

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ
ANABİLİM DALI



LARENKS KANSERLİ HASTALARDA
MİKRONÜKLEUS, NÜKLEOPLAZMİK BRİDGES VE
NÜKLEER BUDS GÖRÜLME SIKLIĞI

UZMANLIK TEZİ
Dr. İBRAHİM YAZICI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. FEVZİ SEFA DEREKÖY
Çanakkale/2015

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ
ANABİLİM DALI

**LARENKS KANSERLİ HASTALARDA MİKRONÜKLEUS,
NÜKLEOPLAZMİK BRİDGES VE NÜKLEER BUDS GÖRÜLME
SIKLIĞI**

UZMANLIK TEZİ
Dr. İBRAHİM YAZICI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. FEVZİ SEFA DEREKÖY

Çanakkale/2015

(ÇOMÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu Tarafından TTU-2014-197 numaralı
Araştırma Olarak Desteklenmiştir.)

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

.....Kulak Burun Boğaz.... Anabilim Dalı uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Dr İbrahim YAZICI' ya Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/09/2015

TEZ KONU BAŞLIĞI

"Larenks Kanserli Hastalarda Mikronükleus, Nükleoplazmik Bridges ve Nükleer BUDS Görülme Sıklığı"

Tez Danışmanı: Prof.Dr.Fevzi Sefa DEREKÖY

Tez Jürisi Üyeleri:

Adı Soyadı

İmzası

Prof.Dr.Fevzi Sefa DEREKÖY.....

Prof.Dr.Recep YAĞIZ.....

Prof.Dr.Mahmut COŞKUN.....

Doç.Dr.Erdoğan GÜLTEKİN.....

Doç.Dr.Oğuz GÜÇLÜ.....

ONAY:

Bu tez Anabilim/Bilim Dalı Akademik Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim Kurulunun **28./09./2015** tarih ve **2015/26** sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

.....
Dekan

Prof.Dr. Hakkı Engin AKSULU
Dekan

TEŞEKKÜR

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda ihtisas eğitimim süresince bilgi ve deneyimi ile teorik ve pratik olarak bana kazandırdığı mesleki becerilerin yanı sıra, hastalarımıza olan yaklaşımı ile bana daima örnek olan ve bana hekimlik mesleğini sevdiren saygıdeğer hocam ve kliniğimizin AD başkanı Sayın Prof. Dr. Fevzi Sefa DEREKÖY'e teşekkürlerimi sunarım.

Hücre kültürü hazırlanmasında deneyim ve özverileri ile bana yol gösteren Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mahmut Coşkun ile Sayın Öğretim Gör. Münevver Coşkun'a ve hücre sayımlarımda bana yardımcı olan Dr. Hayal Tok'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca ihtisas eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle her zaman bana örnek olan sayın Doç. Dr. Oğuz GÜÇLÜ ile Yard. Doç. Dr. Medine KARA'ya çok teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, servis, poliklinik ve ameliyathane hemşire ve personelimize teşekkürlerimi sunarım.

Beni her zaman destekleyip mesleğimde kendime olan güvenimi arttırmamda yardımcı olan sevgili eşim Seda YAZICI'ya,

Butün stres ve yorgunluğumu gideren canım kızım ESLEM'e,

Bu zamana kadar maddi ve manevi bana her zaman destek olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. İbrahim YAZICI

Çanakkale, 2015

ÖZET

Amaç: Larenks kanseri baş boyun bölgesinde en sık görülen kanserdir. Bu çalışmada, KBB ana bilim dalında tanı ve tedavisi gerçekleşen larenks kanserli hastalardan alınan kan örnekleri değerlendirmeye alınmıştır. Kromozom hasarını belirleyebilmek için sitogenetik araştırmaya ihtiyaç duyulmuştur. Bu olgulardan sitogenetik incelemelerle MN, NPB ve NBUDS görülme sıklığı araştırılmıştır. Sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve pestiside maruz kalmanın larengeal kanserleşme üzerine olan olası etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalında tanı ve tedavisi gerçekleşmiş 51 larenks karsinomlu olgu ve 51 kontrol grubu olmak üzere toplam 102 hasta değerlendirilmiştir. Kanserli hastaların klinik öyküsü, yaş ve cinsiyeti, mesleği, pestisite maruziyeti, sigara alışkanlıkları, operasyon öyküsü, radyoterapi ve kemoterapi alıp almadığı ile fizik muayene bulguları TNM klasifikasyonuna göre kayıt edilmiştir. Uygulanan tedavi tipi, nüks ve metastaz göz önüne alınmış ve kaydedilmiştir. Tüm hastaların peliferik lenfositlerindeki MN, NPB ve NBUDS varlığı araştırılmıştır. Larenks kanserli hastalarda pestisid kullanımı öyküsü olan hastalar ayrı bir kategoride değerlendirilmiş ve veriler pestisid maruziyeti olmayan grup ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Kontrol grubu olarak çalışmaya 40 yaş ve üzeri, pestisit maruziyeti bulunmayan, ek hastalığı olmayan, herhangi bir nedenle ilaç kullanmayan ve ailesinde kanser öyküsü olmayan hastalar dahil edildi.

Bulgular: Çalışmamızda yer alan 51 kanserli hastanın tamamı erkektir. Olguların yaş ortalaması 64 (38-81)dir. Kanserli hastaların %35,3'ü riskli meslek gruplarından (Çiftçi, marangoz, kahveci, ormancı, fırıncı, boyacı vb.), %64,7'si risksiz kabul edilen meslek gruplarındandı (Memur, esnaf, aşçı, vb.). Kanserli hastaların %47,1'i pestisit ile temas ederken, %52,9'unda pestisit maruziyeti yoktu. Kanserli gruptaki hastaların tamamı sigara içmekteydi. Hastaların Tümörlerin yerleşim yerine göre 5'i (%9,8) supraglottik, 46'sı(% 90,2) glottikken, subglottik yerleşimli tümörü olan hasta yoktu. T1 18 olguda (%35,3),2ü T2, 22 olguda (%43,1)'i, T3 9 olguda (%17,6)'sı

