daima beni yönlendiren, bana destek olan ve benden yardımlarını esirgemeyen, ayrıca eğitimimde büyük katkıları bulunan danışman hocam Doç. Dr. A.Hakan BİRKENT'e teşekkürü borç bilirim.

Kulak Burun Boğaz hekimi olarak yetişmemde büyük katkıları olan, bilgi ve deneyimlerini bana aktaran kliniğimizin saygıdeğer öğretim üyeleri Prof. Dr. Fuat TOSUN, Prof. Dr. Bülent SATAR, Doç. Dr. M.Timur AKÇAM, Doç. Dr. Serdar KARAHATAY, Doç. Dr. Abdullah DURMAZ ve Yrd. Doç. Dr. H.Hüseyin ARSLAN'a, uzmanlık eğitimimde sürekli bana yol gösteren, her zaman değerli yardımlarını gördüğüm ve bilgilerinden istifade ettiğim Doç. Dr. Ömer KARAKOÇ'a teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Daima desteklerini yanımda hissettiğim ve birlikte çalışma zevkini yaşadığım başta Uzm. Dr. Ümit AYDIN ve Uzm. Dr. Murat BINAR olmak üzere tüm doktor arkadaşlarıma, GATA KBB Anabilim Dalının görevli tüm hemşire ve çalışanlarına şükranlarımı sunarım.

Bugünlere gelmemde büyük emek sahibi olan sevgili aileme ve ihtisasım süresince hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan sevgili eşim Esin ve oğlum Kağan TAŞLI'ya teşekkür ederim.

Dr. Hamdi TAŞLI

ANKARA - 2016

ÖZET

“Larengeal Neoplazilerde Pepsin Enzimi Varlığının Araştırılması”

Larengofarengeal reflü (LFR) hastalığının larenks neoplazileri için önemli bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir, ancak aralarındaki nedensellik ilişkisi halen ortaya konulamamıştır. Bu çalışmanın amacı larenks neoplazilerinin gelişiminde LFR hastalığının olası rolünü ortaya koymak amacıyla, çeşitli larengeal patoloji spesimenlerinde bir gastrik enzim olan pepsinin varlığını araştırmaktır.

Çalışma kapsamında üç grup patoloji spesimeni değerlendirildi. İlk grupta; Eylül 2010 ve Ağustos 2015 tarihleri arasında GATA KBB AD.'da ileri evre larenks yassı hücreli karsinomu (YHK) tanısı ile total larenjektomi ameliyatı gerçekleştirilen hastalara ait, histopatolojik inceleme ile tanısı doğrulanan ve GATA Patoloji AD. arşivinde parafinize halde muhafaza edilen 29 malign patoloji spesimeni, ikinci grupta ilk grup ile aynı şekilde muhafaza edilen ve aynı hastalara ait olan, malign larengeal neoplazilerin komşuluğundan örneklenen 29 benign patoloji spesimeni ve son grupta ise vokal kord nodülü, polibi ve intrakordal kisti gibi benign larengeal neoplaziler nedeniyle opere edilen ilk iki gruptan bağımsız 30 hastaya ait benign patoloji spesimenleri incelendi. Tüm çalışma gruplarını oluşturan malign ve benign patoloji spesimenleri, pepsin enzimi varlığının ortaya konulması ve seviyesinin tespiti amacıyla immünolojik testler olan Western-Blot (WB) ve Enzyme-Linked Immüno Sorbent Assay (ELISA) testleri ile değerlendirildi. WB ve ELISA testleri analizlerinin doğru gerçekleştirildiğinden emin olunması amacıyla her iki test aynı zamanda birer adet rat mide spesimeni ve postoperatif olarak serum içerisinde muhafaza edilen taze malign larenks patoloji spesimenine uygulandı.

Çalışmada larenks malign neoplazisi doku örneklerinin malign ve benign alanları, larenks benign neoplazisi doku örnekleri ve postoperatif olarak serum içerisinde muhafaza edilen taze larenks malign neoplazisi doku örnekleri incelemesinde, WB ve ELISA test sonuçlarına göre pepsin enzimi varlığına rastlanmadı. Yalnızca rat mide doku örneklerinde, her iki tetkik ile değerlendirilmesi sonrası pepsin enzimi tespit edildi.

Bu çalışma sonucunda, ister taze ister formol ile fikse ve parafinize (FFP) olarak muhafaza edilsin, malign ve benign neoplazi doku örneklerinin hiçbirinde pepsin enzimi tespit edilmemiştir. Bu nedenle pepsin enziminin ve dolayısıyla LFR hastalığının, larengeal neoplazilerin gelişiminde rol oynayan bir risk faktörü olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu olası ilişkiyi ortaya koymak amacıyla daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler : Larengofarengeal reflü, pepsin, larenks neoplazileri

Yazar adı : Tbp. Kd. Ütğm. Hamdi TAŞLI

Tez Danışmanı : Doç. J. Tbp. Alb. A. Hakan BİRKENT

SUMMARY

“Assessment of Pepsin Enzyme in Laryngeal Neoplasms”

Laryngopharyngeal reflux (LPR) disease is thought to be a significant risk factor for laryngeal neoplasms although a causal relationship between them is still yet to be proven. The objective of this study was to determine the role of pepsin as a LPR marker in the development of laryngeal neoplasms.

Three groups were investigated in our study. A total of 29 malign pathology specimens of laryngeal cancer patients who had undergone total laryngectomy were evaluated in the first group. The benign sides of 29 malign specimens belonged to the same patients with laryngeal cancer were included in the second group. Thirty patients with benign laryngeal lesions as vocal cord nodules, polyps and cysts, independently operated from the first two groups were included in the third group. All of these specimens were confirmed histopathologically and maintained in paraffin blocks in the pathology department. Western-Blot (WB) and Enzyme-Linked Immüno Sorbent Assay (ELISA) analysis were used for measurement of pepsin levels taken from both malign and benign laryngeal tissue specimens. In order to determine whether both Western-Blot and ELISA analysis were done correctly, also rat stomach tissues and fresh tissue samples of laryngeal cancer exposed to saline postoperatively were investigated.

In all malign pathology specimens of laryngeal cancer, benign sides of the malign specimens, benign lesions and the fresh malign tissue samples exposed to saline, pepsin was not detected. Only the rat stomach tissues applied with Western-Blot and ELISA analysis were positive.

This study showed that pepsin is not presented in any of malign or benign pathologies whether the specimen maintained with paraffin or not and it seems difficult to say pepsin indicates the relationship between reflux and larynx cancer. This study suggest that further studies are needed to verify the role of pepsin in laryngeal neoplasms.

Keywords : Laryngopharyngeal reflux, pepsin, laryngeal neoplasms

Author : Hamdi TAŞLI, MD

Thesis Advisor : A. Hakan BİRKENT, MD, Associate Professor

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.iv
İNGİLİZCE ÖZET	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 LARENKS.....	3
2.1.1 Larenks embriyolojisi.....	3
2.1.2 Larenks anatomisi.....	3
2.1.3 Larenks ve vokal kord histolojisi.....	7
2.1.4 Larenks fonksiyonları.....	7
2.2 LARENGO-FARENGEAL REFLÜ.....	8
2.2.1 Larengo-farengeal reflü fizyopatolojisi.....	8
2.2.2 Larengo-farengeal reflü ile gastroözefageal reflü farkları.....	10
2.2.3 Larengo-farengeal reflüde bulgu ve semptomlar.....	12
2.2.4 Larengo-farengeal reflüde tanı.....	16
2.2.5 Larengo-farengeal reflüde tedavi.....	19
2.2.6 Larengo-farengeal reflü pepsin ilişkisi.....	23
2.2.7 Larengo-farengeal reflü larenks benign neoplazileri ilişkisi.....	24
2.2.8 Larengo-farengeal reflü larenks kanseri ilişkisi.....	25
2.2.9 Dokuların formol ile fiksasyonu ve parafinizasyonu.....	27
2.2.10 Formol ile fikse ve parafinize (FFP) dokularda protein analizi.....	29
2.3 LARENKS BENİGN NEOPLAZİLERİ	30

2.3.1 Larenks benign neoplazilerinin özellikleri.....	30
2.3.2 Larenks benign neoplazilerinin özelliklerinde tanı ve tedavi	31
2.4 LARENKS KANSERİ	32
2.4.1 Larenks kanserlerinin özellikleri.....	32
2.4.2 Larenks kanserlerinin evrelemesi.....	34
2.4.3 Larenks kanserlerinde tanı ve tedavi.....	36
3 GEREÇ VE YÖNTEM	39
4 BULGULAR	43
5 TARTIŞMA.....	48
6 SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
7 KAYNAKLAR	67

KISALTMALAR

KBB	: Kulak Burun Boğaz
GÖR	: Gastroözefageal Reflü
LFR	: Larengofarengeal Reflü
YHK	: Yassı Hücreli Karsinom
ELISA	: Enzyme-Linked İmmünoSorbent Assay
SLS	: Süperior Larengeal Sinir (Nervus Larengeus Süperior)
RLS	: Recurren Larengeal Sinir (Nervus Laryngeus Recurrens)
ÜÖS	: Üst Özefagus Sfinkteri
AÖS	: Alt Ozofagus Sfinkteri
VIP	: Vazoaktif İntestinal Peptid
EGF	: Epitelyal Growth Faktör
RSİ	: Reflü Semptom İndeksi
RBS	: Reflü Bulgu Skoru
TUAS	: Tıkayıcı Uyku Apnesi Sendromu
TNÖ	: Transnazal Özefagoskopi
Mii	: Multikanallı İntroluminal İmpedansmetri
KA	: Karbonik Anhidraz
PPI	: Proton Pompa İnhibitörleri
H2RA	: H2 Reseptör Antagonistleri
SDS-PAGE	: Sodyum Dodecyl Sülfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
FFP	: Formol ile Fiske ve Parafinize
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
PET	: Pozisyon Emisyon Tomografi
SPECT	: Single Photon Emission Computed Tomography
EKY	: Ekstra Kapsüler Yayılım
LC-MS	: Liquid chromatography-mass spectrometry
SHİ	: Ses Handikap İndeksi
MDVP	: Multi Dimensional Voice Program

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Larengofarengeal Reflü (LFR) ve Gastroözefageal Reflü (GÖR) farklılıkları

Tablo 2: Görölme sıklığına göre LFR semptomları

Tablo 3: Reflü Semptom İndeksi (RSi)

Tablo 4: Reflü Bulgu Skoru (RBS)

Tablo 5: TNM evreleme sistemi

Tablo 6: Malign larengeal dokuların histopatolojik özellikleri

Tablo 7: Formol ile Fikse ve Parafinize (FFP) malign ve benign patoloji spesimenleri, taze donmuş malign patoloji spesimeni ve taze donmuş rat mide spesimeni pepsin varlığı değerlendirilmesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Larenks kıkırdakları önden görünümü

Şekil 2: Larenks kıkırdakları yandan görünümü

Şekil 3: Fiberoptik endoskopik muayenede tipik reflü bulguları

Şekil 4: Western-blot kuru jel transferi cihazı (iblot® 2 GEL TRANSFER DEVICE (ThermoFisher Scientific®))

Şekil 5: Qubit 2.0 Fluorometer cihazı ve Bolt Mini Jel Tankı ve Güç Kaynağı (ThermoFisher Scientific®)

Şekil 6: Malign ve benign hasta grupları yaş ortalamaları ve cinsiyete göre dağılımları

Şekil 7: Malign larengeal dokuların (malign taraf) anatomik yerleşimleri

Şekil 8: Malign larengeal dokuların (benign taraf) anatomik yerleşimleri

Şekil 9: Malign larengeal dokularda lenf nodu metastazı

Şekil 10: Malign larengeal dokularda TNM evrelemesi

Şekil 11: Benign larengeal dokularda patoloji türleri

Şekil 12: Benign larengeal dokuların anatomik yerleşimi

Şekil 13: Malign ve benign hasta gruplarında sigara kullanımı

Şekil 14: a) Rat mide dokusu spesimeninde Western-Blot (WB) ile pepsin enzimi varlığı tespit edildi (Bio-Rad Gel Doc XR+ Jel Görüntüleme Sistemi ile tespit edilen pepsin bandı, sola bakan ok ucunda gösterilmekte), **b)** Formol ile fikse ve parafinize (FFP) malign larenks patoloji spesimenlerinde (*malign taraf, örnek no:10-18*) Western-Blot (WB) ile pepsin varlığına rastlanmadı.

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Gastroözefageal reflü (GÖR); mide içeriğinin özefagusa spontan ve eforsuz regürjitasyonudur. Gastroözefageal reflünün atipik bir formu olan larengofarengeal reflü (LFR) ise mide içeriğinin öğürme veya kusma olmaksızın üst özefageal sfinkteri aşarak geri kaçıışı ile larenks ve farenksde mukozal inflamasyon oluşturması anlamına gelmektedir. Bu reflü epizodları sonucunda herhangi semptomatik klinik durum ya da histopatolojik değişiklik larengofarengeal reflü hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde LFR patogeneze yönelik çalışmalar hala devam etmektedir. Gastrik asit ve pepsin, LFR sonucu oluşan larengeal hasardan primer olarak sorumlu tutulmaktadır. Üst gastrointestinal sistemin temel sindirim enzimi olan pepsin, gastrik şef hücrelerinden inaktif zimojen pepsinojen olarak salgılanan ve asidik ortamda aktif hale gelen bir proteazdır. Ekstraözefageal yapılarda bulunmaz fakat nadiren akciğer ve üst hava yollarında saptanabilir. Pepsin reflü patogenezinde mide asidi ile birlikte kilit rol oynar. Pepsin, larenks ve hipofarenks, trakea, akciğer, sinüs, orta kulak, tükürük ve sürüntü örnekleri üzerinden hem invaziv olarak doku biyopsileri ile hem de non-invaziv sürüntü örnekleri ile, immünolojik (Western-Blot, Enzyme-Linked Immüno Sorbent Assay (ELISA)) ve enzimatik (Pepsin Assay) olarak tespit edilebilmektedir. Maksimum aktivitesini ph: 2'de gösterir iken, ph: 6.5'de inaktive-stabilize olur ve ph: 8'de denature olur. Ancak yapılan çalışmalarda pepsinin ph: 7'de bile kronik inflamasyon ve immün yanıt zemini üzerinden hücre içerisinde hasar oluşturarak mitokondri hasarı meydana getirdiği ve hücre içerisinde toksititeye neden olan gen ekspresyonlarını arttırdığı ortaya konulmuştur (1). Ayrıca yapılan hayvan çalışmalarında pepsinin yassı hücreli kanser tümör volumunda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha fazla artışa neden olduğu ve karsinogeneze önemli rol oynadığı ortaya konulmuştur (1).

Larenksin yassı hücreli kanseri (YHK) üst solunum ve sindirim sisteminin en sık görülen kanseridir. Larenks kanserleri baş-boyun bölgesi kanserlerinin %25'ini, tüm vücut kanserlerinin %2-3'ünü ve yaklaşık olarak yeni tanı almış kanserlerin %1'ini oluşturmaktadır (2). Özellikle 1980'li yılların ikinci yarısından itibaren yapılan çalışmalarda, larenks kanseri hastalarının bir kısmınının sigara ve alkol tüketmediği anlaşılmış ve kanser gelişiminde başka endojen risk faktörlerinin olabileceği düşünülmüştür. Aynı zamanda çeşitli larenks neoplazilerinde, GÖR ve LFR hastalıkları sonucu hipofarenks ve larenksde gastrik içerik maruziyeti olduğunun anlaşılması sonrası reflünün, larenks mukozası üzerinde hem benign hem de malign değişikliklere yol açabileceği ve

kanserin yanısıra vokal kord nodülü ve polibi gibi benign birtakım neoplazilerin etiyolojisinde rol oynayabileceği düşünülmeye başlanmıştır.

Günümüzde reflü ve larenks neoplazileri ilişkisini ortaya koymak için yapılan çalışmaların birçoğu, kontrol grubunun kısıtlılığı veya kıyaslanamaz olması, tanısal testlerdeki yetersizlik, retrospektif analiz yöntemlerindeki uygunsuzluk ve yanlış hasta seçimleri nedeniyle tutarlı sonuçlara ulaşamamış ve bu çalışmalarda fikir birliğine varılamamıştır (3). Yapılan bir grup çalışmada larenks kanseri ve LFR arasında anlamlı ilişki olduğu ve LFR'nin larenks kanseri açısından bağımsız bir risk faktörü olduğu ifade edilmekte iken; diğer bir grup çalışmada larenks kanseri ile LFR arasında anlamlı ilişki bulunamamış ve reflü kanser etiyolojisinde bir risk faktörü olarak görülmemiştir. LFR ile vokal kord nodülü veya polibi gibi larenks benign neoplazileri arasındaki ilişkiyi inceleyen bir diğer grup çalışmada ise, benign vokal kord neoplazilerinde sağlıklı kontrol gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha fazla patolojik LFR tanısı konulmuş ve reflünün benign larenks neoplazileri patogenezinde önemli rolü olduğu ifade edilmiştir (4).

Bu çalışmada larenks glottik kanseri nedeniyle total larenjektomi ameliyatı gerçekleştirilen hastalar ile benign vokal kord patolojileri nedeniyle opere edilen hastaların, histopatolojik olarak değerlendirilmiş olan ve parafin bloklar içerisinde muhafaza edilen patoloji örnekleri immünohistokimyasal olarak incelendi. Tüm malign ve benign neoplazi spesimenleri, pepsin enzimi varlığının ortaya konulması ve seviyesinin tespiti amacıyla WB ve ELISA testleri ile değerlendirildi. WB ve ELISA testleri analizlerinin doğru gerçekleştirildiğinden emin olunması amacıyla, her iki test aynı zamanda birer adet taze rat midesi ve postoperatif dönemde serum fizyolojik solüsyonu içerisinde muhafaza edilen taze malign larenks doku örneğine uygulandı. Bu çalışmada larenks malign ve benign neoplazi spesimenlerinde pepsin enzimi varlığı araştırılarak pepsinin, dolayısıyla reflünün larenks neoplazileri gelişimindeki rolünün ortaya konulması amaçlandı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 LARENKS

2.1.1 LARENKS EMBRİYOLOJİSİ,

Solunum, konuşma, yutma ve öksürük fonksiyonlarında gibi fonksiyonlarda önemli rol oynayan ve solunum yollarının önemli bir parçası olan larenks, embriyolojik olarak iki farklı taslaktan gelişir. Bukofarengeal tomurcuktan supraglottis, trakeobronşiyal tomurcuktan ise glottis ve subglottis gelişim gösterir. Supraglottisin bukofarengeal tomurcuktan orta hat birleşmesi olmadan gelişmekte olması, larenksin cerrahi olarak bölünmesindeki anatomik ve embriyolojik uyumu ortaya koymakta ve tümörlerin invazyon gibi davranışlarını öngörmede yardımcı olmaktadır.

Postnatal dönemde de gelişmeye devam eden larenks, 25 yaşlarında kemikleşmeye başlar ve 65 yaş civarında bu kemikleşme tamamlanır (5,6).

2.1.2 LARENKS ANATOMİSİ

Larenks erişkinlerde 3-6. servikal vertebralar seviyesinde yerleşmiştir. Çocuklarda ise daha yüksekte yerleşmiş olan larenks, 1-4. servikal vertebralar seviyesinde iken yaş ilerledikçe yavaş yavaş aşağıya iner ve adölesan çağında yetişkindeki yerini alır (5).

Larenks kıkırdak çatısını, epiglot, tiroid, krikoid, aritenoid, kornikulat ve kuneiform kıkırdaklar oluşturur. Çevresindeki yapılara ligament, membran ve adalelerle tutunur. Larenksin üst kenarı serbest olup epiglotun lateral kenarları, ariepiglotik kıvrım, aritenoid bölge ve interaritenoid aralık tarafından oluşturulur. Alt kenarı krikoid kıkırdağın alt kenarından geçen bir planla sınırlıdır. Anterolateral duvarını, tirohyoid membran, tiroidin laminası, krikotiroid adale ve membran, krikoid kıkırdağın ön kornusu yapar. Posterior sınırını ise, ariepiglotik foldlar, aritenoid kıkırdaklar, interaritenoid boşluk ve krikoid kıkırdağı kaplayan mukoza yapar. Vallecula, piriform sinüs ve postkrikoid bölge superior ve inferior hipofarenks alanlarıdır (7,8).

Larenks, kompartizasyon teorisine göre; gelişim, fonksiyon ve lenfovasküler yapı dikkate alınarak üç bölümde incelenmektedir (9).

1. Supraglottik bölge: Epiglotun tepesinden ventrikül apeksine kadar uzanan bölümdür. Epiglotun larengeal yüzü, ariepiglottik foldlar, aritenoid kıkırdağın larengeal yüzü, yalancı vokal kordlar ve ventrikülleri içerir (9). Glottik bölge ile arasındaki anatomik olarak gerçek sınır, vokal

kordun skuamöz epiteli ile ventrikülün respiratuar mukozasıdır. Klinik olarak gerçek sınırı belirlemenin zorluğu nedeniyle, ventrikülün apeksi pratik bir sınır olarak değerlendirilmektedir.

2. Glottik bölge: Ventrikül apeksi ile subglottise doğru 1 cm kadar uzanan bölümdür. Anterior ve posterior komissür, gerçek vokal kordları içine alır (10,11).

3. Subglottik bölge: Glottik ve subglottik bölge arasındaki sınır, vokal kordun serbest kenarının 5 mm altındadır. Subglottik bölgenin alt sınırı ise krikoid kıkırdağın inferior kenarıdır (12).

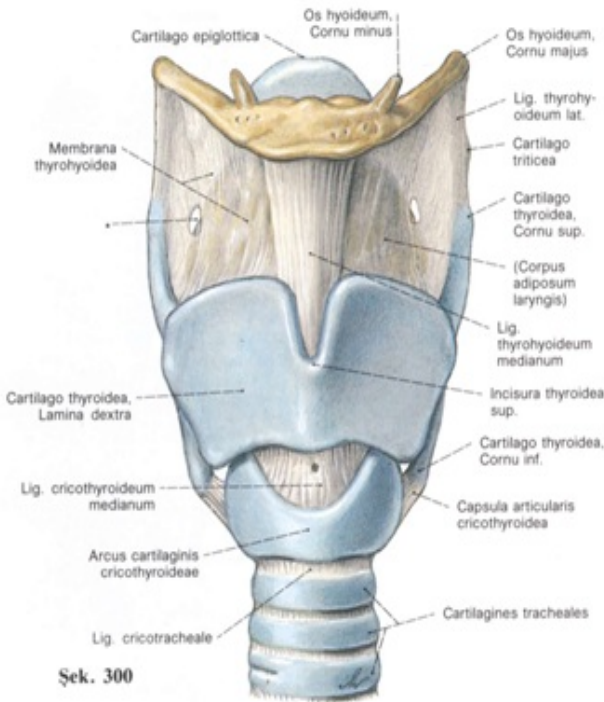
LARENKS KIKIRDAKLARI

1) Tek kıkırdaklar: Üç adet tek kıkırdak vardır (**Şekil 1,2**).

a) Tiroid kıkırdak: Larenksin en büyük tek kıkırdağıdır. Larenksin yumuşak dokularını taşıyarak hava yolunun açık kalmasını sağlar. İki adet ala lamina, ikişer adet üst ve alt kornusu vardır.

b) Krikoid kıkırdak: Solunum yollarında tam bir halka oluşturan tek kıkırdaktır. İntrinsik larenks kaslarının kaynaklandığı bu kıkırdak tüm larenkse temel oluşturur.

c) Epiglot: Larenks üst kısmında ince yaprak biçiminde tek kıkırdaktır. Alt ucu (petiolus), tiroid kıkırdağın iç yüzünde laminaların birleştiği bölgeye bağlanmıştır.



Şekil 1: Larenksin kıkırdakları önden görünüşü (Staubesand J. Larenks. Sobotta İnsan Anatomi Atlası. Türkçe, 3. Baskı, 1.Cilt, Urban &Schwarzenberg München, 1990)



Şekil 2: Larenksin kıkırdakları yandan görünüşü (Staubesand J. Larenks. Sobotta İnsan Anatomi Atlası. Türkçe, 3. Baskı, 1.Cilt, Urban &Schwarzenberg München, 1990)

2) Çift kıkırdaklar: Üç tane çift kıkırdak vardır.

a) Aritenoid kıkırdaklar: Üçgen prizma şeklinde olup çift kıkırdakların en büyüğüdür. Alt yüzeyi krikoid, apeksi ise kornikulat kıkırdakla eklem yapar. Tabanın ön köşesinde vokal çıkıntı bulunur.

b) Kornikulat kıkırdaklar (Santorini Kıkırdağı): Aritenoid kıkırdaklar ile eklem yaparlar.

c) Kuneiform kıkırdaklar (Wrisberg Kıkırdağı): Her ariepiglottik kıvrımda birer tane vardır. Fonksiyonları pasif destek olan bu kıkırdaklar herhangi bir eklem yapmazlar.

LARENKSİN KASLARI

1) Eksternal kaslar: Larenksin bir bütün haliyle hareketi ve fiksasyonu ile ilgilidirler.

a) Hyoid altı kaslar: Sternotiroid, Sternohyoid ve Omohyoid kas larenksi aşağıya çeker. Tirohyoid kas: hyoid fikse ise larenksi kaldırır, larenks fikse ise hyoidi aşağıya çeker.

b) Hyoid üstü kaslar: M.Digastrikus, M.Stilohyoideus, M.Geniohyoideus, M.Milohyoideus, M.Stilofarengus, M. Konstriktör Farengus Media ve Inferior'dur. Larenksi yukarı çekerler.

2) İnternal kaslar: Başlangıç ve bitiş yerleri larengeal yapılar içerisinde kalır.

a) Posterior Krikoaritenoid kas: Abduksiyon gerçekleştirerek glottisi açan tek kasdır.

b) İnteraritenoid kas: Bilateral sinir uyarımı olan tek internal larenks kaslarıdır. Lateral krikoaritenoid kas ise addüksiyon yaptırır.

c) Arieplottik kas: İnteraritenoid kastan ayrılan bazı lifler arieplottik kası oluşturur. Yutma sırasında tiroepiglottik kas ile birlikte epiglotun larengeal girişi kapatmasını sağlar.

d) Tiroaritenoid kas: Tiroid kıkırdağın iç yüzüne tutunarak başlar. Liflerin bir kısmı aritenoid dış kenarına, bir kısmı vokal kas adı ile vokal prosese tutunarak sonlanır.

e) Krikotiroid kas: Superior Larengeal Sinirden (NLS) inerve olan tek kastır. Diğer tüm kaslar Inferior (Rekürren) Larengeal Sinirden (RLS) inerve olurlar.

LARENKSİN MEMBRAN VE BARIYERLERİ

Larenksin membran ve bariyerleri larengeal kompartımanların sınırlarını oluşturan temel destek yapılarıdır;

a) Krikovokal membran (Konus Elastikus): Larenksin alt kısmını sarar ve glottik ve subglottik bölgeyi paraglottik mesafeden ayırır. Önde orta hatta krikotiroid ligameni oluşturacak şekilde birleşir ve krikoid kıkırdağın üst kenarına doğru tutunarak yanlara doğru ilerler. Yukarıda, önde

tiroid kıkırdak, alt kenarında orta hatta birleşir. Serbest kenarı vokal ligameni oluşturacak şekilde arkaya doğru ilerler. Üstte arkada ise vokal prosese tutunarak sonlanır.

b) Kuadrangüler membran: Önde epiglotun serbest kenarına tutunarak başlar ve her iki tarafta arkaya doğru ilerleyerek aritenoid kıkırdağın medial yüzüne tutunur. Üstte ve altta iki serbest kenarı bulunur. Üstteki serbest kenarı ariepiglottik foldu, alttaki serbest kenar ise ventriküler foldu oluşturur.

c) Anterior kommissür tendonu (Broyles tendonu): Her iki vokal ligamen önde birleştikten sonra tiroid kıkırdağa tutunur. Bu bölgede tiroid kıkırdağın iç perikondriumunun olmaması nedeniyle, anterior kommissür lezyonları kolayca tiroid kıkırdağa invazyon yapar. Anterior kommissür tendonu lateral subglottik tümörler için sınırlayıcı olmasına rağmen büyük glottik ve orta hatta yerleşmiş supraglottik tümörler için bir geçiş yoludur.

d) Tirohiyoid membran: Tiroid kıkırdak üst kenarı ile hiyoid kemik korpusu ve büyük boynuzunun alt kenarı arasında uzanır. Preepiglottik boşluğun ön duvarını oluşturur.

e) Krikotiroid membran: Tiroid kıkırdağın alt kenarından krikoid kıkırdağın üst kenarına uzanır.

LARENKS POTANSİYEL BOŞLUKLARI

a) Reinke boşluğu: Vokal kordun mukozasının altında bulunan ve vokal kord boyu boyunca uzanan fibröz yapılardan zayıf subepitelyal konnektif doku tabakasıdır. Etrafı sağlam fibröz dokuyla çevrelenmiştir. Kordun serbest kenarından 2 mm kadar uzaklığa uzanır. Kord kanserlerinin reinke boşluğunda ilerlemesi, lenfatik geçişin göstergesidir (13).

b) Preepiglottik boşluk: Önde tirohiyoid membran ve ligamenti, üstte vallekula mukozası, arkada epiglotun anterior yüzü yer alır (14). Yanlarda paraglottik boşluklara açılır (15). Preepiglottik boşluk, supraglottik tümörlerin, özellikle de epiglottik tümörlerin sıkça invazyon gösterdiği bir alandır (16).

c) Paraglottik boşluk: Glottisin her iki yanında uzanan paraglottik boşluğun sınırlarını; lateralde tiroid kıkırdağın iç perikondriumu ve krikotiroid membran; medialde kuadrangüler membran, ventrikül ve konus elastikus; posteriorda piriform sinüs mukozası oluşturur. Ön-üst kısmında preepiglottik boşluğa açılır (15). Mevcut komşulukları nedeniyle larengeal kanserlerin

yayılımı açısından çok önemli olan paraglottik boşluk glottik, transglottik ve supraglottik tümörlerin ekstralarengeal yayılımlarına olanak sağlayabilir (15).

d) Subglottik boşluk: Vokal kordların alt iç yüzeyinden, krikoidin alt seviyesine kadar uzanır. Yanlarda Konus Elastikus yer alır. Üst bölümü eliptik şekilde iken, alt bölümü aşağıya doğru genişleyerek sirküler bir yapı kazanır ve trakeayla devam eder (17).

