

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ

KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI



**LARENKS KANSERLERİNDE TÜMÖR MARKER  
OLARAK HYALURONİK ASİT ve  
HYALURONİDAZ-1 DÜZEYLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hakkı Caner İNAN

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr. Haydar Murat YENER

İstanbul-2017

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi  
Tarafından Desteklenmiştir. Proje numarası: 21592, proje kodu TTU-2016-  
21592'dir.



## ÖNSÖZ

Öğrenim hayatım boyunca yetişmemde büyük emekleri olan bütün hocalarıma, uzmanlık eğitimim süresince benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen başta Prof. Dr. Özgün ENVER olmak üzere çok değerli hocalarım Prof. Dr. Tahir ALTUĞ, Prof. Dr. Hüsnü ÖZEK, Prof. Dr. İrfan Devranoğlu, Prof. Dr. Salih ÇANAKÇIOĞLU, Prof. Dr. İrfan PAPİLA, Prof. Dr. Ahmet ÖZDOĞAN, Prof. Dr. Mehmet ADA, Prof. Dr. Harun CANSIZ, Prof. Dr. Fatih ÖKTEM, Prof. Dr. Ender İNCİ, Prof. Dr. Özcan ÖZTÜRK, Prof. Dr. Emin KARAMAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Uzmanlık eğitimim ve tezimin hazırlanma sürecinde eşi görülmemiş sabrı, özverisi ve güzel kalbiyle hep yanımda olan ve sadece meslek hayatı içinde değil bundan sonraki ömrümde öz ağabeyim gibi göreceğim değerli hocam Doç. Dr. Haydar Murat YENER'e sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Bütün sorunlarımızla ilgilenen, bizleri hiçbir zaman yalnız bırakmayan hocam ve ağabeyim Doç. Dr. Mehmet YILMAZ ve değerli ablam Uzm. Dr. Ayşegül KARAALTIN'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezimin hazırlanma sürecinde yardımlarını benden esirgemeyen beraber çalıştığımız Prof. Dr. Ayşe Nur BUYRU hocama ve Araş. Gör. Asuman ÇELEBİ'ye teşekkürlerimi sunuyorum.

Beraber güldüğümüz beraber üzüldüğümüz, zor günleri beraber kolaya çevirdiğimiz bütün asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Beni büyük fedakârlıklarla yetiştirip bu günlere gelmemi sağlayan, haklarını ne yapsam ödeyemeyeceğim annem Pakizer İNAN'a, babam Mustafa İNAN'a ve gerektiğinde sırtımı dayayabileceğim en önemli kişi olan kardeşim Hasan Ercan İNAN'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak, tıp fakültesinden itibaren hep yanımda olan ve ömrümün sonuna kadar yanımda olacak, bu yolda en büyük destekçim eşim Özenç İNAN'a ve hayatımıza yeni katılan ve büyük anlam katan kızım Bahar İNAN'a teşekkürlerimi sunuyorum.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
SEMBOLLER ve KISALTMALAR .....	ix
ÖZET.....	xi
ABSTRACT .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Larenks Anatomisi ve Embriyolojisi.....	2
2.1.1. Larenks Kıkırdakları .....	2
2.1.2. Larenks Eklemleri .....	4
2.1.3. Larenks Kasları .....	6
2.1.4. Larenks Damarları.....	7
2.1.5. Larenks Lenfatikleri .....	7
2.1.6. Larenks Ligamentleri ve Membranları.....	8
2.1.7. Larenks Nöroanatomisi .....	8
2.1.8. Larenks Boşluğu( Endolarenks).....	9
2.1.8.1. Supraglottik Bölge .....	9

2.1.8.2.	Glottik Bölge.....	9
2.1.8.3.	Subglottik Bölge .....	10
2.1.9.	Endolarenks Mukozası .....	10
2.1.10.	Vokal Kord Histolojisi .....	11
2.1.11.	Laringeal Membranlar ve Boşluklar: .....	12
2.2.	Larenks Fonksiyonları .....	13
2.3.	Larenks Kanseri .....	14
2.3.1.	Epidemiyoloji .....	14
2.3.2.	Etyoloji .....	14
2.3.3.	Klinik prezentasyon .....	16
2.3.4.	Tanı ve değerlendirme.....	16
2.3.5.	Görüntüleme.....	18
2.3.6.	Evreleme .....	19
2.3.7.	Larenks skuamöz hücreli karsinomlarının tedavisi.....	23
2.3.7.1.	Glottik Kanserin Tedavisi.....	24
2.3.7.2.	Supraglottik Kanserin Tedavisi .....	27
2.3.7.3.	Subglottik Kanserin Tedavisi .....	29
2.3.7.4.	Transglottik Kanserde Tedavi .....	30
2.4.	Hyaluronik Asit ve Hyaluronidazlar .....	30
2.4.1.	Hyaluronik asit .....	30
2.4.2.	Hyaluronidazlar .....	31

2.4.3.	Tümör hücrelerinde hyaluronidaz ekspresyonu .....	31
2.4.4.	Tümör promotör olarak hyaluronidaz .....	33
2.4.5.	Hyaluronidaz tanısal ve prognostik bir belirteçtir.....	33
2.4.6.	Hyaluronidaz ve kanser tedavisi .....	33
<b>3.</b>	<b>GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>35</b>
3.1.	Gereç .....	35
3.1.1.	Çalışma Grubu .....	35
3.1.2.	Kullanılan Cihazlar .....	36
3.1.3.	Kullanılan Ticari Kitler .....	37
3.1.4.	Kullanılan Primerler.....	38
3.2.	Yöntem .....	38
3.2.1.	Dokudan RNA Eldesi.....	38
3.2.2.	Spektrofotometrik Analiz.....	39
3.2.3.	cDNA Eldesi .....	39
3.2.4.	HYAL-1 Geninin İfade Analizi ve Ekspresyon Ölçümü .....	40
3.2.5.	ELİSA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Yöntemi ile Hyaluronik Asit Düzeyinin Belirlenmesi.....	41
3.2.6.	Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi .....	43
<b>4.</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>44</b>
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b>SONUÇ .....</b>	<b>60</b>
<b>7.</b>	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>61</b>

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 2-1.</b> TNM sınıflamasına göre larenks kanserlerinde T evresi .....	20
<b>Tablo 2-2.</b> TNM sınıflamasına göre bölgesel lenf nodu (N) evresi .....	22
<b>Tablo 2-3.</b> TNM sınıflamasına göre uzak metastaz (M) evresi.....	22
<b>Tablo 2-4.</b> Laringeal kanserlerin evreleri .....	23
<b>Tablo 3-1.</b> Gerçek zamanlı PZR için kullanılan HYAL-1 ve G6PD primer dizileri.	38
<b>Tablo 3-2.</b> cDNA sentez bileşenleri ve döngü koşulları.....	39
<b>Tablo 3-3.</b> İfade analizi için gerçek zamanlı PZR karışımı.....	40
<b>Tablo 3-4.</b> Gerçek zamanlı PZR döngü programı .....	40
<b>Tablo 3-5.</b> Standart solüyonların dilüsyonları .....	41
<b>Tablo 4-1.</b> Hastaların demografik özellikleri, sigara ve alkol kullanım durumları ...	44
<b>Tablo 4-2.</b> Hastaların tümör bölgesi, radyoterapi öyküsü, operasyon tipi ve boyun diseksiyonu türüne göre sınıflaması.....	45
<b>Tablo 4-3.</b> Hastaların histopatolojik inceleme sonuçları.....	47
<b>Tablo 4-4.</b> Normal doku ve tümörlü dokularda HYAL-1 ekspresyon miktarı.....	48
<b>Tablo 4-5.</b> Tükürük HA düzeyleri .....	48
<b>Tablo 4-6.</b> Tümör ve normal doku arasındaki HYAL-1 ekspresyon değişimleri ve tükürük HA değişimleri.....	49
<b>Tablo 4-7.</b> HYAL-1 ekspresyon artma durumu ile hastalık özelliklerinin karşılaştırılması .....	50
<b>Tablo 4-8.</b> HYAL-1 ekspresyon artışı ile hastalık özelliklerinin karşılaştırılması....	51
<b>Tablo 4-9.</b> Tümör dokusunda HYAL-1 ekspresyonu artışı ile tükürük HA seviyelerinin karşılaştırılması.....	52

## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2-1.** Larenksin anterior (A) ve posterior (B) görüntüsü. (Seikel JA, King DW, Drumright DG. Anatomy ve Physiology for Speech, Language and Hearing. 4. Baskı) ..... 5
- Şekil 2-2.** Larenksin lateral görüntüsü. Larenks sagital olarak orta hattan kesildiğinden krikoid ve aritenoid kıkırdaklar arasındaki ilişki görülmektedir. (Seikel JA, King DW, Drumright DG. Anatomy ve Physiology for Speech, Language and Hearing. 4. Baskı) ..... 6
- Şekil 2-3.** Koronal kesitte larenks boşluğunun posteriordan görüntüsü. (Seikel JA, King DW, Drumright DG. Anatomy ve Physiology for Speech, Language and Hearing. 4. Baskı) ..... 11



## SEMBOLLER ve KISALTMALAR

AJCC	: American Joint Committee on Cancer
RLS	: Rekürren larengeal sinir
SHK	: Skuamöz hücreli karsinom
HPV	: Human Papilloma Virüs
LFR	: Laringofarengeal reflü
BT	: Bilgisayarlı tomografi
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
HA	: Hyaluronik asit
HYAL	: Hyaluronidaz
HYAL-1	: Hyaluronidaz-1
HAS	: Hyaluronik asit sentetaz
GZ-PZR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
PET	: Pozitron emisyon tomografi
18-FDG	: 18 F-florodeoksiglukoz
UICC	: Union for International Cancer Control
TNM	: Tümör Nod Metastaz
RT	: Radyoterapi
KRT	: Kemoradyoterapi
SKPL	: Suprakrikoid parsiyel larenjektomi
KHEP	: Krikohyoidoepiglottopeksi

ESM : Ekstraselüler matriks

DMA-HA: Düşük molekül ağırlıklı hyaluronik asit

YMA-HA: Yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asit

2<sup>ΔΔCT</sup> : Ekspresyon artış değeri

Ng/ml : Nanogram/mililitre



## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, son yıllardaki tüm gelişmelere rağmen 5 yıllık sağ kalım oranları azalan nadir hastalıklardan biri olan larenks kanserlerinde, birçok malignitede seviyeleri artan Hyaluronidaz-1 ve hyaluronik asit düzeylerinin araştırılması ve hastalık özellikleri ile olan ilişkilerinin ortaya konmasıdır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışma 2016-2017 tarihleri arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda larenks skuamöz hücreli karsinomu nedeniyle açık cerrahi yöntemle total ve parsiyel larenjektomi yapılan 50 hasta üzerinde prospektif olarak yapılmıştır. Hastaların normal doku ve tümör doku örneklerinde gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Hyaluronidaz-1 (HYAL-1) ekspresyonu; ELİSA yöntemiyle ise tükürük Hyaluronik asit (HA) değerleri ölçülmüştür. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından Desteklenmiştir. Proje numarası: 21592, proje kodu TTU-2016-21592'dir.

**Bulgular:** Hastaların yaşları 34 ile 84 arasında değişmekte olup ortalama  $60,56 \pm 9,67$ 'dir. Hastaların 47'si (%94) erkek; 3'ü (%6) kadındır. 50 hasta incelendiğinde  $2^{\Delta\Delta CT}$  değeri tümör hücrelerinde 2,5 normal dokularda ise 1,0 olarak bulunmuştur. Tümör dokularında normal dokuya göre HYAL-1 ekspresyonu ortalama 2,5 kat artmıştır ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ). Tükürük hyaluronik asit (HA) seviyeleri incelendiğinde ortalama  $103,93 \pm 69,04$  ng/ml olarak bulunmuştur. Hastaların HYAL-1 ekspresyon derecesi ile tükürük HA düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ( $p = 0,647$ ).

**Sonuç:** Bu çalışmada elde ettiğimiz veriler ışığında larenks skuamöz hücreli kanserlerinde HYAL-1 ekspresyonu artmaktadır. İleride yapılacak çalışmalarda bu geni hedef almak hastalığın tanı ve tedavisinde faydalı sonuçlar verebilir.

**Anahtar kelimeler:** Larenks kanseri, HYAL-1, hyaluronidaz, hyaluronik asit.

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study is to investigate the levels of Hyaluronidase-1 and hyaluronic acid in laryngeal cancers, in which 5-year survival rates decrease despite all the developments in recent years, and their relationship with disease characteristics.

**Material and Method:** This study was carried out prospectively on 50 patients who underwent total and partial laryngectomy by open surgical method for laryngeal squamous cell carcinoma at the Ear, Nose and Throat Diseases Department of Istanbul University Cerrahpasa Medical Faculty between 2016-2017. Hyaluronidase-1 (HYAL-1) expression was measured by RT-PCR in normal tissue and tumor tissue samples of patients; hyaluronic acid (HA) values of saliva were measured by ELISA method. This work was supported by Scientific Research Project Coordination Unit of Istanbul University. Project number: 21592, project code TTU-2016-21592.

**Findings:** The ages of the patients ranged from 34 to 84, with a mean of  $60.56 \pm 9.67$ . Forty-seven (94%) of the patients were male; 3 (6%) were females. When 50 patients were examined, the mean value of  $2\Delta\Delta CT$  was found to be 2.5 in tumor tissue and 1.0 in normal tissue. HYAL-1 expression increased 2.5-fold in tumor tissue compared to normal tissue and the difference was statistically significant ( $p < 0.001$ ). When the levels of saliva hyaluronic acid (HA) were examined, it was found to be  $103.93 \pm 69.04$  ng/ml. There was no statistically significant relationship between HYAL-1 expression level and salivary HA level of the patients ( $p = 0.647$ ).

**Conclusion:** In this study, we found HYAL-1 expression in laryngeal squamous cell carcinomas is elevated compared to normal tissues of same patients. Targeting this gene in future studies may provide beneficial results in the diagnosis and treatment of the disease.

**Key words:** Larynx cancer, HYAL-1, hyaluronidase, hyaluronic acid.

## 1. GİRİŞ

Larenks kanserleri baş boyun kanserleri arasında 2. en sık görülen malignite olup, 5 yıl ve üzeri sağ kalım tüm larenks kanserleri arasında %67'dir. Bu tümörlerle ilgili önemli özelliklerden biri özellikle ileri evrelerde bölgesel ve uzak metastaz riskidir. Tümörün metastaz olasılığı hücreler arası bağ doku ve bazal membranı yıkma kabiliyetiyle de ilişkilidir. Hyaluronik asit (HA), ekstraselüler matriksin önemli bir bileşeni olup; tümör hücrelerine karşı bariyer görevi görmektedir. Hyaluronidazlar (HYAL) ise HA'ı yıkan başlıca enzimlerdir. Literatürde, prostat ve mesane kanserlerinde idrarda ve tümör dokusunda artmış HYAL-1 ekspresyonu ve enzimi tespit edilmiştir. Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile melanomda, kolon kanserinde, glioblastomda, meme ve over kanserlerinde artmış hyaluronidaz ekspresyonları tespit edilmiştir.

Son dönemlerde, hyaluronidaz aktivitesini azaltmayı sağlamak için hedefe yönelik tedavi edici ajanlar üzerinde çalışılmaktadır. Bu çalışmaya başlarken amacımız larenks kanserlerinde HYAL-1 ekspresyonunu göstermek, tümörlü ve normal dokuları karşılaştırmak, farklı tümör evrelerinde tümörlü dokularda HYAL-1 ekspresyonunu belirlemek, ayrıca tükürükte HA seviyelerine bakarak tümör belirteci veya prognostik özelliğini incelemektir. Ayrıca eğer artmış HYAL-1 seviyeleri bulunursa bu durum aynı prostat kanserlerinde olduğu gibi hedefe yönelik tedavi edici ajanların larenks kanserlerinde de kullanımının incelenmesine temel sağlayacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Larenks Anatomisi ve Embriyolojisi

Larenks, boynun ön kısmında yerleşen nefes alma, ses oluşumu ve üst solunum yollarının aspirasyondan korunması gibi fonksiyonları olan önemli bir organdır. Larenks embriyolojik olarak iki farklı taslaktan gelişir. Bukkofaringeal tomurcuktan supraglottis, trakeobronşiyal tomurcuktan ise glottis ve subglottis gelişim gösterir. Frazer 1909 yılında supraglottisin bukkofaringeal tomurcuktan orta hat birleşmesi olmadan geliştiğini göstermiş olup; larenksin cerrahi olarak bölünmesinin anatomik ve embriyolojik olarak uyumlu olduğunu belirtmiştir. Tarihsel olarak tümörün invazyon ve davranışlarını öngörmeye bu bölünme değer taşımaktadır. Larenksin gelişimi postnatal dönemde de devam eder, 25 yaşlarında kemikleşmeye başlar ve 65 yaş civarında bu kemikleşme tamamlanır. <sup>1</sup>

Erişkin insanda larenksin üst sınırı tiroid kıkırdak üst kenarı veya 3. servikal vertebranın korpusunun alt kenarından geçen yatay bir plan ile alt sınırı krikoid kıkırdak alt kenarı veya 6. servikal vertebra korpusunun alt kenarından geçen yatay plandır. Çocuklarda ise larenks daha yüksekte olup 1-4 servikal vertebralar arasındadır. Yaş ilerledikçe yavaş yavaş aşağıya iner ve adölesan çağında yetişkindeki yerini alır. <sup>1</sup>

Larenks, hyoid kemik ve 9 adet kıkırdak ile bunları tespit eden ligamanlar, membranlar ve kaslardan oluşur.