T4 ise 2 olguda (%3,9) izlendi. Kanserli hastaların 6'sına (%11,8) total larenjektomi, 23 hastaya (%45,1) parsiyel 20'sine (%39,2) mikrolarengoskopik tümör rezeksiyonu operasyonu yapılırken, 2 hastaya (%3,9) sadece KT+RT (kemoterapi+radyoterapi) tedavisi verildi. Servikal lenf nodu metastazı 11 hastada (%21) saptandı. 10 hastada (%19,6) N1 görülürken 1 hasta (%1,9) N2 idi. Kanserli hastaların 24'ü (%47,1)'i primer radyoterapi alırken, 2 hasta (%3,8) hem radyoterapi hem kemoterapi aldı. Hastaların takip süreleri incelendiğinde 2 ay ile 41 ay arasında değişmekte olup ortalama takip süresi 23,2 ay olarak bulundu. Kontrol grubunda yer alan 51 hastanın 24'ü (%47,1) erkek ve 27'si (%52,9) kadındı. Larenks kanserli hastalarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kromozomal hasarın göstergesi olan MN, NBP ve NBUDS değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı. Kanserli grupta yer alan hastalardan tarım ilacı kullanan 24 hasta kullanmayan 27 hasta ile karşılaştırıldığında MN ve NBUDS değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. NPB ortalama değerleri aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Larenks kanserli hastalarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kromozomal hasarın göstergesi olan MN, NBP ve NBUDS değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı. Kanserli grupta yer alan hastalardan tarım ilacı kullanan 24 hastada kullanmayan 27 hasta ile karşılaştırıldığında MN ve NBUDS değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. NPB ortalama değerleri karşılaştırıldığında ise aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Sonuç: Bu sonuçlar mikronükleus tekniğinin kanser tanısında güvenle kullanılabilecek bir teknik olduğunu gösterdi. Pestisit kullanan olgularda kromozom hasarı saptanmış olup MN ve NBUDS değerleri kanser gelişimini ortaya koyabilir. Bu çalışmanın ortaya koyduğu en önemli sonuç sigara kullanımı gibi pestisit kullanımının da sitogenetik değişikliğe neden olduğu ve ayrıca kansere yol açtığı yönünde olmuştur

Anahtar Kelimeler: Mikronükleus, Nükleoplasmik Köprü, Nükleer Bud, Larenks Kanseri, Pestisit

ABSTRACT

Aim: Laryngeal cancer is the most common cancer in the head and neck. In this study, blood samples which have been taken from the cancer patients who are being diagnosed and treated in the Laryngeal ENT department have been evaluated. Cytogenetic research has been required to determine the chromosome damage. From these cases MN, NPB and NBUDS incidences have been investigated with cytogenetic examination. Results were compared with a control group and the research of possible effects of exposure to pesticides on the laryngeal carcinogenesis has been aimed.

Materials and Methods: In this study, 51 patients with laryngeal carcinoma and 51 control group, totally 102 patients whose diagnosis and treatments have been realised at the Faculty of Medicine Department of Otolaryngology of Çanakkale Onsekiz Mart University have been evaluated. Clinical history, age and gender, occupation, pesticide exposure, smoking habits, and history of operation of patients with cancer; whether they have received radiotherapy and chemotherapy and their physical examination findings have been recorded according to the TNM classification. Type of treatment applied, recurrence and metastasis have been considered and recorded. MN, NPB ve NBUDS presences of all patients in their periphery lymphocytes have been researched. Among patients with **larynx** cancer, patients with the history of pesticide usage have been evaluated in a different category and the data were compared with non-exposure to pesticide group and control group. As control group patients over 40 years old, with no exposure to pesticide, with no additional illness, not using any medicine for any reason and having no history of cancer in their family have been included in this research.

Findings: All the 51 cancer patients in our study were male. The average age of cases was 64 (38-81). 35.3% of cancer patients were from risky occupations (farmers, carpenters, tea/coffee shop owners, foresters, bakers, painters etc.). 64,7% of them were from occupation groups regarded as risk-free jobs (civil servants, artisans, cooks, etc.).

While 47.1% of patients with cancer have been in contact with pesticides, 52.9% of them have had no pesticide exposure. All of the patients in the cancer group were smokers. According to the settlement of the tumors on patients; 5 (9.8%) patients were supraglottic and 46 (90.2%) patients were glottic; however there were no patients with subglottic localized tumors. T1 was observed in 18 cases (35.3%), T2 in 22 cases (43.1%), T3 in 9 patients (17.6%), and T4 was observed in 2 patients (3.9%). While 6 (11.8%) of cancer patients were given total laryngectomy, 23 (45.1%) of patients and partial 20 (39.2%) patients were given micro-laryngoscopic tumor resection operation, 2 (3.9%) of patients were given only CT + RT treatment. Cervical lymph node metastases have been found in 11 patients (21%). While N1 was observed in 10 patients (19.6%), N2 was observed in 1 patient (1.9%). 24 cancer patients (47.1%) received primary radiotherapy whereas 2 patients (3.8%) received both radiotherapy and chemotherapy. When considering the follow-up period of patients, it ranged from 2 to 41 months and the average follow-up period was found as 23.2 months. 24 (47.1%) of the 51 patients who were included in the control group were male and 27 (52.9%) of them were female. In larynx cancer patients, compared with control group, a statistically significant increase has been determined in MN, NBP and NBUDS values which are the chromosomal damage indicators. From cancer patients group, in 24 of patients using pesticides; the difference in MN and NBUDS, compared with non-pesticide using 27 patients, has been statistically found significant. The differences among NBP average values were not statistically significant. In Laryngeal cancer patients compared with the control group, a significant increase has been determined in the values of MN, NBP and NBUDS values which are indicators of chromosomal damage. From cancer patients group, in 24 of patients using pesticides; the difference in MN and NBUDS values, compared to non-pesticide using 27 patients, has been statistically found significant. When the NBP average values have been compared, the difference was not statistically significant.

Conclusion: These results have showed that the micronuclei technique is a technique which can be used safely in cancer diagnosis. Pesticide use in patients with chromosomal damage is found you can reveal the value of MN and NBUDS cancer. The most important result of the study revealed that cytogenetic abnormalities caused by the use of pesticides such as smoking and also has been in the direction that leads to cancer.

Keywords: Micronucleus, Nükleoplasmik Bridges, Nuclear Bud, Laryngeal Cancer, Pesticides

İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR	i
II. ÖZET.....	ii
III. ABTRACT.....	iv
IV. İÇİNDEKİLER.....	vii
V. KISALTMALAR.....	ix
VI. TABLO LİSTESİ.....	x
VII. ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Larenks Kanserleri.....	3
2.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji.....	3
2.1.2.Etyoloji.....	3
2.1.3.Larenks Kanserlerinin Histopatolojisi.....	9
2.1.3.1 Vokal Kord Histolojisi.....	9
2.1.3.2. Prekanseroz Lezyonlar.....	12
2.1.3.3 İnvaziv Karsinom.....	13
2.1.4 Larenksin Diğer Tümörleri.....	14
2.2. Larenks Kanseri Tipleri.....	16
2.3.Larenks Kanserlerinde Tanı.....	16
2.3.1 Ayırıcı Tanı	17
2.4 Larenks Tümörlerinde Evreleme.....	18
2.5 Larenks Kanserlerinde Yayılım.....	21
2.5.1 Lenfatik Yayılım.....	22
2.5.2.Uzak Metastazlar	22
2.6 Larenks Kanserlerinde Tedavi.....	23
2.6.1 Tedavide Genel Prensipler.....	23
2.6.2.Cerrahi Tedavi	
2.6.3 Radyoterapi.....	25
2.6.4 Kemoterapi.....	25
2.7 Larenks Kanserlerinde Prognoz, Prognostik ve Prediktif Faktörler.....	26