2.1.3 LARENKS VE VOKAL KORD HİSTOLOJİSİ

Larenks mukozası silyalı çok katlı kolumnar epitel ve çok katlı yassı epitelden oluşur. Çoğunluğu respiratuar epitel ile döşeli olmakla birlikte epiglotun suprahoid kısmı, ariepiglottik kıvrımların üst kısımları ve vokal kordların serbest kenarları çok katlı yassı epitel ile kaplıdır. Diğer larengeal alanlar ise siliyalı respiratuar epitel ile döşelidir (18). Epitelin altında değişken bir bazal membran ve her ikisini birbirinden ayıran gevşek bir fibröz stroma tabakası mevcuttur (13).

Vokal kordlar, ön kommisürden aritenoid kıkırdağın vokal proçesine kadar uzanan ve larenksin vibratuar hareketine katılan tek yapıdır. Sırasıyla;

1. Keratinize olmayan çok katlı yassı epitel,
2. Lamina proprianın yüzeysel tabakası (Reinke boşluğuna uyan, daha çok amorf madde),
3. Lamina proprianın orta tabakası (Çoğunlukla elastik lifler),
4. Lamina proprianın derin tabakası (Çoğunlukla kollajen lifler),
5. Vokalis kası tabakalarından oluşmaktadır.

Tiroid, aritenoid ve krikoid kıkırdak hiyalen tipte olup, epiglot ve diğerleri ise elastik tiptedir. Hiyalin kıkırdaklar yaşlanmayla kalsifikasyona uğrayabilir (19).

2.1.4 LARENKS FONKSİYONLARI

1. Fonasyon (Konuşma)
2. Respirasyon (Solunum)
3. Proteksiyon (Alt solunum yollarının korunması)
4. Deglutisyon (Yutmaya yardımcı rolü)
5. Ekspektorasyon (Öksürük)
6. Sirkülasyon (Dolaşıma yardımcı fonksiyonu)
7. Emosyonel Fonksiyon

2.2 LARENGOFARENGEAL REFLÜ (LFR)

Yunancada “geri kaçış” anlamına reflü, tanım olarak gastrik içeriğin retrograt olarak özefagusa, farenks ve larenks seviyesine iştiraki olarak ifade edilebilir. Gastroözefageal reflünün (GÖR) larengo-farengeal manifestasyonlarından olduğu düşünülen LFR ilk kez J. Cherry (20) ve K. Malcoson (21) tarafından 1968 yılında tanımlanmıştır. LFR klinik seyri ve ortaya çıkardığı semptomlar nedeniyle aynı zamanda atipik reflü, ekstraözefageal reflü, gastrofarengeal reflü, farengoözefageal reflü, reflü larenjit, supraözefageal reflü gibi bir çok farklı şekilde de isimlendirilmektedir. Tarihte LFR ile ilgili tanımlanan ilk larengeal lezyon larenks ülseri ve granülomu iken, zamanla posterior larenjit, larengeal stenoz ve larengeal kanser ile yakından ilişkisi olduğu ortaya konulmuştur. 1987 yılında ilk defa Wiener (22), hem farenkse (üst özefagus sfinkterinin hemen üstüne) hem de özefagusa pH probu yerleştirerek 24 saatlik ambulator çift problu pH monitorizasyonu yaparak klinik LFR’si olan hasta grubunun çoğunda farenkste asit varlığını göstermiştir.

2.2.1 LFR FİZYOPATOLOJİSİ

LFR, özefagus anti-reflü bariyerlerinin yapısı veya fonksiyonlarındaki bozulma sonucunda ortaya çıkan, mukozal inflamasyon ile sonuçlanan, GÖR’ün en sık izlenen klinik manifestasyonlarından biridir. Larenks mukozası üzerinde meydana gelen inflamasyon ve oluşan immün yanıt, LFR bağımlı hasarın karakteristik özellikleri olarak görülmektedir. LFR’nin fizyopatolojisinde GÖR ile benzer şekilde; üst ve alt özefageal sfinkter yapıları ve fonksiyonlarında, özefageal klirens, özefagus mukoza direnci, özefageal motilite ve gastroözefageal bileşke morfolojisi ile basıncında bozulma önemli yer tutmaktadır. Reflünün başlamasıyla anti-reflü bariyerlerdeki disfonksiyon giderek artar ve oluşan kısır döngü nedeniyle reflü süreklilik kazanır. Anti-reflü bariyerlerin disfonksiyonunda ve reflü oluşumundaki mekanizmalar; (23)

1. Üst özefageal sfinkter disfonksiyonu:

Üst özefageal sfinkter (ÜÖS), istirahatte farenks ile servikal özefagus arasında bulunan farengoözefageal bileşkenin kapalı durmasını sağlayan yüksek basınçlı fiziksel bir bariyerdir (24). Üst özefageal sfinkterin temel amacı diğer anti-reflü bariyerler gibi gastrik içeriğin larenks ve farenkse ulaşmasının engellenmesidir.

ÜÖS fonksiyonunda, krikofarengus ve tiro-farengus kasları ile suprahoid kaslar kilit rol oynamaktadır. Krikofarengus kası ÜÖS'in daha çok alt 1/3 distal lifleri oluştururken, tirofarengus kası ÜÖS'in alt 2/3'lük liflerini oluşturur. ÜÖS açılması; krikofarengus ve tirofarengus kaslarının gevşeyerek larenksin öne hareketi ile suprahoid kasların kasılması sonrası ortaya çıkar. Ancak ÜÖS basıncı bir miyogenik aktivitenin sonucu olmaktan çok, pasif elastik bir hareketin sonucudur. Çok sık değişiklikler gösteren ÜÖS basıncı, uykuda belirgin olarak düşer (25). Manometrik çalışmalarda LFR reflü epizotlarında ÜÖS hipotansiyonunun rolü olmadığını ortaya koymuştur (23). Bu, LFR fizyopatolojisini açıklamada sadece ÜÖS basıncı değişikliklerinin yeterli olmadığını göstermektedir (26,27).

ÜÖS koruyucu fonksiyonları; farengo-glottal kontraktıl refleks, larenksde bulunan mekanoreseptörler ile larenksle temas eden reflü içeriğinin aspirasyonunu önler iken; farengo-sfinkterik kontraktıl koruyucu refleks, posterior farengeal duvardaki mekanoreseptörler aracılığı ile farenkse yükselen asidik içeriğin farenksle daha fazla temasını engeller. Aynı zamanda larenks ve farenks mukozal uyarısı da mekanoreseptörler ile beraber afferent uyarıda rol oynar. LFR sonucunda oluşan gastrik içeriğin mukozal irritasyonu ve oluşan inflamatuvar reaksiyon ile larengeal mukozal sensöriyel defisit ve mekanoreseptörlerde bozulma meydana gelebilir.

2. Alt özefageal sfinkter tonusunda azalma:

Fizyolojik bir sfinkter olan alt özefagus sfinkteri (AÖS); özefagus alt 1/3'ünde, 3-4 cm uzunluğa sahip olan tonik olarak kasılmış düz kaslardan oluşmaktadır. AÖS temel fonksiyonu; özefagogastrik bileşkede distal veya intraabdominal basınçtan daha fazla basınç stabilizasyonu oluşturarak özefagusa reflü geçişinin engellenmesidir. Bu bölgenin yarısı intraabdominal bölgede olmakla birlikte farengoözefageal ligaman adını alır. Alt özefagus sfinkteri, krural diafragmatik kas fibrilleri ile bu ligamana bağlanır, diafragmatik kasılma esnasında simultane olarak alt özefagus sfinkteri kasılır ve reflü engellenir.

AÖS; parasempatik (vagal) ve sempatik (splanknik) sistem etkisi altındadır. Parasempatik sistem vagus hakimiyetinde olup, nükleus traktus solitarius ve dorsal motor nükleus relaksasyondan, rostral motor nükleus ise kontraksiyondan sorumludur. Afferent periferel reseptörler sirküler düz kaslardaki mekanoreseptörler ve mukozal reseptörlerden oluşmaktadır. Vagal uyarı sonrası kolinerjik muskarinik reseptörler düz kaslar üzerine Substans P, NO ve VIP nörotransmitterlerinin salınması ile relaksasyonu sağlarlar.

Hiatal herni, diyetle alınan gıdalar, çeşitli ilaçlar ve hormonlar sfinkter basıncını düşürmekte ve reflüye neden olabilmektedir (28). GÖR hastalarında alt özefageal sfinkter basıncının değişken olduğunu gösteren çalışmalar vardır (29). Bu da alt özefageal sfinkter basıncının tek başına GÖR fizyopatolojisini açıklayamayacağını göstermektedir.

3. Özefagus mukoza direncinin azalması:

Reflü materyali; hidroklorik asit, pepsin, pankreatik enzimler ve safra tuzlarını içermektedir. Oluşturulan hücre hasarı daha çok hidrojen iyonları ve pepsin etkisi ile olmaktadır. Reflü içeriğinin oluşturduğu hasarı ortadan kaldırmak amacıyla anatomik ve fizyolojik sfinkterik bariyerlerin dışında özefageal mukozal direnç de önemli rol oynar. Bu dirençteki bozulma primer olarak epitele ait faktörler nedeniyle olabileceği gibi, tükrük miktarının veya mukus yapımının azalması sonucunda da ortaya çıkabilir. Mukozal savunma mekanizması daha çok karbonik anhidraz enzimi ile gerçekleştirilmektedir. Karbonik anhidraz; bikarbonat iyonu sentezi ile gastrik asit sekresyonun nötralize eder ve pH'ı yükseltir. Aynı zamanda ekstrensek (ekstrasellüler) ve intrensek (intraseküller) bikarbonat salınımında, epitelyal iyileşmede, anjiyogeneziste, gastrik sekresyonun azaltılmasında ve yara iyileşmesinde önemli rol oynayan epitelyal growth faktör (EGF) oluşumu, özefagus mukoza direncinde karbonik anhidraz ile birlikte kilit rol oynar.

4. Özefageal asit klirensinde bozulma:

Özefageal persitalsizm reflüyü mideye geri yönlendirirken, bikarbonattan zengin tükrük ise rezidüel asidi kompanse etmektedir. Nöromusküler hastalıklarda, total larenjektomiden sonra gelişen özefageal motilite bozukluklarında (29) ve tükrük bikarbonatının azaldığı durumlarda bile hala reflü ve semptomları ortaya çıkabilmektedir (28). Günümüzde, posterior larenjit tespit edilen hastalarda primer ve sekonder özefageal peristaltizmin sıklıkla normal olduğu ortaya konulmakla birlikte, peristaltizm bozukluğunun LFR'ye neden olan primer mekanizma olduğunu söylemek çok mümkün gözükmemektedir (31).

2.2.2 LARENGO-FARENGEAL REFLÜ İLE GASTRO-ÖZEFAGİAL REFLÜ FARKLARI

LFR mekanizması, manifestasyonu ve tedavisi ile klasik GÖR ile benzerlikler taşıdıkları gibi çok temel farklılıklar da barındırmaktadırlar. Larenks mukozası özefagusla karşılaştırıldığında asit ve pepsine karşı çok daha duyarlıdır (32). Özefagus ise larenks ve farenkste olmayan bikarbonat üretimi, mukozal bariyerler ve peristaltizm gibi mukozal hasarı önleyici, koruyucu mekanizmalara

sahiptir (33). Bu nedenle özefagus epitelinde pH: 4'ün, larenks epitelinde ise pH: 5'in altına indiğinde hücre hasarı oluşur (34) ve özefajit gelişimi için yeterli reflü oluşmadan LFR semptomları ortaya çıkabilir. Temel farklılıklar;

- LFR'li hastalarda reflü çoğunlukla gündüz ve ayakta olur iken, GÖR'lü hastalarda çoğunlukla supin pozisyonda ve nokturnal olmaktadır.
- GÖR'de geri kaçan mide içeriğinin yaptığı doku hasarına bağlı özefajit ve mide yanması şikâyetleri oluşur.
- LFR'de ise mide içeriğinin larengo-farenkse kadar ulaşip hasar oluşturmaya bağlıdır ve oral kavite aftlarına, gingivitelere, diş çürüklerine ve diş şekil bozukluklarına, ülseratif oral mukoza lezyonlarına, kronik rinosinüzite, astmaya, kronik interstisiyel akciğer hastalıklarına ve ani bebek ölümlerine neden olabildiği bilinmektedir (29).
- GÖR'lü hastalar sıklıkla bir gastroenteroloğa müracaat etmekte iken, LFR'li hastalar KBB hekimine başvurumaktadırlar.
- LFR hastalarının çoğunda GÖR için diagnostik olan özefajit görülmez.

SEMPTOMLAR	GÖR	LFR
Mide yanması ve regüjitasyon	++++	+
Ses kısıklığı, öksürük, disfaji ve globus	+	++++
BULGULAR		
Özefajit	++++	+
Larengeal inflamasyon	+	++++
TEST SONUÇLARI		
Erozif veya Barrett's özefagus	+++	+
Anormal özefageal pH monitörizasyonu	++++	++
Anormal farengeal pH monitörizasyonu	+	+++
Ezofageal dismotilite	+++	+
Anormal özefageal asid klirensi	++++	+
REFLÜ PATERNİ		
Supine(nokturnal) reflü	++++	+
Ayakta(gündüz) reflü	+	++++
Her ikisi	+	++
TEDAVİYE CEVAP		
Diyet ve yaşam şekli	++	+
Tek doz PPI başarısı	+++	+
İki doz PPI başarısı	++++	++

Tablo 1: Larengofarengeal Reflü (LFR) ve Gastroözefageal Reflü (GÖR) farklılıkları (+: nadiren, ++: ara sıra, +++: sıklıkla, ++++: çoğu zaman).

- LFR hastalarında genellikle özefajit olmadığı için GÖR’de kullanılan diagnostik testlerin LFR için sensitivite ve spesifitesi düşüktür.
- LFR’nin tanısı semptom, larengeal bulgular ve pH monitörizasyonuyladır (28).
- LFR tedavisi GÖR tedavisine göre daha agresif ve çok daha uzun sürelidir.

2.2.3 BULGU VE SEMPTOMLAR

LFR saptanan hastalarda GÖR semptomlarından çok larenks ve farenkse ait semptomlar vardır. LFR de sık rastlanan semptomlar American Broncho-Esophagological Association (ABEA)’a göre globus farengeus, disfoni, kronik boğaz temizleme, boğazda aşırı mukus, disfaji, kronik öksürük, paroksizmal larengospazm olarak belirtilmiştir. **Tablo 2’** de LFR de sık rastlanan semptomlar verilmiştir.

1	Kronik disfoni
2	İntermitan disfoni
3	Vokal güçsüzlük
4	Seste çatallanma
5	Kronik boğaz temizleme
6	Boğazda aşırı mukus
7	Postnazal akıntı
8	Kronik öksürük
9	Disfaji
10	Globus farengeus
11	Göğüste yanma
12	Regüjitasyon
13	Hava yolu obstrükiyonu
14	Paroksizmal larengospazm
15	Wheezing

Tablo 2: Görülme sıklığına göre LFR semptomları

Belafsky ve Koufman tarafından LFR semptomlarının varlığı ve derecesi hakkında fikir sahibi olabilmek, tedavi öncesi ve sonrasına karşılaştırabilmek için 9 maddeden oluşan Reflü Semptom İndeksini (RSİ) geliştirilmiştir (**Tablo:3**).

REFLÜ SEMPTOM İNDEKSİ (RSİ)

SON BİRKAÇ AY İÇERİSİNDE AŞAĞIDAKİ SORUNLAR SİZİ NE DERECEDE ETKİLEDİ ?		0: HİÇ ETKİLENMEDİM, 5: ÇOK CİDDİ ETKİLENDİM					
1	SES KISIKLIĞI YADA SESLE İLGİLİ SORUN	0	1	2	3	4	5
2	BOĞAZI TEMİZLEME İHTİYACI	0	1	2	3	4	5
3	AŞIRI BOĞAZ SALGISI VEYA GENİZ AKINTISI	0	1	2	3	4	5
4	YEME-İÇMEDE VEYA İLAÇ YUTARKEN YUTKUNMADA ZORLUK	0	1	2	3	4	5
5	YEMEK YEDİKTEN SONRA VEYA SIRT ÜSTÜ UZANINCA ÖKSÜRÜK	0	1	2	3	4	5
6	NEFES ALMADA ZORLUK; BOĞULMA HİSSİ	0	1	2	3	4	5
7	RAHATSIZ EDİCİ GICIK ÖKSÜRÜĞÜ	0	1	2	3	4	5
8	BOĞAZDA BİR ŞEY YAPIŞIP KALMA HİSSİ	0	1	2	3	4	5
9	GÖĞÜSTE YANMA, HAZIMSIZLIK, AĞRI VEYA MİDE ASİDİNİN AĞIZA GELMESİ	0	1	2	3	4	5

Tablo 3: Reflü semptom indeksi (RSİ) (Belafsky PC, Postma GN, Koufman JA. The validity and reliability of the reflux symptom index (RSI). J Voice. 2002 Jun;16(2):274-7)

Koufman ve ark. (35) çalışmasında tedavi öncesi RSİ 21,2 olan 25 LFR hastasının 6 aylık tedavi sonrası RSİ'si 12,8 e düşmüştür. Aynı çalışmada kontrol grubu olarak alınan asemptomatik kişilerde RSİ ortalama 11,6 (9,7-13,6) bulunmuştur. Buna göre RSİ 13 üzerinde olanlar anormal olarak kabul edilmiştir.

LFR şüphesi uyanan hastalarda larenksin ve hipofarenksin muayenesi indirekt fiberoptik veya rigid larengoskopi veya videostroboskopi ile yapılabilir. Videostroboskopinin henüz yapısal değişiklikler meydana gelmemiş hastalarda vokal kordların vibrasyon fonksiyonlarındaki değişiklikleri tespit etmede diğerlerine üstünlüğü vardır (36).

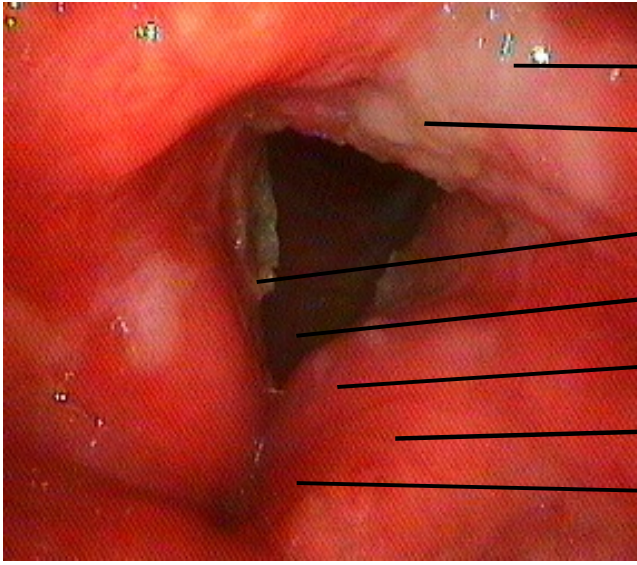
Belafsky ve Koufman LFR'nin ciddiyetini ve bulgularını değerlendirebilmek için LFR'de sıkça saptanan 8 bulgudan oluşan Reflü Bulgu Skorunu (RBS) tanımlamışlardır (**Tablo 4**). Bu değerlendirme kriterlerinde yer alan;

1. **Psödosulkus vokalis** : Vokal kordların alt yüzeyinin anterior komissür ve posterior larenks arasında uzanan ödemli görüntüsüdür. Bir sulkus görünümündedir. Psödosulkus vokalisin LFR için pozitif prediktif değeri %90, sensitivite %70, spesifite %77 dir (37).
2. **Ventriküler Obliterasyon**: Her iki kordun (vokal kord ve yalancı kord) birden ödemlenmesi durumunda ventrikül parsiyel veya tamamen oblitere olur. Ventriküler obliterasyon sonucunda ventriküler bantların mediyal kenarları geniş bir hal alır (38).
3. **Eritem/Hiperemi** : Hiperemi LFR için diagnostik değildir ancak olguların yarısına yakınında saptanmaktadır (38).
4. **Vokal Kord Ödemi** : Çok az bile olsa, klinik olarak sese belirgin değişiklik oluşturmaktadır. LFR'de vokal kord ödemi hafiften polipoide kadar derecelendirilir (39).
 - a. *Grade 1 : Serbest kenarlarda yuvarlaklaşma oluşturan ödem,*
 - b. *Grade 2 : Psödosulkus oluşturan ödem,*
 - c. *Grade 3 : Saplı değişiklikler gösteren ödem,*
 - d. *Grade 4 : Polipoid dejenerasyon (Reinke Ödemi).*
5. **Yaygın Larengeal Ödem** : Subjektif bir parametredir.
 - a. *Grade 1: Herhangi bir düzeyde yaygın larenks ödemi,*
 - b. *Grade 2: Posterior larengeal hipertrofi ile lümenin daraldığı larengeal ödem,*
 - c. *Grade 3: Yaygın ödem (fil derisi görünümü), havayolunun tüm larenkse oranı < 0,5,*
 - d. *Grade 4: Klinik havayolu obstrüksiyonu.*
6. **Posterior Komissür Hipertrofisi** : Posterior komisür mukozasındaki hipertrofi hafif, orta, ağır ve obstrüktif şeklinde derecelendirilir.
 - a. *Hafif : Posterior komissür mukozasında bıyık şeklinde bir görüntü vardır.*
 - b. *Orta : Posterior komissür düz bir çizgi oluşturacak kadar ödemlenmiştir.*
 - c. *Ağır : Posterior larenks havayoluna doğru bulging yapmıştır.*
 - d. *Obstrüktif : Havayolunun belirgin bir kısmını oblitere etmektedir.*
7. **Granüloma/Granülasyon** : Larenksin herhangi bir yerindeki granüloma/granülasyon varlığı değerlendirilir.
8. **Koyu Endolarengeal Mukus** : Vokal kordlarda veya endolarenksin herhangi bir bölgesinde koyu, beyaz endolarengeal mukus varlığı LFR için pozitif bulgulardır.

REFLÜ BULGU SKORU (RBS)

1	Pseudosulkus vokalis (infraglottik ödem)	0=yok
		2=var
2	Ventriküler obliterasyon	0=yok
		2=parsiyel
		4=komplete
3	Eritem/Hiperemi	0=yok
		2=sadece arytenoid
		4=diffüz
4	Vokal kord ödemi	0:yok
		1=az
		2=orta
		3=şiddetli
		4= polipoid
5	Yaygın larengeal ödem	0:yok
		1=az
		2=orta
		3=şiddetli
		4=obstruktif
6	Posterior komissür hipertrofisi	0=yok
		1=az
		2=orta
		3=şiddetli
		4= obstruktif
7	Granülom/Granülasyon	0=yok
		2=var
8	Kalın endolarengeal mukus	0=yok
		2=var
TOPLAM		

Tablo 4 : Reflü bulgu skoru (RFS) (Belafsky PC, Postma GN, Koufman JA. The validity and reliability of the reflux finding score (RFS). Laryngoscope 2001;111:1313-1317)



- Kalın endolarengeal mukus
- Posterior komissür hipertrofisi (Pakidermi)
- Psödosulkus vokalis (infraglottik ödem)
- Ventriküler obliterasyon
- Her iki bant ventrikül ödemi
- Yaygın larengeal ödem
- Bant ventrikülde eritem/hiperemi

Şekil 3: Fiberoptik endoskopik muayenede tipik reflü bulguları

LFR'de larenks ve farenks bölgeleri dışında oral kavite, burun, paranazal sinüsler ve akciğerlere ait semptom ve bulgulara da rastlanabilir. LFR'nin kronik larenjit, larenksin kontakt ülserleri ve granülomları, vokal kord nodülleri, reinke ödemi, subglottik stenoz, larengotrakeal stenoz, paroksizmal larenks spazmları, kronik öksürük ve globus farengeus ve larenks karsinomları gibi çeşitli KBB patolojileri ile astım, kronik öksürük, tıkalıcı uyku apnesi sendromu (TUAS) ve orta kulak hastalıkları gibi çeşitli KBB dışındaki patolojiler ile de ilişkisi olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır.

2.2.4 LARENGO-FARENGEAL REFLÜDE TANI

LFR bulunan hastaların yaklaşık %65'inde özefajit ile ilgili tipik reflü semptomlarına rastlanmaz (40,41) ve yaklaşık %50'sinde özefagus alt ucunda özefajit yoktur (42,43). GÖR tanısında özefajiti tespit etmeye yönelik olarak kullanılan; baryum kontrastlı özefagografi ve asit perfüzyon testi gibi laboratuvar testleri LFR'yi tespit etmeye veya ölçmeye yönelik değildir (44). Bu nedenle doğrudan LFR'yi tespit etmeye yönelik olmayan bu laboratuvar yöntemlerinin tanısal değerleri düşüktür (28). LFR tanısında sıklıkla kullanılan modaliteler ise klinik kullanımlarına göre iki ana başlık altında incelenebilir (45,46).

1. Non-invaziv testler;

- a. Ampirik PPI tedavisi
- b. Non-invaziv örnek toplama ve inceleme (pepsin, safra asidi tespiti...)

2. İnvaziv testler;

- a. Fiberoptik transnazal larengoskopi
- b. Transnazal özefagoskopi (TNE)
- c. 24 saatlik çift problu pH Monitörizasyonu
- d. 24 saatlik phmetri/multikanal intraluminal impedansmetri
- e. Farengeal ph-metri
- f. Özefageal manometri
- g. Biyopsi ile doku incelemesi (ELISA, Western Blot ile pepsin tayini)
- h. Çalışma aşamasındaki tanı testleri

1.NON-İNVAZİV TESTLER;

- a. **Ampirik PPI tedavisi:** LFR tanısı konulan hastalara uygulanan bir aylık tedavi ile hastaların ancak üçte birinde tam semptomatik düzelme olurken, bu oran üç aylık tedavi ile üçte ikiye çıkmaktadır (45). Üç aylık ampirik tedaviye semptomatik cevap alınmayan hastalarda pH monitörizasyonu ile reflü şiddeti ve özefagogastroduodenoskopi ile malignite varlığı araştırılmalıdır (44).
- b. **Non-invaziv örnek toplama ve inceleme:** Yalnızca midede üretilen ve reflü açısından spesifik bir belirteç olan pepsin, (45) tükürük ve sürüntü örneklerinde hem enzimatik yolla (pepsin assay), hem de immünolojik yolla (ELISA ve Western Blot Testleri) tespit edilebilmektedir (46).

2. İNVAZİV TESTLER;

- a. **Transnazal fiberoptik endoskopik larenks muayenesi:** Sedasyon gerektirmeden ofis şartlarında kolaylıkla tolere edilebilen ve larenks görüntülemesinde rutin olarak kullanılan bir cihazdır. Özellikle LFR'ye bağlı bulguların hem tanısal açıdan tespitinde, hem de tedavi sonrası takibinde yaygın olarak kullanılan pratik bir tanı aracıdır. Bilindiği gibi reflü larenjitin en güvenilir ve kesin tanı yöntemi; antireflü tedavisi ile semptom ve bulgulardaki iyileşmedir. Bu test ilk kez Amerikan Bronkoözefagus Derneği tarafından onay almıştır. Serag ve ark. (47) tarafından gerçekleştirilen ilk randomize çiftkör çalışmada reflü larenjitli hastalara günde iki kez 30 mg lansoprazol tedavisi verilmiş; 3 ay sonra plasebo ile kıyasladığında, lansoprazol ile larengeal semptomlarda %50

gerileme pleseboya göre %10 daha anlamlı bulunmuştur. Başka bir çalışmada ise 24-saatlik pH monitörizasyonuna göre LFR pozitifliği, fizik muayene bulgularınormal olan hastalarda %47, posterior larenjit bulunan ve fizik muayene bulguları reflü için şüpheli olan hastalarda %62 bulunmuştur (44).

- b. Transnazal özefagoskopi (TNE):** Sedasyon gerektirmeden ofis şartlarında kolaylıkla kolaylıkla tolere edilebilen ve larenksin yanısıra üst GİS görüntülemesinde de kullanılabilen cihazdır. Transnazal fiberoptik endoskopik larenks muayenesi ile kıyaslandığında temel avantajları; özefagus, üst ve alt özefageal sfinkterler, özefagogastrik bileşke ve midenin kolaylıkla izlenebilmesi ve bu bölgelerden biyopsi gerçekleştirilerek histopatolojik değerlendirme yapılabilmesidir (45).
- c. 24 saatlik çift problu pH monitörizasyonu:** Günümüzde LFR tanısında altın standart kabul edilen ve reflünün kantitatif olarak ölçülebilmesine olanak sağlayan bu yöntem ilk kez Miller ve Spencer (47) tarafından 1960'lı yıllarda tanımlanmıştır. Ph monitörizasyonu; özefagusa yerleştirilen kateter, pH monitörü, kişisel bilgisayar ve pH verilerinin değerlendirildiği yazılımdan oluşan bir sistem ile gerçekleştirilir. Hastanın antireflü tedavi almadığı bir dönemde özefagusa yerleştirilen kateter üzerinde bulunan okuyuculardan her 3-4 saniyede bir alınan pH verileri monitör tarafından 24 saat boyunca kaydedilir. 24 saatlik pH monitörizasyonunun sensitivitesi %90, spesifitesi %98 civarındadır ve günümüzde en yüksek tanı keskinliğine sahip tanı aracı ve en iyi test olarak kabul görmektedir (28). LFR için 24 saat çift problu (eşzamanlı özefagus ve farenks probu) ambulator pH monitörizasyonu spesifik ve duyarlı bir yöntemdir (48,22). Üst özefagus, problemin yerleştirilmesi için doğru bir yer değildir. Özellikle farengeal prob pozitif olduğunda bu LFR için tanısaldır (33). Farengeal prob krikofarengus (ÜÖS) yukarısına farenkse, özefageal prob ise alt özefagus sfinkterinin 5 cm yukarısına yerleştirilmelidir (49,50). 24 saatte 3 LFR epizodu normal kabul edilirken, farenkse tek bir reflü epizodu dahi LFR olarak kabul edilmektedir. Ph monitörizasyonu her ne kadar kantitatif ölçüm gerçekleştirse de hasta bazında değerlendirme yapılması gerekmektedir. Hiçbir semptom veya bulgusu olmayan sağlıklı bir hastada pH monitorizasyonun anormal olması LFR anlamına gelmeyeceği gibi, negatif pH monitörizasyonu da LFR olmadığı anlamına gelmez.
- d. Multikanallı intraluminal impedans Testi:** Ph-metri benzeri olan bu cihaz ile yalnızca asidik reflü değil aynı zamanda hafif-asit ve non-asit reflüde kantitatif olarak ölçülebilmektedir. Bu yeni nesil cihaz ile bolusun antegrat (yutma) veya retrograt (reflü) ayrımı, reflü karakteristiğinin tespiti (sıvı, katı, gaz), intraözefageal ph'n 4'ün altına inmesine rağmen eş zamanlı reflü tespiti

ve non-asidik reflü tespiti kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir. Ancak cihaz pahalıdır, invazivdir ve ulaşılması güçtür (46).