#### 2.1.1. Larenks Kıkırdakları

- a) **Tiroid kıkırdak:** Larenks kıkırdaklarının en büyüğüdür ve orta hatta birleşen iki laminadan oluşmaktadır. Bu iki lamina erkeklerde 90<sup>0</sup>, kadınlarda ise 120-140<sup>0</sup> 'lik bir açı oluşturacak şekilde birleşirler. Laminaların süperiorda inkomplet birleşmesi sonucu tiroid çentik oluşur. Her iki laminanın arka sınırında yukarı ve aşağı doğru uzantıları vardır. Yukarı doğru olan uzantıya superior kornu, aşağı doğru olan uzantıya ise inferior kornu denir. İnférieur kornu, krikoid kıkırdak ile eklem yaparken;

superior kornu lateral tirohyoid ligaman ile hyoid kemiğe bağlanır.<sup>2</sup> İnférieur kornu süperiora göre daha kısa ve kalındır. Tiroid kıkırdağın iç ve dış yüzü, perikondriyum ile örtülüdür (Şekil 1). Dış perikondriyum, iç perikondriyuma göre kıkırdağa daha zayıf yapışmıştır. Kıkırdağın iç yüzeyi oldukça düzdür. İç yüzde tiroid çentik ile alt kenar arasındaki mesafenin yaklaşık olarak ortasına denk gelen yerde küçük bir kabartı vardır. Buraya ön kommisür tendonu (Broyle Ligamanı) yapışır. Perikondriyum içermeyen bu bölge kanser invazyonu için önemlidir. Epiglotun petiolusu bu noktanın yaklaşık 1 cm kadar üzerine tiroepiglottik ligaman ile yapışır. Tiroid kıkırdağın üst kenarına tirohyoid membran, alt kenarına krikotiroid membran ve ligaman yapışır.<sup>3</sup>

- b) Krikoid kıkırdak:** Hyalin yapıda olan bu kıkırdak, tiroid kıkırdağın hemen altında bulunmaktadır. Larenks kıkırdaklarından en sağlam ve en kalın olanıdır. Tiroid kıkırdaktan farklı olarak, larengeal havayolunu çevreleyen tam bir halka şeklindedir. Ön kısım yüksekliği 5-7 mm, arka kısım yüksekliği ise 20-30 mm arasında değişir. Tiroid ve aritenoid kıkırdak ile eklem yaptığı yüzeylere sahiptir (Şekil 2-1).<sup>2</sup>
- c) Epiglot:** Elastik kıkırdak yapısında olan epiglot kıkırdak yaprak şeklindedir. Dil kökü ve hyoid kemik korpusunun arkasında yer alır ve larenks girişini oluşturur. Petiolus adı verilen bir sapı vardır. Petiolus, ön kommisürün üzerinde tiroid laminaya yapışır. Epiglotun ön orta kısmı median glossoepiglottik ligaman ve lateral glossoepiglottik ligamanlar aracılığıyla dile tutunur. Bu plikalar arasında bulunan çukurlara vallekula denilmektedir. Epiglot hyoide ön alt yüzeyinde hyoepiglottik ligaman ile bağlanır. Epiglotun lateralinden farenks lateral duvarına uzanan kıvrıma farengoepiglottik plika adı verilir. Epiglotun larengeal parçasının ön kısmında tabanı tiroepiglottik ligaman ile sınırlanan bir yağ yastığı vardır ve yutkunma esnasında epiglot yukarı ve öne doğru hareket ederek larenksin girişini kapatır, bolusun geçmesini sağlar.<sup>3</sup>

- d) **Aritenoid kıkırdaklar:** Çift kıkırdakların en büyükleridir ve fonksiyon olarak krikoid ile birlikte larenksin en önemli yapısal elamanlarındandırlar. Fibroelastik yapıda olup epeks kısımları hariç hyalin yapıdadırlar. Şekil olarak üç yüzlü piramide benzerler. Krikoid kıkırdak posterior laminası üzerindeki krikoaritenoid eklem yüzlerinde otururlar. Öne doğru olan çıkıntı vokal çıkıntı olarak adlandırılır ve bu bölgeye vokal kordların posterior bölümleri bağlanır. Lateraldeki çıkıntıya muskuler çıkıntı denir ve bu bölgeye posterior krikoaritenoid, lateral krikoaritenoid, oblik aritenoid ve tiroaritenoid kaslar yapışır (Şekil 2-2).<sup>2</sup>
- e) **Kornikulat kıkırdaklar:** Santorini kıkırdakları da denilen bu küçük kıkırdaklar, aritenoid kıkırdaklarının tepesi ile eklem yapar.<sup>3</sup>
- f) **Kuneiform kıkırdaklar:** Wrisberg kıkırdağı da denilen bu kıkırdaklar, kornikulat kıkırdağın hemen önünde ariepiglottik plika içinde olup pasif destek fonksiyonları vardır.<sup>3</sup>

### **Hyoid Kemik**

Tam olarak larenksin bir parçası değildir ancak larengeal fonksiyonlarda yer alır. Preepiglottik mesafenin ön bölümünü oluşturur. Erişkinde hipofarenks ön duvarı ve dil kökünün ön-alt bölümünde tiroid kıkırdağın hemen üzerinde 3. servikal vertebra seviyesinde bulunur. Gövdesinin her iki tarafta kornu majus ve kornu minus olarak adlandırılan boynuzları vardır. Vertikal olarak tirohyoid membran ve superior kornu ile tiroid kıkırdağa tutunur. Suprahyoid ve infrahyoid kaslar arasında asılıdır. Başka kıkırdak veya kemik yapılar ile eklem yapmaz.<sup>2</sup>

### **2.1.2. Larenks Eklemleri**

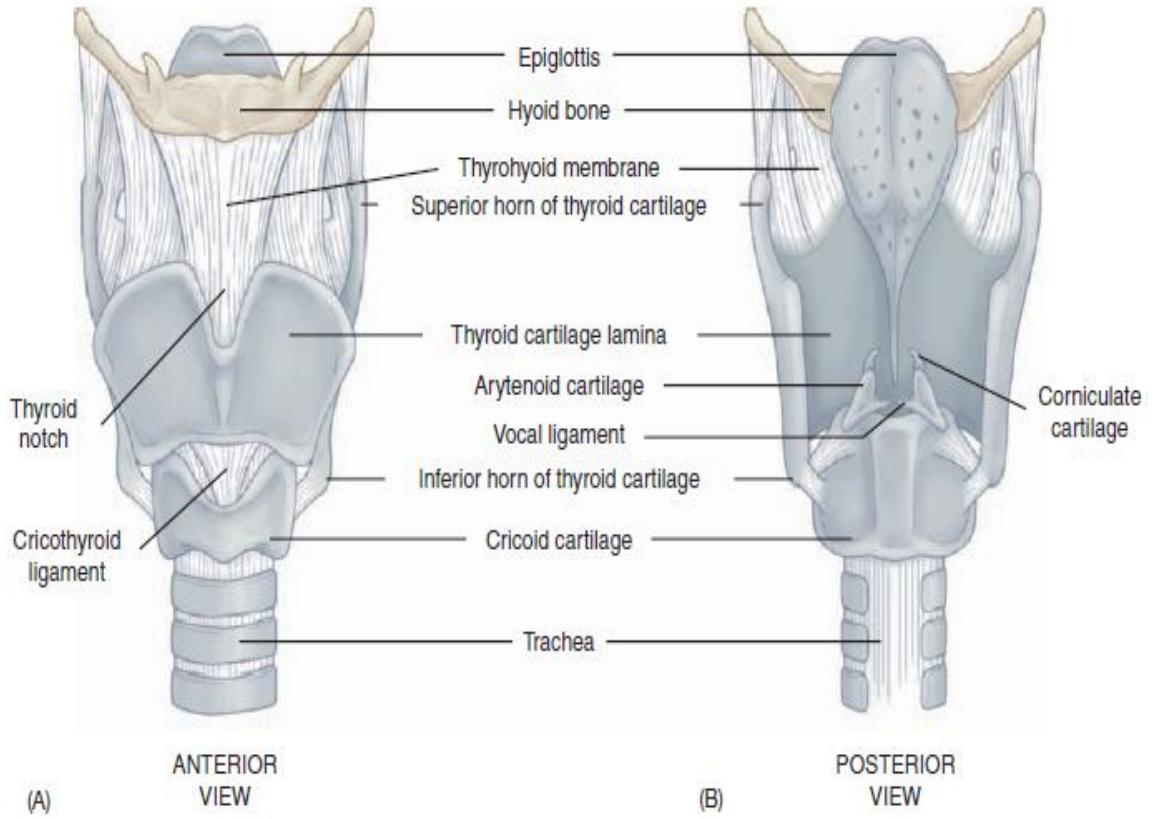
İki önemli eklemi vardır: Krikotiroid ve krikoaritenoid eklemler. Bu eklemlerin her ikisi de gerçek sinovyal eklemlerdir.

- a) **Krikotiroid eklem:** Tiroid kıkırdağın alt kornusu ile krikoid kıkırdağın eklem yüzeyi arasında bulunur. Sesin kalınlaşmasından sorumlu bu eklem,

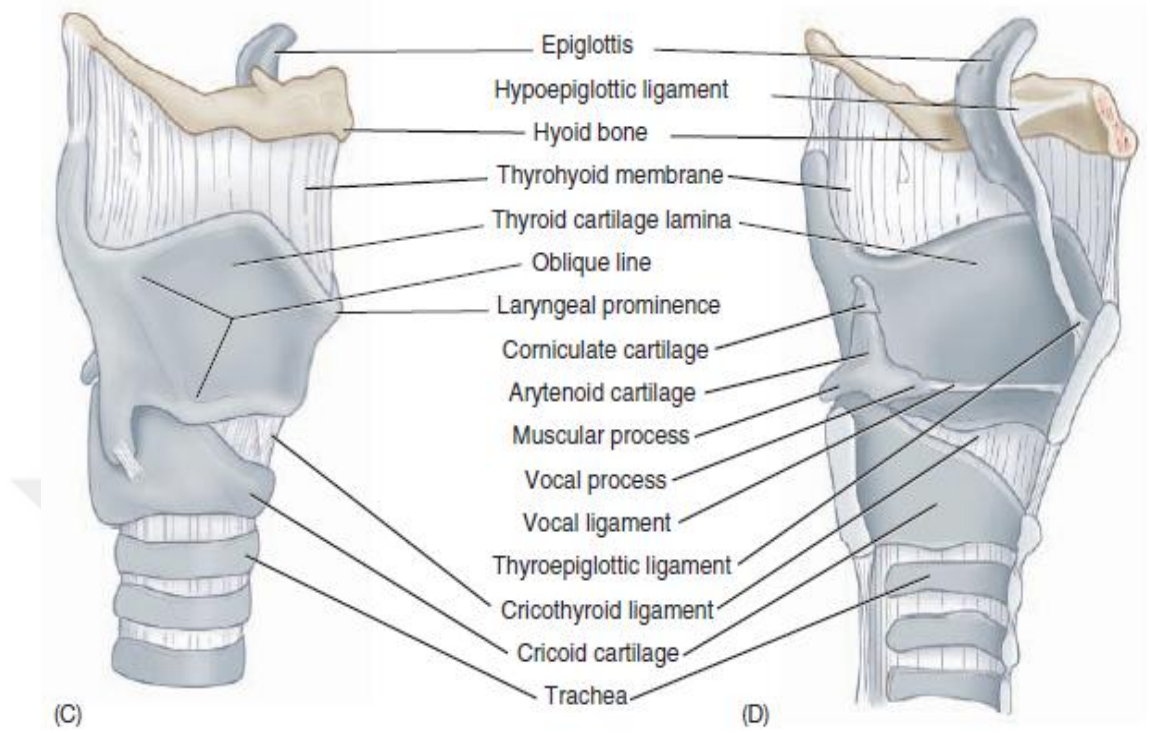


her iki alt kornu üzerinden geçen bir hat üzerinde rotasyon hareketi ile kornu üzerinde öne ve arkaya, sınırlı bir kayma hareketi yapar.<sup>4</sup>

- b) **Krikoaritenoid eklem:** Aritenoid kıkırdak tabanı ile krikoid kıkırdak laminası üst köşesindeki eklem yüzeyi arasındadır. Eklem rotasyon ve kayma hareketi vardır. Arka, üst ve içten, alt ön ve dışa doğru uzanan oblik bir hatta meydana gelen rotasyon hareketi ile vokal kordlar abduksiyon ve adduksiyon hareketini yaparlar.<sup>2</sup>



**Şekil 2-1.** Larenksin anterior (A) ve posterior (B) görüntüsü. (Seikel JA, King DW, Drumright DG. Anatomy ve Physiology for Speech, Language and Hearing. 4. Baskı)



**Şekil 2-2.** Larenksin lateral görüntüsü. Larenks sagital olarak orta hattan kesildiğinden krikoid ve aritenoid kıkırdaklar arasındaki ilişki görülmektedir. (Seikel JA, King DW, Drumright DG. Anatomy ve Physiology for Speech, Language and Hearing. 4. Baskı)

### 2.1.3. Larenks Kasları

Larenksin kasları intrensik ve ekstrensik kaslar olarak iki grupta incelenmektedir.

- a) Ekstrensik kaslar:** Larenksin bir bütün halinde hareketi ve fiksasyonu ile ilgilidirler. Suprahyoid ve infrahyoid kaslar olarak iki gruba ayrılırlar. Suprahyoid kaslar hyoid ve larenksi yukarı ve öne, infrahyoid kaslar ise aşağı çeker.<sup>3</sup>

**Suprahyoid kaslar:** Geniohyoid, Mylohyoid, Stilohyoid ve Digastrik kaslardır.

**İnfrahyoid kaslar:** Omohyoid, Sternohyoid, Sternotiroid, Tirohyoid kaslardır.

**b) İntrensik kaslar:** Larenks fonksiyonlarından esas sorumlu kaslardır. Krikotiroid kas hariç tümü vagusun rekürren larengeal dalı ile innerve edilir. Fonksiyonlarına göre şu şekilde sınıflandırılır:

**Abdüktör kaslar:** Vokal kordların tek abdüktörü posterior krikoaritenoid kaktır.(m.postikus) Bu kasın hareketiyle vokal kordlar birbirinden uzaklaşır, uzar ve gerginleşir.

**Addüktör kaslar:** Vokal kordları birbirine yaklaştırırlar. Lateral krikoaritenoid kas en önemli addüktördür. Tiroaritenoid ve interaritenoid kaslar da addüksiyonda rol alır.

**Tensör (Gerici) kaslar:** Krikotiroid kas(eksternal tensör) ve vokalis kası da denilen internal tiroaritenoid kas(internal tensör) rol alır.<sup>2</sup>

#### **2.1.4. Larenks Damarları**

Larenksin kanlanması superior ve inferior tiroid arterin larengeal dallarından sağlanır. Superior larengeal arter, superior larengeal sinirle birlikte tirohiyoid membranı delerek larenkse girer. Vokal kordlara kadar olan larenks bölgesini ve piriform sinüsü besler. Tiroservikal trunkusun inferior tiroid arter dalının bir devamı olan inferior larengeal arter, rekürren sinir ile birlikte trakea ve özefagus arasındaki olukta yukarı doğru ilerler. Rekürren sinir ile birlikte, alt konstrüktör kasın derininden geçerek larenkse girer. Vokal kordların serbest kenarlarının altında kalan bölümünü kanlandırır. İki arterin dalları arasında anastomozlar vardır. Venöz direnaja arterlere eşlik eden süperior ve inferior larengeal venler aracılığı ile internal juguler vene ve tiroservikal trunkusa boşalır.<sup>2</sup>

#### **2.1.5. Larenks Lenfatikleri**

Pratik olarak glottik bölgenin lenfatik drenajının olmadığı ya da çok az olduğu kabul edilmektedir. Larengeal lenfatiklerin en yoğun olduğu supraglottik bölgenin lenfatik drenajı tirohiyoid membranı geçerek üst ve orta derin servikal zincire doğru olurken; subglottik bölgenin lenfatik drenajı krikotiroid membranı geçerek önce pretrakeal ve prelarengeal (delphian nodülü), buradan da orta derin servikal zincire

doğru olmaktadır. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, epiglot orta hat yapısı olduğundan lenfatik akımı bilateralidir.<sup>2</sup>

### **2.1.6. Larenks Ligamentleri ve Membranları**

Hiyoepiglottik ligament, epiglotun ön yüzü ile hyoidin arka üst parçası arasında yer alır. Krikotrakeal ligament, krikoid ile birinci trakea halkası arasındadır. Farengoepiglottik ligament, epiglotun yan kenarlarından yanlara farenks fasyasına doğru uzanır. Krikotiroid membran, tiroid kartilajın alt kenarından krikoid kartilajın üst kenarına kadar uzanır. Tirohiyoid membran, tiroid kıkırdağın üst kenarından başlayıp hiyoid kemiğin hemen altından geçip hiyoidin üst kenarında sonlanır. Krikovokal membran (konus elastikus) , glottik ve subglottik mesafeyi paraglottik mesafeden ayırır. Kuadreguler membran epiglotun serbestkenarına tutunarak başlar ve arkaya doğru ilerleyerek aritenoid kıkırdağın medial yüzüne yapışır.<sup>2</sup>

### **2.1.7. Larenks Nöroanatomisi**

Larenks; N.vagusun dalları olan süperior ve inferior larengal sinirler tarafından innerve edilir. Süperior ve inferior laringeal sinirler aralarındaki Galen anastomozuyla birbirlerine bağlanırlar. Galen anastomozu arkus aortadaki baro ve kemoreseptörlere duysal inervasyon sağlarken; trakea ile özefagusa motor inervasyon sağlamaktadır.

Süperior laringeal sinir, N. Vagus'tan ayrıldıktan sonra larenkse girmeden eksternal ve internal olarak iki dala ayrılır. İnternal dal sadece duysal dal içerirken; eksternal dal hem duysal hem motor dallar içerir. Eksternal dal krikotiroid kası inerve etmektedir. İnternal dal, tirohyoid membranı superior laringeal arter ile beraber delerek içeri girer ve glottik alan ve yukarısındaki mukozal alanların duysal innervasyonunu sağlar. Gıdaların aspire edilmesini engelleyen öksürme refleksini taşır.

İnferior(Rekürren) larengal sinir (RLS) krikotiroid kasın dışındaki larenksin tüm intrensik kaslarının motor innervasyonunu ve glottik ile subglottik larenksin duysal innervasyonunu sağlar. Seyri boyunun her iki tarafında farklıdır. Sağda A.Subklavia ve solda arkus aortayı dönerek yeniden boyuna yükselen bir yol

izlediklerinden rekürren adını alır. Sağ RLS subklavian arterin önünde vagustan ayrılır. Subklavian arterin etrafında, önden arkaya doğru ilerler ve ardından trakeözefagial oluk içinde yukarı doğru yönelir. Sol RLS ise, arkus aortayı döner, arkus aortanın arkasındaki ligamantum arteriosum lateralinde geçer ve trakeözefagial oluğa girer. Tiroid bezinin alt ucunda inferior tiroid arterin dalları arasında ilerler. Genelde sinir arterin derinindedir, ancak çok çeşitli varyasyonlara rastlanabilir. Her iki taraftaki RLS, tiroid loblarının posteriorunda trakeaya paralel olarak ilerleyerek farenksin alt konstriktör kasının hemen altında krikotiroid eklemde larinkse ulaşır.<sup>5</sup>

### **2.1.8. Larenks Boşluğu( Endolarenks)**

Larenks kavitesi farenksle ilişkili olan larengeal girişiten, trakea ile devam eden krikoid kıkırdak alt kenarına kadar devam eder. Endolarenkste kenarlardan kaynaklanıp ve iç kısma doğru uzanan sağlam soluk bir çift plika vardır. Üstteki plikalara ventriküler band, alttakine vokal kord denir. Vokal kordlar larenksi üç bölgeye ayırır (Şekil 2-3).<sup>2</sup>

#### **2.1.8.1. Supraglottik Bölge**

Epiglot ucundan laringeal ventrikül tabanı ve lateral duvarı birleşim yerine kadar uzanan bölgedir. Epiglotun suprahyoid- infrahyoid bölümleri, preepiglottik bölge, ariepiglottik plikalar, iki aritenoid, ventriküler band bu bölgededir. Vallecula ise orofarenkse aittir. Alt sınır olarak ventrikül apeksinden geçen horizontal düzlem kabul edilir. Supraglottik kanserlerde diğer önemli bir bölgede marjinal zondur. Bu bölgeden kaynaklanan tümörler daha agresiftirler. Bu bölgeye suprahyoid epiglot ve ariepiglottik plikalar dâhildir.