2.8 Larenks Kanserlerinin Moleküler Biyolojisi.....	27
2.8.1 Normal ve Kanserli Hücre Biyolojisi	27
2.8.2. Kanser Hücrelerinin Bazı Eşsiz Özellikleri	31
2.8.3. Aşırı Kanser Hücre Üretiminin Nedenleri.....	32
2.9. Biyomarkerlar (Tümör Belirteçleri).....	34
2.10 Kanserde Yer Alan Genlerin Gruplandırılması.....	37
2.10.1 Onkogenler.....	38
2.10.2 Tümör Supresör Genler.....	39
2.10.3 Diğer Proteinler.....	40
2.11. Sitogenetik İncelemeler.....	42
2.11.1.Konvansiyonel Sitogenetik İncelemeler.....	44
2.11.1.1 Mikronükleus,Nükleoplasmik Bridges ve Nükleer BUDS.....	44
2.11.2. Moleküler Sitogenetik İncelemeler.....	55
2.12. Pestisitler.....	56
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	60
3.1. İstatiksel Analiz.....	63
4. BULGULAR.....	63
5. TARTIŞMA.....	79
6. SONUÇ.....	86
7. KAYNAKLAR.....	88
8. EKLER.....	97
Etik kurul Onay Belgesi.....	98

KISALTMALAR

- AJCC:** American Joint Committee on Cancer
BRCA: Breast Cancer Susceptibility
CA: Karsinojenik Antijen
CIS: Karsinoma insitu
COX: Siklooksijenaz
Cyt-B: Sitokalazin B
DNA: Deoksiribonükleik asit
FISH : Fluorescence In Situ Hybridisation
GÖR: Gastroözogiyal reflü
HPV: Human Papilloma Virüs
KSY: Konvansiyonel Sitogenetik Yöntemler
LFR: Larengofarengeal reflü
MI: Mitotik indeks
MN: Mikronükleus
NBI: Nükleer bölünme indeksi
NF: Nörofibromatozis
NPB: Nükloeoplasmik Bridges
NBUDS: Nükleer budding
PDFG: Platelet Derive Growth Faktör
PSA: Prostat Spesifik Antijen
RB: Retinoblastom
SHK: Skuamöz hücreli karsinom
SPSS : Statistical Package for the Social Sciences
VEGF: Vasküler Endotelyal Growth Faktör
WHO: Dünya Sağlık Örgütü

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Larenks ca TNM evrelemesi (AJCC,2012)

Tablo 2. Bazı Onkogenler

Tablo 3. Bazı Tümör Süpresör Genler

Tablo 4. Kanserli ve kontrol grubundaki hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı

Tablo 5. Kanserli gruptaki hastaların sigara ve alkol kullanma durumlarına göre dağılımı

Tablo 6. Kontrol grubunda yer alan hastaların sigara kullanma durumlarına göre MN, NPB ve NBUDS değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 7. Kanserli Hastalara İlişkin Bilgiler

Tablo 8.Kanserli Hastalara İlişkin Bilgiler

Tablo 9. Kanserli hastalarda Nüks durumuna göre hastaların MN,NPB ve NBUD ortalamaları

Tablo 10. MN, NPB. ve NBUDS değerlerinin kanserli grup ve kontrol grubu bazında incelenmesi

Tablo 11. Kanserli grupta yer alan hastaların tümör yerlerine göre MN, NPB. ve NBUDS değerlerinin incelenmesi

Tablo 12. Kanserli grupta yer alan hastaların tümör evrelerine göre MN, NPB ve NBUDS değerlerinin incelenmesi

Tablo 13. Kanserli grupta yer alan hastaların boyun metastazı durumlarına göre MN, NPB. ve NBUDS değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 14. Kanserli grupta yer alan hastaların radyoterapi alma durumlarına göre MN, NPB. ve NBUDS değerlerinin incelenmesi

Tablo 15. Kanserli grupta yer alan hastaların kırsal yaşantısı olup olmadığına göre MN, NPB ve NBUDS değerlerinin incelenmesi

Tablo 16. Kanserli grupta yer alan hastaların pestisit kullanma durumlarına göre MN, NPB. ve N.BUDS değerlerinin incelenmesi

ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

Şekil 1. Normal vokal kord histolojisi

Şekil 2. Skuamöz hücreli karsinom histolojisi

Resim 1. Sağ vokal kordda larenks karsinomu

Şekil 3. Hücre siklusu

Şekil 4. Kanser hücrelerinin oluşumunu sağlayan faktörler

Şekil 5. Larenks kanserlerinde çalışılmış bazı biyomarkerlar

Şekil 6. Kromozomun genel yapısı

Şekil 7 . Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN'ler.

Şekil 8. Sitokinezi bloklanmış MN yöntemi ile bazı sitogenetik anormalliklerin tayin edilmesi

Şekil 9. In vitro MN test protokolü.

Şekil 10. Mikronukleus görünümü

Şekil 11. Işık mikroskopunda MN,NBUDS ve NPB görünümü

Şekil 12. Nükleoplasmik Bridge (NPB) oluşumu

Şekil 13. Cinsiyet durumuna göre hasta ve kontrol grubunun dağılımı

Şekil 14. Kanserli hastalarda sigara ve alkol kullanımı

Şekil 15. Tümörün yerine göre hastaların dağılımı

Şekil 16. Tümör evresine göre hastaların dağılımı

Şekil 17. Cerrahi tedavi şekline göre hastaların dağılımı

Şekil 18. Kanserli hastalara uygulanan tedavi yöntemleri

Şekil 19. Kanserli hastalarda nüks ve sağkalım oranları

Şekil 20. Tümör evresine göre MN,NPB ve NBUDS dağılımı

Şekil 21. Pestisid kullanan ve kullanmayan grupta MN,NPB ve NBUDS değerlerinin karşılaştırılması

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Larenks kanseri baş boyun bölgesinde %25 oranıyla en sık görülen kanserdir. Erişkinlerde tüm kanserlerin % 2-5'ini oluşturur (1). Türkiye'de erkeklerde görülen kanserler arasında 2. sıklıkta yer aldığı ve erkeklerde tüm ölümlerin % 7'sinden sorumlu olduğu belirtilmektedir (1). Bununla birlikte larenks kanseri, uygun tanı ve yeterli tedavi yaklaşımları uygulandığında, baş boyun bölgesinin tedaviye en iyi yanıt veren tümörüdür.