- e. **Özefagus manometrisi:** Özellikle tanısal değerlendirmeden çok, pH moniterizasyonu öncesinde alt ve üst özefagus sfinkterinin yerini saptamada önemlidir. Kaufman ve ark. (35) yaptıkları çalışmada pH probunu doğru bir şekilde yerleştirmek için manometri kullanılması direkt yerleştirmekten daha etkili olduğu ortaya konulmuştur.
- f. **Biyopsi ile doku incelemesi:** Yalnızca midede üretilen, digastiv sistemin temel proteolitik enzimi olmakla birlikte reflü patogeneğinde kilit rol oynayan pepsinin, aynı zamanda reflü açısından spesifik bir belirteç olduğu düşünülmektedir (45). Ph monitörizasyonu ve endoskopik muayeneye kıyasla daha ucuz olması ile göze çarpman pepsin analizi, doku örneklerinde ile hem enzimatik yolla (pepsin assay), hem de immünolojik yolla (ELISA ve Western Blot Testleri) tespit edilebilmektedir (46).
- g. **Çalışma aşamasındaki tanı testleri:** Günümüzde; larenks epitelini LFR hasarına karşı koruyan karbonik anhidraz (KA) enzimi, larengeal stres proteinleri olan sep 70 ve sep 53 proteinleri ve asit ile birlikte hasar oluşturan pepsin düzeylerinin tespitinin LFR tanısında kullanılabilirliği ile ilgili çalışmalar halen devam etmektedir.

2.2.5 LARENGO-FARENGEAL REFLÜDE TEDAVİ

LFR tedavisi; tedavi seçeneklerinin ilk basamağını oluşturan, konservatif değişikliklerin ön planda olduğu sosyal tedbirler, asit supresyonu amacıyla kullanılan medikal tedavi seçenekleri ve her iki tedavi şekline fayda görmeyen LFR hastalarında nadir olarak tercih edilen cerrahi tedavi seçenekleri olmak üzere üç ana başlık altında incelenir.

1- SOSYAL TEDBİRLER

Günümüzde obezite hastalarının kilo kaybetmesinin klinik olarak LFR üzerine etkilerini gösteren sağlıklı çalışmalar bulunmamaktadır (51,52). Obezlerin zayıf görünmek için giydikleri dar giysilerin reflüyü provoke ettiği ya da zayıflama sırasında daha az yağlı yiyecek alıyor olmaları, obezite ile reflünün klinik birlikteliğini açıklayıcı diğer nedenler olabilir. Bu hastaların yağdan fakir, proteinden zengin bir diyet uygulamaları ve karın içi basıncı arttıracı sıkı giysileri giymekten kaçınmaları önerilmektedir.

Egzersiz reflü oluşumunda önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Anjina benzeri göğüs ağrısı olan ve normal koroner anjiyogramlı olgularda yapılan bir çalışmada efor testi sırasında pH monitörizasyonu ile 52 olgunun 23'ünde reflü geliştiği gözlenmiş ve göğüs ağrısını reflü ile alakalı olabileceği düşünülmüştür (53). Aynı zamanda sağlıklı kişilerde de koşu esnasında reflü oluşmaktadır (54). Tüm bu çalışmalar egzersizin reflü patogenezinde önemli rolü olduğunu düşündürmektedir. Yine de özellikle obez olguların zayıflamaları daha önemli olduğu için egzersiz yapmaları önerilebilir.

Normal kişilerde görülen fizyolojik reflü ayaktayken daha sık oluşur (55). Yapılan çalışmalarda reflü olgularında reflü sıklığı ve süresinin postürden etkilendiğini göstermektedir. 24 saatlik pH monitörizasyonu ile yapılan çalışmalarda yatak başının yükseltilmesinin hem asit klirensinde düzelmeye hemde reflü sıklığında azalmaya yol açtığı gözlenmiştir. Yatak başını 20 cm yükseltmekle reflü sıklığında orta dereceli düzelme saptanırken, klirens zamanında ve total nokturnal asit miktarında anlamlı ve önemli bir azalma olduğu gözlenmiştir (56). Postprandial olarak sağ yana yatılması sol yana göre belirgin daha fazla reflü oluşturur (57).

Yiyeceklerin ya alt özafageal sfinkter basıncı (AÖS) ya da direkt mukozal irritasyon yolu ile GÖR'ye neden oldukları düşünülmektedir. Özellikle yağların kolesistokinin salınımı ile AÖS basıncında belirgin inhibitör etki oluşturdukları bilinmektedir. Baharatlı yiyecekler, sarımsak, soğan, portakal suyu ve kahvenin özefageal asit sensitivitesi olduğu bilinen hastalarda özefageal duyu reseptörlerini doğrudan etkilemek yoluyla semptomlara neden oldukları belirtilmektedir (58). Beslenme şekli olarak ise bir kerede aşırı yemek yerine az ve sık öğünler tercih edilmelidir.

Kahvenin semptomları arttırıcı etkisi uzun süredir bilinmekle birlikte AÖS'e ait basıncı arttırdığı (59), azalttığı (60) ve değiştirmedigine yönelik çelişkili yayınlar (61) bildirilmiştir. Bu nedenle etkisinin mukozal irritasyon, asit üretimi veya yüksek sıcaklık ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Isının semptomları arttırıcı etkisi klinik olarak da gözlenmekte olup son zamanlarda yapılan bir in-vitro çalışmada tavşan özafagus epitelinin mukoza kısmında 48 C° üzeri sıcaklıklarda elektrofizyolojik olarak hasar başladığı ve 58 C° üzerinde ise patolojik olarak subepitelyal dokularda ayrılmalar olduğu gözlenmiştir (62).

Alkollü içecekler etanol oranları ile doğru orantılı olarak artmakla birlikte epitel üzerinde ciddi zararlı etki oluştururlar (38,63). Sigara ise AÖS basıncında azalma, mide boşalmasında yavaşlama ve reflü ataklarının sayısında ciddi artmaya yol açtığı gösterilmiştir (39). Bu nedenle hastalar alkollü içeceklerin alınmaması ve sigara kullanılmaması konusu ısrarla uyarılmalıdır.

Günümüzde kolay erişilebilen ve sıkça kullanılan pekçok ilaç AÖS basıncını azaltmakta ve reflü oluşturmaktadır. Özellikle non-steroid anti inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) ile özafagus hasarı arasında ciddi bir ilişki vardır (64). Diğer sık kullanılan ilaçlardan teofilin, oral beta2 adrenerjik agonistler, oral alfa adrenerjik antagonistler, prostoglandin E1, E2, A2, antikolinerjikler, kalsiyum kanal blokörleri, progesteron, dopamine, nitratlar, meperidine, diazepam, morfin, çok çeşitli anestezi ilaçları ve kalsiyum kanal blokerleri de AÖS basıncını azaltmaktadır (65).

Kısaca özetleyecek olursak GÖR semptomlarının tedavisinde diyet ile ilgili olarak hastalara belirtilmesi gerekenler;

- 1 – Öğle yemeği ana öğün olmalı,
- 2 – Yatmadan önceki 3 saat süresinde yemekten kaçınmalı,
- 3 – Yatmadan önce yağlı, baharatlı yiyecekler, alkol ve çikolata yenilmemeli,
- 4 – Yatak başı yükseltilmeli,
- 5 – Pirozisi presipite ettiği bilinen gıda ve kötü alışkanlıklardan uzak durulmalıdır.

2- FARMAKOLOJİK TEDAVİ

Larenksin reflü hasarına özefagustan çok daha duyarlı olması nedeniyle LFR tedavisi daha agresif ve uzun olmalıdır.

a. Antiasitler;

Antiasitler reflü tedavisinde hastalar tarafından en yaygın kullanılan ilaçlardır. Gastrik asidi nötralize ederek pH'ı yükseltir ve böylece dolaylı olarak pepsini inaktive eder ve semptomları rahatlatırlar. Aynı zamanda AÖS basıncını arttırdıkları, reflü olan asit miktarını azalttıkları ve özafajit iyileşmesini hızlandırdıkları da bildirilmiştir (66). Anti-asitler bu şekilde bazı safra asitlerinin oluşturduğu mukozal hasardan da korur. Pahalı olmamaları, kolayca elde edilebilir ve güvenli olmaları uzun süreli kullanılabilirlikleri avantajlarıdır. Ancak alüminyum içeren antiasitlerin uzun süreli kullanımı sonrasında kemiklerde hasara neden oldukları ve sinir sisteminde potansiyel zararlı etkileri olabileceği bilinmektedir. Kalsiyumlu antiasitlerin ribaund asit sekresyonu yapabilmeleri olasılığı ve kalsiyumun sistemik absorpsiyonu (hiperkalsemi riski) nedeniyle dikkatle kullanılmaları önerilmektedir.

Aljinik asit ise etki mekanizması olarak; mide asit (sekresyon) havuzu üzerinde bir engelleyici tabaka oluşturarak reflüyü engelleyici bariyer görevi gördüğü belirtilmektedir (66,67). Aljinik asit gerek reflü ataklarının sayısını ve gerekse de reflü zamanını azaltmaktadır.

b. Prokinetik ajanlar;

LFR etiopatogenezinde özefagus gövde hipomobilitesi gibi bozukluklar, hastalığı daha da kötüleştiren faktörlerdir. Sisaprid sinir uçlarında asetilkolin etkisini uzatır, özafageal ve gastrik boşalımı düzeltir, geçici olarak AÖS basıncını arttırır (68). Metoklopramid ve domperidon artık bu endikasyonda kullanılmamaktadır (69). Sisaprid özellikle sitokrom P450 3A4 enzimini inhibe eden ilaçlarla (eritromisin, flukonazol, itrakonazol, ketakonazol) beraber kullanımında elektrolit bozuklukları, solunum veya böbrek yetmezliği, ciddi kardiyak aritmiler gibi ciddi yan etkiler görülebilir (70). Reflü ile birlikte skleroderma, konstipasyon ve dispepsi varlığında primer tedaviye ek olarak verilmesi önerilebilir.

c. H2 reseptör antagonistleri;

Gastrik pariyetal hücreleri üzerindeki H2 reseptörleri, histaminin pariyetal hücre stimülasyonunu selektif olarak bloke ederek gastrin, kolinerjik uyarım ve gıda alımı ile olan mide asit sekresyonunu azaltırlar ancak diğer H⁺ iyonu yapım yollarında etkili olmadıkları için total asit supresyonunu sağlamazlar (71). Simetidin yan etki potansiyeli nedeniyle artık kullanılmamaktadır. Ranitidin 150-300 mg tablet, famtidin 20-40 mg tablet, nizatidin 150-300 mg kapsül formunda bulunur. Özefagustaki mukozal iyileşmenin mide ve duodenumdan daha güç olması nedeniyle, klasik dozlarda %50 olan semptomatik iyileşme, yüksek dozlarda (ranitidine 1200mg/gün gibi) özefajitli hastaların yaklaşık %75'lere çıkmaktadır. Uzun süreli etkileri göz önüne alındığında H2 reseptör blokerleri %4 yan etki profiline sahiptirler ve güvenli ilaçlar olarak kabul edilebilirler.

d. Proton pompa inhibitörleri (PPI);

PPI'ler piyasadaki ilaçlar arasında bilinen en güçlü asit inhibitörleri ve en iyi tedavi edici ilaçlardır. Asit sekresyonunun son ortak yolu olan H, K-ATP az enzimini spesifik olarak inhibe ederler. 24 saatlik intragastrik asiditede belirgin azalma yaptıkları gibi hem bazal hemde uyarılmış gastrik asit sekresyonunu uzun süreli ve efektif bir şekilde inhibe ederler. Tüm karşılaştırmalı çalışmalarda dozuna bakılmaksızın PPI'lerin H2 reseptör antagonistlerine olan üstünlükleri ortaya konulmuştur. Omeprazol (20 mg), lansoprazol (15-30 mg), pantoprazol (20-40 mg) ve rabeprazol (20-40 mg) en sık kullanılan formlardır. Olguların %74-97 'sinde 8-12 haftalık tedavi sonrasında tam iyileşme gözlenmektedir. PPI'lerin birbirlerine karşı belirgin üstünlükleri bulunmamakla (72) birlikte rabeprazolün etki başlama süresinin daha kısa ve parsiyel reversibl olduğu ortaya konulmuştur (73). LFR'de tedavi süresi çift doz PPI (2 x 30 mg lansoprazole veya 2 x 20 mg omeprazole) ile 3 aydan kısa olmamalı ve bunu takip eden 3 ayda da standart dozda (1 x 30 mg lansoprazole veya 1 x 20 mg omeprazole) idame tedaviye devam edilmelidir. Asid supresyonu özellikle hastanın sabah yataktan

kalktığı vakitler ile geç öğleden sonra olarak nitelendirilen akşam yemeği öncesi yapılmalıdır (74). Çünkü sabah alınan bir PPI ortalama 14 saat etkili olmakta bu nedenle de günde tek doz PPI tedavisi pek çok hastada etkili olamamaktadır (75). LFR’de antireflü etkinliğini optimize edebilmek için ilaç yemeklerden 30-60 dakika önce alınmalıdır.

3- CERRAHİ TEDAVİ

Cerrahi endikasyonlar konusunda henüz üzerinde fikir birliğine varılmış kriterler olmamakla birlikte, medikal tedaviden yarar görmeyen, tedavi kesildiğinde sık nüksler görülen, asid supresif tedaviye intoleransı olan, tedaviyi reddeden ve şiddetli reflüye bağlı üst solunum sistemi komplikasyonları (subglottik stenoz, epitelial displazi, larengospazm, pnömoni, astım ve özefagotrakeal aspirasyon gibi) bulunan hastalarda cerrahi tedavi endikasyonu mevcuttur (76,77). Ancak farmakolojik tedaviye yanıtı olmayan olguların cerrahi tedaviye de dirençli olma ihtimalinin yüksek olduğu akıldan çıkarılmamalıdır. Bu nedenle cerrahi tedavi medikal tedaviye iyi yanıt veren ancak ilaçlarını kesemeyen olgular için daha idealdir. Olgulara preoperatif manometrik inceleme ve 24 saatlik pH monitörizasyonu hastalığın şiddetinin tespitinde mutlaka yapılmalıdır. Buradan alınacak sonuçlara göre Nissen, Belsey veya Toupet tipi ameliyatlardan birisi seçilecektir. Cerrahi tedavi ile farmakolojik tedaviye cevap alınamayan hastalarda %75 ve üzerinde başarı elde edilmektedir (78). Günümüzde GÖR tedavisinde kullanılmaya başlanan yeni nesil endoskopik yöntemlerden; gastroözefageal bileşkenin sütüre edilmesi, gastroözefageal bileşkeye radyofrekans enerjisi uygulanması (Stretta prosedürü), gastroözefageal bileşkede mukoza altına inert materyallerin enjekte edilmesi (Enteryx enjeksiyon tedavisi) gibi tedavilerinin LFR’de kullanılabilirliği araştırılmaktadır (79).

2.2.6 LFR - PEPSİN İLİŞKİSİ

Asidik bir protez olan pepsin gastrointestinal sistemin primer proteolitik enzimidir. Midede ki şef hücrelerinde inaktif zimojen pepsinojen (42 kd) halinde salgılır ve asidik pH’da aktive olur. Pepsinin (35 kd) birbirinden farklı 7 alt tipi mevcuttur. Bu alt tipler sahip oldukları farklı moleküller özellikler ve elektriksel yükler nedeniyle elektroforezde farklı dağılım özellikleri sergilerler (80). Normal insan mide içeriğindeki pepsinin; %80’ini pepsin A (pepsin 1,3a,3b,3c,4), %20’sini pepsin C (gastriksin veya pepsin 5,6) oluşturmakta iken pepsin 1 düzeyi %5’in altındadır. Özellikle peptik ülser olgularında pepsin 1 düzeyi %5 den %20’lere çıkmakta ve patogeneizde kilit rol oynamaktadır (80).

Pepsin salınımını gastrin ve vagal stimülasyon stimüle eder. Yalnızca midede salınan ve maksimum aktivitesini pH: 2'de gösteren pepsin, pH: 6.5'de inaktif olarak stabilize olur ve pH:8'de denature olur. Pepsin reflü patogenezinde mide asidi, pankreas enzimleri ve safra asitleri ile birlikte kilit rol oynar. LFR ile özefagus dışına ve larenkse ulaşan pepsin; larengeal ve hipofarengeal epitel hücrelerine pepsin reseptör bağımlı endositoz ile alınacak ve golgi ve intrasellüler keselerde muhafaza edilir. Golgi ve lizozomlar normal şartlar halinde pH: 5 ve pH: 4.5'de çalışmaktadır ki pepsin maksimum aktivitesinin %40'ına bu pH'da ulaşmakta ve düşen pH ile aktive olarak proteoliz oluşturmaktadır (1). Yapılan çalışmalarda aktive olması için asidik pH ortamı gereken pepsinin pH: 7'de bile, proteolitik etki göstererek hücre içerisinde mitokondri hasarı meydana getirebildiği, stres ve toksiteye neden olan gen ekspresyonlarını arttırdığı ortaya konulmuştur (1). Endozomlar içerisinde aktive olan pepsin başta hücre duvarı olmak üzere birçok sitoplazmik yapı üzerinde hasar oluşturmakta, artan permeabilite ile hücre içerisindeki özellikle H⁺, Ca²⁺ ve glukoz dengelerini bozarak oksidatif stres ve inflamatuvar sitokin salınımını tetiklemekte ve sonuç olarak LFR patogenezinde kilit rol oynamaktadır (46).

Yalnızca midede sentezlenen pepsin, reflü gibi patolojik durumlar haricinde ekstraözefageal yapılarda bulunmaz. Dokulardaki mevcudiyeti dokuya spesifik olup özellikle LFR sonucunda larenks, hipofarenks ve proksimal özefagus dokusunda tespit edilebilir ve bu durum LFR için tanısal özellik gösterir. Ayrıca LFR tanısı alan olgularda nazofarengeal sürüntü örneklerinde de rastlanabilmekle birlikte nazofarenks ve palatin tonsil dokuları içerisinde tespit edilememektedir (81). Sonuç olarak LFR tanısında pepsin; larenks, hipofarenks, nazofarenks, trakea, akciğer, sinüs, orta kulak sürüntü örnekleri üzerinden non-invaziv şekilde, larenks, hipofarenks ve proksimal özefagusta ise doku biyopsileri ile invaziv olarak, immünolojik (Western-Blot, ELISA) ve enzimatik (Pepsin Assay) yöntemler ile tespit edilebilmektedir (81).

2.2.7 LFR - LARENKS BENİGN NEOPLAZİLERİ İLİŞKİSİ

Vokal nodül, polip ve reinke ödemi, vokal kordun benign mukozal lezyonları olup lamina propriyanın süperfisiyel tabakasından köken almaktadırlar (4). Gençlerde, adölesanlarda ve erişkinlerde karşılaşılabilen bu patolojiler özellikle iş gereği sesini çok ve yanlış kullanan bayan hastalarda sık izlenmektedir (82). Günümüzde benign larengeal neoplazilerin gelişiminde sıklıkla sesin kötü ve yanlış kullanımı, sigara, alkol ve LFR suçlanmaktadır (4). Buna rağmen benign vokal kord neoplazilerinin patogenezi hala belirsizliğini korumaktadır (83). LFR ve benign larenks

neoplazileri birlikteliğini vurgulayan ve literatürdeki çok az sayıdaki çalışmadan Chung ve ark. (4) çalışmasında; benign vokal kord patolojisi ve birlikteliğinde LFR ile alakalı semptomları bulunan 110 hasta ile, vokal kord patolojisine rastlanmayan 200 LFR ile alakalı semptomları bulunan hastaya ambulator 24-saatlik ph-metri testi gerçekleştirilmiş; kontrol grubunda %65, vokal nodül grubunda %66, vokal polip grubunda %75 ve reinke ödemi grubunda %90 hastada patolojik LFR tespit edilmiştir. Çalışmada yalnızca vokal polip ve reinke ödemi hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde patolojik reflüye rastlanmakta olup, benign lezyonların patogenezinde LFR'nin olabileceği ve etiyolojik bir faktör olabileceği ifade edilmiştir (4). Günümüzde inhale ve/veya nutrisyonel allerjenlerin LFR, sigara ve ses yanlış kullanımı ile sinerjistik etki göstererek zayıf olmakla birlikte patogenezinde rol oynayabileceği ifade edilmektedir (84). Tüm bu çalışmalara rağmen, tıpkı LFR larenks kanseri birlikteliğinin net bir şekilde ortaya konulamaması gibi, LFR larenks benign neoplazileri arasındaki ilişki de; kontrol grubunun kısıtlılığı veya kıyaslanamaz olması, retrospektif analizlerdeki yetersizlikler, prospektif çalışmaların sıklıkla invaziv tetkikler gerektirmesi nedeniyle güçlüğü, uygun olmayan hasta seçimleri nedeniyle tutarlı sonuçlara ulaşamaması ve en önemlisi tanılarda testlerdeki yetersizlikler ve tanı kriterleri konusunda fikir birliğine varılamamış olması gibi handikaplar nedeniyle belirsizliğini korumaktadır.

2.2.8 LFR - LARENKS KANSERİ İLİŞKİSİ

1980'li yılların ikinci yarısından itibaren yapılan çalışmalarda, etiyolojisinde sigara ve alkolün varlığı ispatlanmış olan larenks kanseri hastalarının bir kısmının (%5) sigara ve alkol tüketmediği anlaşılmış (85) ve kanser gelişiminde başka endojen risk faktörlerinin olabileceği fikri ortaya çıkmıştır. GÖR ve LFR hastalıkları sonucu hipofarenks ve larenksde gastrik içerik maruziyeti olduğunun anlaşılması, reflünün larenks mukozası üzerinde malign değişikliklere yol açabileceği ve kanser etiyolojisinde rol oynayabileceği ihtimalini ortaya çıkarmıştır. Sigara kullanmayan larenks kanseri hastalarında, yapılan birtakım objektif ve subjektif tanı araçları ve özellikle günümüzde reflü açısından altın standart tanı aracı olarak değerlendirilen 24-saatlik ph metre sonuçlarında, sağlıklı kontrol gruplarına kıyasla yüksek LFR oranları (%58-67), LFR'nin larenks kanseri açısından bağımsız bir risk faktörü olabileceğini düşündürmüştür (86,87,88). Yapılan bazı hayvan çalışmalarında da pepsinin yassı hücreli kanser (YHK) tümör volumunda anlamlı şekilde daha fazla artışa neden olduğu ve karsinogenezde önemli rol oynadığının ortaya konulmuştur (1). Larenks kanseri, 2002 yılında American KBB BBC Derneği toplantısında LFR ile ilişkilendirilmiştir (89). Tüm bunlara rağmen larenks kanseri ve reflü birlikteliğinin aksini savunan çalışmalar da azımsanmayacak kadar çoktur.

Günümüzde çalışmaların birçoğu; kontrol grubunun kısıtlılığı veya kıyaslanamaz olması, tanısal testlerde fikirbirliğine varılmamış olması ve yetersizlikler, retrospektif analizlerdeki yetersizlikler ve uygun olmayan hasta seçimleri nedeniyle tutarlı sonuçlara ulaşamamıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmaların bir kısmında larenks kanseri ile LFR arasında ilişki tespit edilmiş iken, diğer bir kısmında ise herhangi bir birliktelik görülmemiştir. Örneğin Francis ve ark.'nın (90) 2011 yılında 14449 larengeal kanseri hastası üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada; larenks kanseri hasta grubunda, kontrol grubuna kıyasla reflü insidansının daha fazla olduğu (%21-%16) ifade edilmiş ancak reflü ile larenks kanseri arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır. El Serag ve ark.'nın (47) 8228 larenks, 1912 farenks kanseri hastasını 32912 ve 7648 kontrol grubu hastası ile kıyaslandıkları bir diğer çalışmada; reflünün bağımsız bir risk faktörü olduğu ifade edilmiştir.

Reflü ile larenks kanseri arasındaki ilişki ile ilgili **3 temel model** mevcuttur:

1. *Larenks kanseri hastalarının çoğunun sigara-alkol tüketmesi ve sigara-alkol'ün reflü nedeni olması, larenks kanseri ile reflünün **birlikteliği** olabileceğini düşündürmektedir.*
2. *Reflü diğer risk faktörlerinin kanserojen etkilerini artırarak larenks kanseri oluşumunda **ko-karsinojen** olarak rol oynar.*
3. *Reflü larenks kanseri gelişiminde sigara ve alkol gibi **bağımsız bir risk faktörüdür.***

LFR ve larenks kanseri birlikteliği patogenezinde temel olarak; gastrik asit ve pepsinin proteolitik etkisi ile hücre membranı ve mitokondrisini yıkarak hücre membran permabilitesini ve hücre osmolaritesini bozması, hücre üzerinde oksidatif stres ve inflamasyon oluşturmaları ve sonuç olarak hücrede apoptozu tetiklemesi olarak özetlenebilir. Pepsin; hücre proteinleri koruyan, hasarlı larenks hücrelerinin polipeptid yapısını onaran ve hücreler üzerindeki oksidatif stresi azaltan skuamöz epitelyal proteinleri (SEP) Sep 70 ve Sep 53 düzeylerini azaltmaktadır. Ayrıca alkali safra reflüsünün de özefageal kanser etiyolojisinde rol oynadığı bilinen COX-2 salınımı artırarak kanser gelişimine yol açabileceği ve gastrik asit ve pepsin dışında ek bir risk faktörü olabileceği üzerinde çalışmalar mevcuttur (91). Sonuç olarak larengeal mukozada kimyasal stimülasyon sonucu oluşan kronik ve tekrarlayıcı inflamasyonun, karsinogeneizde kilit rol oynadığı düşünülmektedir (17). Pepsin (0.1 mg/ml; pH: 7) bir diğer olumsuz etkisini, S-fazında bulunan larengeal ve hipofarengeal hücre sayısını ve bu hücrelerde karsinogeneizde rolü olduğu düşünülen multiple spesifik mRNA miktarını artırarak gerçekleştirir. Böylece hücre döngüsü bozulur ve karsinogeneiz tetiklenir (45).

Larenks özefagus girişine komşudur ve özellikle posterior kısmı LFR ile tetiklenen pepsine doğrudan maruz kalabilmektedir. Bu nedenle larenksde, pepsin ve mide asidine karşı, özefagusa kıyasla daha sınırlı ve zayıf olmasına rağmen koruyucu nitelikteki karbonik anhidraz enziminin salınması önem arz etmektedir. Larenks kanserleri sıklıkla vokal kordun anterior bölgesinde ortaya çıkmaktadır. Bu durum pepsinin larenks kanserine yol açabileceğinin dolaylı bir göstergesi olarak düşünülebilir. Özellikle posterior larenks bölgesinde daha fazla karbonik anhidraz enzimi varlığı, gastrik asidin burada daha çok nötralize edildiği, larengeal mukozanın daha iyi korunduğu ve böylece karsinogenezin de önüne geçilebildiği anlamına gelmektedir (92).

Larenks kanseri reflü ilişkisi diğer bir yönüyle, epidemiyolojik perspektiften değerlendirildiğinde karşımıza reverzibilite çıkmaktadır. Yapılan birçok çalışmada reflünün tedavisi sonrası karsinogenezin veya rekürrenslerin gerileyebileceği ortaya konulmuş ve sonuç olarak reflü bir risk faktörü olarak düşünülmüştür. Frejie ve ark. (93) yapmış oldukları çalışmada H2RB tedavisi sonrası larenks malign değişiklikleri üzerinde regresyon ve rekürrens oranlarında düşüş izlemişler, Richtsmeier ve ark. (94) ise ranitidin tedavisi sonrası in situ karsinom rekürrensinde düşüş izlemişler ve reflü ile larenks kanserini ilişkilendirmişlerdir.

Genel görüş olarak reflünün karsinogenez üzerine etkisi için en az 3 ay geçmesi gerektiği düşünülmektedir. Ancak El-Serag ve ark. (47) en kısa süreli larenks kanseri-reflü birlikteliğinin 1 ay gibi kısa bir sürede ortaya çıkabileceğini ifade etmiştir.

2.2.9 DOKULARIN FORMOL İLE FİKSASYONU VE PARAFİNİZASYONU

Fiksasyon çapraz reaksiyon ajanlarının kullanıldığı kimyasal fiksasyon ile; dondurma, koagülasyon ile ısı, organik çözücüler ve asid maruziyeti ile gerçekleştirilen fiziksel fiksasyon olmak üzere iki ana başlık altında incelenir (95). İmmünohistokimyasal çalışmalarda kullanılmak üzere günümüze kadar birçok kimyasal fiksatif kullanılmaktadır. Bunlardan en popüler olanı; ucuz, yaygın kullanılan, kolayca temin edilebilen, geniş spesimen morfolojilerini kolaylıkla muhafaza edebilen ve günümüzde birçok laboratuarda rutin olarak kullanılan formaldehitdir. Formalin solüsyonu %35-40 oranında formaldehit ve %10 oranında stabilizasyon amaçlı kullanılan metanol çözeltilerinden oluşmaktadır. Formaldehit doku içerisine hızlıca penetre olmasına rağmen proteinleri yavaş fiske eder (95). Formaldehit proteinler arasında 3 temel bağ oluşturur;

- 1) *Metilol (hidroksimetil) bağları,*
- 2) *Schiff bazlı bağlar,*
- 3) *Stabil metilen köprüleri.*

Formaldehit lizin, sistein, arjinin, triptofan, histidin ve N-terminal amin aminoasitleri arasında metilol bağları ve bu bağlara ek olarak proteinler arasında basit bir yıkama işleminin bile kolaylıkla kırabildiği reversible bağlar oluşturmaktadır. Metilol bağlarının daha sıklıkla lizin ve triptofan rezidüleri arasında olmak üzere dehidratasyon reaksiyonu sonrası Schiff bazlı bağlar oluşur (96). Yalnızca iki aminogrubu arasındaki ve aromatik zincirler arasındaki bağlar stabil olarak nitelendirilir. Oluşan inter/intramoleküler çapraz bağlar (metilen köprüleri) tüm peptid ve proteinlerde gerçekleşir ve sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ile tespit edilebilmektedir (97). Yapılan çalışmalarda formaldehit ile sabitlenmiş proteinlerin ikincil yapılarının korunduğu (98) ve formaldehitin nükleik asit temel yapısında değişikliğe yol açmadığı ortaya konulmuştur (99,100,101). Formaldehit amino ve imino gruplarına metilol grubu ekler ve nükleik asit-protein ile nükleik asit-nükleik asit arasında çapraz bağlar oluşturur ancak çift zincir DNA yapısı üzerinde oda sıcaklığında herhangi bir etki yaratamaz (97,99). Nükleik asit ve proteinler arası çapraz bağlar, protein-protein arasında oluşanlardan daha az stabil olmakla birlikte 37°C'de 2 gün veya 60°C'de 6 saat muhafaza edilmesi sonrası bölünürler (101).