Histolojik olarak supraglottik bölge siliyalı kolumnar epitelyum ile kaplıdır. Sadece epiglot serbest kenarları ve ariepiglottik plikalar çok katlı yassı epitel ile kaplıdır.<sup>2</sup>

#### **2.1.8.2. Glottik Bölge**

Glottik bölge, her iki yanda vokal kordlar, önde ön komissür ve arkada arka komissür tarafından sınırlanan bölgedir. Alt sınır apeksin 1 cm altından geçen

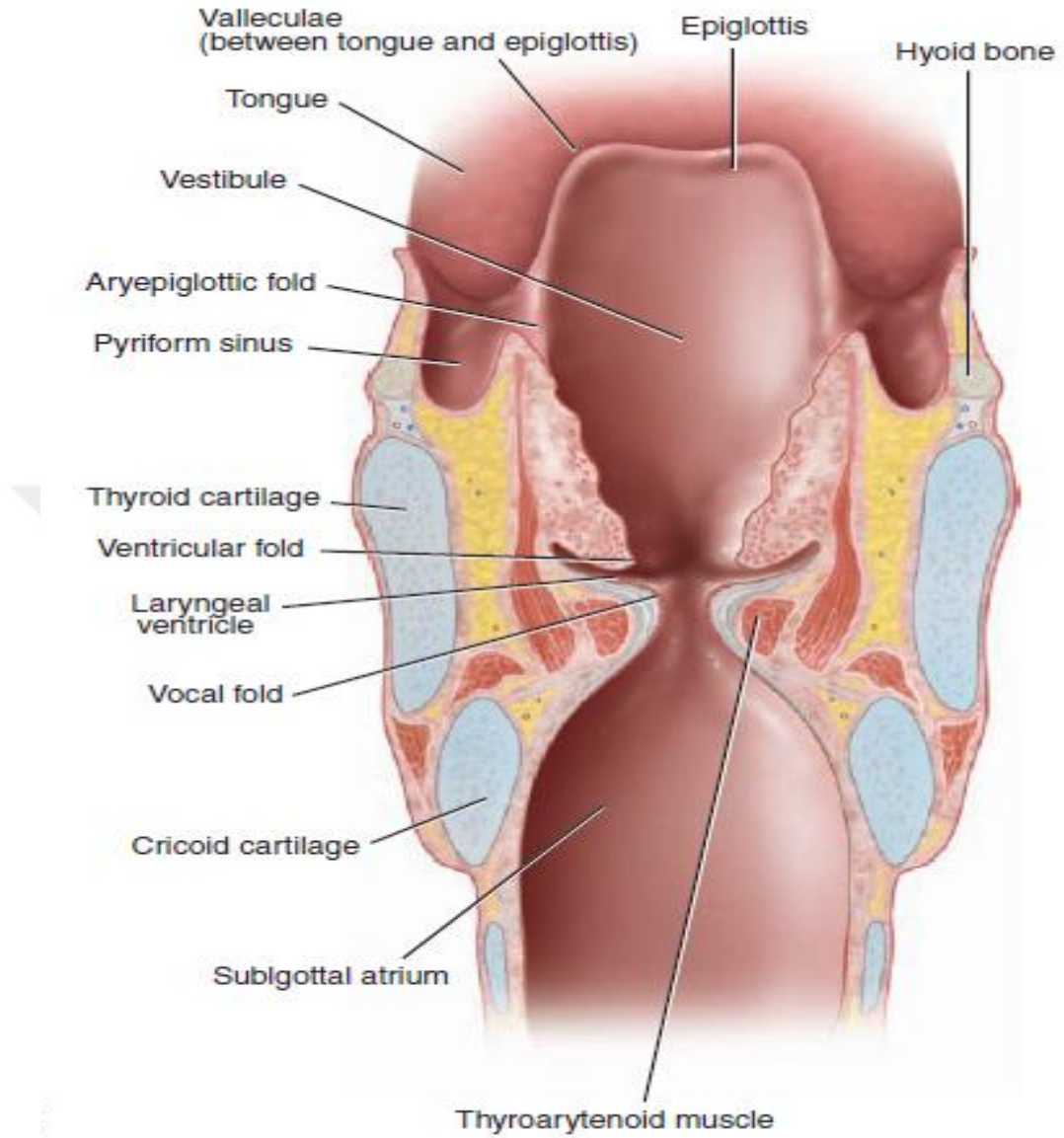
horizontal çizgidir. Vokal kordlar, ön komissürde Broyle ligamanıyla tiroid kartilaj iç yüzüne yapışırlar ve bu bölgede perikondrium bulunmamaktadır. Arka komissür ise esas olarak aritenoid çıkıntılar, interaritenoid kas ve krikoid posterior lamina tarafından sınırlanırlar. Bölge histolojik olarak çok katlı yassı epitelle kaplıdır. Yetişkin erkekte glottisin ortalama uzunluğu 23 mm, yetişkin bayanda ortalama 17mm kadardır. Yetişkinlerde üst solunum yolunun en dar kısmıdır.<sup>2</sup>

### **2.1.8.3. Subglottik Bölge**

Glottik bölgenin alt sınırından krikoid kartilajın alt kenarına kadar uzanan bölgedir. Üst sınır olarak vokal kordların alt yüzeyindeki skuamöz epitel-silyalı respiratuar epitel geçiş zonu ya da vokal kordların 0,5-1 cm altı önerilmektedir. Bölgenin destek yapıları krikoid kırık ve konus elastiktir. Primer olarak buradan başlayan tümörler son derece nadirdir, genellikle glottik kanserler bu bölgeye uzanır.<sup>2</sup>

### **2.1.9. Endolarenks Mukozası**

Larenks mukozası silyalı çok katlı kolumnar epitel ve çok katlı yassı epitelden oluşur. Yukarıda ağız ve hipofarenks mukozası ile devam eder. 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. Epitelin altında değişken bir bazal membran ve bu ikisini ayıran gevşek bir fibröz stroma tabakası mevcuttur. Bu fibröz tabaka vokal kordlarda, epiglotun larengeal yüzünde mevcut değildir.<sup>2</sup>



**Şekil 2-3.** Koronal kesitte larenks boşluğunun posteriordan görüntüsü. (Seikel JA, King DW, Drumright DG. Anatomy ve Physiology for Speech, Language and Hearing. 4. Baskı)

#### **2.1.10. Vokal Kord Histolojisi**

Vokal kordlar histolojik olarak şu tabakalardan oluşur:

1. Keratinize olmayan çok katlı yassı epitel
2. Lamina propria:

- a) Lamina proprianın yüzeyel tabakası: Reinke boşluğu olarak da isimlendirilen ve daha çok amorf yapıda ekstraselüler sıvıdan oluşan yapıdır.
- b) Lamina proprianın orta tabakası: Elastik liflerden oluşmakta ve vokal ligamanın yüzeyel tabakasını meydana getirmektedir.
- c) Lamina proprianın derin tabakası: Kollajen liflerden oluşmakta ve vokal ligamanının derin tabakasını meydana getirmektedir.

3. Kas tabakası: Önde tiroid kıkırdak iç perikondriumuna, arkada aritenoid kıkırdak vokal çıkıntısına yapışan tiroaritenoid kastan meydana gelir.

Mekanik olarak vokal kordlar üç tabaka olarak davranır:

1. Örtü: Skuamöz epitel ve lamina proprianın yüzeyel tabakası
2. Geçiş bölgesi: Lamina proprianın orta ve derin tabakaları
3. Gövde: Vokalis kasi<sup>2</sup>

### **2.1.11. Laringeal Membranlar ve Boşluklar:**

**Reinke Boşluğu:** Vokal kordun mukozasının altında bulunan, fibröz yapılardan zayıf subepitelyal konnektif doku tabakasıdır. Yukarıda vokal ligamentin superolateral kenarı boyunca, ventrikül tabanına doğru ilerler. Etrafı sağlam fibröz doku ile çevrelenmiştir. Kordun serbest kenarından 2 mm kadar uzaklıktadır. Kord kanserlerinin bu aralığa girmesi, lenfatik geçişin başladığını gösterir.<sup>2</sup>

**Tirohyoid membran:** Tiroid kıkırdağın üst kenarı ile hyoid kemik arasındaki elastik fibröz yapıdır. Ortada ve kenarlarda daha kalındır ve bu kalınlıklar lateral tirohyoid membran adını alır. Preepiglottik boşluğun ön yüzünü oluşturur.

**Konus elastikus (Kriko-vokal ligaman):** Üstte vokal ligaman ve aritenoidin vokal çıkıntısından başlayıp krikoid kıkırdak iç perikondriumunun ortasında sonlanan fibröz yapıdır. Vokal ligamanlar konus elastikusun kalınlaşmış parçası ve devamıdır. Paraglottik boşluğun alt kısmı ile subglottik boşluğu birbirinden ayırır.



**Kuadrangüler membran:** Epiglotun lateralinden başlayıp ariepiglottik kıvrım içinde aşağı inen fibröz yapılardır. Arkada aritenoid ve kornikulat kıkırdaklara yapışarak sonlanırlar ve alt uçları vestibüler ligamanı (band vokaller) oluşturur.

**Preepiglottik Boşluk:** Preepiglottik boşluk adından da anlaşılacağı üzere epiglotun anteriorunda yer almaktadır ve epiglot bu boşluğun arka sınırını oluşturmaktadır. Sınırları üstte hyoepiglottik ligaman ve vallekula mukozası, altta tiroepiglottik ligaman ve önde tirohyoid membran ve tiroid laminanın iç yüzeyleridir. Lateralde preepiglottik boşluk paraglottik boşluklara açılmaktadır. Epiglotun infrahyoid parçasından köken alan tümörler bu yapıyı delebilir ve preepiglottik boşluğa yayılabilir.<sup>2</sup>

**Paraglottik Boşluk:** Paraglottik boşluk, glottik bölgenin her iki yanında yer almaktadır. Yalancı ve gerçek vokal kordların hem altında hem de üstünde yer alır ve tümörlerin transglottik ve ekstralaringeal yayılımı açısından önemlidir. Boşluk medialde kuadrangüler membran, ventrikül ve konus elastikus; lateralde tiroid laminanın perikondriyumu ve krikotiroid membranla sınırlıdır. Ön üst kısımda preepiglottik boşluğun posterior parçasına açılır. Piriform sinüs mukozası ise arka sınırını oluşturur. Paraglottik boşluğun komşulukları bu alanı laringeal kanserlerin yayılımında önemli bir duruma getirmektedir. Bu boşluğa giren supraglottik tümörler kolayca ekstralaringeal yayılım gösterebilirler.<sup>2</sup>

**Subglottik Boşluk:** Üstte, önde ve orta hatta Broyle ligamanı, lateralde konus elastikusun medial yüzeyi ve medialde subglottik mukoza ile sınırlıdır.

## 2.2. Larenks Fonksiyonları

Larenksin primer ve en ilkel fonksiyonu, solunum esnasında alt hava yollarını korumaktır. Diğer fonksiyonları, öksürük, Valsalva manevrası ve akciğerlere giren çıkan havanın kontrolü ve düzenlenmesidir. Larenks ayrıca solunum kontrolünü ve kardiyovasküler fonksiyonları etkileyen birçok refleksin aferent ayağını oluşturan duyuşsal bir organdır.<sup>3</sup>

## **2.3. Larenks Kanserleri**

### **2.3.1. Epidemiyoloji**

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2016 yılı içinde 13,430 larenks kanseri vakasının tanı alacağı ve yaklaşık 3620 hastanın bu hastalık nedeniyle yaşamını yitireceği tahmin edilmektedir. Larenks kanseri erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülmektedir (sırasıyla 5.8/100,000 ve 1.2/100,000).<sup>6</sup> Hastaların yaklaşık %60'ı ileri evrede (evre 3 veya 4) tanı almaktadırlar. Ne yazık ki larenks kanseri, 5 yıllık sağ kalım oranı geçen 40 yıl içinde azalan birkaç kanser türünden bir tanesidir. Toplam insidansı azalmasına rağmen 5 yıllık sağ kalım %66'dan %63'e düşmüştür.<sup>6</sup> Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı verilerine göre en sık görülen kanserler sıralamasında 7.7/100,000 ile 6. Sırada gelmektedir.<sup>7</sup> Hastalık çoğunlukla 6. Ve 7. dekatta ortaya çıkmaktadır. Larenkste birçok malignite görülebilmesine rağmen, vakaların %95'inden fazlası larenksi kaplayan epitelden köken alan skuamöz hücreli karsinomdur (SHK).

### **2.3.2. Etyoloji**

#### **Tütün ve alkol**

Tütün ve alkol kullanımı larenks kanseri için iki önemli risk faktörüdür. Alkol ve tütün kullanımının süresine ve miktarına bağlı olarak risk artmakta; kullanımın bırakılmasından sonra yavaşça düşmekte fakat en az 20 yıl boyunca bazal risk seviyesine inmemektedir. Sigara içenler içmeyenlere göre 10-15 kat daha fazla riske sahiptirler ve yoğun sigara kullanımı olanlarda bu oran 30 kata kadar çıkmaktadır.<sup>8</sup> Zuo ve ark.'ları<sup>9</sup> yıllık 40 paket veya üstü sigara kullanımı öyküsü olan bireylerde kanser riskinin 9 kat arttığını raporlamışlardır. Alkol ve tütünün birlikte kullanımı sinerjistik etki göstermektedir. Alkol tüketimi özellikle supraglottik karsinomlar için risk faktörüken, tütün glottik karsinomlarla ilişkilidir.

## **Diğer toksinler**

Bazı çevresel faktörlere maruziyetin larenks SHK riskini arttırdığı düşünülmektedir. Bunlar asbest, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, sülfirik asit, hasırdal gazı, metal tozları, asfalt ve tekstil tozlarıdır.<sup>10</sup>

## **Diyet**

Sebze ve meyvelerin artmış tüketimi ile kırmızı et ve yağ ürünlerinin azalmış tüketimi baş boyun kanserleri açısından koruyucu etkiye sahiptir.<sup>11</sup>

## **Human Papilloma Virüs (HPV)**

Larenks SHK açısından bir diğer önemli faktör HPV enfeksiyonudur. Çok sayıda türü olmasına rağmen oral kavite ve farenks bölgesinde ortaya çıkan epidermoid kanserlerin gelişiminde rol oynayan HPV 16 olarak bildirilmektedir.<sup>12</sup> Son yayınlanan bir metaanalizde larenks SHK olan hastaların %28'inde HPV enfeksiyon bulunmuştur.<sup>13</sup> Xu ve ark.'larının 674 larenks kanseri hastasını incelediği bir çalışmada bu oran %4,9 olarak raporlanmıştır.<sup>14</sup> Erken evre (evre 1-2) tümörlerin, geç evre (evre 3-4) tümörlerden, glottik tümörlerin, supraglottik tümörlerden daha yüksek oranda HPV pozitifliği gösterdiği saptanmıştır.<sup>15</sup>

## **Laringofarengeal reflü**

Larenksin kronik iritasyonu, larenks kanseri açısından risk faktörü olarak kabul edilmektedir ve özellikle sigara ve alkol tüketimi olmayan hastalarda etken olarak düşünülmektedir. Asit içeriğin laringofarengeal reflüsü (LFR)' nün kanser gelişiminde rolü olabileceği düşüncesi 1980'lerde ortaya çıkmıştır. Geniş hasta sayısı ile yapılan bir çalışmada LFR'nin, sigara ve alkol kullanımından bağımsız olarak larenks ve farenks kanseri riskini orta derecede yükselttiği belirtilmiştir.<sup>16</sup> Alkalın safra reflüsü bir diğer faktör olabilir. Bir çalışmada gastrektomi yapılanlarda kontrol gruplarına göre larenks kanseri insidansı artmış olarak bulunmuştur.<sup>17</sup>

### 2.3.3. Klinik prezentasyon

Larenks SHK'nın semptomları primer tümörün köken aldığı yere bağlı olarak değişmektedir. Glottik SHK'ların ana semptomu ses kısıklığıdır. Çok küçük lezyonlarda dahi vokal kordların titreşim özellikleri bozulduğundan bu bölgenin tümörleri erken bulgu verirler. Fakat şikâyetler dikkate alınmazsa ve hastalık ilerlese dispne ve stridor ortaya çıkabilir. Glottik tümörler, doğal bariyerlerden ve lenfatiklerin azlığından dolayı uzun süre bu bölgede sınırlı kalırlar.<sup>18</sup> Supraglottik tümörler vokal rezonansı bozularından disfoni yapabilirler. Disfaji, odinofaji, stridor, dispne, otalji ve hemoptizi diğer semptomlardır. Supraglottik tümörü olan hastalar larengeal semptomlar olmadan ilk olarak boyunda lenfadenopati ile gelebilirler. Subglottik SHK çoğunlukla ileri evrede tanı alır ve dispne ile stridor en sık görülen semptomdur.<sup>19</sup>

Larenks muayenesinde SHK ülseratif, ekzofitik, sesil veya polipoid lezyonlar olarak görülebilir. Ventrikülosakküler sistemden köken alan tümörler erken evrede görülemeyebilir ve derin biyopsiler almak gerekebilir. Bir diğer bulgu laringoseldir. Laringoseli olan hastalarda direkt laringoskopi dikkatli şekilde açılı endoskoplarla yapılmalı ve ventrikül muayene edilmelidir.

### 2.3.4. Tanı ve değerlendirme

Larenks SHK'nın tanısı sıklıkla larenks muayenesindeki bulgulara bağlı olarak koyulur. Fizik muayene, fleksible laringoskopi, genel anestezi altında endoskopik muayene, biyopsi ve görüntüleme tanıda kullanılan yöntemlerdir.

#### **Fizik Muayene**

Palpasyonda larenksin ağrılı ve hassas olması, larenks iskeletinde genişleme, fizyolojik krepitasyonun kaybolması gibi bulgular tespit edilebilir. Tirohyoid ve krikotroid membran bölgesinde dolgunluk olabilir. Bu tümörün, tiroid kıkırdak veya tirohyoid membran bariyerini aşmış doğru cilt altına (bazen ciltten de dışarı çıkar) yayıldığı zaman görülür ve bu durum hastalığın ileri evrede olduğunu gösteren bir bulgudur.

Dil kökü palpe edilmelidir. Vokal kord fiksasyonu olan bir hastada, rekürren sinir fonksiyonunun bozulması ile direkt krikoaritenoid eklem tutulumuna bağlı fiksasyon ayırt edilmelidir. Lenf nodu metastazı açısından supraklavikular bölge üstünde kalan tüm boyun alt bölgeleri dikkatli bir şekilde palpe edilmelidir.<sup>5</sup>

**Bronkoskopi, özofagoskopi ve nazofaringoskopi:** Aynı anda ikinci primer tümör varlığının ve tümörün yayılımının tespiti açısından önemlidir.

**İndirekt larengoskopi:** Tanının ilk basamağıdır. Larenks aynası ile yapılır. Larenksin ana görüntüsü ve dil kökünü iyi gösterir. Tümörün yeri, yayılımı, görünümü, vokal kordların mobilitesi iyice gözden geçirilmelidir. Ancak anterior komissür, subglottik bölge, preepiglottik bölge, paraglottik bölge ve kıkırdak invazyonlarının değerlendirilmesinde güçlük yaşanabilir.<sup>2</sup>

**Endoskopik larenks muayenesi:** Özellikle son yıllarda, larenksin endoskopi ile değerlendirilmesi rutin muayene haline gelmiştir. İndirekt ayna ile değerlendirilemeyen larenks bölgeleri ve aşırı öğürme refleksi olan hastaların muayenesini oldukça kolaylaştırmıştır. Daha pahalı ve ileri bir teşhis metodu olan fleksibl nazofaringoskop kullanımı da gittikçe yaygınlaşmaktadır. En sık kullanılan teleskoplar çocuklarda 2,7mm ve erişkinlerde 4mm çaplı 70 derece teleskoplardır.<sup>2</sup>

**Mikrolarengoskopi:** Preoperatif teşhiste en önemli basamaklardan biridir. Bu yöntemle, tümörün yeri ve yaygınlığı, ventrikül ve sinüs piriformis gibi gizli köşelerin durumu ve tümörün yüzeysel karakteri (nodüler, ekzofitik, granülatöz, ülser vb. gibi) hakkında çok değerli bilgiler elde etmek mümkündür. Hastalığın histopatolojik tanısının da konması için bu aşamada biyopsi alınmalıdır. 70 ve 90 derecelik açılı endoskoplarla ariepiglottik foldlar, epiglot, aritenoidler, interaritenoid bölge, yalancı vokal kordlar, gerçek vokal kordlar yanında subglotis, band ventrikül, anterior komissür gibi rutin muayene ile değerlendirilemeyen bölgeler incelenebilmektedir. Eğer mümkünse hipofarenksin alt bölümleri de değerlendirilmelidir.<sup>2</sup>

**Biyopsi:** Kesin tanı için gereklidir. Tümörün histopatolojik tipi, diferansiyasyon derecesi saptanabilir. Tümörü yakalamak için yeterince derinden alınmalıdır.