Larenks kanserlerinde hastalıksız yaşam süresini, sağkalımı ve organ korunmasını arttırabilmek için tümörün davranışı hakkında bilgi edinilmeli ve bu duruma etki eden faktörler detaylı incelenmelidir. Tümör evresi, anatomik lokalizasyonu, histolojik differansiyasyonu ve boyunda metastaz varlığı larenks kanserleri için genel prognostik faktörlerdir. Bunların içinde özellikle boyun metastazı varlığı kötü prognoz göstergesi olarak kabul edilmektedir. Ancak benzer histopatolojik tanı, grade ve evresi olan tümörlerde dahi farklı tümör davranışlarının gözlemlenebilmesi bizi farklı prognostik faktörlerin araştırılmasına ve yeni moleküler çalışmaların yapılmasına yönlendirmektedir.

Etyolojide sigara ve alkol önemli rol oynamaktadır. Bunun dışında boyacılar, metal sanayinde çalışanlarda, dizel ve benzin buharına maruz kalanlarda, plastik sanayinde çalışanlarda ve boyun bölgesine terapötik dozda radyoterapi görenlerde, gastroözefageal reflüsü olanlarda larenks kanseri riski fazladır. Genetik etyolojide kromozomlardaki delesyon, translokasyon ve mutasyonlar yer alırken onkogen aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin fonksiyon kayıpları önemli rol oynamaktadır.

Pestisitler, zirai mücadele ve uygulamalarında kullanılan her türlü kimyasal madde ve preparatlardır. Zararlı organizmaları engellemek, kontrol altına almak, ya da zararlarını azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin birçok alanda, yüksek miktarda kullanılması çevre kirliliğine yol açmaktadır. Yapılan bir çalışmada kullanılan 100 pestisit bileşenini kapsayan test kimyasallarının %59'unun gen mutasyonu, %83'ünün kromozomal hasar

ve %71'inin DNA hasarında etkili olduğu belirlenmiştir. Ancak %10'unun tüm testlerde negatif sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Bolognesi ve Morasso, 2000).

Mikronükleus (MN), hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. Günümüzde, hızlı endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmaktadır. Bu nedenle güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etme ve önlemler alma ihtiyacı kaçınılmaz olmaktadır. Bu nedenle, MN testi sitogenetik hasarın tespitinde, kromozom analizine göre daha kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi nedeniyle avantajlıdır. Bu yönüyle yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olmuştur.

Nükleoplazmik köprülerin (NPB) anafaz sırasında disentrik kromozomların sentromerlerinin hücrenin farklı kutuplara çekilmesi sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Ayrıca telomer uç birleşmelerinin ise NPB oluşumuna neden olduğu bilinmektedir.

NPB, kromozom yeniden düzenlenmelerini değerlendirmek için kullanılmaktadır. Nükleer tomurcuklanma (NBUD: nuclear budding), gen amplifikasyonunun bir belirticidir. Memeli hücrelerinde yapılan in vitro deneylerde amplifiye DNA'nın nükleusun periferindeki özgün alanlara yerleşmiş olduğu ve mitozun S fazında NBUDS oluşturarak mikronükleusun giderildiği gösterilmiştir.(3)

Bu çalışmada, KBB ana bilim dalında tanı ve tedavisi gerçekleşen larenks kanserli hastalardan alınan kan örneklerinde mikronükleus, NPB ve NBUDS görülme sıklığının kontrol grubu ile karşılaştırılması ve pestiside maruz kalmanın larengeal kanserleşme üzerine olan olası etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.LARENKS KANSERLERİ

2.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji

Larenks kanserleri tüm baş boyun malignitelerinin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır (4). Kadın/erkek oranı yaklaşık 1/5 oranında bildirilmektedir. Tüm kanserler arasında erkek/kadın oranı en yüksek olanıdır. Erkek ve kadın arasındaki görülme oranı, ülkelere göre 4:1 ile 30:1 arasında değişir. Son yıllarda kadınlarda görülme sıklığının artması, kadınlarda sigara kullanımının artmasına ve kadınların da erkekler kadar iş hayatında toksik maddelere maruz kalmasına bağlanmıştır (5). Görülme sıklığı 5. dekattan sonra yükselişe geçmekte, 7. ve 8. dekatlarda pik yapmaktadır. 30 yaş altında görülme sıklığı ise %1 olarak bildirilmiştir (6). Ünelere göre larenks kanseri görülme sıklığı değişmektedir. 1990'lı yılların verilerine göre en yüksek insidans yılda 17,1/10.000 ile İspanya'da saptanmış olup Fransa, İtalya, Brezilya, Uruguay 10/10.000'in üzerinde insidans ile diğer sık görülen ülkelerdir. Çin, Afrika ülkeleri, doğu Asya, Avustralya, Yeni Zelanda, Norveç ve İsveç'te insidansın 3/10.000'in altında olduğu bildirilmiştir.

Larenks kanserleri 2010 Sağlık Bakanlığı verilerine göre ülkemizde en sık görülen kanserler sıralamasında %9,7 ile 6. sırada yer almaktadır(7). Bu oran ABD'de ise yaklaşık %1'dir. Aradaki belirgin farkın ülkemizde kullanımı halen oldukça yaygın olan tütün ürünlerine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Larenks malignitelerinin % 85-90'ını skuamöz hücreli karsinom (SHK) oluşturur (8). Deriden sonra SHK'in en sık görüldüğü bölge larenkstir.

2.1.2.Etyoloji

Larenks kanseri mültifaktöriyel bir hastalıktır. Bunların en önemlileri, aşırı alkol ve sigara kullanımı ile iş ortamında çeşitli toksik maddelere maruz kalınması gibi davranışsal ve çevresel risklerdir. Düşük eğitim düzeyi, papilloma

virüs enfeksiyonu ve gastroözofagiyal reflü bazı çalışmalara göre kofaktörlerdir. Öte yandan taze sebze ve meyvedan zengin bir diyetin koruyucu etkisi olduğu öne sürülmüştür.