Taze-donmuş patoloji kesitleri immünohistokimyasal çalışma amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Dondurma yöntemi ile proteinler üzerinde denaturasyon olmaz ve epitoplarda olumsuz bir etki oluşmaz (95). Bugüne kadar yapılan çalışmalar epitopların küçük bir kısmının formol fiksasyonuna karşı hassas olduğunu ve çoğunun parafinizasyon esnasında maskelendiğini ortaya koymuştur (102). Bu fiksasyon yönteminde; membran proteinlerini intrasellüler filamentöz proteinleri ve ekstrasellüler matrix proteinlerini fiske etmek için sıklıkla alkol ve aseton tercih edilir. Buna rağmen nükleusda ve sitoplazmada bulunan çözünür birtakım proteinler sağlıklı şekilde fikse olmaz ve immünohistokimyasal boyama esnasında dağılırlar (95).

Parafinizasyon, histolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Fiksasyon aşaması sonrası dokular alkol ile dehidrate edilerek ksilen ile temizlenir ve 55-60° sıcaklıktaki parafine maruz bırakılarak gömülür. Bu süreç esnasında fiske haldeki proteinler koagüle edilerek organik çözücülere maruz bırakılabilir veya ısıtılarak epitoplarda kısmen veya tamamen maskelenebilir (103). Daha ince doku yapısının sağlanması amacıyla, fikse halde spesimenler acrylic ve epoksi reçinesi gibi plastik malzemeler içerisinde muhafaza edilir. Ayrıca dokulardan, organik çözücüler veya yüksek sıcaklık uygulanmadan kesitler hazırlayabilmek için polietilen glikol (PEG) kullanılmaktadır (104,105).

FFP ve taze-donmuş dokular, barındırdıkları hücresel lokalizasyon ve moleküler fonksiyonların değerlendirilmesi yoluyla niteliksel olarak da kıyaslanabilmektedir. Yapılan birçok

çalışmada fonksiyonel kategoride olduğu değerlendirilen protein oranları FFP ve taze-donmuş dokular arasında yüksek benzerlik taşımaktadır (105,106). Bazı araştırmacılar lokalizasyon ile ilgili olarak FFP çözülmesi sonrası membran protein oranlarında hafif düzeyde düşme izlemekte ve hidrofilik proteinlerin daha önce çözülmesinin faydalı olabileceğini düşünmektedir (106).

2.2.10 FORMOL İLE FİSKE VE PARAFİNİZE (FFP) DOKULARDA PROTEİN ANALİZİ

Yaklaşık 1 asırdır tüm dünyada, patoloji klinikleri bünyesinde bulunan arşivlerde milyonlarca formol ile fikse ve parafinize (FFP) halde patoloji spesimenleri muhafaza edilmektedir. Bu spesimenler başta protein analizleri olmak üzere birçok çalışma için zengin kaynak oluşturması nedeniyle büyük önem taşımaktadır (95). İmmünolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle antijen tespiti gibi doku bazlı protein analizi çalışmalarındaki en kritik süreç proteinin parafinize ve formol ile fikse doku kesitlerinden sağlıklı bir şekilde çözülerek, sağlam ve mevcut protein yapısının bozulmadan incelenebilir hale gelmesinin sağlanmasıdır (95). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda protein yapıdaki "antijenin" sağlıklı bir şekilde çözülebilmesi ve kullanılabilir hale getirilmesi amacıyla birçok farklı yöntem kullanılmış olmasına rağmen halen fikirbirliğine varılmamıştır (95). Günümüzde bu amaçla kullanılan en sık yöntemlerden biri yaklaşık iki dekad öncesinde kullanılmaya başlanan parafinize dokuların ısı ve/veya çeşitli enzimler kullanılarak çözülmesi ve bu şekilde protein yapıdaki DNA ve RNA yapılarının ortaya konulmasıdır (95). Ayrıca 2-d polyacrylamid jel elektroforezi (PAGE) ile protein yapının çözülmesi araştırmacılar tarafından sıklıkla kullanılan diğer bir metoddur (107). Nirmalan ve ark.'na (108) göre uygun sıcaklık ve tampon çözeltileri kombinasyonu ile %63'e varan oranda uygun protein çözülmesi gerçekleştirilmiştir. Huang ve ark. (109) metastatik ve primer FFP malign melanom dokuları üzerinde gerçekleştirmiş oldukları çalışmada %70'in üzerinde uygun protein çözülmesi gerçekleştirmişlerdir. Heaton ve Master (110) yapmış oldukları çalışmada FFP dokudan peptidlerin ayrılması için kapsamlı bir protokol geliştirmişler, lazer-yakalama mikrodiseksiyon yöntemi ile dokuyu parafinden arındırma yöntemini geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda FFP dokudan çeşitli protokoller uygulanarak gerçekleştirilen çözülme işlemlerinde FFP dokunun ana doku protein yapısına benzerlik yani başarı oranı %56 ile %92 arasında değişmektedir (96). Tüm bu çalışmalar bize günümüzde FFP dokularında protein analizinin gerçekleştirilebileceğini göstermekte ancak gelecekte daha yüksek ve sağlıklı oranda protein analizini gerçekleştirebilen yeni yöntemlere ihtiyaç duyulduğunun altı çizilmektedir (96).

Her ne kadar mevcut yöntemler ile FFP dokularda yeterli ve güvenilir protein analizi yapılabilse de, bu dokular ile taze-donmuş kesitlerdeki dokular arasında protein profili açısından anlamlı farklılıklar oluşabilir. Yapılan çalışmalarda FFP dokudan çeşitli protokoller uygulanarak gerçekleştirilen çözülme işlemlerinde; FFP ve taze-donmuş dokuların kıyaslanmasında protein yapılarında benzerlik oranı %40 ile %91 arasında değişmektedir (96). Xie ve ark.'na göre (111) formol ile fiske dokuların protein yapısında meydana gelen temel değişiklikler uygunsuz dehidratasyon gelişmesi, antijen yapıda dehidratasyona bağlı kayıp ve yüksek nem ile depolanma esnasında protein yapıda hasar oluşması olarak özetlenebilir. Ayrıca bu çalışmada formol ile fiksasyon süresinin protein antijen yapının bozulmasında çok sınırlı bir etkisi olduğunun ve +4 derecede muhafaza edilen dokularda daha az kayıp olduğu ifade edilmiştir. Scicchito ve ark. (112) ise SDS-PAGE ve Western-Blot ile değerlendirildiğinde, protein yapısının çözülmesi esnasında, 120 kDa üzeri dokularda intakt proteine rastlanmamış olup Shi ve ark.'da (96) benzer sonuçlara ulaşmışlardır.

2.3 LARENKS BENİGN NEOPLAZİLERİ

2.3.1 LARENKS BENİGN NEOPLAZİLERİNİN ÖZELLİKLERİ

Vokal nodül, polip ve reinke ödemi, vokal kordun benign mukozal lezyonları olup lamina propriyanın süperfisiyel tabakasından köken almaktadırlar (4). Gençlerde, adölesanlarda ve erişkinlerde karşılaşılabilen bu patolojiler özellikle iş gereği sesini çok ve yanlış kullanan bayan hastalarda sık izlenmektedir (83). Vokal kordların her iki tarafını da tutabilen benign lezyonlar, kordlar arası kapanma kusuruna yol açarak fonasyon fizyolojisini bozmakta ve profesyonel ses sanatçılarıda daha belirgin olmak üzere nefesli, kısık bir ses oluşmasına neden olmaktadır. Vokal nodüller vokal kord anteor ve orta 1/3'de lokalize, sapsız, sıklıkla bilateral ve simetrik, parlak görünümlü, fonasyon esnasında sıklıkla immobil kitle lezyonlarıdır (4). Vokal polipler ise sapsız olmasının yanı sıra pediküllü ve tüm vokal kord üzerinde de yerleşim gösterebilen benign lezyonlarıdır. Reinke ödemi ise sıklıkla her iki vokal kordu da tutabilen ancak sıklıkla tek tarafalı, beyaz renkli, translusen, jöle benzeri, sapsız kitle lezyonu olarak izlenir.

Etiyoloji

Larenks benign neoplazileri sıklıkla sesin kötü ve yanlış kullanımı, sigara, alkol ve LFR sonucu oluşabilirler (4). Czerwonka ve ark. (113) yapmış oldukları çalışmada; özellikle benign vokal kord patolojilerinde sesin yanlış kullanımının doğurduğu ve Bernoulli prensibine esaslarına göre artan

negatif basınç ile, endotelyal vasküler yapılarda hasara, vasküler permeabilite, kapiller geçirgenlik ve intravasküler basınçta artışa yol açtığı ve bu şekilde patogeneizde rol oynadığı ifade edilmiştir. Ayrıca travma ve kronik irritasyona sekonder oluşan hasar ve sonrası iyileşme esnasında subepitelyal tabakada meydana gelen skarlaşma, remodelling ve skarlaşma, vokal kord benign patolojileri gelişiminde kilit rol oynamaktadır (114,115). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda oluşan larengeal hasarın lamina propria subepitelyal tabakasında meydana geldiği ifade edilmiştir (82). Ayrıca Courey ve ark. (116) çalışmasında özellikle benign vokal kord patolojilerinden nodül ve poliplerde, lamina propriyadaki extrasellüler matriksin rejenerasyonu ve yara iyileşmesinde rol oynayan temel protein olan fibronektin miktarında artış izlendiğini ortaya konmuştur.

2.3.2 TANI VE TEDAVİ

Tanı

Benign vokal kord neoplazilerinin tanısında, ortaya çıkan ses bozukluğunun değerlendirilmesinde, tedavi planlaması ve tedavi sonrası takipte subjektif ve objektif birtakım tanı araçları bulunmaktadır. Vokal kord üzerindeki lezyonu tespit edilebilmesi amacıyla flexible veya rijid indirek endoskopik muayene, mikroskop veya rijit endoskoplar ile gerçekleştirilen direk endoskopik muayene, vokal kord mukozal dalga hareketleri, dinamik segmentler ve faz farkının rahatlıkla tespit edilebildiği larengostroboskopik muayene, oluşan ses bozukluğunu derecesini ve sesin kantitatif özelliklerini değerlendiren, objektif bir tanı aracı olan Multi Dimensional Voice Program (MDVP) analizi, ses bozukluğunun insan üzerinde yarattığı bu olumsuz durumu subjektif olarak ortaya koyan Ses Handikap İndeksi (SHİ) ve GRBAS (grade of hoarseness, roughness, breathiness, asthenia and strain) ile reflü şiddetini subjektif olarak ortaya koymayı amaçlayan Reflü Symptom İndeksi (RSİ) ve Reflü Bulgu Skoru (RBS) tanısall amaçlı en sık tercih edilen araçlardır.

Tedavi

Benign vokal kord patolojilerinde en sık tercih edilen tedavi şekli; vokal hijyenin sağlanmasını da içeren ses terapisi, patogeneizinde rolü olduğu düşünülen LFR tedavisine yönelik antireflü tedavi ve tedaviye yanıtız olgularda cerrahi tedavi seçenekleri yer almaktadır. Özellikle malignite şüphesi veya hava yolunu tıkayarak hayati fonksiyonları olumsuz etkileyecek boyuttaki benign lezyonlar mevcut ise zaman kaybedilmeden cerrahi tedavi uygulanır. Cerrahi tedavi seçenekleri ise konvansiyonel soğuk bıçak mikrolarengoskopik yaklaşım ile ve karbondioksit (CO2) veya potasyum

titanil fosfat (KTP) lazer ile cerrahi tedavi seçeneklerinden oluşmaktadır. Çalışmamızı gerçekleştirdiğimiz olguların tamamında (n:30) öncelikle ses terapisi ve antireflü tedavi uygulanmış, sonuç alınamayan olgular üzerinde lazer ile cerrahi eksizyon seçeneği tercih edilmiştir.

2.4 LARENKS KANSERİ

2.4.1 LARENKS KANSERİNİN ÖZELLİKLERİ

Epidemiyoloji

Üst solunum ve sindirim yolunun en sık izlenen kanserlerinden olan larenks kanseri tüm vücut malignitelerinin % 2-5'ini oluşturmaktadır. Baş boyun kanserleri içerisinde cilt kanserleri dışında en sık görülen kanser çeşididir ve tüm baş boyun kanserlerinin %25'ini oluşturur (117). Larenks kanserleri 50 yaşından sonra ve erkek cinsiyette daha sık görülmekle birlikte, erkek/kadın görülme oranı dünya genelinde 4/1 ile 30/1 arasında değişmektedir (118). Günümüzde larenks kanseri kadın popülasyonunda da hızla artmaktadır. Larenks kanserinin insidansı 3-17/100.000 arasında ülkelere bağlı olarak değişmektedir (119). Larenks kanserlerinin tüm evreleri göz önüne alındığında 5 yıllık yaşam %68 civarındadır (120).

Etiyoloji

Etiyolojide herediter ve hormonal faktörler, çevre ve hava kirliliği, asbest, tahta tozu, kömür, metal partikülleri, dizel ve benzin buharı, virüs enfeksiyonları ve baş boyun bölgesine terapötik dozda radyoterapi maruziyeti gibi birçok faktör sorumlu tutulmaktadır. Karsinogen olduğu ispatlanan en önemli etken sigaradır (121,122) ve ikinci sırada sigara ile birlikte sinerjik etkisi gösterilmiş olan alkol gelmektedir. Yapılan çalışmalarda günde iki paket sigara içenlerde kanser riski 4,4 kat, 2 paketten fazla içenlerde 10,4 kat artar. Risk faktörleri sigarayı bıraktıktan 15 yıl sonra ortadan kalkar. Pasif sigara içiciliğinin larenks kanseri oluşumuna etkisi gösterilememiştir. Bazı çalışmalarda alkolün kendi başına risk faktörü olduğu değerlendirilmekle birlikte genel görüş sigara ile sinerjik etki göstermekte olduğu yönündedir (13). Günümüzde her ne kadar larenks kanserinin etiolojisinde sigara ve alkol kullanımı en sık neden olarak gösterilse de, özellikle sigara içmeyen hastalarda görülen larenks kanserlerinde LFR'nin önemli bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir (123).

Histopatoloji

Larenks malign tümörlerinin yaklaşık %95'i yassı epitel hücreli kanser olup (124,125), spindle cell karsinoma ve verrüköz karsinoma gibi varyantları da mevcuttur.

Yassı epitel hücreli karsinom'lar, histolojik olarak hücresel pleomorfizm, diferansiyasyon derecesi ve mitotik aktivite temel alınarak; iyi, orta ve kötü diferansiye olarak derecelendirilirler (126,127). İyi derece diferansiye tümörlerde epitel hücre serisinde düzenli bir tabakalanma ile bol miktarda keratinizasyon gözlenir (128). Orta derece diferansiye tümörlerde hücresel anaplastik özelliklere ek olarak tek hücre keratinizasyonu mevcuttur. Kötü diferansiye tümörlerde ise skuamöz karakter hala fark edilmektedir ancak nükleer pleomorfizm belirgindir ve çok sayıda atipik mitozlar gözlenir (129). İyi ve orta derece differansiye karsinomlar iyi, az diferansiye ve indiferansiye karsinomlar kötü prognozdur.

Larenks kanserleri lokalizasyonlarına göre supraglottik, glottik, subglottik ve transglottik olarak 4 grupta incelenir. Glottik kanserler %56-60, supraglottik kanserler %41-45, transglotik kanserler %4-5 ve subglottik kanserler %1-2 oranında görülmektedir; (130)

Supraglottiste yer alan anatomik yapılar epiglot, ariepiglottik plikalar, ventrikuler bant, ventrikul ve aritenoidlerdir. Supraglottik kanserler larenks kanserlerinin %30-40'ını oluştururlar. Hastaların ön planda boğaz ağrısı, hemoptizi ve aspirasyon öyküsü vardır. En sık neoplazi infrahyoid epiglottan sonrasında ise ventrikül ve suprahyoid epiglottan kaynaklanır (131). İnvazyon sıklıkla dil kökü ve preepiglottik boşluğa doğru olur. Embriyolojik olarak supraglotik alan (3. ve 4. brankiyal ark) ile glottik/subglottik alanlar (5. ve 6. brankiyal ark) farklı embriyolojik yapılardan geliştiği için bu temel anatomik farklılık karsinom invazyonu için arada bir bariyer oluşturur.

Glottik kanserler larenks kanserlerinin %50-75'ini oluştururlar. %57-80'ini erken evre tümörlerdir. Hastalarda daha çok ses kısıklığı ve yutma güçlüğü şikayetleri görülür. Glottik tümörler çoğunlukla vokal kord serbest kenarından ve orta 1/3 kısımdan kaynaklanıp, vokal kord mukozası boyunca öne ve arkaya doğru yüzeysel olarak yayılır. Ön komüüre uzanım gösterip tiroid kıkırdığa ve subglottik alana invazyon yapabilir. Glottiste damarsal ve lenfatik yapılar az olduğu için bölgesel metastaz diğer larenks kanserlerine göre daha az görülür. Glottik tümörlerde lateral ve derine invazyonda reinke boşluğu, inferiorda conus elastikus bariyer görevi yapıp invazyonu engeller.

Larenks kanserlerinin %4'ünü oluşturan subglottik tümörler uzun süre sessiz devam edip dispne ve disfoniyle kendini gösterir. Tanı anında hastaların yarısında kırıkoid kıkırdak infiltrasyonu, 3/4'ünde ise krikotiroid membran infiltrasyonu görülür. Lenfatik metastaz Delphian ve paratrakeal

lenf nodlarına, sekonder yayılım ise alt jugular lenf nodlarına olur. Subglottik tümörlerde tek cerrahi tedavi total larenjektomidir.

Transglottik kanserler tüm larenks kanserlerinin %5'ini oluşturur. Larenksin bir alanından başlayıp diğer alanlarına uzanmaktadırlar. Servikal lenf nodu metastazı en sık bu grupta görülür. Postkrikoid ve priform sinüs kanserlerinin farengeal kaynaklı kanserler olduğu düşünülmekle birlikte bazı kaynaklarda transglottik kanserler olarak değerlendirilmektedir (132).

2.4.2 LARENKS KANSERİ EVRELEMESİ

Larenks kanserlerinde sağkalım süresinin tahmininde en önemli prognostik parametre evredir (132). Larenks kanserlerinde kabul edilen evreleme sistemi 2010 yılında American Joint Committee on Cancer Staging and End Reporting'in (AJCC) modifiye ettiği TNM (tümör = T, Lenf nodu = N, Uzak metastaz = M) evreleme sistemidir; (133)

Primer tümör

Tx: Tümör değerlendirilemedi

To: Primer tümör yok

Tis: Karsinoma in situ

Supraglottik Tümör

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

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

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

T4a: Tümör tiroid kıkırdağı invaze etmiş ve/veya larenks dışına, boyun yumuşak dokularına, tiroide, özefagusa yayılmış.

T4b: Tümör prevertebral boşluğu, mediastinal yapıları invaze etmiş veya karotid arteri kaplamış.

Glottik Tümör

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

a: Tümör tek bir vokal kordadır.

b: Her iki vokal korda da tümör mevcuttur.

T2: Tümör supraglottis ve/veya subglottise uzanmaktadır ve/veya kord hareketleri kısıtlanmıştır.

T3: Tümör larenks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır ve/veya paraglottik alan invazyonu vardır (iç korteks)

T4a: Tümör tiroid kıkırdağı invaze etmiş ve/veya larenks dışına, boyun yumuşak dokularına, tiroide, özefagusa yayılmış.

T4b: Tümör prevertebral boşluğu, mediastinal yapıları invaze etmiş veya karotid arteri kaplamış.

Subglottik Tümör

T1: Tümör subglottiste sınırlıdır.

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

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

T4a: Tümör krikoid veya tiroid kıkırdağı invaze etmiş ve/veya larenks dışına, boyun yumuşak dokularına, tiroide, özefagusa yayılmış.

T4b: Tümör prevertebral boşluğu, mediastinal yapıları invaze etmiş veya karotid arteri kaplamış.

Bölgesel lenf nodları

Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilememektedir.

No: Bölgesel lenf nodu metastazı yoktur.

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

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

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

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

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

Uzak metastazlar

Mx: Uzak metastazlar değerlendirilememektedir.

Mo: Uzak metastaz yoktur.

M1: Uzak metastaz vardır

Kanserli hastalarda uygulanan TNM sınıflaması tümör morfolojisine dayanmakta ve kanseri anatomik yayılımına göre sınıflamaktadır (**Tablo 5**). Tümör büyüklüğünü ve anatomik yayılımı çok iyi tarif etmesine rağmen, kanserin oluşturduğu histopatolojik ve klinik durum (tümörün histolojisi, vasküler invazyon, perinöral invazyon, ekstrakapsüler yayılım, semptomların şiddeti) ile ilgili açıklayıcı bilgi vermemektedir.

TNM EVRELEME SİSTEMİ

EVRE-0	Tis	N0	M0
EVRE-I	T1	N0	M0
EVRE-II	T2	N0	M0
EVRE-III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
EVRE-IVa	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
EVRE-IVb	T4b	Herhangi N	M0
	Herhangi T	N3	M0
EVRE-IVc	Herhangi T	Herhangi N	M1

Tablo 5. Larenks kanseri TNM evrelemesi (2010 yılında American Joint Committee on Cancer Staging and End Reporting'in (AJCC) modifiye ettiği TNM (tümör = T, Lenf nodu = N, Uzak metastaz = M) evreleme sistemi)

Prognozu etkileyen çok sayıda faktör bulunmakla birlikte, sağkalımı belirlemede en önemlisi T ve N'dir. Nodal tutulumun bulunması 5 yıllık sağkalım oranını %64-%94,5'den %29-%54'e düşürmektedir (117). Evre 1 ve 2 kanserler erken, evre 3 ve 4 kanserler ileri evre olarak değerlendirilir. Evre 1-2 kanser olan hastalar evre 3-4 olanlara göre belirgin derecede uzun yaşam süresine sahiptir (134).

2.4.3 TANI VE TEDAVİ

TANI

Larenks kanserleri tanısında sırasıyla anamnez, fizik muayene, radyolojik incelemeler, endoskopi ve biyopsi kullanılmaktadır. Fonksiyonların korunabilmesi için erken tanı ve tedavi şarttır. Tümörün yerleşim yerine göre supraglottik bölge tümörlerinde yutma güçlüğü, ses kısıklığı, kulaklara vuran ağrı, glottik bölge tümörlerinde ses kısıklığı ve nefes darlığı, subglottik bölge

tümörlerinde ise nefes darlığı genellikle ilk başvuru şikayetleridir. Fizik muayenede boyunda lenf nodu palpe edilebilir veya larenks krepitasyonunda muhtemel postkrikoid veya larenks dışına yayılıma bağlı olarak kayıp tespit edilebilir.

Larenks muayenesine indirekt larengoskopi ile başlanmalıdır. Bu şekilde lezyonun yeri, uzandığı bölgeler ve vokal kord hareketleri hakkında yeterli bilgi sahibi olunabilir. Ayrıca fleksibl nazofarengolarengoskopi, rijid larengoskopi, videolarengostroboskopi, transnazal özefagoskopi gibi yöntemlerle de hem dökümantasyon gerçekleştirilebilmekte hem de tümör görülebilmektedir.

Görüntüleme yöntemlerinden bilgisayarlı tomografi (BT); tümörün hacmi, uzanımı, kıkırdak tutulumu ve muayenede görülemeyen bölgelerin durumu hakkında çok değerli bilgiler verir. Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ise submukozal tümör uzanımını BT'den daha iyi gösterir; ama bugün iki nedenle BT, MRG'ye tercih edilmektedir. Bunun nedenleri BT çok daha ucuzdur ve boyun metastazlarını göstermekte ikisinin değeri aynıdır. SPECT (single photon emission computed tomography) ve PET (positron emission tomography) yöntemlerinde ise küçük tümörler tespit edilemeyebilir ve tümör(T) evrelemesini gerçekleştirmek çok mümkün olmayabilir. Lenf nodu durumunu tespit etmede ise diğer metodlara göre daha üstündür, ancak negatif prediktif değeri yeterince yüksek değildir. Özellikle primer kaynağı bilinmeyen uzak metastazları gösterilmesinde diğer metotlara göre daha üstündür (135).

Genel anestezi altında yapılan direkt larengoskopi ameliyat öncesi evrelendirme için çok önemlidir. Bu esnada şüpheli yerlerden biyopsi alınır. Diagnostik larengoskopide ventrikül ve subglottik bölge de dikkatlice değerlendirilmelidir. Aynı zamanda rutin olarak özefagus, bronşiyal sistem, trakea ikinci primer tümörler açısından gözden geçirilmelidir (13).

TEDAVİ

a. Cerrahi Tedavi

Larenks kanserlerinin tedavisinde, günümüzde cerrahi ve radyoterapi olmak üzere iki ana tedavi yöntemi bulunmaktadır. Ayrıca kür amaçlı primer tedavi olarak uygulanan radyoterapi başarısız olduğunda, kurtarma tedavisi olarak cerrahiye başvurulabilmektedir. Ayrıca planlanmış kombine tedavi olarak radyoterapi + cerrahi veya cerrahi + radyoterapi ve larenks koruma tedavisi olarak planlanan kemoradyoterapi uygulanabilmektedir. Cerrahi, ister primer ister radyoterapi ya da kemoradyoterapi başarısızlığından sonra uygulansın, en sık başvuru olan tedavi seklidir. Cerrahi tedavi seçenekleri;

1. Kordektomi
 - a. Larengofissür kordektomi
 - b. Endoskopik kordektomi
2. Vertikal Larenjektomi
3. Frontal (Anterior) Larenjektomi
4. Frontolateral Larenjektomi
5. Horizontal Larenjektomi
6. Supraglottik Larenjektomi
7. Genişletilmiş Supraglottik Larenjektomi
8. Subtotal Larenjektomi (3/4 Larenjektomi)
9. Rekonstrüktif Larenjektomiler
10. Krikotiropeksi (Bilateral glottektomi)
11. Supra-Krikoid Larenjektomi'ler
 - a- Krikohyoidopeksi
 - b- Krikohyoidoepiglotopeksi
12. Total Larenjektomi
13. Near-Total Larenjektomi

b. Radyoterapi

Tümörün yayılım bölgeleri, hastanın tıbbi durumu, hasta ve yakınlarının seçimi ile tedaviyi yapacak merkezin deneyimleri ve olanaklarına göre larenks kanserlerinde radyoterapi, primer tedavi şekli olarak ya da kemoterapi ve/veya cerrahi tedavi ile birlikte kombine olarak kullanılmaktadır. Erken evre glottik kanserlerde konservatif cerrahi ile radyoterapinin eşit sağkalım sağladığı yönünde birçok çalışma vardır. Cerrahi olarak çıkarılabilir ileri evre tümörlerde klasik yaklaşım sıklıkla postoperatif radyoterapi uygulanması iken son yıllarda organ koruyucu kemoradyoterapi protokolleri de artan sıklıkta kullanılmaya başlanmıştır. Subglottik kanserlerde ise genel tıbbi kanaat, kombine (cerrahi + radyoterapi) tedavi lehinedir (136).

c. Kemoterapi

Larenks kanserlerinde kemoterapi günümüzde tek başına küratif değildir. Uzak metastazlı olgularda tek seçenek olarak kalabilen kemoterapide en sık kullanılan kombinasyon Cisplatin + 5-Fluorouracil'dir. Organ koruyucu protokoller ile gündeme gelen neoadjuvan kemoterapi ile primer tümörün önemli oranlarda küçüldüğü tespit edilmekle beraber, bu uygulamanın sağ kalıma ek bir katkısı henüz gösterilememiştir (136).

3- GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesi amacıyla öncelikle GATA Etik Kurulu'nun 06 Mayıs 2014 tarihli 37. oturumunda "Malign Larengeal Lezyonlarda Pepsin Enzimi Varlığının Araştırılması" başlıklı çalışmanın amaç, yöntem ve yaklaşım bakımından etik ilkelere uygun olduğu kararı alındı. Mevcut çalışmanın konu başlığı 30 Mayıs 2016 tarih ve 219/225 ilgi numarası ile "Larengeal Neoplazilerde Pepsin Enzimi Varlığının Araştırılması" olarak değiştirildi.

Çalışma kapsamında üç grup patoloji spesimeni değerlendirildi;

- 1.grup:** Eylül 2010 ve Ağustos 2015 tarihleri arasında GATA KBB AD.'da ileri evre larenks yassı hücreli karsinomu (YHK) tanısı ile total larenjektomi ameliyatı gerçekleştirilen hastalara ait, histopatolojik inceleme ile tanısı doğrulanan ve GATA Patoloji AD. arşivinde parafinize halde muhafaza edilen 29 malign patoloji spesimeni,
- 2.grup:** İlk grup patoloji spesimenleri ile aynı şekilde muhafaza edilen ve aynı hastalara ait, malign larengeal neoplazilerin komşuluğundan örneklenen 29 benign patoloji spesimeni,
- 3.grup:** Vokal kord nodülü, polibi ve intrakordal kisti gibi benign larengeal neoplaziler nedeniyle opere edilen ilk iki gruptan bağımsız 30 hastaya ait benign patoloji spesimenleri incelendi.

Tüm malign ve benign patoloji spesimenleri, pepsin enzimi varlığının ortaya konulması ve seviyesinin tespiti amacıyla immünolojik testler olan Western-Blot (WB) ve Enzyme-Linked ImmünoSorbent Assay (ELISA) testleri ile değerlendirildi. WB ve ELISA testleri analizlerinin doğru gerçekleştirildiğinden emin olunması amacıyla her iki test aynı zamanda kontrol grubu olarak birer adet rat midesi ve postoperatif olarak serum içerisinde muhafaza edilen taze malign larenks doku örneğine uygulandı.