### 2.3.5. Görüntüleme

Larengeal malignensi şüphesi olan bir hastanın değerlendirmesinde radyolojik görüntüleme önemlidir. Bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) larenks tümörlerinin değerlendirilmesinde en faydalı bilgileri verir.<sup>20</sup>

MRG bazı durumlarda daha üstün olmasına rağmen, BT en sık kullanılan yöntemdir. Ossifiye kartilaj ve kalsifikasyon gibi kemik yapıların görüntülemesinde BT daha üstündür. Kartilaj invazyonunun tespiti ve yumuşak doku değerlendirmesinde ise MRI daha üstündür. MRG'nin BT'ye göre dezavantajları artmış hareket artefaktının artmasına yol açan ve çözünürlüğü azaltan uzun görüntüleme zamanı, kemik invazyonunun tespitinde düşük yeteneği ve artmış maliyettir. Ayrıca MRG, pacemaker kullanan hastalarda veya diğer ferromanyetik yabancı cisim olanlarda kontraendikedir. Reaktif inflamatuvar değişiklikler ve tümör arasında tam ayırım yapamadığından yabancı pozitiflik oranı yüksektir.<sup>21</sup>

BT incelemeleri, ekstralarengeal yapıları ve lenf nodlarının değerlendirmek için boynu taramakta, 1mm aralıklarla kesitler alarak detaylı incelemeye olanak sağlamakta ve multiplanar rekonstruksiyona izin vermektedir. Aksiyel kesitler tümör lokalizasyonunu ve boyutunu doğru tespit edebilmek için vokal kordlara paralel olarak çekilmelidir. Primer tümör sıklıkla kontrast tuttuğundan, intravenöz kontrast kullanılması önemlidir. Yağ baskılı sekans gibi özel MRG serileri, özellikle paraglottik ve preepiglottik boşlukların değerlendirilmesinde faydalıdır.<sup>5</sup>

Radyoaktif madde işaretli glukoz (18 F-florodeoksiglukoz (FDG)) kullanılarak çekilen pozitron emisyon tomografisi (PET) malignensi ve inflamasyon gibi diğer patolojik hastalıklar arasında ayrımı yapmakta kullanılabilir. PET, BT ile beraber çekildiğinde (PET-BT) şüpheli alanların anatomik lokalizasyonunu mükemmel şekilde verir. PET'in faydaları: bölgesel ve uzak metastazları tespit ederek malign

tümörlerin evrelemesi, primeri bilinmeyen tümörlerin tanısı, senkron tümörlerin belirlenmesi ve özellikle larenkse radyoterapi tedavisi uygulanmış hastalarda rezidüel veya rekürren kanserleri tespit etmesidir.<sup>5</sup>

Radyoloji larengeal SHK'larının evrelemesinde önemli bir role sahiptir. Çünkü klinik ve endoskopik muayene primer tümörün derin invazyonunu belirlemede yetersiz kalmaktadır. Primer tümörün evrelemeyi belirleyen bazı özellikleri (preepiglottik boşluk, paraglottik boşluk, tiroid veya krikoid kartilaj, ekstralarengeal dokular, prevertebral faysa, mediastinal yapılar ve karotis invazyonu) görüntüleme olmadan değerlendirilemez.<sup>20</sup>

Preepiglottik boşluk invazyonuna BT'de bu bölgedeki yağ dokusunun kaybı ve orta derecede kontrast tutan bir kitleyle yer değiştirmesiyle tanı konur. MRG preepiglottik bölge ve dil köü invazyonunun tespitinde yüksek sensitiftir ve BT'ye üstündür. Tiroid ve krikoid kartilajların radyolojik görüntüsü ossifikasyonun derecesine bağlı olarak değişir. BT kemik ve kalsiyumun görüntülemesinde MRG'ye üstün olmasına rağmen; larenks kartilajlarının belirlenmesinde MRG daha üstündür. MRG kartilaj invazyonu açısından yüksek sensitiviteye ve yüksek negatif prediktif değere sahiptir. Fakat reaktif tümör ve inflamasyon arasındaki ayrımı tam yapamaması düşük spesifite ve %70'lere varan düşük pozitif prediktif değerlere yol açmaktadır.<sup>5</sup>

BT kartilaj invazyonunun tanısında MRG'ye göre daha az sensitiftir. BT'de görülen ekstralarengeal yayılım, sklerozis, erozyon ve lizis kartilaj invazyonunu düşündürür. Yine MRG subglottik tümörlerde krikoid invazyonunun tespitinde daha üstündür. Kartilaj invazyonunun doğru tanısı oldukça önemlidir çünkü erken evre bir tümörü T3 veya T4 bir tümöre dönüştürebilir. Bu tümörler RT'ye kötü cevap, kötü lokal kontrol ve artmış osteokondronekrozis riski taşırlar.<sup>5</sup>

### **2.3.6. Evreleme**

Malign tümörlerin evrelemesinde, AJCC (American Joint Committee on Cancer) ve Union for International Cancer Control (UICC) 1943 yılında Pierre Denoix tarafından geliştirilen Tümör Nod Metastaz (TNM) sınıflamasını

kullanılmaktadır. TNM sınıflaması primer tümörün yayılımını (T), bölgesel lenf nodlarının varlığını veya yokluğunu ve yayılımını (N) ve uzak metastaz olup olmadığını (M) içermektedir. Larenks kanserlerinin sınıflamasında 2017 yılında yayınlanan AJCC/UICC TNM sınıflama sistemi kullanılmaktadır (Tablo 2-1, 2, 3).<sup>22</sup> Bu sistem kullanılarak T, N ve M değişik kombinasyonlarına göre tümörler evrelere ayrılmaktadır (Tablo 2-4). Tümörler klinik olarak (kTNM) veya patolojik (pTNM) olarak sınıflanabilir.

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

<b>TNM sınıflaması</b>	
<b>Primer tümör (T)</b>	
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümöre ait herhangi bir bulgu yok
Tis	Karsinoma in situ
<b>Supraglottis</b>	
T1	Normal vokal kord hareketleriyle birlikte supraglottisin bir kesimine sınırlı tümör
T2	Larenks fiksasyonu olmadan supraglottisin birden fazla alt bölgesine veya glottise ya da supraglottis dışında bir bölgeye (Dil kökü, valleküla, priform sünüşün medial duvar mukozası, vb) invaze tümör
T3	Vokal kord fiksasyonu ile birlikte larenkse sınırlı ve/veya postkrikoid alanın, preepiglottik boşluk, paraglottik boşluktan herhangi birine ve/veya tiroid kıkırdağın iç korteksine invaze tümör
T4a	Orta düzeyde lokal ileri hastalık Tiroid kartilaj ve/veya larenks dışında herhangi bir dokuya (trakea, dilin ekstrinsik kasları dahil boyun yumuşak dokusu, strap kası, tiroid veya özefagus vb) invaze tümör
T4b	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık Tümör prevertebral boşluğa invaze veya karotid arteri sarmış



<b>Glottis</b>	
T1	Normal vokal kord hareketleriyle beraber vokal kord(lar)a sınırlı (anterior veya posterior komissürü tutabilir) tümör
T1a	Bir vokal korda sınırlı tümör
T1b	Her iki vokal kordu tutmuş tümör
T2	Supraglottis ve/veya subglottise uzanan tümör ve/veya vokal kord hareketinde bozukluk
T3	Vokal kord fiksasyonuylabirlikte larenkse sınırlı ve/veya paraglottik boşluğa invaze ve/veya tiroid kartilajın iç korteksine invaze tümör
T4a	Orta düzeyde lokal ileri hastalık Tiroid kartilaj dış korteksine ve/veya larenks dışında herhangi bir dokuya (trakea, dilin ekstrinsik kasları dahil boyun yumuşak dokusu, strap kası, tiroid veya özefagus vb) invaze tümör
T4b	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık Tümör prevertebral boşluğa invaze veya karotid arteri sarmış
<b>Subglottis</b>	
T1	Subglottise sınırlı tümör
T2	Tümör vokal korda uzanıyor ve vokal kord hareketleri normal ya da bozulmuş
T3	Vokal kord fiksasyonuylabirlikte larenkse sınırlı tümör
T4a	Orta düzeyde lokal ileri hastalık Krikoid veya tiroid kartilaja ve/veya larenks dışında herhangi bir dokuya (trakea, dilin ekstrinsik kasları dahil boyun yumuşak dokusu, strap kası, tiroid veya özefagus vb) invaze tümör
T4b	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık Tümör prevertebral boşluğa invaze veya karotid arteri sarmış

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

<b>Bölgesel Lenf Bezleri (N)</b>	
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemedi
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Tek ipsilateral lenf nodu metastazı, 3 cm veya daha küçük ve EKY-negatif
N2	Tek ipsilateral lenf nodu metastazı, 3cm veya daha küçük ve EKY-pozitif; veya 3 cm'den büyük 6 cm'den küçük ve EKY- negatif; veya multiple ipsilateral lenf nodu metastazı, hepsi 6 cm'den küçük ve EKY-negatif; veya bilateral veya kontralateral lenf nodu metastazı, hepsi 6 cm'den küçük e EKY-negatif
N2a	Tek ipsilateral veya kontralateral 3 cm'den küçük lenf nodu metastazı ve EKY-pozitif; veya tek ipsilateral lenf nodu 3 cm'den büyük 6 cm'den küçük ve EKY- negatif
N2b	Multiple ipsilateral lenf nodu metastazı, hepsinin çapı 6 cm'den küçük ve EKY-negatif
N2c	Bilateral veya kontralateral lenf nodlarına metastaz, hepsinin çapı 6 cm'den küçük ve EKY-negatif
N3	6 cm'den büyük lenf nodu metastazı ve EKY- negatif; veya tek ipsilateral lenf nodu, 3 cm'den büyük ve EKY- pozitif; veya multiple ipsilateral, kontralateral veya bilateral EKY-pozitif olan metastazlar
N3a	6 cm'den büyük lenf nodu metastazı ve EKY- negatif
N3b	Tek ipsilateral lenf nodu, 3 cm'den büyük ve EKY- pozitif; veya multiple ipsilateral, kontralateral veya bilateral EKY-pozitif olan metastazlar

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

<b>Uzak Metastaz (M)</b>	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

**Tablo 2-4.** Laringeal kanserlerin evreleri

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

### **2.3.7. Larenks skuamöz hücreli karsinomlarının tedavisi**

Larenks kanserlerinde tedavinin amacı hastayı sağlığına kavuşturmak, larenks fonksiyonlarını korumak ve tedavi sonrası morbiditeyi minimize etmektir. Tedavi türünün kararını vermede; tümörün histolojik tanısının koyulması, tümör lokalizasyonunu belirlenmesi ve hastalığın evrenmesi (TNM) gerekmektedir.

Larenks kanserlerinde çeşitli tedavi yöntemleri olmasına rağmen cerrahi ve radyoterapi (RT) iki en önemli tedavi şeklidir. Son 30 yılda larenks koruyucu cerrahiler (parsiyel larenjektomiler) ve kemoterapi ile kombine edilen radyoterapi (kemoradyoterapi (KRT)) tedavide kullanılmaktadır. Genel olarak erken evre larenks kanserleri (evre 1 veya 2) tek tedavi yöntemiyle (tek başına cerrahi veya radyoterapi) tedavi edilmektedir. İleri evre larenks kanserlerinde (evre 3 veya 4) ise kombine tedavi yöntemleri (primer cerrahi sonrası RT veya KRT veya primer KRT veya RT sonrası kurtarma cerrahisi) kullanılmaktadır. Hangi yöntemin kullanılacağına hastaya, hastalığa veya merkeze bağlı faktörlere göre karar verilmektedir.<sup>2</sup>

### 2.3.7.1. Glottik Kanserlerin Tedavisi

#### Erken evre glottik (evre 1 veya 2) skuamöz hücreli karsinom tedavisi

Erken evre glottik kanserler (T1N0 veya T2N0) boyunun elektif tedavisine gerek olmadan primer cerrahi veya RT ile tedavi edilebilir.

Erken glottik kanserlerin cerrahi tedavisi larenksin korunmasını hedeflemektedir ve larenks koruyucu cerrahi veya parsiyel larenjektomi olarak adlandırılır. Eksternal yaklaşımla yapılan iki klasik açık cerrahi teknik laringofissür kordektomi ve vertikal parsiyel larenjektomidir.<sup>5</sup>

**Laringofissür kordektomi:** Laringofissür ile birlikte kordektomi vokal kordların eksizyonuna olanak veren tirotomi girişimidir. Anatomik nedenlerle endoskopik rezeksiyonun yapılamadığı T1 glottik kanserlerde uygundur. Hastalığın bulunduğu korda mükemmel görüş sağlar ve gerekli durumlarda tiroid kartilaj gibi komşu dokuların rezeksiyonuna da olanak sağlar.<sup>5</sup>

**Vertikal parsiyel hemilarenjektomi:** Laringofissür ile başlayan daha geniş bir rezeksiyondur. Vokal kordun ve altındaki tiroid kartilaj segmentinin de rezeksiyonu yapılır. Daha geniş rezeksiyonlarda ipsilateral ala ve aritenoid kartilaj da çıkarılabilir.

Vertikal parsiyel larenjektominin daha genişletilmiş halinde ön komissür de rezeksiyona dahil edilir. Karşı kordun bir kısmının da rezeke edilmesi gereken durumlarda laringofissür orta hattın karşı tarafından, tiroid ala üzerinden alttaki vokal kordu içine alacak şekilde yapılabilir (frontolateral vertikal larenjektomi).<sup>2</sup>

**Suprakrikoid parsiyel larenjektomi (SKPL):** Her iki membranöz vokal kord ve komşu paraglottik mesafe ile tüm tiroid kartilaj çıkartılır. Epiglot tabanı da rezeksiyona dahil edilir ve bant ventriküllerle birlikte bir aritenoidi, tüm epiglotu ve preepiglottik mesafeyi de içine alacak şekilde genişletilebilir. Petiolün üzerinde kalan epiglotun korunduğu olgularda yapılan rekonstrüksiyona krikohyoidoepiglottopeksi (KHEP) , epiglot çıkartıldığında yapılan rekonstrüksiyona krikohyoidopeksi denilir. Laccourreye ve ark.'ları ön komissür tutulumu olan ve SKPL yaptıkları hastalarda lokal kontrol oranını %98 olarak raporlamışlardır.

Son 30 yılda, larenksin destek yapılarına zarar vermeden yapılan endoskopik cerrahi teknikler gelişmektedir. Ambrosch tarafından transoral lazer mikrocerrahinin onkolojik sonuçlarını yayınlamıştır. İn situ, T1 ve T2 tümörlerde lokal kontrol oranlarını %80-94, larenks korunma oranını %94 ve üzeri bulmuştur.

Glottik tümörlerde ön komissür tutulumu cerrahi veya RT sonrası lokal kontrol oranlarını düşüren bir durumdur. Ön komissür bölgesinde tiroid kartilaj perikondriyumu bulunmamakta ve tümör invazyonu açısından bu bölgeyi zayıf hale getirmektedir. Ayrıca bu bölgenin değerlendirilmesi zor olduğundan düşük evrelemeye ve yetersiz tedaviye yol açmaktadır. Frontolateral vertikal hemilarenjektomi, anterior komissür tutulumu olan T1 tümörlerde lokal kontrol oranlarını %80-90'a kadar sağlamaktadır. Ön komissür tutulumunun olması, bazı yazarlar tarafından transoral cerrahiler açısından kontraendikasyon olarak düşünülmektedir.

**Radyoterapi:** Erken glottik kanserlerin tedavisinde etkin bir yöntem olarak kabul edilir. T1 glottik tümörlerde primer RT sonucu 5 yıllık sağkalım %81-90; larenks koruması %90-98 olarak raporlanmıştır. Vokal kord hareketleri normal olan T2 tümörlerde RT'nin başarısı %64-87 arasında bildirilmektedir.

### **İleri evre glottik (evre 3 veya 4) skuamöz hücreli karsinom tedavisi**

İleri evre glottik tümörler, vokal kord fiksasyonu, kartilaj invazyonu, tümörün transglottik yayılımı, subglottik yayılım, larengeal çatı invazyonu, ekstralarengeal yayılım, lenf nodu tutulumu ve uzak metastazla ilişkilidir ve bütün bu durumlar prognozu kötüleştirir.

Glottisin T3- T4 ileri evre tümörlerinde uygulanan cerrahi tedavi total larenjektomi ve onun alterantifi olan subtotal larenjektomi yöntemleridir.

Seçilmiş vakalarda konservasyon cerrahisi yapılabilir. Konservasyon cerrahisinde uygun bir rekonstrüksiyonla fonksiyone edilebilen larenks için bulunması gereken en küçük birim "aritenoid birimidir". Aritenoid birimi, hareketli aritenoid, ona bağlı vokal kord ve ventriküler bandın bir bölümü ve sağlam krikoid bölgeden oluşur. Krikoid bölgesi konservasyon cerrahisinin sınırınıdır. Krikoid

bölgesinde lenfatik drenaj sirküler olup parsiyel rezeksiyona onkolojik yönden olarak tanımaz.<sup>2</sup>

Geçmişte T3 tümörler tek tedavi modalitesi olarak total larenjektomi ile tedavi edilmekteydi. Açık vertikal hemilarenjektomi ve daha geniş parsiyel larenjektomiler, seçilmiş vakalarda günümüzde kullanılan metodlardır. Kirchner ve Som açık parsiyel larenjektomi yaptıkları hastalarda 2 yıllık sağkalımı %60 olarak bulmuşlardır.

**Near Total Larenjektomi:** Bu teknikte bir aritenoid ve krikoid kıkırdağın bir parçası korunmaktadır. Bu sayede fonasyon sağlanmakta fakat kalıcı trakeotomi gerektirmektedir. Bu nedenle konservasyon cerrahisi olarak kabul edilemez.

**Total Larenjektomi:** Standart ve genişletilmiş rekonstrüktif parsiyel larenjektomi tekniklerine rağmen aşırı ilerlemiş tümörler onkolojik olarak ancak total larenjektomi ile tedavi edilebilir. Total larenjektomi, solunum ve sindirim yollarının tam olarak ayrılması ve larenksin servikal trakea 3. ve 4. halkaları ile birlikte en blok rezeksiyonu ile uygulanan klasik cerrahi tekniktir. Günümüzde uygun endikasyon ve hasta seçimi ile total larenjektomi oranı %15-30'a kadar indirilebilir. Artık total larenjektomi larenks kanser cerrahisinde altın standart cerrahi değil endikasyonda başvurulacak en son cerrahi girişimdir.<sup>2</sup>

**Radyoterapi:** İleri evre glottik tümörlerde radyoterapi bir çok merkezde kür amaçlı veya kemoradyoterapi ile birlikte kombine tedavi şeklinde uygulanmaktadır. Küratif amaçlı primer radyoterapi taraftarları radyoterapi ile hastanın larenksinin korunabileceğine, ancak başarısız kalındığında cerrahinin gerektiğine inanmaktadır. T3 glottik tümörlerde radyoterapinin tek başına kür şansı %20-30 olup kurtarma cerrahisi ile birlikte %50'ye ulaşmaktadır. Radyoterapiden önce mevcut olan konservasyon cerrahisi şansı, kurtarma cerrahisinde kaybolmaktadır. Ayrıca radyoterapiden sonra yara iyileşme sorunu vardır. Bütün bu nedenler kurtarma cerrahisini total larenjektomi şekline dönüştürür. Hasta tek ve daha uygun tedavi yerine iki kere tedavi almak zorunda kalmaktadır.