Sigara

Larenks ve genel olarak tüm skuamöz hücreli baş boyun kanserlerinin gelişiminde en önemli risk faktörü sigaradır. Larenks kanserli hastaların % 95'inde sigara içme öyküsü mevcuttur (9). Tütün kullananlarda larenks kanseri risk oranı % 13,2 olarak belirtilmiştir (10). Tütün, özellikle supraglottik ve glottik larenks kanserleri için bir risk faktörüdür. Sigaraya başlama yaşı ve kullanım süresi, tüketilen günlük sigara adeti ve yıllık paket sayısının kanser ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (11). Araştırmalara göre hücre içinde kritik düzeylerde kümülatif ve persistan hasar oluşuktan sonra sigarayı bırakmanın etkisi pek azdır (12). Hiç sigara ve alkol kullanmayan larenks kanserli hastalar ile bunları kullananlar karşılaştırılmış ve bu kişilerde, alkol ve sigara kullananlara göre kanserin 10 yıl daha geç ortaya çıktığı, erkek baskınlığı bulunmadığı, tümörlerin en sık glottik bölgeye yerleştiği ve erken tanı konularak daha iyi bir sağkalım süresi gösterdikleri saptanmıştır (13). Araştırmalar tütünde kansere neden olan primer maddenin nikotin olmadığını, aromatik heterosiklik radikaller ve epoksitler gibi çok sayıda başka karsinojenler olduğunu ortaya koymuştur. Bu maddeleri detoksifiye eden enzimleri kodlayan genlerin polimorfizmi, sigaranın kanser yapıcı etkisinden sorumlu tutulmaktadır (14). Menvielle'in 504 baş boyun kanserli hastada yaptığı olgu kontrollü çalışmada, sigaraya bağlı kanser riski artış oranı, çeşitli derecelerde sigara kullanımı için %3-44 arasında bildirilmiştir (15). Talamini'nin 527 hastayı kapsayan olgu kontrollü çalışmasına göre larenks kanseri görülme riski, sigara içmeyenlere oranla günde 15'ten az sigara içenlerde 9,8 kat, günde 25'ten fazla sigara içenlerde 42,9 kat fazladır. Koyu tütün ve elde sarılmış sigara kullanımı bu riskleri arttırmaktadır. Pasif içicilerin de mutlak risk altındadırlar.

Alkol

Alkol özellikle supraglottik kanserler için bir risk faktörü olup tütünde olduğu kadar kesin olmamakla birlikte doza bağlı olarak riski arttırır (11).

Menvielle baş boyun kanserleri için değişik derecelerde tüketim miktarlarına göre risk oranının 1,4-5,9 arasında değiştiiğini bildirmiştir. Kullanılan içkinin çeşidinin riski etkilemediği belirtilmiştir (15). Sigara ve alkol, kanser gelişimi açısından bağımsız risk faktörleridir. Kombine alkol ve tütün kullanımının kanser riskini belirgin ölçüde artırdığı gösterilmiştir. Hiç sigara kullanmayanlarda aşırı derecede alkol tüketimi, larenks kanseri riskini artırır. Haftada 30 'adet'ten fazla içki tüketimi halinde (1 adette 12 gr alkol olmak üzere), alkol almayanlara göre tüm baş boyun kanserlerinin riski 9 kat artmıştır. Olgu kontrollü bir çalışmada, sigara kullanmayan alkol tiryakilerinde larenks kanseri riskinin 2,46 kat, alkol hiç almayan sigara tiryakilerinde 9,38 kat fazla olduğu saptanmıştır (16). İkisini birlikte tüketenlerde ise bu risk, 26 kat artmaktadır (16).

Diyet

Yetersiz ve dengesiz beslenenlerde larenks kanseri insidansının arttığı savunulmaktadır. Sebze, meyve, bitkisel yağlar ve balıktan zengin 'Akdeniz tipi' diyetle beslenenlerde, larenks kanseri riskinin azaldığı gözlenmiştir. Bunun A, E ve C vitaminleri, beta karoten ve çokludoymamış yağların koruyucu etkisine bağlı olduğu öne sürülmüştür (17). Ayrıca artırılmış tahılların tüketimi, larenks kanseri riski ile ilişkili bulunurken, doğal haldeki tahıl ürünlerinin tüketimi ile larenks kanseri riski arasında ters orantı olduğu bildirilmiştir . Diyette lifli gıda tüketimi arttıkça, larenks kanseri riskinin azaldığı, özellikle sebze ve meyveden zengin diyetle bu azalmanın belirgin olduğu gösterilmiştir.

Selenyumun larenks kanserinde koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir. Lajtman ve ark. 43 larinks kanserli olgunun Se düzeylerini, 47 sağlıklı olgunun Se düzeyleri ile karşılaştırmış, özellikle T4 supraglottik larenks kanserli olguların Se düzeyinin sağlıklı olgulardan daha düşük olduğunu göstermişlerdir (18). Selenyumun kanser önleyici etkisi için ileri sürülen mekanizmalar; programlanmış hücre ölümüne, DNA tamirine, selenoenzimlerdeki rolüne, immün sisteme etkisine, karsinojenik mekanizmaya olan etkisine ve bazı metabolitleriyle antianjiojenik ajan olmasına bağlanmaktadır.

Çevresel Faktörler

Mesleki ve çevresel faktörler, larenks kanseri gelişiminde rol oynayabilir. Larenks kanserli olguların çoğu, polisiklik aromatik bileşiklere, çimento ve metal

tozlarına, asbest ve verniğe maruz kalarak çalışan işçilerdir. 1970'lerden beri özellikle asbestin larenks kanseri ile ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. Asbeste maruz kalma sonucu, riskin 1,8 ile 9 kat arttığını gösteren çalışmalar vardır (10). Uluslararası Kanseri Araştırma Enstitüsü tarafından, sülfirik asit buharı akciğer, larenks ve sinüsler için kanserojen madde olarak belirtilmiştir. Kerestecilik ve ahşap mobilya işiyle uğraşanlarda da riskin arttığına dair Avrupa ülkelerinde yapılmış çalışmalar vardır. Uruguay'da yapılmış olgu kontrollü çalışmada, kasaplar, fırıncılar, şarapçılar arasında, duman, silika tozu ve canlı hayvanlarla içiçe çalışan işçilerde artmış riskten söz edilmektedir. Elçi ve arkadaşları, larenks kanserini, çeşitli meslek gruplarında araştırmış; üretim denetleyicileri, tekstil, inşaat ve belediye işçileri ile şoförlerde, özellikle supraglottik tümörlerin görülme riskinin arttığını göstermişlerdir. Ayrıca silika ve pamuk tozları, diesel ve benzin egzozu ile polisiklik aromatik hidrokarbonlara uzun süre maruz kalma sonucunda, supraglottik larenks kanseri riskinin belirgin olarak arttığı saptanmıştır.

Bazı kaynaklarda pestisit kullanımı larenks kanseri risk faktörleri arasında gösterilmiş olup literatürde bununla ilgili henüz yeterli çalışma mevcut değildir.