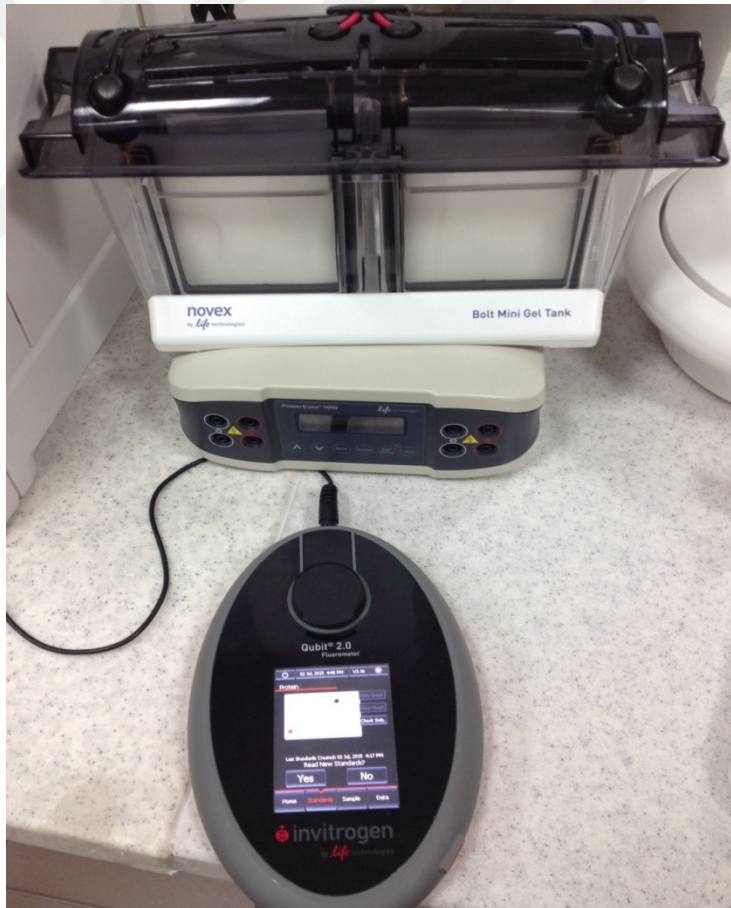
Öncelikle parafinize halde bulunan tüm spesimenleri oluşturan doku kesitleri doku taşıma sepetine yerleştirilerek 55-58°C'lik etüvde yaklaşık 15 dakika süre ile bekletildi. Bu işlemle ısı ile, doku çevresindeki blok parafininin ve dokuya infiltre olmuş tüm parafinin eriyerek uzaklaşması sağlandı ve ksilole daha kolay maruz kalması sağlanmış oldu. Doku kesitleri ısı işleminden sonra iki ayrı kaptaki ksilende yaklaşık 5 dakika süre ile bekletildi. Bu işlem sonunda doku kesitlerinde bulunan parafinler uzaklaştırılarak şeffaflandırılmış oldu. Ksilolun giderilmesi amacıyla da dokular; sırasıyla %100, %95, ve %70 lik etil alkolde yaklaşık 5'er dakika bekletildi. Sonrasında doku kesitleri

distile suda 10 dakika süre ile bekletilerek dokuların kaybettiği su tekrar kazandırıldı ve deparafinizasyon işlemi tamamlandı.

Elde edilen malign ve benign tüm larenks dokuları içerisinde pepsin enzimi protein yapısının tespit edilebilmesi için tüm dokular RIPA Lysis Buffer sistem ile Retsch marka bilyalı homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Homojenize edilen tüm dokular histopatolojik tanılarına uygun şekilde Western-Blot (WB) ve Enzyme-Linked ImmünoSorbent Assay (ELISA) testleri ile değerlendirilmek üzere ikiye ayrıldı. İlk olarak Western-Blot tetkiki gerçekleştirildi.

Western-Blot (WB) testi

Homojenize larenks dokularına ait protein içeriği Qubit 2.0 Fluorometer cihazı (**Şekil 4**) ile Qubit Protein Assay Kiti kullanılarak protokole uygun olarak ölçüldü. Ardından numunelerin ön hazırlığı jele yüklenmek üzere prosedüre uygun olarak yapıldı.



Şekil 4: Qubit 2.0 Fluorometer cihazı ve Bolt Mini Jel Tankı ve Güç Kaynağı
(ThermoFisher Scientific®)

Hazırlanan numune; kalitatif ve kantitatif karşılaştırma ile kontrol için kullanılacak olan protein standartı önceden protokole uygun olarak hazırlanan ve Bolt Mini Jel Tankı' na yüklenmiş olan NuPAGE® % 12 Bis-Tris Gels kasetine 20'şer mikrolitre olmak üzere pipetlendi. Güç kaynağı çalıştırılarak proteinlerin jelde yürümesi sağlandı. Yürütme işleminden sonra kasetlerinden çıkarılan jellerde ki numuneler gerekli işaretlemelerin yapılabilmesi için İblot® Jel Transfer cihazı (**Şekil 5**) ile nitroselüloz membrana transfer edildi. Membrana transfer edilen proteinler LIFE-TECH WB Chromogenic Detection SYS MOUSE kitinde belirtildiği şekilde önce bloklandı. Ardından Santa Cruz Biotechnology, INC. Pepsin A (2F5:sc-101405) ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon ve yıkama işlemlerinden sonra Seconder Antibody ile inkübe ve sonrasında membrandaki protein bantlarını görünür hale getirmek için Chromojenik Solüsyonla muamele edildi. Bio-Rad Gel Doc XR+ Jel Görüntüleme Sistemi ile membranlar görüntülendi.



Şekil 5: Western-blot kuru jel transferi cihazı (**iBlot® 2 GEL TRANSFER DEVICE**
(ThermoFisher Scientific®))

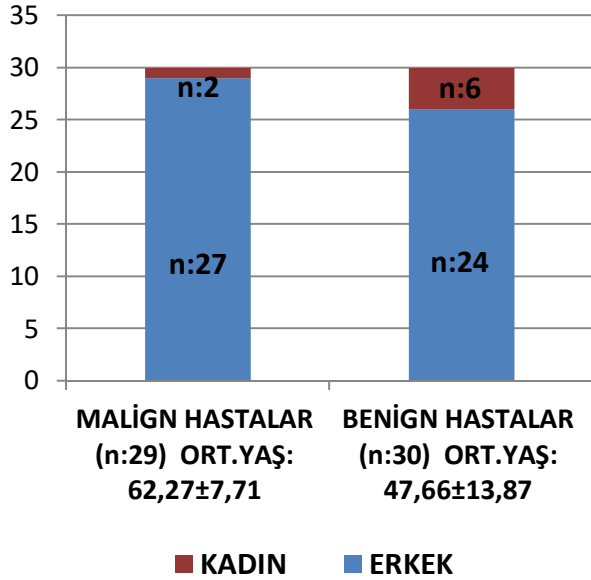
Pepsin bandının yoğunluğu semikantitatif olarak değerlendirildi; yok (0: pepsin yok), düşük (1, pozitif kontrole kıyasla yarıdan az) , orta (2, pozitif kontrol ile aynı yoğunluğu) veya yüksek (3, iki kat pozitif kontrol yoğunluğu) olmak üzere kaydedildi.

Enzyme-Linked ImmünoSorbent Assay (ELISA) testi

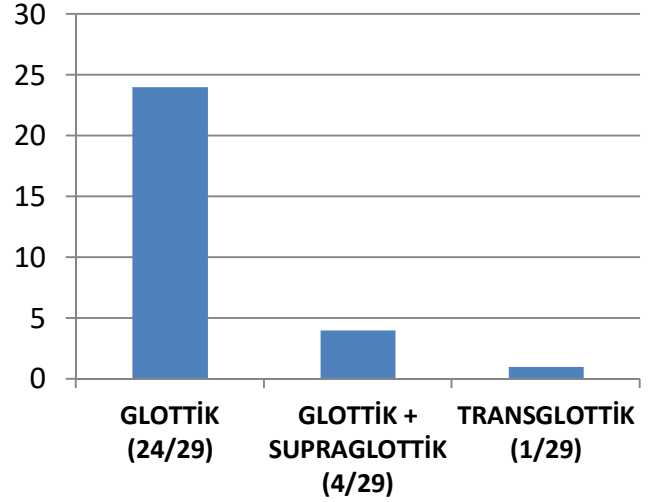
Homojenize edilen ve eşit olarak bölünen larenks dokularının diğer yarısına ise ELISA uygulandı. Öncelikle doku örneklerinin homojenizasyonu gerçekleştirildi. Bu testte prensip olarak sandviç ELISA kiti kullanıldı (SunRed Human Pepsin ELISA KİT; 96 Wells; Serum, Plasma, TissueHomogenate and Cell Culture sup EASTBİOPHARM/CK-E11073). Bu kit içerisinde bulunan 96 kuyucuklu plate Pepsin (PP) için özel bir antikor ile önceden kaplanmıştı. Bu plate numune ve standartlar kit protokolünde belirtildiği şekilde pipetlendi. Ardından Biotin PP Ab ve Streptavidin-Horseradish peroxidase ile 37° C’de 60 dakika inkübe edildi. Plate Wash Solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra protokole uygun olarak Chromojenik Solüsyonlarda eklenerek tekrar 37° C’de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda Stop Solüsyonu ile reaksiyon durduruldu. BioTek Synergy H1 Multi-Mode Reader ile plate 450 nanometre dalgaboyunda okundu. Standartlar ile kalibrasyon eğrisi çizildi. Numune sonuçları bu eğriye karşı değerlendirildi.

4- BULGULAR

Malign larengeal neoplazilerin incelendiği 29 patoloji spesimeninden oluşan ilk grup ile, komşuluğundaki benign larengeal neoplazilerin incelendiği ikinci grupta olguların; 27'si (% 93,1) erkek, 2'si (%6,8) kadın iken hastaların ortalama yaşı $62,27 \pm 7,71$ (48-76) idi (**Şekil 6**).



Şekil 6: Malign ve benign hasta grupları yaş ortalamaları ve cinsiyete göre dağılımları



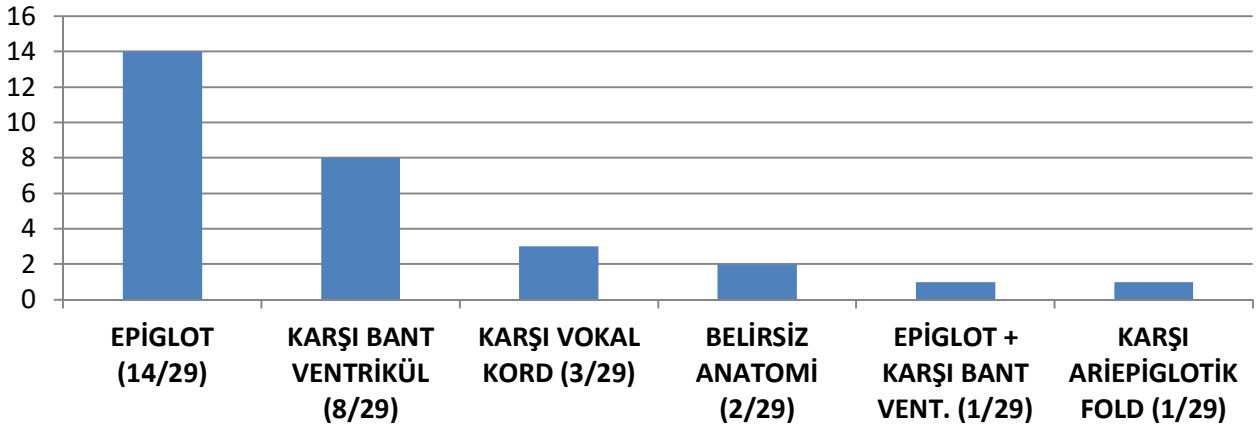
Şekil 7: Malign larengeal dokuların (malign taraf) anatomik yerleşimleri

Malign larengeal neoplazilerin 24'ü (% 82,7) glottik, 4'ü (% 13,7) glottik + supraglottik ve 1'i (% 3,4) transglottik, yerleşimli idi (**Şekil 7**). Malign larengeal neoplazilerin tamamı yassı hücreli karsinom (YHK) olarak tespit edilmiş idi. Olgulardan 4'ü (% 13,7) iyi diferansiye, 19'u (% 65,5) orta derecede diferansiye ve 6'sı (% 20,6) az diferansiye idi.

	EKSTRAKAPSÜLER YAYILIM	PERİNÖRAL- PERİVASKÜLER İNVAZYON	CERRAHİ SINIR POZİTİFLİĞİ
MALİGN DOKULAR (n:29)	5/29 (%17,2)	6/29 (%20,6)	5/29 (%17,2)

Tablo 6: Malign dokuların histopatolojik özellikleri

Malign larengeal neoplazilerin komşuluğundaki benign dokuların incelendiği ikinci grupta ise olguların ise 14'ü (% 48,2) epiglot, 8'i (% 27,5) karşı bant ventrikül, 3'ü (% 10,3) karşı vokal kord, 2'si (% 6,8) belirsiz anatomik lokalizasyon, 1'i (% 3,4) epiglot + karşı bant ventrikül ve 1'i (%3,4) karşı ariepiglotik fold yerleşimli idi (**Şekil 8**).

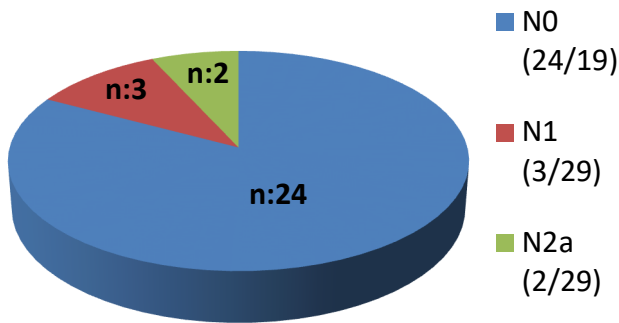


Şekil 8: Malign larengeal dokuların (benign taraf) anatomik yerleşimleri

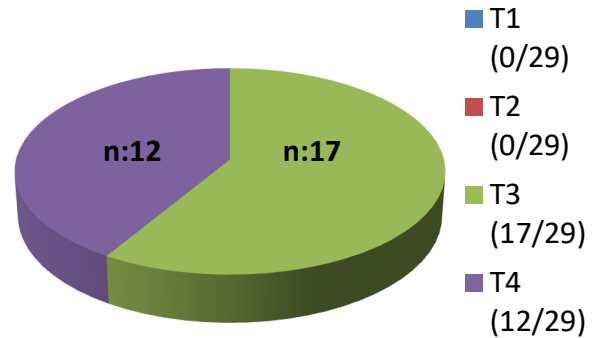
T1 ve T2 olgu bulunmamakla birlikte, 17 (% 58,6) olgu T3, 12 (% 41,3) olgu T4 olarak izlendi. N evresi; 24 olgu (% 82,7) NO, 3 olgu (% 10,3) N1, 2 olgu (% 6,8) N2a evresinde idi (**Şekil 9**). Olguların tamamı M0 olarak değerlendirildi (**Şekil 10**).

Ekstrakapsüler yayılım (EKY) olguların 5'inde (% 17,2) perinöral-perivasküler invazyon (PN-PV İ.) 6'sında (% 20,6), cerrahi sınır pozitifliği ise 5'inde (% 17,2) görüldü (**Tablo 6**).

Neticede hastalar TNM evrelemesine göre oranlandığında 17 olgu (% 58) Evre 3, 12 olgu (% 41,3) olgu evre 4 olarak tespit edildi. T4 hastalarının tamamı, 12 olgu (% 17,2) Evre IVa idi.

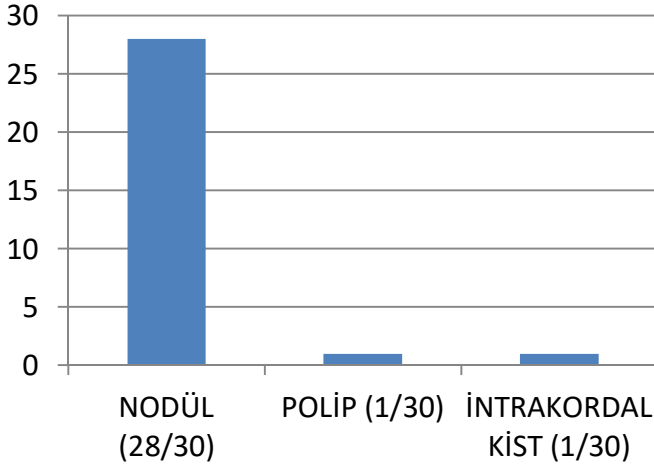


Şekil 9: Malign larengeal dokularda lenf nodu metastazı

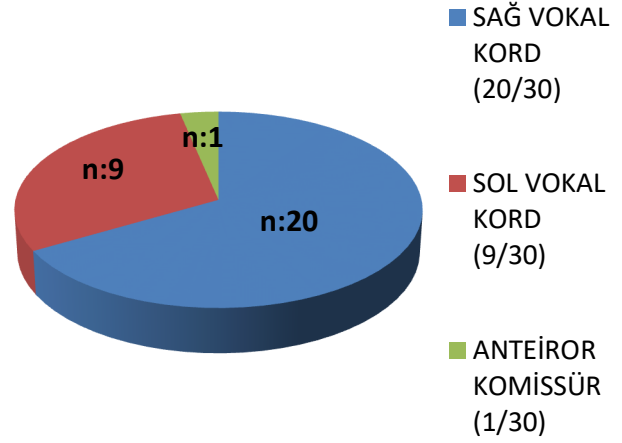


Şekil 10: Malign larengeal dokularda TNM (T) evrelemesi

Benign larengeal dokuların incelendiği ve 30 hastadan oluşan son grupta ise olguların 24'ü (% 80) erkek, 6'sı (%20) kadın iken hastaların ortalama yaşı $47,66 \pm 13,87$ (29-81) idi (**Şekil 6**). 1 (%3,3) hastada intrakordal kist, 1 (%3,3) hastada vokal kord polibi ve 28 (%93,3) hastada vokal kord nodülü tespit edildi (**Şekil 11**). Lezyonların 20'si (%66,6) sağ vokal kordda, 9'u (%30) sol vokal kordda ve 1'i (%3,3) anteor komissürde yerleşim göstermekteydi. Anteor komissürde yerleşim gösteren lezyon vokal kord nodülü olarak raporlanmıştı (**Şekil 12**).

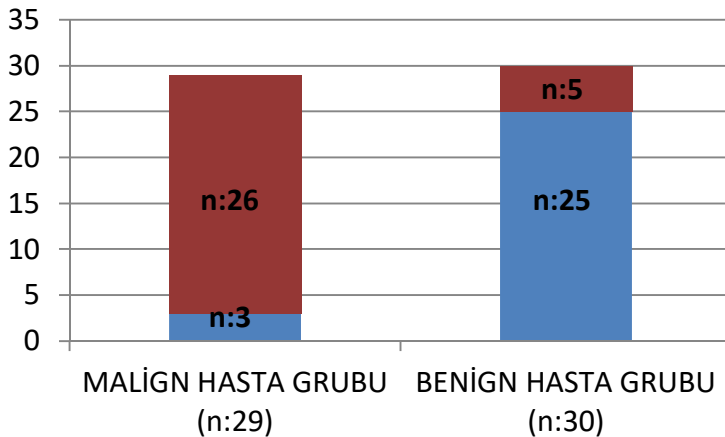


Şekil 11: Benign larengeal dokularda patoloji türleri



Şekil 12: Benign larengeal dokuların anatomik yerleşimi

Malign ve komşuluğundaki benign larengeal dokuların incelendiği 29 patoloji spesimeninden oluşan ilk iki grupta; sigara içmeyen hasta sayısı 3 (% 10) iken içen hasta sayısı 26 (% 89) idi. Vokal kord nodülü, polibi ve intrakordal kisti gibi benign larengeal lezyonlar nedeniyle opere edilen tamamı benign larengeal dokulardan oluşan son grupta ise sigara içen hasta sayısı 5 (% 17,2), içmeyen hasta sayısı 25 (% 82,7) idi (**Şekil 13**).

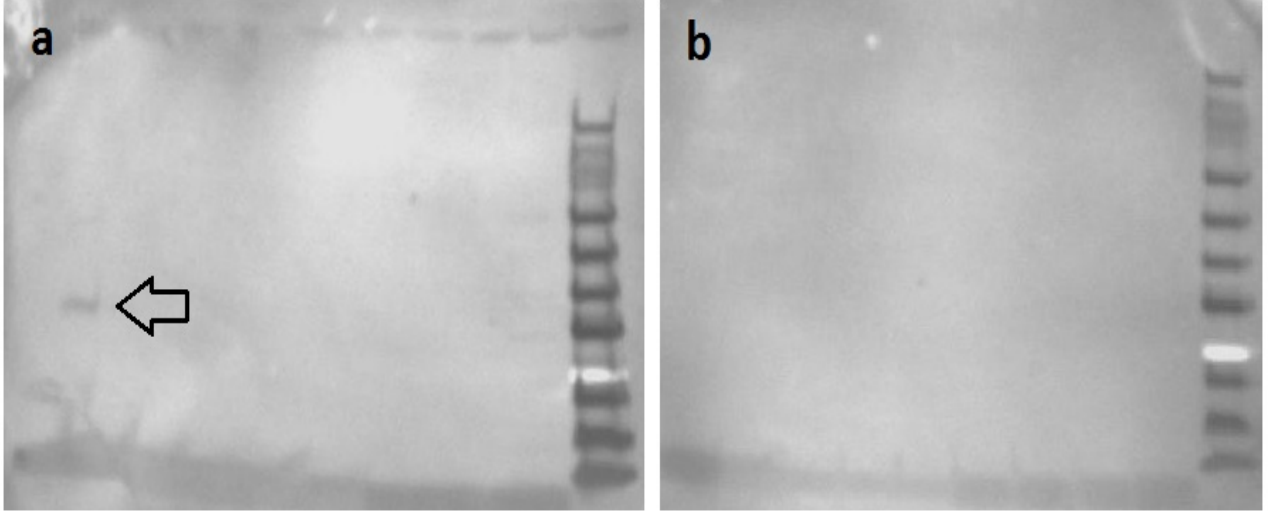


Şekil 13: Malign ve benign hasta gruplarında sigara kullanımı

Çalışma sonucunda; 29 malign larengeal patoloji spesimeni, malign spesimenlerin komşuluğunda bulunan 29 benign larengeal patoloji spesimeni ve vokal kord nodülü, polibi ve intrakordal kisti gibi benign larengeal neoplaziler nedeniyle opere edilen hastalara ait 30 benign larengeal neoplazi patoloji spesimeni WB ve ELISA tetkikleri ile incelenmesi sonucunda hiçbir dokuda pepsin varlığına rastlanmadı (**Tablo 7**).

	DOKU ÇEŞİTLERİ	TOPLAM SAYI		İMMÜNOLOJİK ÇALIŞMA YÖNTEMLERİ	
				Western-Blot	ELISA
1)	MALİGN PATOLOJİ SPESİMENLERİ (FFP DOKU)	MALİGN TARAF n:29	Spesimen 1-9	(-) Negatif	(-) Negatif
			Spesimen 10-18	(-) Negatif	(-) Negatif
			Spesimen 19-27	(-) Negatif	(-) Negatif
			Spesimen 28-29	(-) Negatif	(-) Negatif
		BENİGN TARAF n:29	Spesimen 1-9	(-) Negatif	(-) Negatif
			Spesimen 10-18	(-) Negatif	(-) Negatif
			Spesimen 19-27	(-) Negatif	(-) Negatif
			Spesimen 28-29	(-) Negatif	(-) Negatif
2)	BENİGN PATOLOJİ SPESİMENLERİ (FFP DOKU)	n:30	Spesimen 1-7	(-) Negatif	(-) Negatif
			Spesimen 8-15	(-) Negatif	(-) Negatif
			Spesimen 16-23	(-) Negatif	(-) Negatif
			Spesimen 24-30	(-) Negatif	(-) Negatif
3)	MALİGN PATOLOJİ SPESİMENİ (TAZE DONMUŞ DOKU)	n:1	Spesimen 1	(-) Negatif	(-) Negatif
4)	RAT MİDE SPESİMENİ (TAZE DONMUŞ DOKU)	n:1	Spesimen 1	(+) Pozitif	(+) Pozitif

Tablo 7: Formol ile fikse ve parafinize (FFP) malign ve benign patoloji spesimenleri, taze donmuş malign patoloji spesimeni ve taze donmuş rat mide spesimeni pepsin varlığı değerlendirilmesi



Şekil 14: a) Rat mide dokusu spesimeninde Western-Blot (WB) ile pepsin enzimi varlığı tespit edildi (Bio-Rad Gel Doc XR+ Jel Görüntüleme Sistemi ile tespit edilen pepsin bandı, sola bakan ok ucunda gösterilmekte), **b)** Formol ile fikse ve parafinize (FFP) malign larenks patoloji spesimenlerinde (*malign taraf, örnek no:10-18*) Western-Blot (WB) ile pepsin varlığına rastlanmadı.

Çalışmada ek olarak WB ve ELISA testleri analizlerinin doğru gerçekleştirildiğinden emin olunması amacıyla her iki test aynı zamanda birer adet rat midesi ve postoperatif olarak serum içerisinde muhafaza edilip incelenen taze malign larenks doku örneğine de uygulandı. Bu doku örneklerinden yalnızca rat mide doku örneklerinde, her iki tetkik ile pepsin enzimi tespit edildi (**Şekil 14**).

5- TARTIŞMA

Reflü, tanım olarak gastrik içeriğin retrograt olarak özefagusa, farenks ve larenks seviyesine iştiraki anlamına gelmektedir. GÖR sağlıklı kişilerde de sıklıkla rastlanan ve herhangi bir semptom oluşturmeyen mide içeriğinin özefagusa kaçıışı olarak ifade edilebilir. İlk kez J. Cherry (20) ve K. Malcoson (21) tarafından 1968 yılında tanımlan LFR ise mide içeriğinin özefagusdan daha proksimaline yani üst aerodigestif sistemi oluşturan temel anatomik yapılardan larengofarenkse geri kaçıışı anlamına gelmektedir. GÖR'ün en sık izlenen klinik manifestasyonlarından biri olarak dikkati çeken ve toplumda neredeyse sağlıklı popülasyonun %65-70'inde rastlanabilen LFR (137), klinik seyri ve ortaya çıkardığı semptomlar nedeniyle aynı zamanda atipik reflü, ekstraözefageal reflü, gastrofarengeal reflü, larengeal reflü, farengoözefageal reflü, reflü larenjit ve supraözefageal reflü gibi bir çok farklı şekilde de isimlendirilebilir. Larenkse kaçan temel mide içerikleri gastrik asit ve pepsinin, larengofarengeal bölge mukozası üzerinde oluşturduğu inflamasyon ve immün yanıt, LFR bağımlı hasarın karakteristik özellikleri olarak görülmektedir. LFR şiddetini; süresi, frekansı ve volumu belirler (1).

LFR'nin oluşumundan başlıca 3 önemli patolojik durum; üst ve alt özefageal sfinkter yapıları ve fonksiyonlarında bozulma, peristaltik özefagus dalgalanmaları ve tükürük salgısının yutulmasını oluşturduğu özefageal klirens patolojisi ve son olarak özefagus epitelyum dokusunun yani mukoza direncideki bozulma sorumlu tutulmaktadır. Reflünün başlamasıyla anti-reflü bariyerlerdeki disfonksiyon giderek artar ve oluşan kısır döngü nedeniyle reflü süreklilik kazanır (46). HCL ve Pepsin hücresel düzeyde; epitelyum hücreleri arasında intersellüler bağlantılara hasar vererek permeabilite artışına yol açmakta, Na-K-2Cl pompasında bozulma ile iyon ve su transportunu engellemekte ve böylece osmotik dengeyi bozarak hücre ölümüne yol açmaktadır. Sonrasında hasarlanan epitelyum hücreleri çevresinde, doku tamiri mekanizmaları ürünü olan nötrofil ve lökositler; serbest radikaller ve inflamatuvar mediatörler açığa çıkarılarak, hücre hasarı ve nekrozunu derinleştirmektedir. Bu inflamatuvar süreci, sesin kötü kullanılması, sigara, kronik öksürük, kusma ve sık tekrarlayan enfeksiyonlar gibi eksojen ajanlar da destekler (91). Bu da oluşan larengeal hasarın muhtemelen multifaktöriyel bir etkinin sonucu olduğu kanaati uyandırmaktadır (138).

GÖR'ün klinik manifestasyonlarından kabul edilen LFR'de, semptomların ortaya çıkmasında başlıca kronik gastrik iritanlara maruziyet ve refleks nörojenik mekanizma sorumlu tutulmaktadır (45). GÖR semptomlarından çok larenks ve farenkse ait semptomlar barındıran LFR'de GÖR'de tipik

olarak izlenen göğüs kalp benzeri ağrısı ve epigastrik ağrı/yanma hissi sık olarak izlenmez. LFR de sık rastlanan semptomlar American Broncho-Esophagological Association (ABEA)' a göre globus farengeus, disfoni, kronik boğaz temizleme, boğazda aşırı mukus, disfaji, kronik öksürük, paroksizmal larengospazm olarak belirtilmiştir. Bu yakınmalara sıklıkla boğazda gıcıklanma, vokal güçsüzlük, seste çatallanma, postnazal akıntı ve wheezing gibi yakınmalar eşlik edebilir (46). Belafsky ve Koufman tarafından LFR semptomlarının varlığı ve derecesi hakkında fikir sahibi olabilmek, tedavi öncesi ve sonrasına karşılaştırabilmek için 9 maddeden oluşan Reflü Semptom İndeksini (RSİ) geliştirilmiştir (**Tablo: 3**).

Tarihte LFR ile ilgili tanımlanan ilk larengeal lezyon larenks ülseri ve granülomudur. Klinik bulgular değerlendirildiğinde en sık bulgu olarak psödosulkus vokalisdir. Buna ek olarak posterior larenjit, interaritenoid pakidermi, interaritenoid bar, posterior komissür hipertrofisi, postkrikoid ödem, aritenoid ödemi, vokal kordlar arası ödem, ventriküler obliterasyon, granülom ve idiopatik subglottik stenoz gibi diğer bulgular izlenebilmektedir (137). LFR şüphesi uyanan hastalarda larenksin ve hipofarenksin muayenesi indirekt fiberoptik veya rijid larengoskopi veya videostroboskopi ile yapılabilir. Belafsky ve Koufman LFR'nin ciddiyetini ve bulgularını değerlendirebilmek için LFR'de sıkça saptanan 8 bulgudan oluşan Reflü Bulgu Skorunu (RBS) tanımlamışlardır (**Tablo: 4**).