**Boyun tedavisi:** Erken evre glottik kanserlerde boyuna gizli metastaz olasılığı oldukça düşüktür. Bu nedenle N0 vakalarda elektif boyun diseksiyonuna gerek yoktur.

Klinik olarak N+ hastalarda lenf nodlarının yerleşimine göre radikal veya modifiye radikal komprehensif boyun diseksiyonu gerekir. Subglottik uzanımı olan vakalarda ipsilateral tiroidektomi ve 6. bölge de diseksiyon planına katılmalıdır.

Erken T1-T2N0 glottik kanserlerde boyuna gizli metastaz olasılığının düşük olmasına rağmen T3-T4N0 tümörlerde gizli metastaz olasılığı yüksektir. Özellikle supraglottik, subglottik ve paraglottik uzanımı olan tümörlerde bu bölgelerin zengin lenfatik ağı nedeniyle risk daha fazladır. T3 ve T4 tümörlerde boyun metastazı oranları %20-65 dolayındadır.<sup>23</sup> Transglottik tümörlerde bu oran %30-50 düzeyine çıkmaktadır. Klinik olarak lenf nodu metastazı saptanmamış hastalarda primer tümöre cerrahi yapılacaksa T3 ve T4 tümörlerde elektif boyun diseksiyonu yapılmalı, 2-4. Bölgeler temizlenmelidir. Primer tümöre RT uygulanan hastalar da ise aynı bölgeler elektif olarak ışınlanmalıdır.<sup>2</sup>

### **2.3.7.2. Supraglottik Kanserlerin Tedavisi**

#### **Erken evre supraglottik larenks kanserlerinde tedavi**

T1N0 ve T2N0 supraglottik kanserlerde cerrahi seçenekleri lazer supraglottik parsiyel larenjektomi, açık supraglottik parsiyel larenjektomi, suprakrikoid parsiyel larenjektomi ve RT'dir. Embriyolojik olarak supraglottik bölge glottik ve subglottik bölgeden ayrılmaktadır. Bu nedenle çoğu vakada supraglottik tümörlerin, glottik bölgeyi koruyacak anatomik yapıların yokluğuna rağmen glottik bölgeye yayılmadığı görülmektedir.

**Supraglottik larenjektomi:** Ventrikülün tabanından itibaren yukarıya doğru bütün larengeal yapılar çıkarılmaktadır. Vokal kordlar, aritenoidler, dil kökü ve hyoid kemik korunmaktadır. Açık supraglottik larenjektomi için kontraendikasyon oluşturan durumlar genel fiziksel durumda bozukluk veya komorbiditeler (ileri yaş, akciğer hastalığı, disfaji veya aspirasyon ve nörolojik hastalıklar), glottik tutulum, bozulmuş vokal kord hareketi veya fiksasyonu, tiroid veya krikoid kıkırdak

tutulumu, sirkumvallat papillara 1 cm'den yakın tutulum olması ve derin dil kaslarının tutulmasıdır. Eğer tümör tutulumuna bağlı olarak epiglot lingual yüzü, dil kökü veya aritenoidler rezeksiyona katılmışsa genişletilmiş supraglottik larenjektomi adını alır. Erken evre supraglottik kanserlerde SGPL'nin lokal kontrol oranı %80-100 arasında raporlanmaktadır.<sup>24</sup>

Transoral lazer mikrocerrahinin endikasyonları, açık cerrahi ile benzerdir. Yetersiz ekspozisyon olanlarda, büyük damar tutulumu olanlarda ve aspirasyon riski olanlarda kontraendikedir.

Glottik uzanımı olan seçilmiş T2 supraglottik kanserlerde krikohyoidopeksili suprakrikoid parsiyel larenjektomi (SKPL) kullanılmaktadır. Onkolojik kontraendikasyonları aritenoid kıkırdak fiksasyonu, hyoid kemiğin rezeksiyonunu gerektiren tümörün hyoid kemiğe dayanması, krikoid kıkırdak tutulumu veya larenks dışına yayılımdır. Kontrol oranları %90 civarındadır.

**Radyoterapi:** T1-T2 hastalarda kullanılan diğer tedavi yöntemidir. Spriano ve arkadaşları tarafından primer RT ve parsiyel larenjektomi sonuçları karşılaştırılmıştır. Cerrahi grupta 5 yıllık hastalısız sağ kalım %88, RT grubunda %76 raporlanmıştır. Bu nedenle supraglottik tümörlerde kontraendikasyon yoksa primer tedavi olarak cerrahi düşünülmelidir.

### **İleri evre supraglottik larenks kanserlerinde tedavi**

Geçmişte ileri evre primer supraglottik tümörlerde (T3-T4) tedavi geleneksel olarak total larenjektomi, bilateral boyun diseksiyonu ve postoperatif radyoterapiyi kapsamaktaydı. Fakat günümüzde yaşam kalitesinin artırılması açısından organ koruyucu cerrahiler önem kazanmıştır.

Seçilmiş T3 vakalarda lazer ile rezeksiyon, açık supraglottik larenjektomi, lezyon piriform sinüs medial duvarına ve preepiglottik aralığa yayılmış ama vokal kord fiksasyonuna neden olmamışsa genişletilmiş supraglottik hemilarenjektomi yapılabilir.



Total larenjektomi genellikle karşı kordun ön bölümü tutulmuşsa, vokal korda yayılım ve vokal kord fiksasyonu varsa, postkrikoid bölgeye veya larenks kıkırdaklarına yayılım varsa ya da radyoterapi başarısız olmuşsa endikedir.

**Radyoterapi:** Supraglottik kanser tedavisinde radyoterapi primer, ameliyat sonrası adjuvan tedavi veya kombine tedavi olarak üç şekilde uygulanır. Primer radyoterapi taraftarları için erken supraglottik tümörde cerrahiye eş kür şansı vardır. Ancak erken görülen tümörlerin büyük bölümü preepiglottik bölge tutulumu nedeniyle T3 evresindedir. Bu evredeki tümörlerde yalnız başına radyoterapinin kür şansı azdır. Olguların 2/3'üne kurtarma cerrahisi uygulanır. Başarısızlık durumunda yapılacak kurtarma cerrahisi genellikle total larenjektomi olup, hasta mevcut konservasyon cerrahisi şansını yitirmiş ve iki kere tedavi olmuş olur.

**Boyun tedavisi:** Supraglottik kanserli hastalarınızın dönem sağ kalımını etkileyen en önemli faktörlerden birisi boyundaki lenfatiklerin tutulumudur. Okkült veya klinik olarak saptanabilen metasta durumunda hastaların yaşam şanslarında %50'lik bir azalma meydana gelmektedir.<sup>25</sup>

N+ boyunu olan hastaların tedavisinde lenfatik tutulumuna bağlı olarak selektif diseksiyon veya radikal/modifiye radikal boyun diseksiyonu yapılmaktadır.

Klinik olarak N0 boyundaki tutulum tartışmalı olmasına rağmen okkült metastaz oranları %30 civarındadır. Bu nedenle günümüzde daha çok genel tutum hastalara elektif boyun diseksiyonu uygulanmasıdır. Lateralize tümörlerde kontralateral boyun metastazı %10'un altında bildirilmesine rağmen en sık nükslerin opere edilmeyen boyunda olmasından dolayı primer odağa cerrahi uygulanan bütün vakalarda bilateral seviye 2-4 boyun diseksiyonu önerilmektedir.<sup>25</sup> İntraoperatif bulgulara göre 1. ve/veya 5. Bölgede diseksiyona eklenebilir.<sup>2</sup>

### **2.3.7.3. Subglottik Kanserlerin Tedavisi**

Primer subglottik kanserler, tüm larenks kanserlerinin sadece %4'ünü oluşturur. Tedavisi total larenjektomi ve postoperatif RT'yi içermektedir. Ayrıca ipsilateral tiroidektomi ve paratrakeal lenf nodu diseksiyonu önerilmektedir. Stell ve Tobin serilerinde %44 mortalite raporlamışlardır.<sup>26</sup>

#### **2.3.7.4. Transglottik Kanserlerde Tedavi**

Transglottik terimi glottik veya supraglottik tümörün ventrikülü atlayarak larenksin iki bölümündeki tümörü ifade eder. İki taraflı transglottik tümörlerde sadece total larenjektomi önerilirken, günümüzde konservasyon cerrahileri (horizontal vertikal larenjektomi, suprakrikoid subtotal larenjektomi, neartotal larenjektomi) seçilmiş tümörlere başarıyla uygulanmaktadır.<sup>2</sup>

### **2.4. Hyaluronik Asit ve Hyaluronidazlar**

#### **2.4.1. Hyaluronik asit**

Hyalurunan veya hyaluronik asit (HA), yüksek molekül ağırlıklı multifonksiyonel bir glikozaminoglikandır. Bağ dokusunun ekstraselüler matriksinin (ESM) yapısını oluşturan ana maddelerden biridir. Tekrarlayan D-glukoronik asit ve N-asetil-D-glukozamin disakkaritlerinden oluşan lineer glikozaminoglikan yapısı vardır. Plazma membranında hyaluronan sentetaz (HAS1, HAS2, HAS3) tarafından üretilip, plazma membran hyaluronidazlarıyla (HYAL) ekstraselüler olarak yıkılır.<sup>27</sup> <sup>28</sup> HA, doku kaynağına bağlı olarak 2000-5000 disakkarit ünite ve 106-107 Da kütle içerebilir. Düşük molekül ağırlıklı formları (DMA-HA) geniş çeşitlilikte biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Yüksek molekül ağırlıklı HA (YMA-HA) sağlıklı dokular açısından bir belirteç iken, DMA-HA kanser gelişiminde önemli rolü olan angiogenez ve aktive edici sinyal yollarını aktive etmektedir.<sup>29</sup> Eşsiz biyofiziksel özellikleri olan HA doğrudan doku homeostazını etkilemekte, ESM ve periselüller matriksin temel yapısını oluşturan proteinler ve proteoglikanlar arasında bağlantı oluşturmakta, hücre yüzeyindeki HA reseptörleriyle bağlantı kurarak hücre davranışında önemli rol oynamaktadır. Bütün bu özelliklerinden dolayı HA, hücre adhezyonu, hücre migrasyonu, hücre-hücre tanınması ve bazı hastalıkların gelişiminde (tümör, ateroskleroz) rol oynamaktadır.<sup>30</sup> ESM'teki HA ve katabolizma ürünleri, sentez ve yıkımın artış gösterdiği bazı malignitelerde yükselmektedir.

## 2.4.2. Hyaluronidazlar

Hyaluronidazlar esas olarak hyaluronik asidi (HA) yıkan bir grup enzimdir.<sup>31</sup> Ancak, küçük bir oranda olsa da kondroitin sülfat ve kondroitini de yıkmaktadırlar. HA polimerleri arasındaki  $\beta$ -N-asetill-D-glukozaminidik bağlarını yıkarak endoglikozidaz olarak işlev yaparlar. İnsan genomunda iki farklı bölgede yerleşimli altı hyaluronidaz geni bulunmuştur. HYAL-1, -2, -3 genleri kromozom 3p21.3, HYAL-4, HYAL-P1 ve PH 20 (testiküler hyaluronidazı kodlar) ise kromozom 7q31.3'te yerleşmiştir.<sup>31, 32</sup> Memelilerdeki altı Hyaluronidaz geni büyük olasılıkla gen duplikasyonları ile oluşmuşlardır. Örneğin, HYAL-1, -2, -3 ve PH 20 %40 aminoasit benzerliği göstermektedir.<sup>31</sup> Hyaluronidazlar pH aktivite profillerine göre iki gruba ayrılmaktadır. HYAL-1, -2, -3 asidik hyaluronidazlar olarak bilinmektedir çünkü asidik pH'ta aktiftirler. Örneğin HYAL-1 en iyi Ph 4,0-4,2'de aktiftir, 5,0'ın üzerindeki Ph değerlerinde inaktif olur.<sup>33</sup> Buna karşın PH20 nötral aktif bir enzimdir ve Ph 7,0'de aktiftir.<sup>34</sup>

Memelilerdeki altı hyaluronidaz arasından HYAL-1, -2 ve PH20 iyi tanımlanmıştır. PH20 ovum fertilizasyonu için gereklidir ve bazı doğal ve sentetik hyaluronidaz inhibitörleri kontrasepsiyon oluşturmak amacıyla çalışılmaktadır.<sup>35</sup> PH20 ve HYAL-2 glikozil fosfotidil-inozitol (GPI) –ilişkili proteinlerdir. HYAL-2 HA'ı 20 kDa boyutundaki (25 disakkarit ünitesi) oligosakkaritlere yıkmaktadır.<sup>31</sup> HYAL-1 ise esas olarak serum hyaluronidazıdır ve bazı somatik dokularda da eksprese edilmektedir.<sup>31</sup> HYAL-1 insan idrarında da tespit edilmiştir ve burada iki moleküler form olarak eksprese edilmektedir. HYAL-1, HA yıkımı için yüksek spesifik aktiviteye sahip olmasına rağmen insan serumundaki konsantrasyonu düşüktür (60ng/ml).<sup>31</sup>

## 2.4.3. Tümör hücrelerinde hyaluronidaz ekspresyonu

Dokularda, vücut sıvılarında ve hücre kültürlerinde hyaluronidaz aktivitesinin tespiti ve ölçümü Stern ve Stern tarafından geliştirilen Hyaluronidaz ELİSA testi sayesinde mümkün olmuştur.<sup>36</sup> Bu testin modifiye bir versiyonu Lokeshwar tarafından prostat ve mesane kanseri olan hastalarda dokulardaki ve hücrelerdeki ve mesane kanseri olan hastalarda idrardaki hyaluronidaz düzeylerini ölçmek için

kullanılmıştır.<sup>37,38</sup> Lokeshwar ve ark.'ları<sup>38</sup> hyaluronidaz testini kullanarak, prostat kanser dokularında normal ve benign prostatik hiperplazi dokularıyla kıyaslandığında artmış hyaluronidaz düzeylerini bulmuşlardır. Ayrıca bu çalışma ilk kez tümör progresyonu ve hyaluronidaz düzeyleri arasında bağlantı kurmuştur. Bu çalışmada, düşük grade (Gleason 5-7) prostat kanser dokularıyla karşılaştırıldığında yüksek grade (Gleason>7)prostat kanser dokularında 3-7 kat artmış hyaluronidaz aktivitesi bulmuşlardır. Metastatik prostat kanser lezyonlarında, yüksek grade primer tümörlere oranla artmış hyaluronidaz düzeyi gösterilmiştir. Ayrıca yüksek grade mesane kanseri dokularında ve bu hastaların idrarlarında hyaluronidaz düzeyleri artmış olarak görülmüştür. Bu çalışmalar hyaluronidaz düzeyleri ile invaziv/metastatik tümörler arasında bağlantı olduğunu göstermiştir. Genitoüriner tümörlere ek olarak baş boyun skuamöz hücreli kanserlerde, meme tümörlerinde ve metastatik tümörlerde hyaluronidaz düzeyleri artmıştır.

Gerçek zamanlı PZR ve cDNA klonlama, protein pürifikasyon, immunblot, Ph aktivite profil ve immünohistokimya yöntemleri; prostat ve mesane kanserlerinde ekprese edilen major hyaluronidazın HYAL-1 olduğunu göstermiştir. HYAL-1 435 aminoasitten oluşan, 55-60kDa ağırlığında bir proteindir. Ayrıca Hyal-1 tümör hücreleri tarafından salgılandığı ilk fark edilen ve ekspresyonunun invazyon/metastaz ile ilişkili olduğu anlaşılan ilk hyaluronidazdır.

Baş boyun skuamöz hücreli karsinomu olan hastaların tükürüklerinde artmış hyaluronidaz düzeyleri gösterilmiştir ve HYAL-1 tümör dokularından seztezlenen major hyaluronidaz olarak bulunmuştur. HYAL-1'e ek olarak gerçek zamanlı PZR analizleri baş boyun kanserlerinde (özellikle larenks kanseri) PH20 ekspresyonunu göstermiştir.<sup>39</sup>

Kramer ve ark.'ları 2010 yılında mesane kanseri olan hastalarda yaptıkları çalışmada HYAL-1'in kas invazyonu ve metastaz açısından bağımsız prognostik bir gösterge olduğunu belirtmişlerdir.<sup>40</sup> Bouga ve ark.'ları kolon kanserli hastalarda HYAL-1 ekspresyonunu göstermiş; özellikle ileri evrelerde overekspresyon olduğunu yayınlamışlardır.<sup>41</sup>

#### **2.4.4. Tümör promotör olarak hyaluronidaz**

HA'in hyaluronidaz tarafından tam yıkımı sonucu tetrasakkaritler oluşmaktadır. Fakat sınırlı yıkım sonucu bazıları anjiogenik (3-25 disakkarit ünitleri) HA fragmanları oluşur. 10-15 disakkarit ünite içeren HA fragmanlarının endotelial hücre proliferasyonunu, adhezyonunu ve kapiller formasyonu stimüle ettiği gösterilmiştir. Bunun gibi anjiogenik HA fragmanları yüksek grade mesane kanseri hastalarının idrarında, baş boyun skuamöz hücreli kanseri olan hastaların tükürüklerinde ve yüksek grade prostat tümörlerinde doku örneklerinde bulunmaktadır. Bu da HA-hyaluronidaz sisteminin yüksek grade invaziv tümörlerde aktif olduğunu göstermektedir.

#### **2.4.5. Hyaluronidaz tanısal ve prognostik bir belirteçtir**

Sınırlı sayıda çalışmada, hyaluronidaz ekspresyonu diğer karsinomlar için de çalışılmıştır. Örneğin, HYAL-1'in baş boyun skuamöz hücreli karsinomu olan hastalarda uygun bir tümör belirteci olabileceği ve baş boyun kanserli hastaların tükürüklerinde hyaluronidaz seviyelerinin arttığı belirtilmiştir.<sup>34</sup> 2003 yılında Franzmann ve ark.'larının<sup>34</sup> baş boyun kanserli 11 hastada yaptığı çalışmada tümör dokularında HYAL-1 ekspresyonu artmış olarak bulunmuştur. Ekspresyon gerçek zamanlı PZR yöntemiyle bakılmıştır. 4 hasta oral kavite, 7 hasta farenks, 1 hasta larenks kanseri tanısı ile çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca bu hastalarda tükürük örnekleri toplanmış, hyaluronidaz testi ile (ELİSA) hyaluronidaz enzimi ve HA protein seviyeleri ölçülmüştür ve normal grupla karşılaştırıldığında artmış enzim ve protein seviyeleri bulunmuştur.