Günümüz dünyasının en önemli sorunlarından biri de hızla artan dünya nüfusedir. Çünkü dünya nüfusu gittikçe artmasına karşın dünyanın yüzölçümü değişmemektedir. Dünya nüfusunun % 40'ı yeterli derecede beslenememekte, hatta açlığa bağlı nedenlerle her yıl 20 milyon insan ölmektedir. Dünyanın yüzölçümü sınırlı olduğundan bu ihtiyacı karşılayacak üretim için yeni alanların tarıma açılması mümkün değildir. O halde yapılacak iş, birim alandan elde edilecek ürün miktarını arttırmaktır. Bunun için de modern tekniklerin ve girdilerin kullanılması bir zorunluluktur. Pestisitler de bu girdilerin başında gelmektedir. Bugün pestisit kullanılmadan üretim yapılması halinde, ürün miktarında ortalama % 65 oranında kayıp olmaktadır. Bazı hastalık ve zararlılara karşı son yıllarda bulunan dayanıklı çeşitler yine de gerekli sonucu sağlayamamıştır. Ayrıca gübreleme, sulama, toprak işleme vb. verimi artırıcı kültürel yöntemler bazı bitkilerde hastalık ve zararlıların daha da artmasına neden olmuştur. Bu sebeplerden dolayı, pestisitler bugün bütün dünyada

kullanılmasından vazgeçilemeyecek maddeler olarak kabul edilmektedir. Pestisitlerin kullanımlarının artması çevre üzerine ve insan sağlığına zararlı etkileri de beraberinde getirmektedir. Özellikle pestisitlerin mutajenik, karsinogenik ve teratojenik etkilere sahip olduğu geçmişte yapılan çalışmalarda saptanmıştır.

Teratojenik etkiye sahip pestisitler 2,4,5-T ve 2,4-D herbisitler, organik fosforular, kaptan, folpat ve difolatan'dır. Mutajenik etkiye sahip pestisitler (diazinon, ziram v.b) kromozomal kırılmalara neden olurlar. Pestisitlerin kullanımı ile kanser insidansı arasında bir korelasyon saptanmıştır. Tarım işçilerinde kanser insidansı genellikle düşüktür. Bununla birlikte son yıllarda tarım işçilerinde spesifik kanser tiplerinin riski artmaktadır. Bu spesifik kanser tipleri lösemi, Hodkin's hastalığı, non-Hodkin's lenfoma, multiple myeloma ile dudak, mide, prostat, merkezi sinir sistemi ve meme kanserleridir.

Viral Risk Faktörleri

Herpes simplex enfeksiyonu ile larenks lökoplakileri ve kanseri arasında ilişki olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (19). Ancak larenks kanserinde Human Papilloma Virus (HPV) enfeksiyonunun rolü tam olarak bilinmemektedir (21). Araştırmacılar HPV DNA'sını baş ve boyun karsinomlarında Southern blot hibridizasyon ve polimeraz zincir reaksiyon yöntemleri ile göstermişlerdir. Larenks kanserlerinde HPV pozitifliği % 3 ile % 85 arasında değişmektedir (20). HPV'nin onkojenik potansiyelinin, viral onkoproteinler olan E6, E7 ve E5 ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. E6 proteini p53; E7 proteini retinoblastom tümör süpresör proteinlerine bağlanarak, onları inaktive eder ve apoptozu inhibe ederek hücre proliferasyonunu artırır. E5 proteininin ise özellikle EGFR ile ilişkiye geçerek hücre proliferasyonunu arttırdığından sözedilmektedir (21). Larenksin papillom ve kanserlerinde farklı HPV tiplerine rastlanır. Larenksin en sık görülen benign tümörü olan rekürren respiratuar papillamatozis, düşük riskli HPV 6 ve 11 ile ilişkilidir. Papillomlar yaklaşık % 2 olguda malign transformasyon gösterebilir. Papillomlardan gelişen larenks karsinomunda da virüsün bu tiplerine rastlanır. Larenks karsinomlarında en sık saptanan tipler ise yüksek risk grubundan olan HPV 16, 18 ve 33'tür (19). Erken evre (evre 1-2) tümörlerin, geç evre (evre 3-4) tümörlerden, glottik

tümörlerin, supraglottik tümörlerden daha yüksek oranda HPV pozitifliği gösterdiği saptanmıştır (21). Ayrıca iyi differansiye karsinomlarla, HPV DNA pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı beraberlik gösterilmiştir.

Radyasyon

İyonize radyasyon larenks kanseri için bir risk faktörü olarak öne sürülmüştür. Respiratuar papillomatozisten larenks kanseri gelişen olguların çoğunun papillomları için radyoterapi görmüş olduğu belirtilmiştir. Radyasyonun karsinojenik etkisi doz, fraksiyon ve dağılım oranına bağlıdır. Larenks kanserinde, radyoterapiden yıllar sonra oluşan tümörlerin, rekürren tümör değil radyasyona bağlı olarak oluşan ikinci primer tümörler olduğu savunulmaktadır (22).

Gastroözofageal ve Larengofarengeal Reflü

Gastroözogiyal reflü (GÖR) ve larengofarengeal reflünün (LFR) , sigara ve alkol kullanmayan hasta popülasyonunda tek başına, kullananlarda ise bu ajanların reflü yapıcı etkileri ile birlikte, larenks kanseri etyolojisinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Asite maruz kalma ile mukozalarda oluşan inflamatuvar hastalığın ardından kanser gelişimi ilk olarak 1976'da Glaz ve Kleinsasser tarafından ileri sürülmüştür. 1988'de Morrison ve Ward sigara içmeyenlerde larenks kanseri oluşumunda larengofarengeal reflünün rolünden söz etmiştir. pH monitörizasyonu ile, özofageal probda pH'nın 4'ün altına düşüşü GÖR, bunun ardından farengeal probda ölçülen reflü atağı ise LFR olarak kabul edilmektedir (23). El-Serag ve ark.'nın 8223 hospitalize edilmiş, 1912 poliklinik izlemlili larenks kanseri hastasının değerlendirildiği çalışmasında, diğer parametreler kontrol edildikten sonra GÖR'de larenks kanseri risk oranı yatan hastalar için 2,4; ayaktan tedavi olanlar için 2,31 oranında artış göstermiştir. Larenks kanserinde Barrett özofagusundakine benzer prekanseröz bir lezyon olup olmadığı bilinmemektedir (24). Çeşitli serilerde larengofarengeal reflü larenks kanserli hastalarda % 58-63 oranında bulunmuş olup, bu oran kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksektir (23).

Heredite

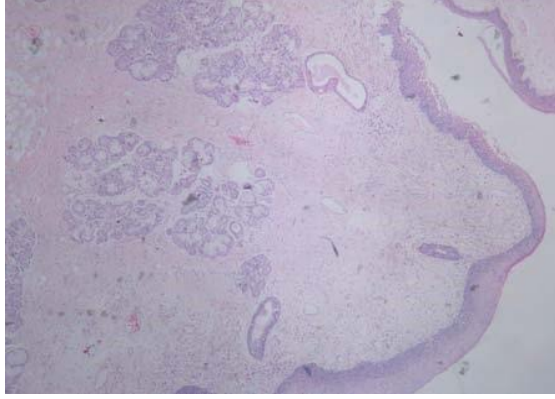
Famlyal larenks kanseri ile ilgili olgu sunumları mevcuttur. Lynch famlyal kanser sendromlu olgularda da larenks kanserleri tanımlanmıştır. Larinks kanserleri için herediter predispozisyon bu hastalarda saptanan yüksek Arilhidrokarbon hidroksilaz enzim seviyelerine bağlanmıştır. Polisiklik aromatik hidrokarbonların epoksitlere dönüşümüne neden olan bu enzim, özellikle sigara kullanımı söz konusu olduğunda kanser gelişme riskini arttırmaktadır (25). Larinks kanseri olgularının yakın aile bireylerinde %7-15 oranında yüksek enzim seviyelerine rastlanmıştır (25). Bu enzimleri kodlayan genlerin polimorfizmi ve penetransı, sigarayla ilişkili kanserlerden sorumlu tutulmuştur. Cyclin D1 gen amplifikasyonu ile glottik kanserler arasında bağıntıdan söz edilmiştir (26).