Asidik bir protez olan ve gastrointestinal sistemin primer proteolitik enzimi olan pepsin, midedeki chief (şef) hücrelerinde inaktif zimojen "pepsinojen" halinde salınır ve asidik pH'da aktive olur. Normal insan mide içeriğinde bulunan ve 7 alt tipi bulunan pepsinin; %80'ini pepsin A (pepsin 1,3a,3b,3c,4), %20'sini pepsin C (gastriksin veya pepsin 5,6) oluşturmakta iken pepsin 1 düzeyi %5'in altındadır. Özellikle peptik ülser olgularında pepsin 1 düzeyi %5 den %20'lere çıkmakta ve patogeneze kilit rol oynamaktadır (81). Yalnızca mideden vagal stimülasyon ve gastrin etkisi ile mideden salınan ve ekstraözefageal yapılarda bulunmayan pepsin reflü patogenezinde mide asidi ile birlikte kilit rol oynar. Pepsin LFR ile özefagus dışına ve larenkse ulaşarak, larengeal ve hipofarengeal epitel hücrelerine reseptör bağımlı endositoz ile alınacak ve golgi ve intrasellüler lizozomal keselerde muhafaza edileceklerdir. Yalnızca midede salınan ve maksimum aktivitesini pH: 2'de gösteren pepsin, pH: 6.5'de inaktif olarak stabilize olur ve pH: 8'de denature olur. Normal şartlar altında pH: 5 ve 4,5'de çalışmakta olan, golgi ve intrasellüler keselerin içerisinde bulunan pepsin, maksimum aktivitesinin %40'ına bu pH'da ulaşmakta ve epitelyum hücrelerinde proteoliz ve hasar oluşturmaktadır (1). Endozomlar içerisinde aktifleşen pepsin başta hücre duvarı olmak üzere birçok

sitoplazmik yapı üzerinde hasar oluşturmakta, artan permeabilite ile hücre içerisindeki özellikle H, Ca ve glukoz dengelerini bozarak oksidatif stres ve inflamatuvar sitokin salınımını tetiklemekte ve sonuç olarak LFR patogeneğinde kilit rol oynamaktadır (46).

LFR'si olan hastaların yaklaşık %65'inde özefajit ile ilgili tipik reflü semptomlarına rastlanmaması (28) ve yaklaşık %50'sinde alt uçta özefajit bulunmaması (43) nedeniyle doğrudan LFR'yi tespit etmeye yönelik olmayan bu laboratuvar yöntemlerinin LFR tanısındaki değeri düşüktür (28). LFR tanısında sıklıkla kullanılan modaliteler klinik kullanımlarına göre non-invaziv ve invaziv olmak üzere iki ana başlık altında incelenebilir (46). Günümüzde LFR tanısında altın standart kabul edilen ve reflünün kantitatif olarak ölçülebilmesine olanak sağlayan 24 saatlik pH monitörizasyonunun sensitivitesi %90, spesifitesi %98 civarındadır ve en yüksek tanı keskinliğine sahip tanı aracı ve en iyi test olarak kabul görmektedir (28,29). Ancak her ne kadar altın standart kabul edilse de yalnızca asit reflü tanısında kullanılabilmeyle birlikte reflünün yönü, reflü morfolojisi ve non-asit içeriğin tespitinde yetersiz olması temel handikaplarını oluşturmaktadır. Bu nedenle hiçbir semptom veya bulgusu olmayan sağlıklı bir hastada pH monitorizasyonun anormal olması LFR anlamına gelmeyeceği gibi, negatif pH monitörizasyonu da LFR olmadığı anlamına gelmez. Ph-metri benzeri olan 24 saatlik multikanallı intraluminal impedans (Mİİ) testi ise yalnızca asidik reflü değil aynı zamanda hafif-asit ve non-asit reflüde kantitatif olarak ölçülebilmekte, bolusun antegrat (yutma) veya retrograt (reflü) ayırımına ve reflü karakteristiğinin tespitine (sıvı, katı, gaz) olanak sağlaması ile ön plana çıkmaktadır. Ancak cihaz pahalıdır, invazivdir ve ulaşılması güçtür (46). Yalnızca mide de sentezlenen ve sindirim sisteminin temel proteolitik enzimi olan pepsin, günümüzde reflünün spesifik belirteci olarak kabul edilmekte ve tespiti bir tanı aracı olarak kullanılabilir (46). Tüm tanı yöntemleri arasında ph monitörizasyonu, Mİİ testi ve endoskopik muayeneye kıyasla daha ucuz olması ile dikkat çeken pepsin analizi, tükürük ve sürüntü örneklerinde non-invaziv olarak veya doku örneklerinden biyopsi alınmak suretiyle invaziv olarak, hem enzimatik yolla (pepsin assay), hem de immünolojik yolla (ELISA ve Western Blot Testleri) tespit edilebilmekte ve tanısal amaçlı kolaylıkla kullanılabilir (46). Biz de çalışmamızda LFR tanısında, FFP dokuda ELISA ve Western-Blot testleri ile pepsin analizi yöntemlerini tercih ettik.

Pepsin tespitinde en sık kullanılan metod enzim immunoassay olarak da bilinen ELISA'dır. ELISA'nın sensitivitesi ve spesifitesi daha çok antikorun afinitesi ve spesifitesine bağlıdır. LFR tanısında kullanılan ve Pepsin A antikoruna için kullanılan ELISA, pH-metri ile teyit edilmesi ile birlikte %100 sensitivite ve %89 spesifiteye sahiptir. Spesifiteyi arttırmayı amaçlayan alternatif tekniklerden

en önemlisi Western-Blot (WB) analizidir. WB daha çok kros-reaktiviteyi ortadan kaldırmayı ve bu şekilde spesifiteyi arttırmayı amaçlar. LFR tanısı amacıyla, tükürük ve sürüntü örneklerinde WB ile yapılan çalışmalarda %89 sensitivite ve %68 spesifite sonuçlarına ulaşılmıştır (46). WB tetkiki yalnızca sıvı materyallerinde değil aynı zamanda larengeal ve subglottik biyopsi materyallerinde de pepsin varlığının araştırılması amacıyla kullanılmıştır. Johnston ve ark. (1) reseptör bağımlı endositoz ve intrasellüler alanda bulunan intakt pepsinin larengeal mukozada 6 saat kadar kaldığını izlemişlerdir.

Üst solunum ve sindirim yolunun en sık izlenen kanserlerinden olan ve tüm vücut malignitelerinin %2-5'ini oluşturan larenks kanserleri (139) baş boyun kanserleri içerisinde cilt kanserleri dışında %25 görülme sıklığı ile en sık rastlanan kanser çeşididir (117). Sıklıkla 50 yaşından sonra ve erkek cinsiyette ortaya çıkan larenks kanserinin erkek/kadın görülme oranı dünya genelinde 4/1 ile 30/1 arasında değişmektedir (118). Bizim çalışmamızda ise larenks kanseri hastalarına ait 29 patoloji spesimeninden oluşan çalışma grubu olguların; 27'si (% 93,1) erkek, 2'si (%6,8) kadın iken hastaların ortalama yaşı $62,27 \pm 7,71$ (48-76) idi. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre; literatürde birçok çalışmada ifade edilen erkek dominansı ve 50 üzeri yaş ortalaması ile benzerlik göstermekteydi. Larenks kanseri etiyolojisinde herediter ve hormonal faktörler, çevre ve hava kirliliği, asbest, tahta tozu, kömür, metal partikülleri, dizel ve benzin buharı, virüs enfeksiyonları ve baş boyun bölgesine terapötik dozda radyoterapi maruziyeti gibi birçok faktör sorumlu tutulmakla birlikte, karsinogen olduğu ispatlanan en önemli etken sigara (121,122) ve birlikte sinerjik etkisi gösterilmiş olan alkoldür. Bizim çalışmamızda ise larenks kanseri grubunda hastaların 26/29'u (%89) sigara tüketmekteydi.

LFR ve larenks kanseri ilişkisi

Özellikle 1980'li yılların ikinci yarısından itibaren yapılan çalışmalarda, sigara ve alkol tüketmemesine rağmen larenks kanseri olan hastalarda reflünün sık izlendiği ve reflünün larenks mukozası üzerinde malign değişikliklere yol açabileceği ifade edilmiştir. Sigara kullanmayan larenks kanseri hastalarında, yapılan birtakım objektif ve subjektif tanı araçları ve özellikle günümüzde reflü açısından altın standart tanı aracı olarak değerlendirilen 24 saatlik ph-metre sonuçlarında, sağlıklı kontrol gruplarına kıyasla yüksek LFR oranları (%58-67), LFR'nin larenks kanseri açısından bağımsız bir risk faktörü olabileceğini düşündürmüştür. LFR sonrası larengeal mukozada kronik ve tekrarlayıcı kimyasal stimülasyon ve inflamasyon olduğu ve böylece karsinogenezin tetiklendiği

düşünülmektedir (123). Larenks kanseri 2002 yılında American KBB BBC derneği toplantısında LFR ile ilişkilendirilmiştir (89).

LFR ve larenks kanseri birlikteliği patogeneğinde temel olarak; gastrik asit ve pepsinin proteolitik etkisi ile hücre membranı ve mitokondrisini yıkarak hücre membran permabilitesini ve hücre osmolaritesini bozması, hücre üzerinde oksidatif stres ve inflamasyon oluşturmaları, doku düzeyinde değerlendirildiğinde larengeal mukozada kronik ve tekrarlayıcı inflamasyon oluşması ve hücrede apoptozu tetiklemesi yatmaktadır. Böylece pepsin karsinogeneğinde kilit rol oynar. Pepsinin aynı zamanda epitelyal savunma mekanizmasında kilit rol oynayan stres proteinleri üzerinde de olumsuz etkileri vardır. Etanol ve asit gibi zararlı ajanları azaltan ve pepsin varlığından olumsuz etkilenen Heat-shock veya Stres proteinleri sellüler defans mekanizmasında önemli rol oynamaktadırlar. Stres proteinleri yalnızca dokuları hücresel hasardan korumakla kalmaz, aynı zamanda onarma, hasarlı polipeptidlerin uzaklaştırılması ve programlanmış hücre ölümü üzerinde de önemli pay sahibidirler. Larengeal hasar sonrası epitel koruyucu proteinler olan sep70, karbonik anhidraz 3 ve e-kadherin artmakta, HSP 70 ekspresyonu ise azalmaktadır. Nikki Johnston ve ark. (140) 2006 yılında yaptıkları çalışmada özefagus ve larenksden alınan biyopsi sonuçlarında, pepsin varlığı ile LFR tanısı doğrulanan hasta grubu ve pepsin tespit edilmeyen kontrol grubu kıyaslamasında; LFR hastalarında sep70 ve sep53 düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı olacak şekilde belirgin azalma izlenmiştir. Komatsu ve ark. (141) 2014 yılında yapmış oldukları çalışmada, hipofarengeal MII ile LFR tanısı konulan ve hipofarenks, distal özefagus ve gastrik kardiya bölgelerinden biyopsi gerçekleştirilen 17 hasta ile 10 kontrol grubu hastası kıyaslanmış, LFR grubunda anlamlı olacak şekilde Sep70 düzeylerinde azalma izlenmesi üzerine pepsin veya düşük pH'nın larengeal mukozada intrasellüler bağlantılar ile sep70 seviyelerini de azalttığı ve epitelyal defans mekanizmasını devre dışı bıraktığı sonucuna varılmıştır. Mevcut çalışmalar ışığında pepsin varlığı larenks üzerindeki Heat-shock veya Stres proteinlerini azaltmakta böylece hücresel hasarın engellenmesi ve hücrelerin onarılmasının önüne geçmektedir. Sonuç olarak pepsinin larenks üzerindeki kanserojen etkisini yalnızca proteolitik aktivite ve eşlik eden inflamatuvar süreç mekanizmaları ile değil aynı zamanda Heat-shock veya Stres proteinlerinin azaltılması ile de gerçekleştirebileceği düşünülebilir. Pepsin (0.1 mg/ml; pH:7) bir diğer olumsuz etkisini, S-fazında bulunan larengeal ve hipofarengeal hücre sayısını ve bu hücrelerde karsinogeneğinde rolü olduğu düşünülen multiple spesifik mRNA miktarını arttırarak gerçekleştirir. Böylece hücre döngüsü bozulur ve karsinogeneğinde tetiklenir (45). Ayrıca yapılan birçok çalışmada reflünün tedavisi sonrası

karsinogenezin veya rekürrenslerin gerileyebileceği ortaya konulmuş ve sonuç olarak reflü bir risk faktörü olarak düşünülmüştür. Frejie ve ark. (142) yapmış oldukları çalışmada H2RB tedavisi sonrası larenks malign değişiklikleri üzerinde regresyon ve rekürrens oranlarında düşüş izlemişler, Richtsmeier ve ark. (143) ise ranitidin tedavisi sonrası in situ karsinom rekürrensinde düşüş izlemişler ve reflü ile larenks kanserini ilişkilendirmişlerdir.

Günümüze kadar yapılan birçok çalışmada larenks kanseri hastalarında LFR'nin sık izlendiğine yönelik sonuçlar elde edilmiştir. Qadeer ve ark. (144) 2005 yılında yapmış oldukları 4 çalışmanın yorumlandığı 17706 larenks kanseri ve 71602 kontrol grubu hastasının incelendiği meta-analizde reflü hastalarında larenks kanseri riskinin 2.37 kat yüksek oranda izlendiği ve reflünün larenks kanseri patogenezinde belirgin rol oynadığının altı çizilmiştir. Vaezi ve ark. (145) 2006 yılında yapmış oldukları ve 96 larenks kanseri ile 192 kontrol grubu hastasının semptomları, özefagoskopik bulguları, özefagogram ve ph-metri ile değerlendirildiği çalışmada sigara, alkol ve reflünün her birinin larenks kanseri için bağımsız risk faktörleri olduğu ve ayrıca en ciddi risk grubunun reflü ile sigara birlikteliği bulunan hasta grubunda olduğu ifade edilmiştir. Dağlı ve ark.'nın (146) 22 larenks kanseri ve 25 kontrol grubu hastasını 24-saatlik çift-prob ph-metri ile değerlendirdiği çalışmasında LFR'nin istatistiksel olarak anlamlı fark olacak şekilde çalışma grubunda %64, kontrol grubunda ise %20 oranında görüldüğü ifade edilmiştir. Lewin ve ark. (147) çalışmasında 14 erken evre larenks kanseri ve 26 displazi hastası olmak üzere 40 hasta 24 saatlik çift-prob ph-metri ile değerlendirilmiş, hastaların %85'inin LFR ile ilişkili olduğu kanaatine varılmıştır. Cianci ve ark. (148) 93 mide cerrahisi geçiren hasta ile 93 dispeptik yakınmaları bulunan kontrol grubu hastasını kıyaslamış, cerrahi geçiren 7 hastada premalign veya malign hastalık ve bir hastada vokal kordda lökoplaki tanısı konmuş ve yazarlara göre mide cerrahisi geçiren hastalarda larenks kanseri görülme ihtimali cinsiyet, yaş, alkol ve sigara kullanımı gibi bağımsız etkenler çalışma dışı bırakıldığında olmayanlara kıyasla daha çok olarak değerlendirilmiştir. Doustmouhammadian ve ark. (149) 65 larenks kanseri ve 65 kontrol hasta grubu hastalarını özefagogastroduodenoskopi ile değerlendirmiş, larenks kanseri hasta grubunda reflü ile uyumlu muayane bulgularına sahip hasta popülasyonunun %87.7 iken kontrol grubunda %58.5 olarak izlendiğini ifade etmişler ve larenks kanseri hasta grubunda (n:48) eroziv özefajit ve gastritin kontrol grubuna kıyasla (n:29) daha fazla olduğu kanaatine varmışlardır. Reflü ile larenks kanseri arasındaki ilişkinin ortaya konulduğu çalışmalarda 3 temel model dikkate alınmaktadır (150);

Birinci model olan **birliktelik modeli lehine** sonuç alınan çalışmalarda larenks kanseri hastalarında reflü birlikteliğinin sık izlenmesine rağmen bu hastalarda sigara ve alkol kullanımının da olmasının reflü-larenks kanseri birlikteliğinde belirsizliğe neden olduğunun altı çizilmiştir. Price ve ark. (151) 24 larengofarengoözefajektomi hastasının %68'inde GÖR tespit etmiş, fakat bu hastalarda sigara ve alkol kullanımı ekarte edilmemiştir. Cooper ve ark. (86) %92 oranında sigara %54 oranında alkol kullanıcısı olan 24 larenks kanseri hastasında ph-metri sonuçlarına göre %83 olguda patolojik reflü izlemişlerdir. Lewin ve ark. (147) %65'i sigara içicisi olan 40 larenks kanseri hastasının %55'inde patolojik reflü izlemiştir.

İkinci model olan ve reflünün **bağımsız bir risk faktörü** olduğu lehine değerlendirilen çalışmalarda reflünün bağımsız bir risk faktörü olduğu ifade edilmektedir. Morrison ve ark.'nın (152) 458 larenks kanseri hastası üzerinde yapmış oldukları çalışmada; 21 sigara içmeyen hastanın %14'ünde GÖR izlenmekte iken sigara kullanan hasta grubunda %47 GÖR izlenmiş, ve GÖR'ün bağımsız bir risk faktörü olduğu ifade edilmiştir.

Son olarak üçüncü modelde reflü, diğer risk faktörlerini arttırarak yani **ko-karsinojen** rol oynayarak larenks kanseri oluşumuna neden olabileceği ifade edilmiştir. El-serag ve ark. (153) çalışmasında 1991 ve 1997 yılları arası 9292 larenks kanseri olgusu ile 37168 kontrol grubu hasta verileri karşılaştırılmış, GÖR hastalarında 2.31 kat, sigara içen hastalarda 2.6 kat ve sigara + GÖR hasta grubunda 2.79 kat daha fazla kanser geliştiği ifade edilmiş, sigara ve reflünün sinerjist ve ko-karsinojenik etki ile larengeal kanser riskini arttırmakta olduğu ifade etmiştir. Yapılan çalışmalarda görüldüğü üzere reflünün larenks kanseri üzerinde etkisi olduğu ve bağımsız bir risk faktörü olduğu kanaatine varılan çalışmaların yalnızca birinde LFR temel patoloji olarak ele alınmış, diğer çalışmalarda GÖR hastaları çalışma grubu olarak değerlendirilmiştir. Bu da halen günümüzde LFR ile larenks kanseri iştirakini gösteren yeterli çalışma olmadığını göstermektedir.

Öte yandan larenks kanseri ve reflü birlikteliği konusunda aksini savunan çalışmalar da mevcuttur. Geniş olgu serilerinin değerlendirildiği, Nilsson ve ark. (154), Francis ve ark. (90), ve El-Serag ve ark. (153) olmak üzere 3 büyük çalışmadan ilk ikisinde, reflü ile larenks kanseri arasında anlamlı ilişki olmadığı kanaatine varılmıştır. Bunlardan Nilsson ve ark. (154) semptom, radyolojik bulgular ve özefagoskopi ile 66695 GÖR hastasını değerlendirdikleri, alkol kullanan hastaların bağımsız risk faktörü olarak değerlendirilerek elemine edildiği çalışmasında reflünün bir risk faktör olmadığı (relatif risk: 1.6) kanaatine varılmıştır. Francis ve ark. (90) 2011 yılında yapmış oldukları ve

2000-2006 yılları arası 14449 larenks kanseri olgusunun değerlendirildiği çalışmada alkol ve sigara kullanımının larenks kanseri riskini arttırdığını ancak reflünün bir risk faktörü olmadığını ifade etmişlerdir. Özlügedik ve ark. (155) 2006 yılında yapmış oldukları çalışmada 24 saatlik ph-metri ile 29 larenks kanseri ve 103 kontrol grubu hastasını kıyaslamışlar ve her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamamışlardır.

Larenks kanseri ve LFR birlikteliği ile ilgili olumlu veya olumsuz sonuçlara varan mevcut çalışmalarda en temel problemler; kontrol grubunun kısıtlılığı veya kıyaslanamaz olması, retrospektif analizlerdeki yetersizlikler, prospektif çalışmaların sıklıkla invaziv tetkikler gerektirmesi nedeniyle güçlüğü, uygun olmayan hasta seçimleri nedeniyle tutarlı sonuçlara ulaşamaması ve en önemlisi tanısal testlerdeki yetersizlikler ve tanı kriterleri konusunda fikir birliğine varılamamış olması olarak özetlenebilir. LFR ve larenks kanseri birlikteliğini ortaya koymayı amaçlayan çalışmaların büyük çoğunluğunda tanı aracı olarak 24 saatlik ph-metri kullanılmış, bir kısmında ise fiberoptik endoskopi, özefagoskopi ve subjektif anketler gibi testler uygulanmış ve çok az sayıda çalışmada ve sınırlı hasta sayısı ile pepsin enzimi varlığı araştırılmıştır (1). Bizde bu çalışmada üst gastrointestinal sistemin temel sindirim enzimi olan, ekstraözefageal yapılarda bulunmayan ve reflü patogenezinde mide asidi ile birlikte kilit rol oynayan pepsin enziminin larenks kanseri dokularında varlığını inceleyerek kanser patogenezindeki varlığını ortaya koymayı amaçladık. Nikki Johnston ve ark. (1) 2012 yılında yapmış oldukları çalışmada, sağlıklı kontrol hasta grubundan ve larenks kanseri hastalarının lezyon tarafı posterior krikoid bölgesinden biyopsiler alınarak hücreler Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), hücre kültürü, mRNA süperanalizi ve RNA/PZR ile incelenmiş; pepsin enziminin karsinogenez ile suçlanan 27 gende ve baş boyun kanserleri ile alakalı 22 mikroRNA seviyesinde artış meydana getirdiği ortaya konulmuş, ayrıca larenks kanseri olgularının %60 (3/5)'inde pepsin tespit edilmekte iken normal kontrol spesimenlerinin hiçbirinde (0/5) pepsin tespit edilmemiştir. Bu çalışmaya göre ph: 7'de inaktive fakat sağlam olan pepsinin hücre içine endositoz ile alınmakta olduğu, uygun ph oluştuğunda ise aktive olarak hücrede hasar oluşturduğu düşünülerek, pepsinin karsinogenez ve proliferasyonunda önemli rolü olduğu ifade edilmiştir. Yine Nikki Johnston ve ark. (1) çalışmasında asidik pepsinin in vivo olarak (ph: 4) hamster bukkal mukoza yassı epitelyum hücreli kanser dokusu üzerinde karsinojen 7,12 dimethylbenzan-thracene (DMBA)'e ve 7,12 DMBA + Pepsin (Ph 4)'in gelişme ve proliferasyon üzerine etkileri incelenmiş, karsinojen 7,12 DMBA'ya kıyasla 7,12 DMBA + Pepsin (ph: 4) birlikteliğinin tümör volumunda daha fazla artışa yol açtığı izlenmiştir. Adams ve ark. (156) 2000 yılında toplam 60 hamster üzerinde yapmış oldukları

çalışmada; 3 gruba ayrılan deneklere 18 hafta süre ile 9,10-DMBA, DMBA + gastrik asit ve DMBA + gastrik asid + pepsin uygulanmış, tüm gruplarda kanser izlenmesine rağmen, kombine gruplarda DMBA grubuna kıyasla daha yüksek oranda kanser izlenmiş ve sonuç olarak asit ve pepsinin kombine uygulanması halinde kansere neden olabileceği ifade edilmiştir. Wassenaar ve ark. (138) tarafından 2011 yılında yapılan çalışmada LFR tanısı 24 saatlik ph-metri ile doğrulanmış ve Nissen fundoplikasyonu ameliyatı gerçekleştirilen 9 hastanın pre-operatif ve post-operatif olarak hem biyopsi gerçekleştirilerek dokuda hem de sürüntü örneğinde pepsin düzeyleri incelenmiş, 8/9 hastadan biyopsi materyalinde pepsin +, 4/5 hastada hem biyopsi hem sürüntü örneğinde pepsin +, olarak tespit edilmiş ve sürüntü ile biyopsi alınması arasında tanısal fark izlenmemiştir. Ayrıca post-operatif 9/9 hastada sürüntü örneğinde pepsin negatif (–) olarak değerlendirilmiştir. Yapılan mevcut çalışmalar ile LFR hastalarında larenks dokusu içerisinde pepsin varlığının immünolojik yöntemler ile değerlendirilebileceği ortaya konulmuş ve larenks kanseri gelişiminde LFR'nin rolü olabileceğinin altı çizilmiştir.

LFR ve larenks kanseri birlikteliğine yönelik yapılan çalışmalardaki temel sorunlardan ikincisi; retrospektif analizlerdeki yetersizlikler ve prospektif çalışmaların sıklıkla invaziv tetkikler gerektirmesi nedeniyle güçlüğü idi. Yukarıda bahsi geçen çalışmaların büyük çoğunluğu kohort, retrospektif kohort, kesitsel ve olgu-kontrol çalışmaları olup prospektif çalışma az sayıda bulunmaktadır. Az sayıda bulunan prospektif çalışmaların ise büyük çoğunluğu genel cerrahi ve gastroentoloji hekimlerince gerçekleştirilen ve LFR yerine GÖR'ün tartışıldığı çalışmalardır ve yalnızca 2 çalışmada patogeneze LFR üzerinde durulmuştur. Bu iki çalışmada (Dağlı ve ark., Lewin ve ark.) prospektif olarak larenks kanseri ve kontrol grubu hastaları 24-saatlik çift-prob ph-metri ile değerlendirilmiş ve her iki çalışma sonucunda da larenks kanserinin LFR ile ilişkili olduğu kanaatine varılmıştır (3). Ancak bu çalışmaların her ikisinde de tanı aracı olarak 24-saatlik çift-prob ph-metri kullanılmış, olabilecek non-asid reflü içeriği ve özellikle pepsin göz ardı edilmiştir. Nikki Johnston ve ark. (1) 2012 yılında yapmış oldukları sınırlı sayıdaki olguyu kapsayan (n:10) ve postkrikoid bölgeden alınan biyopsi sonuçlarının değerlendirildiği çalışmada ise larenks kanseri olgularının %60 (3/5)'inde pepsin tespit edilmekte iken normal kontrol spesimenlerinin hiçbirinde %0 (0/5) pepsin tespit edilmemiştir. Biz de çalışmamızda LFR larenks kanseri ilişkisini değerlendirmek amacıyla LFR patogenezinde asit mide içeriği ile birlikte kilit rol oynatan pepsin varlığını, FFP halde muhafaza edilen larengeal neoplazilerde inceleyerek prospektif olarak ortaya koymayı amaçladık.

LFR ve larenks benign neoplazileri ilişkisi

Vokal nodül, polip ve reinke ödemi, vokal kordda lamina propriyanın süperfisiyel tabakasından köken alan benign mukozal değişiklikler olup, her yaş grubunda rastlanmakta ve sıklıkla işi gereği sesini yanlış kullanan bayan hastalarda izlenmektedir (82). Vokal kord benign neoplazilerinin zemininde sıklıkla sesin kötü ve yanlış kullanımı, sigara, alkol ve LFR yatar. Çalışmamızda benign larengeal neoplaziler nedeniyle opere edilen hasta grubunda sigara içen hasta sayısı 5 (% 17,2), içmeyen hasta sayısı 25 (% 82,7) idi (4). Günümüzde benign larengeal neoplazilerin patogenezi de, malign larengeal neoplazilere benzer şekilde halen belirsizliğini korumaktadır (83). Vokal travma ve LFR gibi birçok eksojen faktör sonucu ortaya çıkan kronik irritasyon ve oluşan inflamatuvar süreç benign lezyonların patogenezinde kilit rol oynamaktadır (4,157). Oluşan hasar ve sonrasında başlayan iyileşme döenminde, subepitelyal tabakada meydana gelen fibrozis, remodelling ve skarlaşma, vokal kord benign patolojileri gelişimine ciddi katkıda bulunmaktadır. (114,115). Günümüzde oluşan larengeal hasarın lamina propria subepitelyal tabakasından meydana geldiği anlaşılmıştır (82). Czerwonka ve ark. (113) yapmış oldukları çalışmada; özellikle benign vokal kord neoplazilerinde, sesin yanlış kullanımının doğurduğu ve Bernoulli prensibine esaslarına göre artan negatif basıncın, endotelyal vasküler yapılarda hasara, vasküler permeabilite, kapiller geçirgenlik ve intravasküler basınçta artışa yol açtığı ve bu şekilde patogeneze rol oynadığı ifade edilmiştir. Courey ve ark. (116) çalışmasında ise özellikle benign vokal kord neoplazilerinden nodül ve poliplerde, lamina propriyadaki extrasellüler matriksin rejenerasyonu ve yara iyileşmesinde rol oynayan temel protein olan fibronektin miktarında artış izlendiği ortaya konmuştur.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda LFR'nin, larenjit, subglottik stenoz, vokal granülom ve hatta larenks kanseri gelişiminde rolü olabileceği vurgulanmış (28,75) ancak literatürde çok az sayıda çalışmada LFR ve benign neoplazi birlikteliği incelenmiştir. Chung ve ark. (4) çalışmasında, benign vokal kord neoplazisi ve birlikteliğinde LFR ile alakalı semptomları bulunan 110 hasta ile, vokal kord neoplazisi rastlanmayan 200 LFR ile alakalı semptomları bulunan hastaya ambulator 24-saatlik ph-metri testi gerçekleştirilmiş; kontrol grubunda %65, vokal nodül grubunda %66, vokal polip grubunda %75 ve reinke ödemi grubunda %90 hastada patolojik LFR tespit edilmiştir. Çalışmada yalnızca vokal polip ve reinke ödemi hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde patolojik reflüye rastlanmakta olup, benign lezyonların patogenezinde LFR'nin olabileceği ve etiyolojik bir faktör olabileceği sonucuna varılmıştır. LFR'nin vokal kord cerrahileri sonrası etkisini değerlendiren ve patogeneze rolünü dolaylı olarak inceleyen prospektif başka bir çalışmada,

benign vokal kord neoplazisi ve ph-metri ile kanıtlanan reflü tespit edilen hasta grubu ile yalnızca benign vokal kord neoplazisi grubu kıyaslanmış, LFR grubu ikiye ayrılarak yarısına PPI verilmiş, kontrol grubu olarak ise LFR izlenmeyen 50 benign vokal kord neoplazisi hastası ele alınmıştır. Operasyonu müteakip 1 yıllık takipler sonrası tüm hasta gruplarında epitelizasyon tamamlanmış ancak PPI almayan LFR grubunda 6 hastada patoloji tekrarlanmıştır. Sonuç olarak LFR'nin özellikle cerrahi sonrası iyileşme üzerine olumsuz etkisi olduğu, cerrahi sonrası nüksde ve patogeneizde rolü olabileceği ifade edilmiştir (158). Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda vokal polip, reinke ödemi ve LFR hastalığının tümünde vokal kordda ödematöz değişikliklerin yer aldığı ve bu nedenle patolojik LFR'nin özellikle vokal polip ve reinke ödemi ile nedensellik ilişkisi içerisinde bulunabileceği ifade edilmektedir (4). Gram negatif spiral bir organizma olan, kronik gastrit gelişiminde kilit rol oynayan, tonsil, adenoid ve sinüs mukozasında rastlanarak ve kronik inflamasyon zemininde rolü olduğu düşünülen *helicobakter pilorinin* larenks benign neoplazilerindeki varlığı, LFR ile nedensellik ilişkisi açısından yol gösterici olabilir. Tiba ve ark.'nın (159) çalışmasında vokal polip, nodül ve granülomdan oluşan 14 benign vokal kord neoplazisi üzerinde immünohistokimyasal yöntemler ile gerçekleştirdikleri çalışmada; 10/14 (%71) hastada *h.pilori* pozitif (+) olarak değerlendirilmiş, bu hastaların tedavisinde antireflü ilaçlara ek olarak *h.pilori* eradikasyonunun da gerekli olabileceği ifade edilmiştir. Bu çalışmaya göre larenksde *h.pilori* varlığının ve dolaylı olarak LFR'nin, larenks benign neoplazilerinin gelişiminde rolü olabileceği düşünülebilir. Larenks benign neoplazileri patogenezinde bir diğer nokta allerji ve benign lezyon birlikteliğidir. Günümüzde inhale ve/veya nutrisyonel allerjenlerin LFR, sigara ve ses yanlış kullanımı ile sinerjistik etki göstererek zayıf olmakla birlikte patogeneizde rol oynayabileceği ifade edilmektedir. Krouse ve ark. (84) çalışmasında çöp mite allerjisi olan hastalarda alerjik olmayanlara göre her ne kadar benzer endoskopik görüntülere sahip olsalar da yükses ses handikap indeksi (SHİ) skorlarına sahip oldukları ifade edilmiştir. Tüm bu çalışmalara rağmen, tıpkı LFR larenks kanseri birlikteliğinin net bir şekilde ortaya konulamaması gibi, LFR larenks benign neoplazileri arasındaki ilişki de; kontrol grubunun kısıtlılığı veya kıyaslanamaz olması, retrospektif analizlerdeki yetersizlikler, prospektif çalışmaların sıklıkla invaziv tetkikler gerektirmesi nedeniyle güçlüğü, uygun olmayan hasta seçimleri nedeniyle tutarlı sonuçlara ulaşılamaması ve en önemlisi tanısal testlerdeki yetersizlikler ve tanı kriterleri konusunda fikir birliğine varılamamış olması gibi handikaplar nedeniyle belirsizliğini korumaktadır. Benign vokal kord neoplazilerinin patogenezinde LFR'nin rolünü inceleyen çok sınırlı sayıda prospektif çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalarda tanı aracı olarak yalnızca 24-saatlik ph-metri kullanılmıştır. Biz ise çalışmamızda, LFR larenks benign neoplazileri ilişkisini değerlendirmek amacıyla, LFR

patogenezinde asit mide içeriği ile birlikte kilit rol oynatan pepsin varlığını, FFP halde muhafaza edilen larengeal neoplazilerde inceleyerek prospektif olarak ortaya koymayı amaçladık.