HYAL-1'e ek olarak, PH20 mRNA seviyelerinin normal larenks dokularıyla kıyaslandığında primer ve lenf nodu metastazı olan larenks kanserli hastalarda arttığı gösterilmiştir.<sup>39</sup>

#### **2.4.6. Hyaluronidaz ve kanser tedavisi**

Testiküler hyaluronidaz, kanser kemoterapi rejimlerine ilaç penetrasyonunu arttırmak için eklenmiştir. Son bulgular varlığında hyaluronidaz hücre döngüsünün

ilerlemesi için gereklidir. Hyaluronidaz tedavisi hücrelerin döngü havuzuna girişini arttırarak onları hücre döngüsüne bağlı ilaçlara daha duyarlı hale getirir. Son yapılan çalışmalarda hyaluronidaz; malign melanom ve Kaposi sarkomunda vinblastinin<sup>42</sup>, gliomada boron nöron terapinin<sup>43</sup>, mesane kanser tedavisinde itravezikal mitomisin<sup>44</sup> ve baş-boyun skuamöz hücreli kanser tedavisinde sisplatin ve vindezini içeren kemoterapi rejiminin yanına tedavinin etkinliğini arttırmak için eklenmektedir.<sup>45, 46</sup>



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından Desteklenmiştir. Proje numarası: 21592, proje kodu TTU-2016-21592'dir. Çalışma öncesinde İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan etik onay formu alınmıştır (83045809/604.01/02-82637 nolu yazı).

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda 2016-2017 yılları arasında larenks skuamöz hücreli karsinomu tanısı almış ve açık cerrahi yöntem ile parsiyel veya total larenjektomi yapılan 50 hasta çalışmaya alınmıştır. Hastalara tümörün yerleşimine, lenf nodu tutulumuna göre lateral boyun diseksiyonu da yapılmıştır. Daha önce kemoterapi almış hastalar, seroloji pozitif hastalar, başka bir malignite öyküsü olan hastalar çalışmaya alınmamıştır. Bütün hastalardan cerrahi öncesi aydınlatılmış onam formu alınmış ve sadece çalışmaya katılmayı kabul eden hastalardan örnek toplanmıştır.

Operasyon öncesi hastalardan tükürük örnekleri, cerrahi operasyon sırasında ise tümör dokusu ve tümöre komşu normal doku örnekleri alındı. Sabah 08:00-09:00 saatleri arasında hastalardan alınan tükürük örnekleri santrifüj edildikten sonra üst sıvıda hyalüronik asit miktarı belirlendi. Alınan tümör ve normal dokulardan RNA elde edilerek cDNA'ya çevrildi. cDNA örnekleri, ifade analiz çalışmaları yapıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Hastaların histopatolojik incelemeleri incelenmiş ve TNM evreleme sistemine göre patolojik evrelemeleri de yapılmıştır. Patoloji spesmenleri tek bir ekip tarafından incelenmiştir.

Hastalarda ařađıdaki parametreler deęerlendirilmiřtir:

1. Cinsiyet
2. Yaş
3. Sigara kullanımı
4. Alkol kullanımı
5. Tümör lokalizasyonu
6. Preoperatif radyoterapi hikayesi
7. Klinik T evresi
8. Yapılan cerrahinin řekli
9. Patolojik T evresi
10. Patolojik N evresi
11. Tümör evresi
12. Perinodal yayılım
13. Histolojik grade
14. Kan damarı invazyonu
15. Lenfatik invazyon
16. Perinöral invazyon
17. Kartilaj invazyonu
18. Tümör dokusunda Hyal-1 ifade analizi
19. Normal dokuda Hyal-1 ifade analizi
20. Tümör dokularında HYAL-1 ekspresyonun artış miktarı
21. Tükrük hyaluronik asit düzeyi

### **3.1.2. Kullanılan Cihazlar**

Derin Dondurucu (-20) (Arçelik, TÜRKİYE)

Derin Dondurucu (-80) (Sanyo, JAPONYA)

Distile Su Cihazı (Nüve, TÜRKİYE)

Etüv (Hybaid, İNGİLTERE)

Bullet Blender Storm Homojenizatör (Avarill Park., ABD)



Hassas Terazı (Shimadzu, JAPONYA)

NanoDrop Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD)

LightCycler 480-II Gerçek Zamanlı PZR cihazı (Roche, ALMANYA)

Applied Bio Systems 9700 Termal Döngü Cihazı (PZR) (ABI, SİNGAPUR)

Otoklav (Hirayama, JAPONYA)

Otomatik Mikropipetler (Eppendorf, ABD)

Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich, ALMANYA)

Vortex (Velp Scientifica, ABD)

ELİSA mikroplate okuyucu (Thermo Scientific, ABD)

### **3.1.3. Kullanılan Ticari Kitler**

➤ ***PureLink RNA Mini Kit (Life Technology, NY, ABD)***

Parçalama tampon, Yıkama tamponu I- II, RNaz içermeyen su, spin kartuşu, toplama tüpleri, geri kazanım tüpleri

➤ ***cDNA Sentez Kiti (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)***

RevertAid ters transkriptaz (200 U/µl), ribolock RNaz engelleyici (20 U/µl), 5X tepkime tamponu, 10mM dNTP karışımı, oligo (dT) primer (100 µM), random hexamer primer (100 µM), ileri GAPDH primer (10µM), geri GAPDH primer (10µM), control GAPDH RNA (0,05 µg/µl), nükleaz içermeyen su.

➤ ***Hyalüronik asit ELİSA Kit (Bioassay Technology Laboratory, Şangay, Çin)***

Standart solüsyon (640ng/ml), ELİSA plate, standart dilüent, streptavidin HRP, durdurma solüsyonu, substrat solüsyonu A-B, yıkama tamponu (30X), biotin-bağlı anti-insan HA antikoru.

### 3.1.4. Kullanılan Primerler

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'nda kullanılan hedef ve referans genlerin primer dizileri tasarlanıp ticari olarak sentezletirilmiştir (Tablo 3-1). Liyofilize formda alınan primerler distile su ile sulandırıldıktan sonra ana stoklar oluşturulmuş ve -20°C'de saklanmıştır.

**Tablo 3-1.** Gerçek zamanlı PZR için kullanılan HYAL-1 ve G6PD primer dizileri

HYAL-1	İleri Primer: 5'-CTGTCTGAGAAGCTAGTCTTGA-3'
	Geri Primer: 5'-CTGTGGTAAGTAAAGAATGTCAC-3'
G6PD	İleri Primer: 5'-ATGCCTTCCATCAGTCGGATAACA-3'
	Geri Primer: 5'-ATAGCCCACGATGAAGGTGTTTTC-3'

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Dokudan RNA Eldesi

Tümör ve normal doku örneklerinden total RNA elde edilmesinde PureLink™ RNA Mini Kit (Life Technology, ABD) kullanılmıştır. RNA izolasyonu için firmanın önerdiği protokol uygulanmıştır:

1. 30-50 mg doku üzerine 500µl parçalama tamponu ve 5µl β-merkaptoetanol eklenip homojenizatörde parçalandı.
2. Lizat, 2600 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
3. Ayrı bir mikrosantrifüj tüpe alınan üst sıvı üzerine (1:1) oranında %70'lik soğuk etanol eklendi. Mikrosantrifüj tüplerindeki karışım filtreli tüplere aktarıldı.
4. 12 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi.
5. Santrifüj yapıldıktan sonra filtreli tüpler yeni toplama tüplerine yerleştirildi. Üzerine 700 µl yıkama tamponu I eklendi.
6. 12 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi.

7. Filtreli tüpler yeni toplama tüplerine konulduktan sonra üzerine 500 µl yıkama tamponu II eklendi.
8. Sırasıyla, 12 000 g'de 30 saniye ve 12 000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
9. Filtreler yeni mikrosantrifüj tüplere yerleştirildi. Üzerine 80 µl RNaz içermeyen su eklendikten sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
10. 12 000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
11. Elde edilen total RNA, cDNA yapımı aşamasına geçmeden önce spektrofotometrede ölçüldü.

### 3.2.2. Spektrofotometrik Analiz

RNA'ların miktarı ve saflığı ND-1000 NanoDrop spektrofotometrede ölçüldü. RNA örneklerinin 260nm / 280nm oranlarından saflık değerleri 1,8-2,0 aralığında bulundu.

### 3.2.3. cDNA Eldesi

Dokudan elde edilen total RNA'nın miktar ve saflığına uygun olarak cDNA konsantrasyonları ayarlandı, "RevertAid cDNA Sentez Kiti (Thermo Scientific, ABD)" ile cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentez bileşenleri ve döngü koşulları Tablo 3-2'de gösterilmektedir.

**Tablo 3-2.** cDNA sentez bileşenleri ve döngü koşulları

<b>cDNA Sentez Bileşenleri</b>	<b>İlk Derişim</b>	<b>Son Derişim</b>
<b>Oligo (dT) Primer (0,2 µg/µl)</b>	100 µM	5 µM
<b>Nükleaz İçermeyen Su</b>	-	12 µl'ye tamamla
<b>Başlangıç Kalıp RNA'sı 400 ng 80°C'de 3 dakika</b>		
<b>Tepkime Tamponu</b>	5X	1X
<b>Deoksinükleotid Karışımı (dNTP)</b>	10 mM	1 mM
<b>RNaz Engelleyici</b>	20 U/µl	1 U/µl
<b>Ters Transkriptaz</b>	200 U/µl	10 U/µl
<b>37°C'de 90 dakika</b>		
<b>94°C'de 2 dakika</b>		

Elde edilen cDNA'lar, hedef ve referans genlerin ifade analizi çalışmalarına kadar -80°C'de saklandı.

### 3.2.4. HYAL-1 Geninin İfade Analizi ve Ekspresyon Ölçümü

Larenks kanserli hastaların tümör ve normal dokularında HYAL-1 geninin ifade analizi LightCycler 480 II cihazında gerçek zamanlı PZR yöntemi ile analiz edildi. Normalizasyon için referans gen olarak Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) geni kullanıldı.

İfade analizi için gerçek zamanlı PZR karışımı Tablo 3-3'te, PZR döngü programı Tablo 3-4'te gösterilmektedir.

**Tablo 3-3.** İfade analizi için gerçek zamanlı PZR karışımı

	İlk Derişim	Hacim	Son Derişim
Eva Green Master Karışımı	2X	7,5 µl	1X
dH <sub>2</sub> O		2,5 µl	
İleri Primer	100µM	1 µl	10µM
Geri Primer	100µM	1 µl	10µM
cDNA		3 µl	400ng
Toplam Hacim: 15 µl			

Tepkime çözeltisi 96'lık kuyuların içine konularak Light Cycler 480-II cihazına yerleştirildi.

**Tablo 3-4.** Gerçek zamanlı PZR döngü programı

	Döngü Sayısı	Hedef Sıcaklık	Bekletme Süresi
Ön-kuluçka ( <i>pre-incubation</i> )	1	95°C	15 dk
Çoğalma ( <i>amplification</i> )	45		
Bozunma ( <i>denaturation</i> )		95°C	15 sn
Bağlanma( <i>annealing</i> )		62°C	30 sn
Uzama	1	72°C	3 dk
Soğuma ( <i>cooling</i> )	1	50°C	10 sn

### Ekspreyon için formül

$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-[(CT \text{ hedef gen} - CT \text{ referans gen}) \text{ Tümör} - (CT \text{ hedef gen} - CT \text{ referans gen}) \text{ Normal}]}$$

### 3.2.5. ELİSA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Yöntemi ile Hyaluronik Asit Düzeyinin Belirlenmesi

Larenks Kanserli hastaların tükürüğünde hyaluronik asit düzeyinin belirlenmesi için “Hyaluronik asit ELİSA Kit (Bioassay Technology Laboratory, Şangay, Çin)” kullanılmıştır. Operasyon öncesi hastalardan ortalama 5cc tükürük örnekleri steril falkon tüplere alınmıştır. +4°C’de 1000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı ependorf tüplere aktarılmıştır. Bunu takiben hyaluronik asit tayini yapılabildiği kadar örnekler -80°C’de muhafaza edilmiştir.

Çalışmaya başlamadan önce standartlar uygun dilüsyonlarda hazırlandı (Tablo 3-5).

**Tablo 3-5.** Standart solüyonların dilüsyonları

Konsantrasyon	Standart No	Dilüsyon
320ng/ml	S5	120µl orijinal standart + 120µl standart dilüent
160ng/ml	S4	120µl standart 5 + 120µl standart dilüent
80ng/ml	S3	120µl standart 4 + 120µl standart dilüent
40ng/ml	S2	120µl standart 3 + 120µl standart dilüent
20ng/ml	S1	120µl standart 2+ 120µl standart dilüent



Standartlar hazırlanıp 30X yıkama tamponu 1X haline getirildikten sonra ELİSA deneyine kit protokolüne uygun olarak devam edildi.

- Standart kuyularına her bir standarttan 50µl eklendi.
- Örnek kuyularına ise 40µl tükürük örneği (dilüsyon yapılmadan) ve 10µl anti-HA antikoru eklendi.
- Standart ve örnek kuyularına 50µl streptavidin-HRP eklendi (negatif kontrol kuyusu hariç). Plate kapatıcı ile kaplandı ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Kapatıcı kaldırıldıktan sonra yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
- Her bir kuyuya 50µl substrat A solüsyonu ve 50µl substrat B solüsyonu eklendi. Plate kapatıcı ile kaplandıktan sonra 37°C'de 10 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası kapatıcı kaldırıldı ve her bir kuyuya 50µl durdurma solüsyonu eklendi.
- Örneklere durdurma solüsyonu eklendikten sonra 30 dakika içerisinde 450 nm dalga boyunda optik dansite (OD) değerleri ölçüldü.
- Standartların konsantrasyonları ve ilgili OD değerlerine göre, standartların doğrusal regresyon denklemi hesaplandı. Örneklerin OD değerleri regresyon denklemine yerleştirilerek örnek konsantrasyonları belirlendi.

### Tükürük HA ölçümü için ELİSA için regresyon denklemi

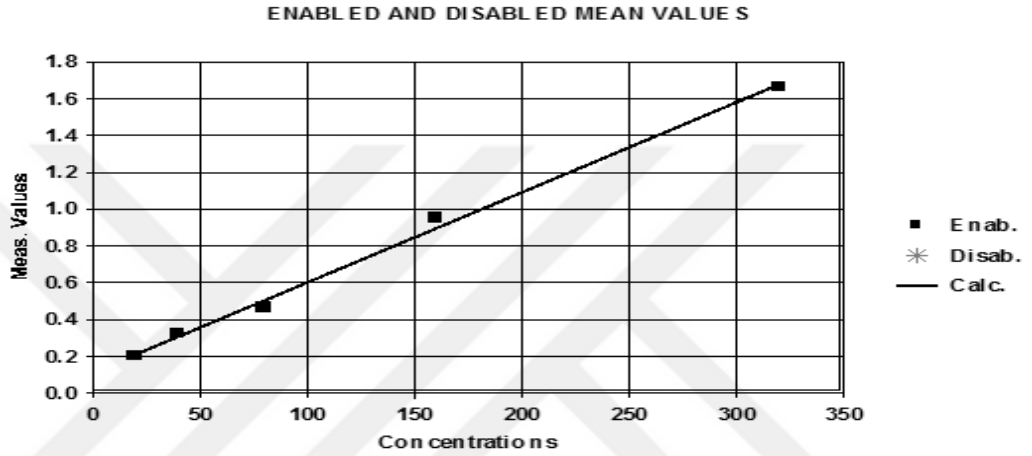
Linear regression (SVD):  $y = a + b \cdot x$

Parameters:

$a = 0,113$

$b = 0,005$

**Corr.coeff.R2:0,992**



### 3.2.6. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 for Windows programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler; sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma, minimum, maksimum, kategorik değişkenler için sayı ve yüzde olarak verildi. Gruplarda oranların karşılaştırılması Ki Kare Analizi ile yapıldı. Koşulların sağlanmadığı durumlarda Monte Carlo simülasyonu uygulandı. Sayısal değişkenler normal dağılım koşulunu sağladığından karşılaştırmalar, bağımsız iki grupta Mann Whitney U testi ile, bağımsız ikiden çok grupta Kruskal Wallis Testi ile analiz edildi. İstatistiksel alfa anlamlılık seviyesi  $p < 0,05$  olarak kabul edildi. Sayısal değişkenler arası ilişkiler parametrik test koşulu sağlanmadığından Spearman Korelasyon Analizi ile yapıldı.

## 4. BULGULAR

Bu çalışma 2016-2017 tarihleri arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda larenks skuamöz hücreli karsinomu nedeniyle açık cerrahi yöntemle total ve parsiyel larenjektomi yapılan 50 hasta üzerinde prospektif olarak yapılmıştır. Hastaların yaşları 34 ile 84 arasında değişmekte olup ortalama  $60,56 \pm 9,67$ 'dir. Hastaların 47'si (%94) erkek; 3'ü (%6) kadındır. (Tablo 4-1)

Hastaların sigara ve alkol kullanım durumlarına bakıldığında, 37'si (%74) alkol kullanmamakta; 13'ü (%26) alkol kullanmakta idi. Sigara kullanımı 0 paket/yıl ile 120 paket/yıl arasında değişmekte olup; ortalama  $42,82 \pm 22,76$  paket/yıl'dır. (Tablo 4-1)

**Tablo 4-1.** Hastaların demografik özellikleri, sigara ve alkol kullanım durumları

	Sayı (n: 50)	Yüzde (%)	
<b>Yaş (yıl)</b>	Ortalama: $60,56 \pm 9,67$		
	Minimum: 34		
	Maksimum: 84		
<b>Cinsiyet</b>			
	Erkek	47	94
	Kadın	3	6
<b>Alkol kullanımı</b>			
	Var	13	26
	Yok	37	74
<b>Sigara kullanımı (Paket/yıl)</b>	Ortalama: $42,82 \pm 22,76$		
	Minimum: 0		
	Maksimum: 120		



Tümör bölgesi 14 (%28) hastada glottik bölgede, 17 (%34) hastada supraglottik bölgede, 19 (%38) hastada ise transglottik bölgede yerleşim göstermektedir. 2 (%4) hasta daha önceki dönemde larenks kanseri nedeniyle primer radyoterapi tedavisi almıştır. 31(%62) hastaya parsiyel larenjektomi; 19(%38) hastaya total larenjektomi operasyonu yapılmıştır. 42 (%84) hastada bilateral lateral boyun diseksiyonu, 5 (%10) hastada tek taraflı lateral boyun diseksiyonu yapılmıştır. 3 (%6) hastaya ise boyun diseksiyonu yapılmamıştır. (Tablo 4-2)

**Tablo 4-2.** Hastaların tümör bölgesi, radyoterapi öyküsü, operasyon tipi ve boyun diseksiyonu türüne göre sınıflaması

	Sayı (n: 50)	Yüzde (%)
<b>Tümör bölgesi</b>		
Glottik	14	28
Supraglottik	17	34
Transglottik	19	38
<b>Radyoterapi öyküsü</b>	2	4
<b>Operasyon tipi</b>		
Parsiyel larenjektomi	31	62
Total larenjektomi	19	38
<b>Lateral boyun diseksiyonu</b>		
Bilateral	42	84
Unilateral	5	10
Yapılmayan	3	6

Histopatolojik inceleme sonrası patolojik T evresine bakıldığında 2 (%4) hasta T1, 14 (%28) hasta T2, 13 (%26) hasta T3 ve 21 (%42) hasta T4 evresindedir. Erken evre (T1 ve T2) hasta sayısı 16; ileri evre (T3 ve T4) hasta sayısı 34'tür. Patolojik N evresine bakıldığında 27 hasta N0 (%54), 7 (%14) hasta N1, 6 (%12) hasta N2 ve 10 (%20) hasta N3'tür. Hastaların 23'ünde (%46) lateral boyunda lenf nodu metastazı bulunmaktaydı. (Tablo 4-3)

Histopatolojik grade; 1 (%2) hastada grade 1, 32 (%64) hastada grade 2, 17 (%34) hastada grade 3'tür. (Tablo 4-3)

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

Boyun metastazı olan hastalar incelendiğinde 12 (%24) hastada perinodal yayılım görüldü. (Tablo 4-3)

24 (%48) hastada kan damarı invazyonu, 40 (%80) hastada lenfatik invazyon, 18 (%36) hastada perinöral invazyon, 20 (%40) hastada ise tiroid kartilaj invazyonu görüldü. (Tablo 4-3)

**Tablo 4-3.** Hastaların histopatolojik inceleme sonuçları

		Sayı (n: 50)	Yüzde (%)
<b>Patolojik T evresi</b>			
	T1	2	4
	T2	14	28
	T3	13	26
	T4	21	42
<b>Patolojik N evresi</b>			
	N0	27	54
	N1	7	14
	N2	6	12
	N3	10	20
<b>Histopatolojik grade</b>			
	Grade 1	1	2
	Grade 2	32	64
	Grade 3	17	34
<b>Hastalık evresi</b>			
	Evre 1	1	2
	Evre 2	8	16
	Evre 3	6	12
	Evre 4	35	70
<b>Perinodal invazyon</b>			
	Var	12	24
	Yok	38	76
<b>Kan damarı invazyonu</b>			
	Var	24	48
	Yok	26	52
<b>Lenfatik invazyon</b>			
	Var	40	80
	Yok	10	20
<b>Perinöral invazyon</b>			
	Var	18	36
	Yok	32	64
<b>Tiroid kartilaj invazyonu</b>			
	Var	20	40
	Yok	30	60

50 hasta incelendiğinde ekspresyon değeri ( $2^{\Delta\Delta CT}$  değeri) tümör dokularında ortalama 2,5, normal dokularda 1 olarak bulunmuştur. Paired sample T-test ile yapılan analizde  $p < 0,001$  olarak bulunmuştur ve sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu sonuca göre HYAL-1 ekspresyonu, tümör hücrelerinde normal dokuya göre ortalama 2,5 kat artmıştır. (Tablo 4-4)

**Tablo 4-4.** Normal doku ve tümörlü dokularda HYAL-1 ekspresyon miktarı

	$\Delta CT$ ortalama $\pm$ ss	$\Delta\Delta CT$ ortalama $\pm$ ss	$2^{-\Delta\Delta CT}$ ortalama $\pm$ ss	*P değeri
<b>Tümör dokusu</b>	5,46 $\pm$ 2,02	-1,32	2,5	<0,001
<b>Normal doku</b>	6,78 $\pm$ 1,25	0	1	

\*İstatistiksel analizler Paired Sample T-Test ile yapılmıştır.