2.1.3.LARENKS KANSERLERİNİN HİSTOPATOLOJİSİ

2.1.3.1 Vokal Kord Histolojisi

Sadece vokal kord larenksin vibratuar hareketlerine katılır. Bu yapı ön kommisürden aritenoid kıkırdağın vokal proçesine kadar uzanır. Vokal kordlar aşağıdaki yapılardan meydana gelen katmanlı bir yapıdadır.

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



Şekil 1. Normal vokal kord histolojisi

Lamina proprianın derin ve orta tabakası, trianguler membranın üst serbest kenarı vokal ligamenti oluşturur. Lamina proprianın orta tabakası anteriorda ve posteriorda sırasıyla anterior makula flava ve posterior makula flavayı oluşturacak şekilde kalınlaşmıştır. Bunların vokal kordların uç bölümlerini, vibratuar hasardan koruyan yastıklar şeklinde fonksiyon gördükleri düşünülmektedir.

Mekanik olarak vokal kordlar üç tabaka olarak davranır:

- 1.Örtü: Skuamöz epitel ve lamina proprianın yüzeysel tabakası
- 2.Geçiş bölgesi: Lamina proprianın orta ve derin tabakaları
- 3.Gövde: Vokalis kası

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.

Larenks embriyolojik gelişim, fonksiyon ve lenfovasküler yapısı dikkate alınarak üç bölgeye ayrılır.

1. Supraglottik bölge
2. Glottik bölge
3. Subglottik bölge

Supraglottik bölge: Epiglotun tepesinden larengeal ventrikülün apeksine uzanır. Epiglotun larengeal yüzü, ariepiglottik foldlar, aritenoid kıkırdağın larengeal yüzü, yalancı vokal kordlar ve ventrikülleri içerir. Bilateral olarak lenfatiklerden oldukça zengindir. Glottik bölge ile arasındaki anatomik olarak gerçek sınır, vokal kordun skuamöz epiteli ile ventrikülün respiratuar mukozasıdır. Klinik olarak bunu belirlemek zordur. Pratik olarak sınır, ventrikülün apeksidir.

Glottik bölge: Ventrikül apeksi ile bu noktanın 1cm altından geçen horizontal plan arasındaki bölgedir. İki gerçek vokal kord, anterior ve posterior kommissürleri içerir. Lenfatiklerden fakir bir bölgedir.

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

Prepiglottik Bölge: Bu boşluğun sınırlarını; yukarıda vallekula mukozası ve hiyoepiglottik ligaman, altta petiolus, medialde glossoepiglottik plika ve epiglot, önde tirohyoid membran ve tiroid laminanın iç yüzü oluşturur. Yanlarda paraglottik mesafeyle ilişkilidir. Bu alandaki tümörler, supraglottik bölgeye ve paraglottik bölgeye yayılmaya meyillidir.

Paraglottik Boşluk: Yukarıda ventrikül tabanı, lateral sınırını tiroid kıkırdağın iç perikondriyum ve krikotiroid membran, altta konus elastikus, içte kuadranguler membran, ventrikül ve konus elastikus ile sınırlandırılmıştır. Konus elastikus, subglottik mesafeyle kesin bir sınır oluşturur. Paraglottik boşluk seviye olarak vokal kordların hem alt hem üst kesiminde yer aldığından tümörlerin transglottik ve ekstralaringeal yayılımlarında önemlidir. Ön üst kısmında preepiglottik boşlukla ilişkilidir.

2.1.3.2 Prekanseröz Lezyonlar

Keratozis: Basit hiperplazi, epitelyal hiperplazi, skuamöz hiperplazi, lökoplaki olarak da adlandırılır. En sık gerçek kordları ve interaritenoid bölgeyi tutar. Sigara içenlerde, şarkıcılarda ve sesini çok kullananlarda daha sık görülür. Hastalarda ses kısıklığı şikâyeti olur. Larengoskopik muayenede keratotik alanlarda beyaz renkli kalınlaşma görülür. Mikroskopik olarak keratotik lezyonlar hiperplazik epitel ve akantozla karakterizedir. Atipi görülmez. Daha ileri kalınlaşma pakiderma olarak değerlendirilir (27).

Displazi/karsinoma insitu(CIS): Farklı derecelerde hücresel atipi, normal epitelde matürasyon kaybı ve stratifikasyon kaybı ile karakterizedir. Displazi hafif, orta veya şiddetli olarak derecelendirilir. Derecelendirmede nükleer anomaliler ile birlikte maturasyon ve stratifikasyonun kaybolduğu epitel seviyesi gözönüne alınır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün tanımladığı derecelendirme sistemi aşağıdaki gibidir:

1. Hafif Displazi: Nükleer anomaliler hafif olup epitelin 1/3 bazal tabakasına sınırlıdır. Hücrelerin matürasyon ve stratifikasyon gösterdiği üst tabakalarda nükleer anomaliler minimaldir.

2. Orta Derecede Displazi: Nükleer anomaliler hafif displazidekinden daha belirgindir. Nükleoller belirginleşme eğilimindedir. Bu değişiklikler epitel tabakasının 2/3 alt bölümünde görülür. Orta derecede nükleer anomaliler yüzeye kadar çıkabilir. Ancak epitel tabakasının üst kısmında hücresel matürasyon ve stratifikasyon korunmuştur.

3. Şiddetli Displazi: Nükleer anomaliler ve matürasyon kaybı, epitel tabakasının 2/3'ünden daha fazlasını tutar. Nükleer hiperkromazi ve pleomorfizm belirgindir. Bizar nükleuslu hücreler görülebilir. Nükleoller belirginleşme eğilimindedir. Mitoz vardır ve atipik mitoz izlenebilir. Hücrelerde bir miktar matürasyon ve stratifikasyon varlığı ile karsinoma insitudan ayrılır.