Çalışmamızı, benzer çalışmalardan ayrı kılan ve gördüğümüz kadarıyla literatürde bu güne kadar bahsi geçmeyen en önemli konu, incelemenin taze veya taze-donmuş neoplazi spesimenlerinde veya sürüntü örneklerinde değil de, histopatolojik inceleme ile tanısı doğrulanan ve parafinize halde muhafaza edilen, her biri ayrı hastalara ait patoloji spesimenlerinin Western-Blot ve Enzyme-Linked ImmünoSorbent Assay (ELISA) testleri ile değerlendirilmiş olmasıdır. Ayrıca 29 malign larengeal patoloji örneği komşuluğunda bulunan her biri ayrı hastalara ait toplam 29 benign patoloji spesimeni de Western-Blot ve ELISA testleri ile değerlendirildi. Çalışmada WB ve ELISA ile incelenmesi sonucunda; kontrol amaçlı değerlendirilen rat mide spesimenleri dışında malign veya benign hiçbir larengeal patoloji spesimeninde pepsin varlığına rastlanmadı. Çalışma sonucunda tüm FFP larenks neoplazileri patoloji spesimenlerinde pepsin enzimi tespit edilmedi ve malign/benign vokal kord neoplazileri etiyolojisinde pepsinin rolü olmadığı düşünöldü.

Çalışmamızda hiçbir dokuda pepsin varlığına rastlanılmamış olması; mevcut immünolojik testlerinin (Western-Blot, ELISA) çalışır durumda olup olmadığı ve formol ile fiske ve parafinize (FFP) dokuda protein analizinin yani pepsin tespitinin mümkün olup olmayacağı sorularını beraberinde getirdi. Öncelikle Western-Blot ve ELISA testleri analizlerinin doğru gerçekleştirildiğinden emin olunması amacıyla her iki test aynı zamanda birer adet rat midesi ve birer adet postoperatif olarak serum içerisinde muhafaza edilip incelenen taze malign larenks doku örneklerine de uygulanmıştı. Bu doku örneklerinden yalnızca rat mide doku örneklerinde, her iki tetkik ile değerlendirilmesi sonrası pepsin enzimi tespit edildi ve mevcut testlerin çalışır durumda olduğundan emin olundu. Diğer soru işareti içeren konu ise FFP dokularda bugüne kadar pepsin analizi gerçekleştirilmemiş olması idi. Ancak FFP dokularda protein analizi gerçekleştirilebileceğine yönelik birçok çalışma bulunmaktadır.

Günümüzde özellikle nadir görölen birtakım hastalıklar üzerine gerçekleştirilen immünolojik ve immünohistokimyasal çalışmalar gibi doku bazlı protein analizi değerlendirmelerinde, taze preperatlara ulaşılabilirlik güçtür ve geniş çalışma grupları oluşturmak neredeyse imkansızdır. Günümüzde patoloji arşivlerinde muhafaza edilen ve kolaylıkla elde edilebilen FFP dokular, geniş hasta popölasyonlarına ait klinik öykü, tanı, prognoz, tedaviye yanıt ve yaşam süresi gibi birçok kıymetli sorunun cevabını barındırmakta ve immünohistokimyasal çalışmalarda kullanılabilirliği ile

dikkatleri üzerine çekmektedir (107). İmmünohistokimyasal yöntemlerle antijen tespiti gibi doku bazlı protein analizi çalışmalarındaki en kritik süreç proteinin formol ile fikse ve parafinize doku kesitlerinden sağlıklı bir şekilde çözülerek, sağlam ve mevcut protein yapısının bozulmadan incelenebilir hale gelmesinin sağlanmasıdır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda proteinin sağlıklı bir şekilde çözülebilmesi ve kullanılabilir hale getirilmesi amacıyla birçok farklı yöntem kullanılmış olmasına rağmen halen fikirbirliğine varılmamıştır (107). Bu konudaki kırılma noktalarında biri Shi ve ark. (160) 1991 yılında tarif etmiş oldukları tam uzunluktaki proteinlerin çözülmesi ve antijen retrieval (AR) antijen kurtarma metodudur. Doku kesitlerinin çeşitli solüsyonlar içerisinde kaynatılması ile antijenlerin açığa çıkması sağlanmış ve antikör bağımlı immünohistokimyasal çalışmaların önü açılmıştır. 2005 yılı sonrasında ise, FFP dokuları üzerinde immünohistokimyasal yöntemler ile protein analizi gerçekleştirilebilmesi için iki basamaklı bir strateji tercih edilmeye başlanmıştır. İlk basamakta; formaldehit maruziyeti sonrası oluşan proteinler arası çapraz bağlar enzimatik yolla ve/veya ısı işlem uygulayarak yıkılır ve tam uzunluktaki protein yapıları elde edilir. Tam uzunluktaki proteinlerin elde edilmesi jel bazlı uygulamaların kullanılabilmesine olanak sağlar. Nirmallan ve ark. (161) çalışmasında daha yüksek sıcaklık (20 dk süre ve 100°) ve orta şiddetteki basınç uygulamasının (15 psi) başarılı bir şekilde kullanılabildiğini belirtmiştir. İkinci basamakta ise; intakt, mikrodiseke ve homojenize haldeki proteinlerin sindirilerek, ortaya çıkan kompleks peptid karışımının pepsin tayini amacıyla uygun boyuttaki proteinlere ayrıştırılması yani ekstraksiyon işlemidir. Günümüzde FFP dokuları ekstraksiyonu amacıyla en çok tercih edilen, tam uzunluktaki proteinlerin analiz edilemediği dokuların triptik enzimler ile parçalanması yöntemleridir. Bu uygulamaların atası ilk kez Prieto ve ark. (162) tarafından 2005 yılında tariflenen patentli bir yöntem olan tripsin enzimi ile denatrasyonun gerçekleştirildiği sıvı doku (Liquid Tissue) yöntemidir. Zaman içerisinde doku üzerinde SDS-DTT (163), asetonitrileamonyum bikarbonat (164), Tris-HCL bazlı ve RIPA (164,165) gibi direk tripsinizasyona eşdeğer etkiye sahip farklı ph ve sıcaklıklarda kullanılabilen çözeltiler kullanılmaya başlanmıştır. Shi ve ark. (160) protein çözülmesi amacıyla yüksek sıcaklık maruziyeti ve güçlü deterjan özellikli sodium dodecyl sulfate (SDS) uygulanması esnasında uygulanan tampon çözeltilerinin farklı ph değerleri taşıması ile (ph: 7-9 arası) benzer sonuçlar elde edildiğinin altını çizmişlerdir.

2006 yılında Becker ve ark. (166) FFP doku ekstraksiyonu amacıyla ilk kez bu amaçla Qiagen® tarafından üretilen kiti kullanmışlar ve ortaya çıkan tam uzunluktaki proteinleri WB ile

değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak FFP dokulardan protein analizi gerçekleştirilebilmesi amacıyla temel olarak;

1. *Sodium dodecyl sulfate (SDS) veya analogları olan kuvvetli deterjanların ve DTT gibi seyreltici ajanların uygulanması ve/veya en az 20 dk süre ile 100° sıcaklığa maruz bırakılması,*
2. *Tampon çözelti Ph değerinin 7 ile 9 arasında olması,*
3. *Homojenizasyon basamakları tercih edilmektedir. Ancak ekstraksiyon verimliliğinin dokular arası farklılık gösterdiği unutulmamalıdır (167).*

Bizde çalışmamızda özet olarak; güçlü deterjan özellikli sodium dodecyl sulfate (SDS) ve P2-d polyacrylamid jel elektroforezi (PAGE) kullanarak pepsin içeren kompleks protein yapılarını ortaya koymayı, RIPA ekstraksiyon kiti kullanarak kompleks peptid yapıların arasından uygun proteinleri açığa çıkarmayı ve son olarak WB ve ELISA ile bu proteinler arasından pepsini tespit etmeyi amaçladık.

Literatürde tamamen taze preperatlar üzerinde gerçekleştirilen pepsin enzimi analizinin, FFP dokudaki geçerliliği ile ilgili halihazırda herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak taze ve FFP dokuların ekstraksiyonu sonrası elde edilen protein yapılarının orantısal olarak kıyaslandığı başka çalışmalar mevcuttur. Hood ve ark. (162) yapmış olduğu çalışmada 664 FFP ve 776 taze doku kıyaslanmış (ortak proteinlerin yüzdesi hakkında yorum yapılmamış), %40-50 oranlarında benzerlik izlenmiştir. Guo ve ark. (168) glioblastoma hücrelerine ait 2700 protein üzerinde immünoelektrik inceleme yöntemi ile gerçekleştirdikleri çalışmada her iki grup arasında %83 benzer proteinlerin elde edildiğini izlemişlerdir. Rat ile fare karaciğer dokuları ile insan renal kanserli dokularının LC-MS/MS ile değerlendirildiği çalışmada protein sayılarında belirgin farklılık izlenmemekle birlikte her iki yöntem arasında %60 oranında benzerlik izlenmiştir (105). İki bin eşleştirilmiş kolon adenomu triptik proteininin LC-MS/MS ve immünoelektrik inceleme yöntemleri ile değerlendirildiği ve eşleştirilerek kıyaslandığı bir diğer çalışmada taze ve FFP grupları arasında %67 oranında benzerlik tespit edilmiştir (169). Bugüne kadar yapılan iyi sonuca ait çalışmalardan Ostasiewicz ve ark. (170) çalışmasında FFP-FASP metodu ve Orbitrap Velos (Thermo) analiz yöntemlerini kullanarak beşbin taze ve FFP karaciğer dokusu üzerinde yapmış oldukları çalışmada %91 oranında benzerlik tespit edilmiştir. Formaldehitin proteinler üzerinde moleküler düzeyde yarattığı etki ile ilgili yapılan çalışmalarda, Sprung ve ark. (169) lizin ve arjinin arasındaki terminal peptid oranında FFP doku incelemesinde taze-donmuş olanlara kıyasla anlamlı düzeyde azalma izlenmiş ve gerçekleştirilen

modifikasyonların hiçbirinin formol kimyasal reaksiyonu üzerine etki edemediği ortaya konulmuştur. Aksine Tanca ve ark. (107) çalışmasında iskelet kası proteinleri üzerinde ekstraksiyon sonrası fiske proteinlerde lizin-terminal peptidleri istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha yüksek oranda izlenmiştir. Günümüzde protein analizinde liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) platformlarının tüm dünyaya yayılmasına rağmen klasik jel bazlı teknikleri hala protein analizinin merkezinde yer almaktadır. Bizde çalışmamızda protein ekstraksiyonu aşamasında günümüzde yeterli geçerliliğe sahip olan klasik jel bazlı teknik kullandık. Tüm bu çalışmalar incelendiğinde FFP dokudan protein çözülmesinde ve tespitinde hala ortak bir yöntem veya algoritma oluşturulamadığı, farklı metodların bulunduğu görülmekle birlikte, gelecekte jel bazlı protein analizi yöntemlerinin daha yüksek sensitivite ve rezolüsyon ile protein analizi gerçekleştirilebileceği, daha yeni ve güçlü güncel protein ekstraksiyonu metodlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Protein ekstraksiyon yöntemlerinin standardize hale getirilmesi ile moleküler bias ortadan kalkacak ve bu şekilde proteom analizlerine güvenilirlik daha da artabilecektir. Sonuç olarak FFP dokular ve taze preparatlar üzerinde protein analizi üzerine, günümüze kadar gerçekleştirilen kıyaslamalı çalışmalar incelendiğinde, her ne kadar bazı çalışmalarda parafinizasyon ve fiksasyon laboratuvar ortamında deneysel amaçlı gerçekleştirilmiş veya ortak proteinler üzerinde çalışılabilmesi amacıyla spektrometrik ölçümler gerçekleştirilememiş olsa da, çeşitlilik göstermekle birlikte %40-91 arasında benzerlik tespit edilmiş ve FFP dokuları üzerinde gerçekleştirilen protein analizi çalışmalarının yeterli güvenilirliğe sahip olduğu kanatine varılmıştır (107). Çalışmamızda FFP dokulardan protein çözülmesi ve pepsin tayini amacıyla kullandığımız tüm bu yöntemler her ne kadar en çok kabul edilen yöntemler olarak görülse de, literatürde başarı oranlarının çeşitlilik göstermekle birlikte ortalama %60-70 arası olması, düşük ihtimal taşımakla birlikte pepsin tespit edilememesinin bir nedeni olarak düşünülebilir.

FFP dokuların değerlendirilmesinde dokuların toplanma şekli, işlenmesi, depolanması, mikrodiseksiyon koşulları, tespit ve arşivlenme uzunluğu gibi birtakım preanalitik değişkenler bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, FFP dokudan incelenmesi planlanan alanın lazer mikrodiseksiyon, ve iğne diseksiyonu yöntemleri arasında ekstraksiyon sonrası anlamlı fark izlenmemiştir (171). Bizde çalışmamızda FFP dokudan parafini öncelikle iğne ile diseksiyon metodu kullandık. Arşivlenen dokuların fiksasyon altında kaldıkları süre bir diğer önemli değişkendir ve literatürde bu konuda farklı görüşler mevcuttur. Rahimi ve ark. (172) çalışmasında iki beyin spesimeni 3 ve 7 yıl süre ile formolde tutulmuş ve beklenmedik şekilde daha uzun süre fiske kalan

dokuda daha yüksek miktarda protein analiz edilebilmiştir. Bir diğer çalışmada fare böbrek ve dalağı 6 saat, 24 saat, 1 hafta ve 14 gün süre ile formolde fiske edilmiş, protein ekstraksiyonu sonrası hiçbir grup arasında anlamlı fark izlenmemiştir. Sprung ve ark. (169) ise 4 günlük fiksasyonun kolon adenokarsinoma spesimenleri üzerindeki protein analizi çalışmalarında, istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde olumsuz etki yarattığının altı çizmiştir. Ostasiewicz ve ark. (170) aynı böbreğe ait 2 ayrı dokudan ilkinin 1 gün diğerini ise 5 gün süre ile muhafaza ederek protein miktarlarını ölçmüşler, her iki grup arasında %82 benzerlik izlenmiş, fakat daha uzun süre fiske edilen örneklerde %7 daha az oranda protein tespit edilmiştir. Sonuç olarak aksini savunan çalışmalar olmakla birlikte fiksasyon süresinin ekstraksiyonu gerçekleştirilen protein miktarı üzerinde olumsuz etki oluşturduğu genel kabul gören bir görüştür. Bizim çalışmamızda da hem benign hem de malign FFP dokularda pepsin varlığına rastlanmamış olması, çok düşük bir ihtimal olmakla birlikte patoloji kliniğine spesimenlerin teslimat ve parafinizasyon öncesi bekleme süresi olan ortalama 24-48 saat süresince formalin içerisinde kalmasına bağlı olabilir. Fikse edilen biyopsi spesimeninin yaşı da bir diğer önemli değişkendir. Bu konuda yapılan çalışmalarda özet olarak depolama ve arşivleme işlemleri, fiksasyon işlemi ile kıyaslandığında daha az olumsuzluk yaratmaktadır (107). Bagley ve ark. (173) çalışmasında 20 yıl ve 6 yıl süre ile arşivlenen örneklerin protein analizi sonuçları kıyaslandığında her iki grup arasında anlamlı fark izlenmemiş ancak 10 yaşın üzerindeki düşük yoğunluklu proteinler daha zor analiz edilebilir olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar ile tutarlı olacak şekilde 1, 3, 5 ve 10 yaşındaki kolon adenokanseri spesimenleri değerlendirilmesinde hiçbir grupta anlamlı fark izlenmemiştir (174). Larenks kanseri dokuları üzerinde gerçekleştirilmiş çalışma olmamakla birlikte genel görüş; ilgili FFP spesimeninin protein içeriğini ve pepsin varlığını belli oranlarda koruyabileceği ve analiz gerçekleştirilmesine uygun olduğu yönündedir. Çalışmamızda 2010-2015 yılları arası opere edilen ileri evre larenks kanseri preperatları değerlendirilmiş olup ortalama $3,66 \pm 1,86$ (minimum: 1, maksimum: 6) yıl muhafaza edilmiş olan spesimenler çalışmaya dahil edilmişti. Literatürde 20 yıla kadar muhafaza edilmiş olan ve incelenen dokularda anlamlı protein yapı farklılığı izlenmediği düşünüldüğünde; parafinizasyon sonrası sürenin, pepsin üzerine herhangi bir etkisi olmadığı söylenebilir. Ayrıca histolojik değerlendirme amacıyla başta hematoksilen olmak üzere boya materyallerinin protein ekstraksiyonu üzerinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığı ortaya konulmuştur (170).

Son olarak larenks kanseri etiyolojisinde yalnızca asit ve pepsinin değil aynı zamanda alkali safra reflüsünün de rol oynayabileceğinin unutulmaması gerekmektedir. Pepsin varlığının ortaya konulamaması larenks kanseri üzerinde non-asit ve non-pepsin reflü gibi başka faktörlerin etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Galli ve ark. (91) alkali safra reflü içeriğinin COX-2 salınımı arttırarak kanser gelişimine yol açabileceği ve gastrik asit ve pepsin dışında ek bir risk faktörü olabileceğini ifade etmiştir.



6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Gastroözefageal reflünün (GÖR) atipik bir formu olan larengofarengeal reflü (LFR); mide içeriğinin öğürme veya kusma olmaksızın üst özefageal sfinkteri aşarak geri kaçıışı ile larenks ve farenksde mukozal inflamasyon oluşturmaya anlamına gelmektedir. Gastrik asit ve gastrointestinal sistemin primer proteolitik asidik enzimi olan pepsin, LFR sonucu oluşan larengeal hasardan primer olarak sorumlu tutulmaktadır. Pepsin analizi, ph monitörizasyonu ve endoskopik muayeneye kıyasla daha ucuz olmasının yanında tükürük ve sürüntü örneklerinde non-invaziv olarak veya doku örneklerinden biyopsi alınmak suretiyle invaziv olarak, hem enzimatik yolla (pepsin assay), hem de immünolojik yolla (ELISA ve Western Blot) tespit edilebilmektedir. Yapılan çalışmalarda aktive olması için asidik ph ortamı gereken pepsinin ph: 7'de bile hücre içerisinde proteolize yol açabileceği ve hücre membranı ve mitokondri hasarı oluşturduğu, stres ve toksiteye neden olan gen ekspresyonlarını ise arttırdığı ortaya konulmuştur (1).

LFR ve larenks kanseri birlikteliği patogenezinde temel olarak; gastrik asit ve pepsin tarafından larengeal mukozada oluşturulan kronik ve tekrarlayıcı kimyasal stimülasyon ile inflamasyonun yattığı düşünülmektedir. Bu konuda gerçekleştirilen çalışmaların bir kısmında larenks kanseri ile LFR arasında ilişki tespit edilmiş iken aksini savunan çalışmalarda azımsanmayacak kadar çoktur. Mevcut çalışmalar ile reflü ve malinite ilişkisinin tam olarak ortaya konulamaması olarak kontrol grubunun kısıtlılığı veya kıyaslanamaz olması, retrospektif analizlerdeki yetersizlikler, prospektif çalışmaların sıklıkla invaziv tetkikler gerektirmesi nedeniyle güçlüğü, uygun olmayan hasta seçimleri nedeniyle tutarlı sonuçlara ulaşamaması ve en önemlisi tanısal testlerdeki yetersizlikler ve tanı kriterleri konusunda fikir birliğine varılamamış olması nedeniyle tutarlı sonuçlara ulaşılamamıştır (3). LFR ve larenks kanseri birlikteliğini ortaya koymayı amaçlayan çalışmaların büyük çoğunluğunda tanı aracı olarak 24 saatlik ph-metri kullanılmış, bir kısmında ise fiberoptik endoskopi, özefagoskopi ve subjektif anketler gibi testler uygulanmış ve çok az sayıda çalışmada ve sınırlı hasta sayısı ile pepsin enzimi varlığı araştırılmıştır (1).

Çalışmamızı, benzer çalışmalardan ayrı kılan ve gördüğümüz kadarıyla literatürde bugüne kadar bahsi geçmeyen en önemli nokta; malign veya benign larengeal neoplazi spesimenlerinde LFR tanısı amacıyla, immünolojik yolla (Western-Blot (WB) ve Enzyme-Linked Immüno Sorbent Assay (ELISA)) pepsin varlığının değerlendirilmiş olmasının yanı sıra, bu tetkiklerin taze larenks kanseri spesimenlerinde veya sürüntü örneklerinde değil de, histopatolojik inceleme ile tanısı doğrulan

ve formol ile fikse ve parafinize (FFP) patoloji spesimenlerinde gerçekleştirilmiş olmasıdır. Çalışmamızda ister taze ister FFP olsun, malign ve benign larenks neoplazileri spesimenlerinin hiçbirinde pepsin tespit edilmedi ve önemli bir LFR belirtici olan pepsinin larenks yassı hücreli kanseri ile, vokal kord nodülü, polipi gibi benign larenks neoplazilerinin etiyolojisinde rolü olmadığı düşünüldü.

Mevcut spesimenlerin hiçbirinde pepsin tespit edilememiş olması, akılda FFP dokuda pepsin tespit edilebilirliği ile ilgili teknik birtakım soru işaretleri oluşmasına yol açmaktadır. Literatürde taze preparatlar yerine FFP dokular üzerinde protein analizi gerçekleştirilen çalışmalarda, çeşitlilik göstermekle birlikte proteinler arasında %40-91 arasında benzerlik tespit edilmiş ve pepsin enzimi analizi amacıyla FFP dokuların uygun işlemlerden geçirilmeleri sonrası rahatlıkla kullanılabileceği ortaya konulmuştur. Çalışmamızda FFP dokulardan protein çözülmesi ve pepsin tayini amacıyla kullandığımız yöntemler her ne kadar en çok kabul gören yöntemler olsa da, literatürde başarı oranlarının çeşitlilik göstermekle birlikte ortalama %60-70 arası olması, pepsin tespit edilememesinin bir nedeni olarak düşünülebilir. Ayrıca fiksasyon süresinin ekstraksiyonu gerçekleştirilen protein miktarı üzerinde olumsuz etki oluşturduğu genel kabul gören bir görüştür (169,170). Bizim çalışmamızda da hem benign hem de malign FFP dokularda pepsin varlığına rastlanmamış olması, patoloji kliniğine spesimenlerin teslimat ve parafinizasyon öncesi bekleme süresi olan ortalama 24-48 saat süresince formalin içerisinde kalmasına bağlı olabilir.

Larenks kanseri gelişiminde yalnızca asit ve pepsinin değil, alkali safra reflüsünün de rolü bulunmaktadır. Alkali safra reflüsünün de, özefageal kanser etiyolojisinde rol oynadığı bilinen COX-2 salınımı arttırarak larenks kanseri gelişimine yol açabileceği ve gastrik asit ve pepsin dışında ek bir risk faktörü olabileceği unutulmamalıdır.

Sonuç olarak formol ile fikse ve parafinize (FFP) halde muhafaza edilen malign ve benign larenks neoplazileri spesimenlerinin hiçbirinde tespit edilmemesi nedeniyle pepsin enziminin, LFR hastalığı ile larenks neoplazileri arasındaki ilişkiyi gösteren bir kanıt olduğunu söylemek güçtür. Larenks neoplazileri gelişiminde LFR hastalığı ve pepsin enzimi varlığının rol oynadığını doğrulamak amacıyla daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7- KAYNAKLAR

1. Johnston N, Yan JC, Hoekzema CR, Samuels TL, Stoner GD, Blumin JH, Bock JM. Pepsin promotes proliferation of laryngeal and pharyngeal epithelial cells. *Laryngoscope*. 2012 Jun;122(6):1317-25. doi: 10.1002/lary.23307. Epub 2012 May.
2. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin* 1998;48:6 – 29.
3. Wilson, Janet A. What is the evidence that gastroesophageal reflux is involved in the etiology of laryngeal cancer?. *Current Opinion in Otolaryngology & Head & Neck Surgery*, April 2005 - Volume 13 - Issue 2 - pp 97-100.
4. Chung JH, Tae K, Lee YS, Jeong JH, Cho SH, Kim KR, Park CW, Han DS. The significance of laryngopharyngeal reflux in benign vocal mucosal lesions. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009 Sep;141(3):369-73
5. Meller SM. Functional anatomy of the larynx. *Clin North Am* 1984;178(1):3-12
6. Cummings CW *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, third edition Mosby Book St Louis: 1998:2326-2345.
7. Kaya S. Larenks Hastalıkları. Ankara: Bilimsel Tıp Yay; Ocak 2002;539–716
8. Welsh LW, Welsh JJ, Rizzo TA: İnternal anatomy of the larynx and spread of the cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1989 Mar;98(3):228-34
9. Adams GL, Maisel RH. Larenks ve Hipofarinksin Malign Tümörleri. In: Cummings CW, et al (Eds) (çeviri editörü: Koç C.). *Otolaringoloji Baş ve Boyun Cerrahisi*. Güneş Tıp Kitapevleri, 2007, cilt 3, bölüm 99, s:2222-2283.
10. Akduman D. Larenks Kanserlerinin Cerrahi Sonuçları; Evrelendirmelerin Preoperatif, İntraoperatif ve Postoperatif Karşılaştırılması; Sağkalım ve Tedavi Sonrası Hayat Kalitelerinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. İstanbul: Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. KBB Kliniği, 2007.
11. Becker W, Neumann HH, Pfaltz CR. KBB Hastalıkları El Kitabı. Cevanşir B, çeviri editörü. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin ve Çocuk KBB hastalıkları, Baş-Boyun Cerrahisi ve İletişim Bozuklukları Derneği Yayını, İstanbul; 1993, ss.386-427.
12. Sagel SS, Aufder Heide JF, Aronberg DJ, Stanley RJ, Archer CR. High resolution computed tomography in the staging of carcinoma of larynx. *Laryngoscope*. 1981 Feb;91(2):292-300
13. Çaylan R. Larenks anatomi ve fizyolojisi. In: Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi (Editör: Koç C.), Güneş Kitabevi 2004; 1141-1154.
14. Thawley SE. Cysts and Tumors of the Larynx. Paperella MM, et al (Eds): *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. W. B. Saunders Company, Philadelphia 1991, Vol 2, Chapter 32, pp: 2307-2370.