Tükürük hyaluronik asit (HA) seviyeleri incelendiğinde ortalama 103,93 $\pm$ 69,04 ng/ml olarak bulunmuştur. (Tablo 4-5)

**Tablo 4-5.** Tükürük HA düzeyleri

<b>Tükürük HA (ng/ml) Ort.<math>\pm</math>SD (Min-Maks)</b>	103,93 $\pm$ 69,04 (0,01-350,8)
---	---------------------------------

Tümörlü doku örnekleri ile aynı hastaların normal doku örnekleri HYAL-1 ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında; 32 (%64) hastada normal dokuya göre tümör dokularında ekspresyon artmış olarak bulundu. 7 (%14) hastada ekspresyon değişmezken, 11 (%22) hastada ise ekspresyonun azaldığı görüldü. (Tablo 4-6)

Tükürükteki HA seviyeleri ortalamaya standart sapma değerleri eklenerek ve çıkartılarak hastalarda bir aralık belirlenmiştir. Bu belirlenen aralığa göre hastaların 38 (%76)'inde tükürük HA seviyeleri değişmemiş, 6(%12)'sında azalmış, 6(%12)'sında ise artmıştır. (Tablo 4-6)

**Tablo 4-6.** Tümör ve normal doku arasındaki HYAL-1 ekspresyon değişimleri ve tükürük HA değişimleri

		<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Tükürük HA değişimi</b>	Değişmemiş	38	76
	Azalmış	6	12
	Artmış	6	12
<b>HYAL-1 ekspresyon değişimi</b>	Aynı kalmış	7	14
	Azalmış	11	22
	Artmış	32	64

HYAL-1 ekspresyonu aynı kalan veya azalan grupla ekspresyonu artmış grup arasında; tümör lokalizasyonu ( $p=0,504$ ), T evresi ( $p=0,328$ ), boyun metastazı ( $p=1,0$ ), hastalık evresi ( $p=0,76$ ), perinodal yayılım ( $p=0,808$ ), histopatolojik grade ( $p=0,18$ ), kan damarı invazyonu ( $p=0,462$ ), lenfatik invazyon ( $p=0,097$ ), perinöral invazyon ( $p=0,37$ ), kartilaj invazyonu ( $p=0,333$ ) arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Transglottik tümörlerde, T3-T4 tümörlerde, ileri evre tümörlerde, boyun metastazı olan vakalarda HYAL-1 ekspresyonu artan hasta yüzdesi daha fazladır fakat gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. (Tablo 4-7)

**Tablo 4-7.** HYAL-1 ekspresyon artma durumu ile hastalık özelliklerinin karşılaştırılması

		Değişim						p
		Aynı kalmış		Azalmış		Artmış		
		n	%	n	%	n	%	
<b>Tümör yeri</b>	Glottik	1	7,1	3	21	10	71	0,504
	Supraglottik	4	23,5	5	29	8	47	
	Transglottik	2	10,5	3	16	14	74	
<b>Patolojik T</b>	T1	0	0	0	0	2	100	0,434
	T2	4	28,6	3	21	7	50	
	T3	2	15,4	4	31	7	54	
	T4	1	4,8	4	19	16	76	
<b>T evre</b>	Erken evre (T1,T2)	4	25	3	19	9	56	0,328
	İleri evre (T3, T4)	3	8,8	8	24	23	68	
<b>Boyun lenf nodu metastazı</b>	Yok	4	14,8	6	22	17	63	1
	Var	3	13	5	22	15	65	
<b>Evre</b>	Evre 1, 2	2	22,2	2	22	5	56	0,76
	Evre 3,4	5	12,2	9	22	27	66	
<b>Perinodal yayılım</b>	Yok	5	13,2	8	21	25	66	0,808
	Var	2	16,7	3	25	7	58	
<b>Histolojik grade</b>	Grade 1, 2	3	9,1	6	18	24	73	0,18
	Grade 3	4	23,5	5	29	8	47	
<b>Kandamarı invazyonu</b>	Yok	2	7,7	6	23	18	69	0,462
	Var	5	20,8	5	21	14	58	
<b>Lenfatik invazyonu</b>	Yok	1	10	0	0	9	90	0,097
	Var	6	15	11	28	23	58	
<b>Perinöral invazyon</b>	Yok	5	15,6	5	16	22	69	0,37
	Var	2	11,1	6	33	10	56	
<b>Kartilaj invazyonu</b>	Yok	6	20	7	23	17	57	0,333
	Var	1	5	4	20	15	75	

\* İstatistiksel analiz Kruskal Wallis Testi ile analiz edildi.

HYAL-1 ekspresyon artışı ile hastalık özellikleri arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. (Tablo 4-8)

**Tablo 4-8.** HYAL-1 ekspresyon artışı ile hastalık özelliklerinin karşılaştırılması

	Ekspresyon artışı ( $2^{\Delta\Delta CT}$ )				
	Ort.	SD	Median	p	
<b>Tümör yeri</b>	Glottik	10,33	16,52	2,52	0,200
	Supraglottik	6,09	16,78	1,15	
	Transglottik	17,93	44,04	2,81	
<b>Patolojik T</b>	T1	8,17	0,32	8,17	0,521
	T2	10,05	21,68	1,26	
	T3	7,96	19,77	1,24	
	T4	15,63	40,55	2,39	
<b>T evre</b>	Erken evre (T1, T2)	9,81	20,20	1,64	0,747
	İleri evre (T3, T4)	12,70	33,96	1,89	
<b>Boyun metastazı</b>	Yok	16,19	38,14	2,73	0,376
	Var	6,60	15,52	1,84	
<b>Evre</b>	Evre 1, 2	15,59	25,96	2,73	0,801
	Evre 3, 4	10,94	31,11	1,87	
<b>Perinodal yayılım</b>	Yok	14,91	33,96	2,69	0,093
	Var	1,86	2,03	1,30	
<b>Histopatolojik grade</b>	Grade 1, 2	8,94	16,07	2,64	0,093
	Grade 3	17,28	46,91	1,02	
<b>Kandamarı invazyonu</b>	Yok	8,24	16,33	2,72	0,593
	Var	15,61	40,06	1,66	
<b>Lenfatik invazyonu</b>	Yok	14,84	24,52	3,87	0,104
	Var	11,01	31,51	1,66	
<b>Perinöral invazyon</b>	Yok	14,69	35,43	2,27	0,275
	Var	6,59	16,43	1,85	
<b>Kartilaj invazyonu</b>	Yok	8,73	19,38	1,30	0,322
	Var	16,34	41,47	2,52	

\* İstatistiksel analiz bağımsız iki grupta Mann Whitney U testi ile yapılmıştır.

Hastaların HYAL-1 ekspresyon derecesi ile tükürük HA düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (p=0,647). (Tablo 4-9)

**Tablo 4-9.** Tümör dokusunda HYAL-1 ekspresyonu artışı ile tükürük HA seviyelerinin karşılaştırılması

<i>2<sup>ΔΔCT</sup> (HYAL-1 ekspresyon artışı)</i>		
	rho	p
<i>Tükürük HA</i>	-0,67	0,647

\* İstatistiksel analiz Spearman Korelasyon Analizi ile yapılmıştır.



## 5. TARTIŞMA

Larenks kanserleri son yıllardaki gelişmelere rağmen 5 yıllık sağ kalım oranları düşen ender kanserlerden birisidir. Bu durum hastalığın engellenmesi, tanı ve tedavisi açısından yeni gelişmelere gerek olduğunu bize göstermektedir. Son yıllarda mesane, prostat, over, meme kanserlerinde çalışılan bir grup HA ve HYAL grubu enzimlerdir. Bu ailenin moleküllerinin tümör gelişimini, metastazı ve anjiogenezi arttırdığı gösterilmiştir.<sup>47</sup> Şu anda değişik kanser türlerinde HYAL ve HA moleküllerini hedef alan tedavi modaliteleri açısından çalışmalar yapılmaktadır.

HA ailesinde yer alan moleküllerin baş boyun kanserlerinde raporlandığı referans sayısı oldukça azdır. Bizim çalışmamız larenks kanserleri açısından bakıldığında 50 larenks kanseri hastasının incelendiği literatürdeki en geniş seridir.

Godin ve ark.'ları<sup>39</sup> hyaluronidaz grubu enzimlerden biri olan PH-20'yi 11 larenks kanseri hastasında çalışmışlardır. Preoperatif dönemde radyoterapi almayan hastaların kanser örneklerinde normal dokulara göre istatistiksel olarak anlamlı PH-20 ekspresyonu görülmüştür. Ayrıca metastatik lenf nodlarında primer larengeal kanser dokularına ve normal larengeal dokulara göre daha yüksek ekspresyon bulunmuştur. PH-20 hyaluronidaz grubu enzimlerden birisidir. Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya benzer olarak aynı grubun insan dokularında sentezlenen ve birçok tümörde ekspresyonu artan HYAL-1 ekspresyonu tümör dokularında aynı hastaların normal doku örneklerine göre 2,5 kat artmış olarak bulunmuştur. Tümör dokusu ve normal dokular arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ).

Franzmann ve ark.'ları<sup>34</sup> HA testi kullanarak (ELİSA testi) 11 baş-boyun kanseri hastasının tükürük örneklerini 6 normal kontrolle karşılaştırmışlardır. Baş boyun kanseri hastalarında 4,9 kat artmış tükürük HA düzeyleri bulunmuştur ve fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Kanser grubunda  $2841 \pm 887$  ng/mg protein, kontrol grubunda ise  $579,3 \pm 122,6$  ng/mg protein tespit edilmiştir. Bu hastaların 4'ü oral kavite, 7'si farinks, 1'i ise larenks kanseridir. Bu çalışmada ayrıca tükürük hyaluronidaz düzeylerine de bakılmış ve normal kontrol grubuna göre hastalarda 3,7 kat arttığı bulunmuştur. Tümörün köken olduğu dokuya bağlı olarak; tümör dokuları, tümör ilişkili stroma veya her ikisi birden artmış HA salgısı yapmaktadır. Bizim

çalışmamızda değişik evrelerdeki ve yerleşimlerdeki larenks kanseri hastalarında tükürük HA düzeylerine ELİSA testi kullanarak baktık. Fakat HYAL-1 ekspresyonuyla tükürük HA seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Daha önce larenks ve baş boyun kanserlerinde yapılan çalışmada tükürük HA seviyesi artmasına rağmen en düşük değer larenks kanseri hastasında tespit edilmiştir.<sup>34</sup> Ayrıca önceki çalışmada hastaların büyük çoğunluğu oral kavite ve farenks kanserleriydi.<sup>34</sup> Bizim çalışmamızda tümör mikroçevresi tükürük ile ilişkili olmadığından ve HYAL-1 ekspresyonu tümör olan bölge dışındaki normal dokularda tümöre göre düşük olduğundan böyle bir durum ortaya çıkmış olabilir.

ESM’i yıkan enzim grubu olan hyaluronidazların intersitisyel sıvı ve mikrovasküler ortamdaki miktarları birçok tümörde incelenmiştir. Hyaluronidazlar ve HA seviyeleri birçok tümörle yakın ilişkilidir. Tümör hücreleri tarafından sentezlenen hyaluronidazlar, HA’i 2-15 disakkarit ünite içeren HA fragmanlarına parçalamaktadır. Bu küçük parçaların da hücre yüzeyindeki reseptörlerle (CD44 ve RHAMM) etkileşerek anjogenezisi ve endotelial hücre proliferasyonunu artırıcı etkisi bulunmaktadır.<sup>48</sup> HA-CD44 ilişkisi in vivo olarak malign tümör büyümesi, anjiyogenezis açısından önemlidir.<sup>29</sup> İnvaziv mesane kanseri hücrelerinde HYAL-1 ekspresyonunun blokajı tümör büyümesini yavaşlatmakta, tümör infiltrasyonunu inhibe etmekte ve mikrodamar yoğunluğunu azaltmaktadır. İntraserebral gliomalarda HYAL-2’nin yüksek ekspresyonu sadece tümör gelişimini hızlandırmakla kalmayıp; tümörün invazivliğini ve vaskularizasyonunu da arttırmaktadır.<sup>49</sup> Larenks skuamöz hücrelerinde HYAL-1 gen ekspresyonunun arttığını gösterdiğimiz çalışmamızda özellikle ileri evredeki larenks kanseri hastaları incelenmiştir. Bu hastaların 40’ında (%80) lenfatik invazyon vardı ve 23 (%46) hastada metastatik hastalık mevcuttu. Elde ettiğimiz veriler bize larenks kanserlerinde de HYAL-1 ekspresyon artışı sonucu meydana gelen değişikliklerin tümör gelişimini, büyümesini ve yayılımını hızlandırdığını düşündürmüştür.

Lokeshwar ve ark.’ları<sup>38</sup> hyaluronidaz testini kullanarak, prostat kanser dokularında normal ve benign prostatik hiperplazi dokularıyla kıyaslandığında artmış hyaluronidaz düzeylerini bulmuşlardır. Ayrıca bu çalışma ilk kez tümör progresyonu ve hyaluronidaz düzeyleri arasında bağlantı kurmuştur. Bu çalışmada,

düşük grade (Gleason 5-7) prostat kanser dokularıyla karşılaştırıldığında yüksek grade (Gleason>7)prostat kanser dokularında 3-7 kat artmış hyaluronidaz aktivitesi bulmuşlardır. Metastatik prostat kanser lezyonlarında, yüksek grade primer tümörlere oranla artmış hyaluronidaz düzeyi gösterilmiştir. Ayrıca yüksek grade mesane kanseri dokularında ve bu hastaların idrarlarında hyaluronidaz düzeyleri artmış olarak görülmüştür.

Kramer ve ark.'ları<sup>40</sup> mesane kanserlerinde tümör gelişiminde ve progresyonunda fonksiyonları olan hyaluronik asit ve HA-ailesinin bütün 7 üyesini HA-sentetazları(1, 2, 3), HYAL-1 hyaluronidazı ve HA-reseptörlerini (CD44s, CD44v, RHAMM) incelemişlerdir. Kantitatif-PZR ve immünohistokimya kullanılarak, 72 mesane kanserli hastadan toplanan dokular prospektif olarak incelenmiştir. HA sentetazların, HYAL-1, CD44v ve RHAMM transkripsiyon düzeylerinin normal dokularla karşılaştırıldığında mesane kanser dokularında 4-16 kat arttığını bulmuşlardır(P<0,0001). Bizim çalışmamızda da HYAL-1 ekspresyonu tümör hücrelerinde normal dokuya göre ortalama 2,5 kat artmıştır (p<0,001). Bu da mesane kanserlerinde olduğu gibi larenks kanserlerinde de HYAL-1 ekspresyon düzeylerinin rolü olduğunu göstermektedir. Tümör evresi, lenf nodu invazyonu, HYAL-1 ve HAS 1 transkripsiyon düzeylerinin ve HYAL-1 boyamanın metastazla bağımsız olarak ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada ayrıca tümör evresi ve HYAL-1 transkripsiyon düzeylerinin hastalık spesifik mortalite ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Sonuç olarak HYAL-1 ekspresyonunun metastaz riskini ve hastalık spesifik sağ kalımı öngördüğü belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda hastaların 40'ında lenfatik invazyon mevcuttu ve 23 hastada boyun metastazı bulunmaktaydı. Fakat HYAL-1 ekspresyonuyla boyun metastazı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır. Hastaların uzun dönem takiplerinde HYAL-1 ekspresyon seviyeleri ile hastalık nüksü ve sağ kalım arasında ilişki incelenebilecektir.

Düşük ve yüksek grade tümörler arasında HYAL-1 düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.<sup>40</sup> Bizim çalışmamızda da grade 1, 2 ile grade 3 tümörler arasında HYAL-1 ekspresyonları arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Kramer ve ark.'ları<sup>50</sup> 178 mesane kanseri olan hastayı inceledikleri bir çalışmada hastaları kas invazyonu olan ve olmayan olmak üzere iki gruba ayırmışlardır. HA ve HYAL-1 ekspresyonunun tümörün derecesi, evresi ve multifokalitesi ile korele olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca invazyon ve rekürrensle HYAL-1 düzeyleri arasında belirgin olarak ilişki bulunmuştur. Biz de ileri evre tümörlerde, transglottik kitlelerde HYAL-1 ekspresyonu artan hasta yüzdesinin daha fazla olduğunu gözlemledik. İleri evre hastalığı (T3, T4) olan 34 hastanın 23'ünde (%68) HYAL-1 ekspresyonu artmışken, erken evre (T1,T2) hastalığı olan 16 hastanın 9'unda (%56) HYAL-1 ekspresyonu artmıştır. Supraglottik hastalığı olan 17 hastanın 8'inde (%47) ekspresyon artmışken, transglottik hastaların %74'ünde HYAL-1 ekspresyonu artmıştır. İleri evre hastalığı olanlarda ve transglottik hastalığı olanlarda daha yüksek oranda HYAL-1 ekspresyon artışı görülmüştür. Bu durum büyük boyutlu, yaygın ve metastaz yapmış tümörlerde (evreyi yükselten bazı faktörler) HYAL-1 ekspresyon artışının önemli olabileceğini göstermektedir. Ayrıca histopatolojik inceleme sonucunda ekspresyon artışı ile kartilaj invazyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmamasına rağmen kartilaj invazyonu olan hastaların %75'inde ekspresyon artmışken; invazyon olmayan grubun %57'sinde ekspresyon artmıştır. Bu durum hyaluronidaz grubu enzimlerin sadece HA'ı değil ayrıca kondroitin sülfatı da yıkma özelliklerinden kaynaklanıyor olabilir.

Kolorektal kanser nedeniyle opere edilen hastaların tümör ve normal dokularının incelendiği çalışmada hyaluronidaz düzeyleri araştırılmıştır. Ayrıca gerçek zamanlı PZR yöntemiyle ekspresyonlarda çalışılmıştır. İncelenen hyaluronidazlar arasında, HYAL-1, -2, -3 ve PH20 tespit edilmiştir. Akitiviteleri kanser örneklerinde daha yüksek bulunmuştur. HYAL-1 ve HYAL-2, özellikle ileri evre kanserlerde yüksek eksprese edilmiştir.<sup>41</sup> Bizim çalışmamızda da 32 (%64) hastada, aynı hastanın normal doku örneklerine göre tümör hücrelerinde artmış HYAL-1 ekspresyonu tespit edildi. Normal doku örneklerine göre tümör dokularında HYAL-1 ekspresyonu 2,5 kat artmıştı. Çalışmamızdaki hastaların çoğu ileri evre hastalardı. T evresine ve hastalık evresine bakıldığı zaman ileri evre hastalarda HYAL-1 ekspresyonu daha çok artmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bunun nedeni Evre 1 hasta sayısının az olması olabilir. Çünkü bu

hastalar daha çok kapalı cerrahi yöntemler (CO2 lazer) ile tedavi edildiğinden çalışmaya dahil edilmemiştir.

Akciğer/bronş biyopsisi ve invaziv karsinom nedeniyle cerrahi yapılan, 136 akciğer/bronşial ve 56 akciğer parankim doku örneği alınan hastanın incelendiği bir çalışmada dokularda HYAL-1 ekspresyon düzeyi karşılaştırılmıştır.<sup>51</sup> Akciğer/bronş örnekleri; bazal hücre hiperplazisi, skuamöz metaplazi, orta displazi, adenomatöz hiperplazi, ağır displazi, skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinom tanılarını içermektedir. Akciğer parankim örnekleri 25 skuamöz hücreli karsinom olgusunu ve 32 adenokarsinom olgusunu içermektedir. İmmünohistokimyasal çalışma sonucu bazal hücre hiperplazisi örneklerinde orta displazi, atipik adenomatöz hiperplazi veya ağır displazi örneklerine kıyasla HYAL-1 belirgin olarak daha yüksek ekspresyon göstermiştir. Epitelyal HYAL-1 ekspresyonları preneoplastik lezyonlarda neoplastik lezyonlara göre daha yüksek oranda ekspresyon edilmiştir. Sonuç olarak HYAL ve HAS düzeylerinin akciğer/bronş preneoplastik ve neoplastik lezyonlarında malignensi ile ters orantılı olarak bulunmuşlardır ve akciğer kanseri şüphesi olan hastalarda bu faktörlerin bakılmasının kullanışlı bir tanısal yöntem olduğunu belirtmişlerdir.<sup>51</sup> Bizim çalışmamıza katılan hastaların tümünün skuamöz hücreli karsinom tanısı mevcuttu. 7 hastada ekspresyon değişmezken 11 hastada ise ekspresyon azaldı. Fakat 32 hastada ekspresyon artmıştı. Hastalarımızın çoğu ileri evre hastalar olduğundan daha önceki yayınlarda belirtildiği gibi ortamdaki HYAL-1 gen ürünlerinin artmasının sonucu negatif geri bildirim ile ekspresyon miktarları azalmış olabilir.

Yoffou ve ark.'ları<sup>52</sup> 2010 yılında epitelyal overyan kanserlerde HYAL-1 düzeylerini incelemişlerdir. Epitelyal overyan kanserler seröz, endometrioid, berrak hücreli ve müsinöz olarak sınıflanmaktadır. HYAL-1 mRNA ekspresyonunun berrak hücreli ve müsinöz epitelyal overyan doku örneklerinde arttığını fakat seröz ve endometrioid örneklerde, normal overlerde veya benign tümörlerde ise artmadığını bulmuşlardır. Berrak hücreli ve müsinöz alt tiplerde HYAL-1 aktivitesinin hastaların plazmalarında da arttığını göstermişlerdir. HYAL-1'in berrak hücreli ve müsinöz epitelyal overyan tümörlerde potensiyel bir hedef/biyomarker olduğunu belirtmişlerdir. Biz de çalışmamızda tükürük HA ve tümör ve normal dokulardaki

HYAL-1 mRNA ekspresyonunu inceledik. Artmış ekspresyon (ortalama 2,5 kat) larenks skuamöz hücreli kanserlerinde HYAL-1'in potansiyel bir hedef/biyomarker olabileceğini göstermektedir. Fakat HYAL-1 ekspresyon sonuçları ile tükürük HA seviyeleri arasında ilişki saptanamamıştır. Şu anki durumda HA'in larenks kanserli hastalarda tümör marker olarak kullanılması doğru sonuç vermiyecektir.

Mesane kanseri olan 50 hasta ile kontrol grubu olan 20 hastanın serum, idrar ve doku örneklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada 140 idrar ve serum örneğinde gerçek zamanlı PZR ile HYAL-1 ekspresyonu incelenmiştir. Malign dokularda (%86) ve hasta idrar örneklerinde (%79,6) kontrol grubuna göre (%10 ve %0,0) daha sık mRNA saptanmıştır. Kötü diferansiye ve ileri evre tümörlerde HYAL-1 mRNA daha fazla eksprese edilmektedir. Bu çalışmada sitoloji pozitif ve lenf nodu pozitif hastalarda, sitoloji ve lenf nodu negatif hastalara göre daha yüksek HYAL-1 mRNA saptanmasna rağmen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Sonuç olarak HYAL-1 ekspresyonu olan mesane kanserlerinde invazyon/metastaz potansiyelinin daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. HYAL-1 varlığının malign potansiyel açısından indikatif olduğunu ve high-grade tümörler için bir marker olacağını raporlamışlardır.<sup>53</sup> Bizim çalışmamızda da hastaların büyük çoğunluğu ileri evre hastalardı fakat histopatolojik grade ile HYAL-1 ekspresyonu açısından anlamlı bir ilişki saptanamadı. Ayrıca bu çalışmaya benzer olarak lenf nodu metastazı ile HYAL-1 seviyesi ve artış miktarı arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

HYAL-1 ekspresyonuyla histopatolojik verileri karşılaştırdığımızda perinodal invazyon, perinöral, lenfatik ve kan damarı invazyonu arasında arasında anlamlı ilişki saptayamadık. Hatta yüzde olarak invazyon olmayan gruplarda olan gruplara göre hasta oranları daha fazla görüldü. Bu durum hasta sayısının azlığından kaynaklanıyor olabilir.

İleri evre tümöre sahip ve lenf nodu metastazı olan bazı hastalarda HYAL-1 ekspresyonun artmaması iki hipotezle açıklanabilir.<sup>53</sup> Bunlardan birincisi Beech ve ark.'ları tarafından öne sürülen metastaz yapmış tümörlerin bu proteinin ekspresyonuna olan ihtiyaçlarının ortadan kalkmasıdır. İkincisi ise; gerçek zamanlı PZR ile sadece RNA üretiminin ölçülmesidir. Bu yöntemle ortamdaki protein miktarı

ölçülememektedir. Yüksek miktarda HYAL-1 enziminin ve ortamdaki yıkım ürünlerinin varlığında negatif feed-back ile HYAL-1 mRNA üretimi düşüyor olabilir.

Bazı tümörlerde ise HYAL-1 ekspresyonu olmamaktadır. 97 seröz ovaryan karsinomunda (61 efüzyon, 27 primer karsinom, 9 solid metastaz) HAS ve HYAL mRNA'larının incelendiği bir çalışmada HYAL-1, spesmenlerin tamamında bulunamamıştır.<sup>54</sup> Bizim çalışmamızda tüm örnekler primer tümörden alınmıştır. Bütün dokularda HYAL-1 ekspresyonu görülmüştür ve hastaların %64'ünde tümör hücrelerinde normal dokuya göre ekspresyon artmıştır. Fakat bazı hastalarda ekspresyon miktarı azalmış veya değişmemiştir. Bu durumun nedeni iki hipotezle de açıklanabilir. Hastalarımızın % 82'si ileri evre hastalardı ve %46'sında lenf nodu metastazı vardı. Çalışmamızda gerçek zamanlı PZR ile ekspresyon bakılmıştır. Ortamdaki yıkım ürünlerinin varlığında ekspresyonun negatif feed-back ile düşmüş olabilir. Bunun için tümörlü dokudaki HA'i ve fragmanlarını inceleyecek bir çalışmaya ihtiyaç olacaktır.

Bazı çalışmalarda hyaluronidazların kanserler üzerinde hem inhibe edici hem de kolaylaştırıcı etkilerinin olduğu belirtilmektedir. Bu bulgu enzimlerin hücrel konsantrasyonuyla yakından ilişkilidir. Bizim çalışmamızda kanserli doku örneklerinde ekspresyon seviyelerinin artmış olması bu genin ve ürünlerinin kanser gelişiminde etkili olduğunu göstermektedir. Özellikle HA'in yıkımı sonucu ortaya çıkan düşük molekül ağırlıklı fragmanların varlığının anjiogenezisi ve tümör gelişimini uyardığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir.<sup>47</sup> Bazı çalışmalarda söylenen HYAL-1 ekspresyon ürünlerinin in vivo olarak doz bağımlı olarak tümör gelişiminde inhibitör veya aktivatör etki göstermesi, bizim sonuçlarımız düşünüldüğünde larenks skuamöz hücreli kanseri olan hastalarda ekspresyon artışının tümör gelişiminde rol aldığını düşündürmüştür. Daha faydalı sonuçlar alabilmek için daha fazla hasta sayısı ve tümörlü dokuda HYAL-1 enzim ve HA yıkım ürünlerinin ölçümünü hedefleyen bir çalışmaya gerek vardır.

## 6. SONUÇ

Larenks kanserleri son yıllardaki gelişmelere rağmen 5 yıllık sağ kalımı düşen nadir hastalıklardan birisidir. Son çalışmalar özellikle tümör mikroçevresi ile ilgili araştırmalara kaymaktadır. Biz de çalışmamızda kolon, mesane, over gibi birçok tümörde ekspresyonu artmış Hyaluronidaz-1geninin ekspresyonunu larenks skuamöz hücreli kanseri olan hastalarda inceledik. Larenks kanserlerinde de HYAL-1 ekspresyonun normal dokulara göre 2,5 kat arttığını bulduk. Tümör gelişimini, damarlanmasını ve invazyonunu hızlandırdığı bilinen HYAL-1'i ve bu genin ürünlerini hedef alan tedavi yaklaşımları larenks kanserlerinde de gelecek dönemde çalışılabilir.



## 7. KAYNAKLAR

1. Meller SM. Functional anatomy of the larynx. *Otolaryngol Clin North Am.* 1984;17(1):3-12.
2. Koç C. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi. 2nd ed.; 2013;1105-1185.
3. Sancak B. Fonksiyonel Anatomi. Baş-Boyun ve İç Organlar. 7th ed.; 2013;105-114.
4. Koç C. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi 1. Baskı Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti. 2003;1141-1154.
5. Flint PW HB. Cummings Otolaryngology Head and Neck Surgery. 6th ed. By Saunders; 2015;1579-1731.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics , 2016. 2016;66(1):7-30.
7. Sağlık Bakanlığı. Sağlık İstatistikleri Yıllığı. 2014.
8. Kuper H, Boffetta P, Adami H-O. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *J Intern Med.* 2002;252(3):206-224.
9. Zuo J-J, Tao Z-Z, Chen C, et al. Characteristics of cigarette smoking without alcohol consumption and laryngeal cancer: overall and time-risk relation. A meta-analysis of observational studies. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology.* 2017;274(3):1617-1631.
10. Stell PM, McGill T. Asbestos and laryngeal carcinoma. *Lancet (London, England).* 1973;2(7826):416-417.
11. Giraldi L, Panic N, Cadoni G, et al. Association between Mediterranean diet and head and neck cancer. *Eur J Cancer Prev.* August 2016:1.
12. Snow AN, Laudadio J. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. *Adv Anat Pathol.* 2010;17(6):394-403.

13. Li X, Gao L, Li H, et al. Human Papillomavirus Infection and Laryngeal Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Infect Dis.* 2013;207(3):479-488.
14. Xu Y, Liu S, Yi H, et al. Human Papillomavirus Infection in 674 Chinese Patients with Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. Liu X, ed. *PLoS One.* 2014;9(12):e115914.
15. Almadori G, Cadoni G, Cattani P, et al. Human papillomavirus infection and epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7(12):3988-3993.
16. El-Serag HB, Hepworth EJ, Lee P, et al. Gastroesophageal reflux disease is a risk factor for laryngeal and pharyngeal cancer. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(7):2013-2018.
17. Galli J, Cammarota G, Cal L, et al. The Role of Acid and Alkaline Reflux in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Laryngoscope.* 2002;112(10):1861-1865.
18. Schultz P. Vocal fold cancer. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2011;128(6):301-308.
19. Licitra L, Bernier J, Grandi C, et al. Cancer of the larynx. 2003;47.
20. Becker M, Burkhardt K, Dulguerov P, et al. Imaging of the larynx and hypopharynx. *Eur J Radiol.* 2008;66(3):460-479.
21. Adolphs APJ, Boersma NA, Diemel BDM, et al. A systematic review of computed tomography detection of cartilage invasion in laryngeal carcinoma. *Laryngoscope.* 2015;125(7):1650-1655.
22. Arjani GA, In h, Sano T, et al. Larynx. In: Amin MB, editor. *AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition: Update*, New York; Springer-Verlog; 2017.
23. Moe K, Wolf GT, Fisher SG, et al. Regional metastases in patients with advanced laryngeal cancer. Department of Veterans Affairs Laryngeal

- Cancer Study Group. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996;122(6):644-648.
24. Shah JP. Larynx and Trachea. In: Jatin Shah's Head and Neck Surgery and Oncology. 2012:356-425.
  25. Scola B, Fernández-Vega M, Martínez T, et al. Management of cancer of the supraglottis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001;124(2):195-198.
  26. Stell PM, Tobin KE. The behavior of cancer affecting the subglottic space. *Can J Otolaryngol.* 1975;4(4):612-617.
  27. Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments : An information-rich system. 2006;85:699-715.
  28. Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan Synthases. *J Biol Chem.* 1997 May 30;272(22):13997-4000.
  29. Stern R. Hyaluronidases in Cancer Biology. In: *Hyaluronan in Cancer Biology.* ; 2009:207-220.
  30. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(7):528-539.
  31. Stern R, Jedrzejewski MJ. Hyaluronidases: Their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev.* 2006;106(3):818-839.
  32. Frost GI, Csoka AB, Wong T, et al. Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236(1):10-15.
  33. Lokeshwar VB, Rubinowicz D, Schroeder GL, et al. Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer. *J Biol Chem.* 2001;276(15):11922-11932.
  34. Franzmann EJ, Schroeder GL, Goodwin WJ, et al. Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck

- tumors. *Int J Cancer*. 2003;106(3):438-445.
35. Hardy CM, Clydesdale G, Mobbs KJ, et al. Assessment of contraceptive vaccines based on recombinant mouse sperm protein PH20. *Reproduction*. 2004;127(3):325-334.
  36. Stern M, Stern R. An ELISA-like assay for hyaluronidase and hyaluronidase inhibitors. *Matrix*. 1992;12(5):397-403.
  37. Lokeshwar VB, Obek C, Pham HT, et al. Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. *J Urol*. 2000;163(1):348-356.
  38. Lokeshwar VB, Lokeshwar BL, Pham HT, Block NL. Association of elevated levels of hyaluronidase, a matrix-degrading enzyme, with prostate cancer progression. *Cancer Res*. 1996;56(3):651-657.
  39. Godin DA, Fitzpatrick PC, Scandurro AB, et al. PH20: a novel tumor marker for laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000;126(3):402-404.
  40. Kramer MW, Escudero DO, Lokeshwar SD, et al. Association of hyaluronic acid family members (HAS1, HAS2, and HYAL-1) with bladder cancer diagnosis and prognosis. *Cancer*. 2011;117(6):1197-1209.
  41. Bouga H, Tsouros I, Bounias D, et al. Involvement of hyaluronidases in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2010;10:499.
  42. Spruss T, Bernhardt G, Schönenberger H, et al. Hyaluronidase significantly enhances the efficacy of regional vinblastine chemotherapy of malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1995;121(4):193-202.
  43. Haselsberger K, Radner H, Pendl G. Boron neutron capture therapy for glioblastoma: improvement of boron biodistribution by hyaluronidase. *Cancer Lett*. 1998;131(1):109-111.
  44. Maier U, Baumgartner G. Metaphylactic effect of mitomycin C with and

without hyaluronidase after transurethral resection of bladder cancer: randomized trial. *J Urol.* 1989;141(3):529-530. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2493098>. Accessed May 26, 2017.

45. Klocker J, Sabitzer H, Raunik W, et al. Hyaluronidase as additive to induction chemotherapy in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Lett.* 1998;131(1):113-115.
46. Klocker J, Sabitzer H, Raunik W, et al. Combined application of cisplatin, vindesine, hyaluronidase and radiation for treatment of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am J Clin Oncol.* 1995;18(5):425-428.
47. Lokeshwar VB, Selzer MG. Hyaluronidase: both a tumor promoter and suppressor. *Semin Cancer Biol.* 2008 Aug;18(4):281-7.
48. Kultti A, Li X, Jiang P, et al. Therapeutic Targeting of Hyaluronan in the Tumor Stroma. 2012:873-903.
49. Novak U, Stylli SS, Kaye AH, et al. Hyaluronidase-2 Overexpression Accelerates Intracerebral but not Subcutaneous Tumor Formation of Murine Astrocytoma Cells 1. 1999:6246-6250.
50. Kramer MW, Golshani R, Merseburger AS, et al. NIH Public Access. 2011;57(1):86-94.
51. De Sa VK, Rocha TP, Moreira AL, et al. Hyaluronidases and hyaluronan synthases expression is inversely correlated with malignancy in lung/bronchial pre-neoplastic and neoplastic lesions, affecting prognosis. *Brazilian J Med Biol Res.* 2015;48(11):1039-1047.
52. Yoffou PH, Edjekouane L, Meunier L, et al. Subtype specific elevated expression of Hyaluronidase-1 (HYAL-1) in Epithelial ovarian cancer. *PLoS One.* 2011;6(6).
53. Aboughalia AH. Elevation of hyaluronidase-1 and soluble intercellular

adhesion molecule-1 helps select bladder cancer patients at risk of invasion. Arch Med Res. 2006;37(1):109-116.

54. Weiss I, Trope CG, Reich R, et al. Hyaluronan synthase and hyaluronidase expression in serous ovarian carcinoma is related to anatomic site and chemotherapy exposure. Int J Mol Sci. 2012;13(10):12925-12938.