15. Sasaki CT, Driscoll BP, Gracco C. Larenks anatomi ve fizyolojisi. In: Ballenger JJ, Snow JB, editors (çeviri editörleri: Şenocak D, Kaleli Ç), Otolarengoloji-Baş ve Boyun Cerrahisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2000: 422-436.
16. Janfaza P, Montgomery WW, Randolph EW. Baş ve boyunun cerrahi anatomisi (Cansız H, Yüksel S, çeviri editörleri). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2002; 629-674.
17. Williams and Warwick. Gray's Anatomy 36 th British Edition W.B. Saunders Company Philadelphia, Churchill Livingstone; 1980.
18. Mutlu V. Kliniğimizde Larenjektomi ve Boyun Diseksiyonu Yapılan Hastalarda; Larenksteki Pirimer Tümörün Lokalizasyonu, Büyüklüğü, Evresi Ve Histopatolojisi İle Boyun Metastazı Arasındaki İlişkinin Retrospektif Olarak İncelenmesi. Uzmanlık Tezi. Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2008.
19. Moore KL, Dalley AF. Clinically Oriented Anatomy. 4th ed. Lippincott-Williams&Wilkins Philadelphia 1999; p: 1038-1047.
20. Cherry J, Margulies SI : Contact Ulcer of the Larynx. Laryngoscope 1968, 78: 1937-1940
21. Malcomson, K.G. Globus Hystericus vel Pharyngis (A Reconnaissance of Proximal Vagal Modalities). J Laryngol Otol1968, 82:219-230.
22. Wiener GJ, Koufman JA, Wu WC, et al. The pharyngo-esophageal dual ambulatory pH probe for evaluation of atypical manifestations of gastroesophageal reflux (GER). Gastroenterology 1987;92:1694
23. Batioğlu A. Laringovideostroboskopik inceleme ve skrolama ile laringofarengeal reflü tanısında ampirik lansoprazol kullanımının etkinliği ve tedavi ile larengeal bulgulardaki değişimler. Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği. 2006.
24. Kahrilas PJ: Upper esophageal sphincter function during antegrade and retrograde transit. Am J Med 1997;103:56-60.
25. Kahrilas PJ, Dodds WJ, Dent J, Haeberle B, Hogan WJ, Arndorfer RC. Effect of sleep, spontaneous gastroesophageal reflux, and a meal on upper esophageal sphincter pressure in normal human volunteers. Gastroenterology 1987; 92:466-471.
26. Shaker R, Hogan W (2000) ReXex-mediated enhancement of airway protective mechanisms. Am J Med 108(4A):8-14
27. Vakil NB, Kahrilas PJ, Dodds WJ, Vanagunas A: Absence of an upper esophageal sphincter response to acid retlux. Am J Gastroenterol 1989; 84:606-610.
28. Koufman JA. The otolaryngologic manifestations of gastroesoph-ageal reflux disease (GERD): A clinical investigation of 225 patients using ambulatory 24-hour pH monitoring and an experimental

investigation of the role of acid and pepsin in the development of laryngeal injury. Laryngoscope 1991;101(Suppl 53):1-78.

29. Yorulmaz İ. Larengofarengeal reflü, derleme. KBB-Forum 2002; 1(1):22-34

30. Hanks JB, Fisher SR, Meyers WC, Christian KC, Postlethwait RW, Jones RS. Effect of total laryngectomy on esophageal motility. Ann Otol Rhinol Laryngol 90:331-334, 1981.

31. Ulualp S, Toohill R, Shaker R. Secondary esophageal peristalsis is preserved in patients with posterior laryngitis. Gastroenterology 1998; 114: 1291.

32. Goyal RK, Rattan S. Neurohumoral, hormonal, and drug receptors for the lower esophageal sphincter. Gastroenterology. 1978;74:598-619.

33. Ossakow SJ, Elta G, Colturi T. Esophageal reflux and dysmotility as the basis for persistent cervical symptoms. Ann Otol Laryngol 1987; 96:387-92.

34. Axford SE, Sharp N, Ross PE, et al. Cell biology of laryngeal epithelial defenses health and disease: Preliminary studies. Ann Otol Laryngol 2001;110 :1099-1108.

35. Koufman JA: The otolaryngologic manifestations of gastroesophageal reflux disease. Ambulatory esophageal pH monitoring. Practical approach and clinical applications. Igakushion Med Publ Inc. New York 1991: 129-149.

36. Wallin L, Madsen T: 24-hour simultaneous registration of acid reflux and peristaltic activity in the esophagus: A study in normal subjects. Scan J Gastroenterol 1979;14: 561-6.

37. Larengofarengeal reflülü hastalarda üst özefageal sfinkterin (krikofarengeal kas) elektrofizyolojik olarak incelenmesi. Uzmanlık Tezi. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kulak Burun Boğaz Kliniği. İstanbul-2009.

38. Bor S, Caymaz-Bor C, Tobey NA, abdulnour-Nakhoul S, Orlando RC: Esophageal exposure to ethanol increases the risk of acid damage in rabbit esophagus. Dig Dis Sci 1999;44(2): 290-300.

39. Kahrilas PJ, Gupta RR: Mechanism of acid reflux associated with cigarette smoking. Gut 1990;31: 4-10.

40. Ulualp SO, Toohill RJ. Larngopharyngeal reflux: state of the art diagnosis and treatment. Otolaryngol Clin North Am 2000; 33(4):785-801.

41. Yorulmaz İ, Küçük B, Palabıyıkoglu M: Gastroözafageal reflünün kulak burun boğaz ile ilgili belirti ve bulguları. Güncel Gastroenteroloji 1998, 2: 237-250.

42. Ulualp SO, Toohill RJ, Kern M, Shaker R: Pharyngo-UES contractile reflex in patients with posterior laryngitis. Laryngoscope 1998, 108: 1354-1357.

43. McNally PR, Maydonovitch CL, Prosek RA, Collette RP, Wong RK: Evaluation of gastroesophageal reflux as a cause of idiopathic hoarseness. *Dig Dis Sci* 1989;34: 1900-1904.
44. Wilson LJ, Ma W, Hirschowitz BI: Association of obesity with hiatal hernia and esophagitis. *Am J Gastroenterol* 1999 Oct;94(10): 2840-4.
45. Nikki Johnston, Peter W. Dettmar, Vicki Strugala, Jacqui E. Allen, and Walter W. Chan. Laryngopharyngeal reflux and GERD. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* ISSN 0077-8923.
46. Tina L. Samuels, MS; Nikki Johnston, PhD. Pepsin as a Marker of Extraesophageal Reflux. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* 119(3):203-208.
47. El-serag HB, Sonnenberg: Comorbid occurrence of laryngeal or pulmonary disease with esophagitis in United States military veterans. *Gastroenterology* 1997;113: 755-760. (PMID: 9287965)
48. Postma GN. Ambulatory pH monitoring methodology. *Ann Otol Laryngol* 2000 (Suppl 184):10-14
49. Postma GN, Belafsky PC, Aviv JE, Koufman JA. Laryngopharyngeal reflux testing. *ENT Journal* 2002;81: (Suppl 2) 14-18.
50. Korsten MA, Rosman AS, Fishbein S. Chronic xerostomia increases esophageal acid exposure and is associated with esophageal injury. *Am J Med* 1991;90:701-6.
51. DeMeester TR, Stein HJ: Ambulatory 24-hour esophageal pH monitoring-what is abnormal? Igakushin Med Publ Inc. New York 1991: 81-92.
52. DeMeester TR, Wang CI, Wernly JA et al.: Technique, indications and clinical use of 24 hour esophageal pH monitoring. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1980;79: 656-70.
53. DeMeester TR, Ching-I Wang, Johnson F: Comparison of clinical test for detection of gastroesophageal reflux. *Eur Surg Res* 1979;11: 13.
54. Johnson F, DeMeester TR: Development of 24 hour intraesophageal pH monitoring composite scoring system. *J Clin Gastroenterol* 1986;8(suppl. 1): 52-58.
55. Pujol A, Grande L, Ros E, Pera C: Utility of in patient 24 hour pH monitoring in diagnosis of gastroesophageal reflux. *Dig Dis Sci* 1988;33: 1134-1140.
56. Johnson F, DeMeester TR: Evaluation of elevation of head of the bed, bethanecol, and antacid foam tablets on gastroesophageal reflux. *Dig Dis Sci* 1981;26: 673-80.
57. Johnson F, Joelson B, Isberg p-E: Ambulatory 24-hour pH monitoring in diagnosis of gastroesophageal reflux disease. *Gut* 1987;28: 1145-50.

58. İşler M, Yönetici M, Çavuşoğlu H: 24 saat intraözafageal pH monitörizasyonu: Gastroözafageal reflü tanısındaki önemi ve yeni bir 24 saat intraözafageal pH bileşik skor yöntemi. Gastroenterohepatol 1995;6: 87-94.
59. Richter JE: Chest pain and gastroesophageal reflux disease. Ambulatory esophageal pH monitoring. Practical approach and clinical applications. Igakushion Med Publ Inc. New York 1991: 115-128.
60. Salvatore C, Sergio M et al.: Esophageal dysmotility and gastroesophageal reflux in intrinsic asthma. Dig Dis dysmotility Sci.1997;42: 1184-88.
61. Yönetici N, İşler M, Bor S, Özütemiz Ö, Çavuşoğlu H: Bronşial astma hastalarında 24 saat intraözafageal pH monitörizasyonu ile gastroözafageal reflünün değerlendirilmesi. Gastroenterohepatoloji 1995;6: 289-294.
62. Schlesinger PK, Donahue PH, Schmid B et al.: Limitations of 24 hour intraesophageal pH monitoring in the setting. Gastroenterology 1985;89: 797-804.
63. Bor S, Caymaz-Bor C, Tobey NA, abdulnour-Nakhoul S, Orlando RC: Esophageal exposure to ethanol increases the risk of acid damage in rabbit esophagus. Dig Dis Sci 1999;44(2): 290-300.
64. Heller SR, Fellows IW, Ogilvie AL, Atkinson M: Non-steroidal antiinflammatory drugs and benign esophageal stricture. Br Med J 1982;285: 167-168.
65. Castell DO: The lower esophageal sphincter : physiologic and clinical aspects. Ann Intern Med 1975;83:390.
66. Beckloff GL, Chapman CH, Shiverdecker P: Objective evaluation of an antacid with unusual properties. J Clin Pharmacol 1972;12:11.
67. Moss HA et al.: Anti-reflux agents: stratification or flotation. Eur J Gastren.Hepatol 1990;2: 45.
68. Verlinden M: Review article: a role for gastrointestinal prokinetic agents in the treatment of reflux esophagitis. Aliment Pharmacol Ther 1989 Apr;3(2): 113-31.
69. Ramirez B, Richter JE: Review article: promotility drugs in the treatment of gastroesophageal reflux disease. Aliment Pharmacol Ther 1993;7: 5-20.
70. Piquette RK: Torsade de pointes induced by cisapride / clarithromycin interaction. Ann Pharmacol Ther 1999 Jan; 33(1): 22-6.
71. Nebel OT, Fornes MF, Castell DO: Symptomatic gastroesophageal reflux: incidence and precipitating factors. Am J Dig Dis 1976;21: 953-956. (PMID: 984016)
72. Castell DO, Richter JE, Robinson M, Sontag SJ, Haber MM: Efficacy and safety of lansoprazole in the treatment of erosive reflux esophagitis. The Lansaprazole Group. Am J Gastroenterol 1996;91: 1749.

73. Lew EA, Barbuti RC, Kovacs TOG et al.: An ascending single-dose safety and tolerance study of an oral formulation of rabeprazole (E3810). *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12: 667-72.
74. Koufman JA, Aviv JE, Casiano RR, Shaw GY. Laryngopharyngeal reflux: Position statement of the committee on speech, voice, and swallowing disorders of the American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;127:32-5.
75. Koufman JA. Gastroesophageal Reflux Disease. In: *Otolaryngology / Head and Neck Surgery*. Cummings CW et al. 1993; 2351.
76. Lindstrom DR, Wallace J, Loehrl TA, Merati AL, Toohill RJ. Nissen Fundoplication Surgery for Extraesophageal Manifestations of Gastroesophageal Reflux (EER). *Laryngoscope* 2002, 112:1762 – 1765.
77. Loughlin CJ, Koufman JA. Paroxysmal laryngospasm secondary to gastroesophageal reflux. *Laryngoscope* 1996; 106:1502-5.
78. Hanks JB, Fisher SR, Meyers WC, Christian KC, Postlethwait RW, Jones RS. Effect of total laryngectomy on esophageal motility. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 90:331-334, 1981.
79. Berstad A, Weberg R, Froyshov Larsen I, Hoel B, Hauer-Jensen M: Relationship of hiatus hernia to reflux esophagitis. A prospective study of coincidence, using endoscopy. *Scand J Gastroenterol* 1986;21: 55-58. (PMID: 3952452)
80. Roberts NB. Review article: human pepsins-their multiplicity, function and role in reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 24 (Suppl.2), 2-9.
81. Analysis of Pepsin in Tracheoesophageal Puncture Sites. Jonathan M, Bock., Mary K, Brawley, Nikki Johnston, Tina Samuels, Becky L. Massey, Bruce H. Campbell, Robert J. Toohill, Joel H. Blumin, *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 119(12):799-805.
82. Karkos PD, McCormick M. The etiology of vocal fold nodules in adults. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009 Dec;17(6):420-3.
83. Powitzky ES. Extraesophageal reflux: the role in laryngeal disease. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2002:485–91.
84. Krouse JH, Dworkin JP, Carron MA, Stachler RJ. Baseline laryngeal effects among individuals with dust mite allergy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;139:149–151.
85. Wynder EL, Stellman SD. Comparative epidemiology of tobacco-related cancers. *Cancer Res* 1977;37:4608- 22
86. Copper MP, Smit CF, Stanojcic LD, Devriese PP, Schouwenburg PF, Mathus-Vliegen LM (2000) High incidence of laryngopharyngeal reflux in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope* 110:1007–1011.

87. Chen MY, Ott DJ, Casolo BJ, Moghazy KM, Koufman JA (1998) Correlation of laryngeal and pharyngeal carcinomas and 24-hour pH monitoring of the esophagus and pharynx. *Otolaryngol Head Neck Surg* 119:460–462
88. Geterud A, Bove M, Ruth M (2003) Hypopharyngeal acid exposure: an independent risk factor for laryngeal cancer? *Laryngoscope* 113:2201–2205
89. Relationship between reflux and laryngeal cancer. Andres Coca–Pelaz, Juan P. Rodrigo, Robert P. Takes, Carl E. Silver, Daniela Paccagnella, Alessandra Rinaldo, Michael L. Hinni, Alfio Ferlito. Published online 22 June 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
90. Francis DO, Maynard C, Weymuller EA, Reiber G, Merati AL, Yueh B. Reevaluation of gastroesophageal reflux disease as a risk factor for laryngeal cancer. *Laryngoscope* 2011;121: 102-105
91. Galli J, Cammarota G, Calo L, et al. The role of acid and alkaline reflux in laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2002;112:1861–1865.
92. Maronian N, Haggitt R, Oelschlager BK, Bronner M, Yang J, Reyes V, et al. Histologic features of reflux-attributed laryngeal lesions. *Am J Med.* 2003 Aug 18;115 Suppl 3A:105S8S.
93. Frejie JE, Beatty TW, Campbell BH, et al. Carcinoma of the larynx in patients with gastroesophageal reflux. *Am J Otolaryngol* 1996;17: 386- 90.
94. Richtsmeier WJ, Eisele DW. In vivo reversal with cimetidine in patients with cancer. *Arch Otol* 1986;112:1074- 7.
95. Shuji Yamashita. Heat-induced antigen retrieval: Mechanisms and application to histochemistry. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 41 (2007) 141–200.
96. Shan-Rong Shi, Clive R Taylor, Carol B Fowler, and Jeffrey T Mason. Complete Solubilization of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue May Improve Proteomic Studies. *Proteomics Clin Appl.* 2013 April ; 7(0): 264–272. doi:10.1002/prca.201200031.
97. Hopwood D, Slidders W, Yeaman GR. Tissue fixation with phenol-formaldehyde for routine histopathology. *Histochem J* 1989;21:228–34.
98. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *J Histochem Cytochem* 1991;39:225–9.
99. McGhee JD, von Hippel PH. Formaldehyde as a probe of DNA structure. I. Reaction with exocyclic amino groups of DNA bases. *Biochemistry* 1975a;14:1281–96.
100. McGhee JD, von Hippel PH. Formaldehyde as a probe of DNA structure. II. Reaction with endocyclic imino groups of DNA bases. *Biochemistry* 1975b;14:1297–303.

101. Orlando V, Strutt H, Paro R. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* 1997;11:205–14.
102. Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker MH, Poggi S, Bifulco C, et al. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 1993;171:83–98.
103. Light and electron microscopic localization of antigens in tissues embedded in polyethylene glycol with a peroxidase labeled antibody method. *J Histochem Cytochem* 1972;20:969–74.
104. Addis, M. F., Tanca, A., Pagnozzi, D., Crobu, S. et al., Generation of high-quality protein extracts from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Proteomics* 2009, 9, 3815–3823.
105. Perroud, B., Ishimaru, T., Borowsky, A. D., Weiss, R. H., Grade-dependent proteomics characterization of kidney cancer. *Mol. Cell. Proteomics* 2009, 8, 971–985.
106. Jiang, X., Jiang, X., Feng, S., Tian, R. et al., Development of efficient protein extraction methods for shotgun proteome analysis of formalin-fixed tissues. *J. Proteome Res.* 2007, 6, 1038–1047.
107. Tanca A, Pagnozzi D, Addis MF. Setting proteins free: progresses and achievements in proteomics of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Proteomics Clin Appl.* 2011; 6:7–21.
108. Nirmalan NJ, Harnden P, Selby PJ, Banks RE. Development and validation of a novel protein extraction methodology for quantitation of protein expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissues using western blotting. *J Pathol.* 2009; 217:497–506.
109. Huang SK, Darfler MM, Nicholl MB, You J, et al. LC/MS-based quantitative proteomic analysis of paraffin-embedded archival melanomas reveals potential proteomic biomarkers associated with metastasis. *PLoS One.* 2009; 4:e4430. [PubMed: 19221597]
110. Heaton KJ, Master SR. Peptide extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Curr Protoc Protein Sci.* 2011; 65:23.5.1–23.5.19.
111. Xie R, Chung JY, Ylaya K, Williams RL, et al. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem.* 2011; 59:356–365. [PubMed: 21411807]
112. Scicchitano MS, Dalmas DA, Boyce RW, Thomas HC, Frazier KS. Protein extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue enables robust proteomic profiles by mass spectrometry. *J Histochem Cytochem.* 2009; 57:849–860. [PubMed: 19471015]
113. Czerwonka L, Jiang JJ, Tao C. Vocal nodules and edema may be due to vibration-induced rises in capillary pressure. *Laryngoscope.* 2008 Apr;118(4):748–52.
114. Johns MM. Update on the etiology, diagnosis and treatment of vocal fold nodules, polyps and cysts. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 11:456–461.
115. Titze IR. Mechanical stress in phonation. *J Voice* 1994; 8:99–105.

116. Courey MS, Shohet JA, Scott MA, Ossoff RH. Immunohistochemical characterization of benign laryngeal lesions. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991; 105:525–531.
117. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005 Mar-Apr; 55(2):74-108.
118. Gallus S, Bosetti C, Franceschi S et al. Laryngeal cancer in women: tobacco, alcohol, nutritional and hormonal factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003 June; 12(6) 514-7.
119. Guney K, Ozbilim G, Derin AT, Çetin S. Expression of PTEN protein in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx* 2007;34:481–6
120. Dr. Erdinç ÇEKİÇ. Larenks kanserlerinde lazer cerrahisi sonrası nüksü kolaylaştıran faktörlerin incelenmesi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilimdalı. Uzmanlık Tezi-2011.
121. Hoffmann D, Hecht SS, Ornaf RM, Wynder EL, Tso TC. Chemical studies on tobacco smoke. XLII. Nitrosonornicotine: presence in tobacco, formation and carcinogenicity. *IARC Sci Publ*. 1976;(14):307–320
122. Kahn HA. The Dorn study of smoking and mortality among U.S. veterans: report on eight and one-half years of observation. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1966;19:1–125.
123. Cohen JT. Bach KK. Postma GN. Koufman JA. Clinical manifestations of laryngopharyngeal reflux. *Ear, Nose & Throat Journal*, 2002;81:19-23.
124. Dr. TUBA MÜDERRİS. Larenks kanserli hastaların tümör dokularında Epstein-Barr Virüsün gerçek zamanlı polimeraz zincirleme reaksiyonu ile saptanması. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı-Haziran 2009.
125. Demireller A. Larenks kanserleri. Koç C (eds) *Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi* GüneşKitapevi Ankara 2004;1183–1187
126. Rosai J, Rosai and Ackerman's Surgical Pathology Ninth ed., New York 2004; p: 335-350
127. Mills SE, Gaffey MJ, Frierson HF. Tumors of the Upper Aerodigestive Tract and Ear. *Armed Forces Institute of Pathology* Washington DC. 2000; pp.45-50.
128. Coşkun H. Larenks Kanserleri. In: Engin K, Erişen L, ed. *Baş Boyun Kanserleri*, Nobel Tıp Kitabevi, 2003, ss.345-407.
129. Kirchner J, Som ML. The anterior commissure technique of partial laryngectomy: clinical and laboratory observations. *Laryngoscope* 1975; 85(8):1308-17.
130. Dr. Muhammet Fatih TOPUZ. Larenksin skuamöz hücreli karsinomunda nötrofil/lenfosit oranının önemi. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz ve Baş-Boyun Cerrahisi Anabilimdalı-2014.

131. Gilpin DA., Hsieh CC, Kuninger DT, Herndon DN. Regulation of the acute phase response genes alpha1 - acid glycoprotein and alpha1 - antitrypsin correlates with sensitivity to thermal injury. *Surgery* 1996; 119; 664-673
132. Kirchner JA, 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.
133. Sasaki CT, Driscoll BP, Gracco C. Larenks anatomi ve fizyolojisi (çeviri: Öktem F).In: Ballenger JJ, Snow JB, editors, Otolarengoloji-Baş ve Boyun Cerrahisi (çeviri editörleri: Şenocak D, Kaleli Ç). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 422-436; 2000
134. Teppo H, Koivunen P, Hyrynkangas K, Alho OP. Diagnostic delays in laryngeal carcinoma:Professional diagnostic delay is a strong independent predictor of survival. *Head Neck* 2003; 25: 389-94.
135. Brouwer J, Senft A, de Bree R, et al. Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer; is there a role for(18) FDG-PET?. *Oral Oncol.* 2006 Mar;42(3):275-80.
136. Frederick L. Greene. *AJCC Cancer Staging Atlas* 6th ed. Chicago: Springer, 2006
137. Larenks kanserlerinde cerrahive radyoterapi tedavisi sonrası tiroid fonksiyonlarının değerlendirilmesi. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Kulak Burun Boğaz Kliniği. Uzmanlık Tezi-2007.
138. Wassenaar E, Johnston N, Merati A, Montenovio M, Petersen R, Tatum R, Pellegrini C, Oelschlager B.Pepsin detection in patients with laryngopharyngeal reflux before and after fundoplication. *Surg Endosc.* 2011 Dec;25(12):3870-6. doi: 10.1007/s00464-011-1813-z. Epub 2011 Jun 22.
139. Dr. Mehmet Akif ABAKAY. Cerrahi olarak tedavi edilen larenksin yassı epitel hücreli karsinomunda fascin-1 ve galectin-3' ün prognostik önemi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi-2013.
140. Johnston N, Dettmar PW, Lively MO, Postma GN, Belafsky PC, Birchall M, Koufman JA. Effect of pepsin on laryngeal stress protein (Sep70, Sep53, and Hsp70) response: role in laryngopharyngeal reflux disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2006 Jan;115(1):47-58.
141. Komatsu Y, Kelly LA, Zaidi AH, Rotoloni CL, Kosovec JE, Lloyd EJ, Waheed A, Hoppo T, Jobe BA. Hypopharyngeal pepsin and Sep70 as diagnostic markers of laryngopharyngeal reflux: preliminary study. *Surg Endosc.* 2015 May;29(5):1080-7.
142. Frejie JE, Beatty TW, Campbell BH, et al. Carcinoma of the larynx in patients with gastroesophageal reflux. *Am J Otolaryngol* 1996;17: 386 - 90
143. Richtsmeier WJ, Eisele DW. In vivo reversal with cimetidine in patients with cancer. *Arch Otol* 1986;112:1074 – 7

144. Qadeer MA, Colabianchi N, Vaezi MF. Is GERD a risk factor for laryngeal cancer? *Laryngoscope* 2005;115:486–491 yer değıştirdi.
145. Vaezi: Vaezi MF, Qadeer MA, Lopez R, Colabianchi N. Laryngeal cancer and gastroesophageal reflux disease: a case-control study. *Am J Med.* 2006 Sep;119(9):768-76.
146. 137. Dağlı S, Dağlı U, Kurtaran H, Alkim C, Sahin B. Laryngopharyngeal reflux in laryngeal cancer. *Turk J Gastroenterol* 2004;15:77–81
147. Lewin JS, Gillenwater AM, Garrett JD, et al. Characterization of laryngopharyngeal reflux in patients with premalignant or early carcinomas of the larynx. *Cancer* 2003; 97:1010-1014
148. Cianci R, Galli J, Agostino S, Bartolozzi F, Gasbarrini A, Almadori G, D'Ugo D, Gasbarrini G, Cammarota G. Gastric surgery as a long-term risk factor for malignant lesions of the larynx. *Arch Surg.* 2003 Jul;138(7):751-4; discussion 755.
149. Doustmohammadian N, Naderpour M, Khoshbaten M, Doustmohammadian A. Is there any association between esophagogastric endoscopic findings and laryngeal cancer?. *Am J Otolaryngol.* 2011 Nov-Dec;32(6):490-3.
150. Qadeer MA, Colabianchi N, Strome M, Vaezi MF. Gastroesophageal reflux and laryngeal cancer: causation or association? A critical review. *Am J Otolaryngol.* 2006 Mar-Apr;27(2):119-28.
151. Price JC, Jansen CJ, Johns ME. Esophageal reflux and secondary malignant neoplasia at laryngoesophagectomy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1990;116:163 - 4.
152. Morrison MD. Is chronic gastroesophageal reflux a causative factor in glottic carcinoma? *Otolaryngol Head Neck Surg* 1988;99:370 – 3.
153. El-Serag HB, Hepworth EJ, Lee P, Sonnenberg A. Gastroesophageal reflux disease is a risk factor for laryngeal and pharyngeal cancer. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2013–2018
154. Nilsson M, Chow WH, Lindblad M, Ye W. No association between gastroesophageal reflux and cancers of the larynx and pharynx. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 May;14(5):1194-7.
155. Ozlugedik S, Yorulmaz I, Gokcan K. Is laryngopharyngeal reflux an important risk factor in the development of laryngeal carcinoma? *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2006;263:339–343
156. Adams J, Heintz P, Gross N, et al. Acid/pepsin promotion of carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;126:405 – 9
157. Marcotullio D, Magliulo G, Pietrunti S, et al. Exudative laryngeal diseases of Reinke's space: a clinicohistopathological framing. *J Otolaryngol* 2002;31:376–80.
158. Kantas I, Balatsouras DG, Kamargianis N, et al. The influence of laryngopharyngeal reflux in the healing of laryngeal trauma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009; 262:253–259.

159. Tiba M, Fawaz S, Osman H. *Helicobacter pylori* and its role in vocal folds' minimal lesions. *Clin Respir J*. 2010 Oct;4(4):237-40.
160. Shi, S. R., Liu, C., Balgley, B. M., Lee, C., Taylor, C. R., Protein extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections: quality evaluation by mass spectrometry. *J. Histochem. Cytochem*. 2006, 54, 739–743.
161. Chung, J.-Y., Lee, S.-J., Kris, Y., Braunschweig, T. et al., A well-based reverse-phase protein array applicable to extracts from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Proteomics Clin. Appl*. 2008, 2, 1539–1547.
162. Prieto DA, Hood BL, Darfler MM, Guiel TG, Lucas DA, Conrads TP, Veenstra TD, Krizman DB. Liquid Tissue: proteomic profiling of formalin-fixed tissues. *Biotechniques*. 2005 Jun; Suppl:32-5.
163. Palmer-Toy, D. E., Krastins, B., Sarracino, D. A., Nadol J. B., Jr., Merchant, S. N., Efficient method for the proteomic analysis of fixed and embedded tissues. *J. Proteome Res*. 2005, 4, 2404–2411.
164. Hwang, S. I., Thumar, J., Lundgren, D. H., Rezaul, K. et al., Direct cancer tissue proteomics: a method to identify candidate cancer biomarkers from formalin-fixed paraffin-embedded archival tissues. *Oncogene* 2007, 26, 65–76.
165. Crockett, D. K., Lin, Z., Vaughn, C. P., Lim, M. S., Elenitoba- Johnson, K. S. J., Identification of proteins from formalin-fixed paraffin-embedded cells by LC-MS/MS. *Lab. Invest*. 2005, 85, 1405–1415.
166. Becker, K. F., Schott, C., Hipp, S., Metzger, V. et al., Quantitative protein analysis from formalin-fixed tissues: implications for translational clinical research and nanoscale molecular diagnosis. *J. Pathol*. 2007, 211, 370–378.
167. Addis, M. F., Tanca, A., Pagnozzi, D., Crobu, S. et al., Generation of high-quality protein extracts from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Proteomics* 2009, 9, 3815–3823.
168. Guo, T., Wang, W., Rudnick, P. A., Song, T. et al., Proteome analysis of microdissected formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens. *J. Histochem. Cytochem*. 2007, 55, 763 – 772.
169. Sprung, R. W., Brock, J. W. C., Tanksley, J. P., Li, M. et al., Equivalence of protein inventories obtained from formalin- fixed paraffin-embedded and frozen tissue in multidimensional liquid chromatography–tandem mass spectrometry shotgun proteomic analysis. *Mol. Cell. Proteomics* 2009, 8, 1988–1998.
170. Ostasiewicz, P., Zielinska, D. F., Mann, M., Wisniewski, J. R., Proteome, phosphoproteome, and N-glycoproteome are quantitatively preserved in formalin-fixed paraffin-embedded tissue and analyzable by high-resolution mass spectrometry. *J. Proteome Res*. 2010, 9, 3688–3700.

171. Xu, H., Yang, L., Wang, W., Shi, S.-R. et al., Antigen retrieval for proteomic characterization of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J. Proteome Res.* 2008, 7,
172. Rahimi, F., Shepherd, C. E., Halliday, G. M., Geczy, C. L., Raftery, M. J., Antigen-epitope retrieval to facilitate proteomic analysis of formalin-fixed archival brain tissue. *Anal. Chem.* 2006, 78, 7216–7221.
173. Toews, J., Rogalski, J. C., Kast, J., Accessibility governs the relative reactivity of basic residues in formaldehyde-induced protein modifications. *Anal. Chim. Acta* 2010, 676, 60–67.
174. Wolff, C., Schott, C., Porschewski, P., Reischauer, B., Becker, K. F., Successful protein extraction from over-fixed and long-term stored formalin-fixed tissues. *PLoS One* 2011, 6, e16353.