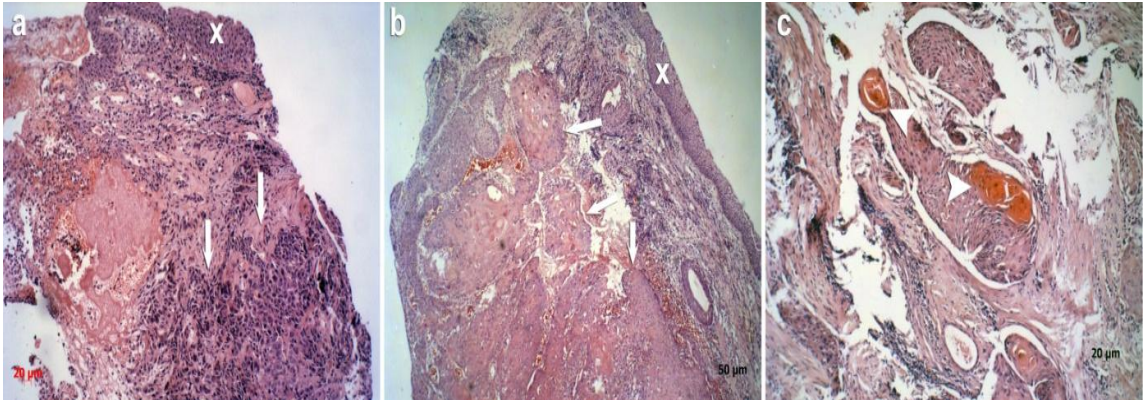
4. Karsinoma insitu (CIS): Skuamoz epitelin tam kat tutulduğu lezyonlardır. Stromaya invazyon görülmez. Bazal membran ve lamina propia

normaldir. WHO'nun yeni sınıflamasında şiddetli displazi ile CIS ayrı kategorilere alınmıştır. Ancak diğer birçok sınıflamada bu iki durum aynı gruba alınmıştır. Çünkü birbirinden ayırım oldukça zordur.

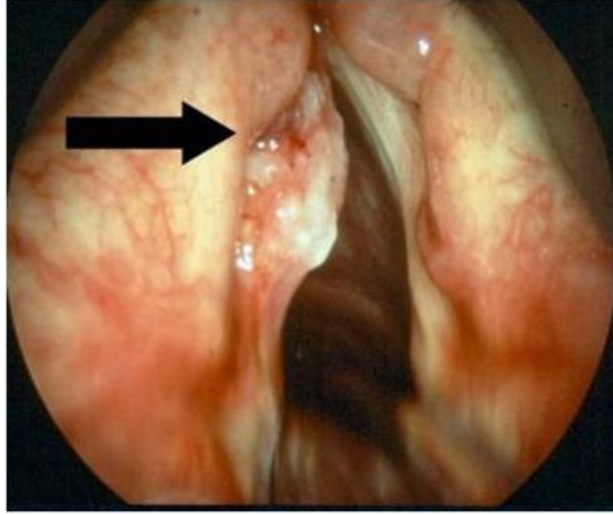
Bu sınıflamaya göre ilk iki kategori benign, üçüncüsü potansiyel malign, dördüncüsü gerçek malign olarak kabul edilmiştir (27).

2.1.3.3 İNVAZİV KARSİNOM

Klasik tip yassı epitel hücreli karsinom: Keratin oluşumu ve/veya interselüler köprülerin varlığı ile karakterize, skuamöz diferansiyon gösteren bazal membranı invaze eden bir malign epitelyal tümördür. Gradeleme; iyi, orta, ve kötü diferansiye olmak üzere üç grupta yapılır. Gradelemede hücrel pleomorfizm ve mitotik aktivite esas alınır. Larenks karsinomlarının çoğu supraglottik ve glottik yerleşimli olup, iyi veya orta derecede diferansiyedir. Subglottik bölgedeki karsinomlar ise orta veya kötü diferansiyedir (27) ,



Şekil 2: a: Az diferansiye skuamöz hücreli karsinom (x:yüzeyi döşeyen çok katlı yassı epitel, ok:tümör adaları, HEx50) b:orta diferansiye skuamöz hücreli karsinom (x:yüzeyi döşeyen çok katlı yassı epitel, ok:tümör adaları, HEx50) c:iyi diferansiye skuamöz hücreli karsinom (ok başları:infiltrasyon alanında skuamöz epiteli taklit eden keratin inciler içeren tümör adaları, Hex100)



Resim 1: Sağ vokal kordda larenks karsinomu

Mikroinvaziv yassı epitel hücreli karsinom: Bazal membranın hemen altındaki (lamina propia) alanda seyrek olarak dağılmış hücrelerden veya küçük tümör odaklarından oluşur.

Papiller tip yassı epitel hücreli karsinom: Egzofitik büyüme paterni sergileyen fokal invazyon odağı içeren, yassı epitel hücreli karsinom varyantıdır. Verrüköz karsinomdan sitolojik atipisi ile ayrılır. Sıradan epidermoid karsinom vakalarına göre belirgin derecede HPV ile birliktelik söz konusudur. Prognozu iyidir (27).

Verüköz karsinom: Polipoid görünümlü ve oldukça iyi diferansiye olup yassı epitel hücreli karsinomun nadir görülen bir varyantıdır. Yaygın lokal invazyona rağmen pratik olarak hemen hiç metastaz yapmaz. Ayırıcı tanıda esas olan invazyon varlığıdır ve bu da ancak rezeke edilen materyalin tümünün incelenmesiyle görülebilir. Mitoz nadirdir (16).

2.1.4 LARENKSİN DİĞER TÜMÖRLERİ

Küçük hücreli (nöroendokrin) karsinom: Nadir olup tüm vakaların % 0,5'inden daha azını oluşturur. 6. ve 7. dekatta ağır sigara içenlerde görülür. Küçük, yuvarlak, oval veya içsi hücrelerden oluşur. Mitoz, nekroz ve lenfovasküler invazyon sık görülür. Bölgesel ve uzak metastaz çok sık olup

agresif seyreder. Atipik karsinoid/Büyük hücreli nöroendokrin karsinomdan ayırımı mutlaka yapılmalıdır (27)

Bazaloid karsinom: Oldukça malign seyirli bir laringeal tümördür. Ağır sigara içicilerde daha sık görülür. Hiperkromatik nukleuslu, dar sitoplazmalı, periferel palizatlanma içeren, hiyalinize stromaya sahip hücrelerden oluşur. Adenoid kistik karsinomun solid varyantından ayırımı zordur (27).

Lenfoepitelyoma-benzeri karsinom İndiferansiye karsinom benzeri alanlardan oluşur. Sıklıkla servikal lenf nodu metastazı ile birlikte gider. Agresif seyir gösterir (27).

Adenokarsinom: Adenokarsinomlar çok nadir görülür. Çoğunlukla supraglottik veya subglottik bölgeye yerleşir (27).

Sarkomatoid karsinom (iğsi hücreli karsinom, karsinosarkom): Üst solunum ve gastrointestinal sisteme yüksek derecede eğilim gösteren bir tümördür. Polipoid yapılanma gösterir ve laringeal polibe benzerler. Çoğu supraglottik yerleşimlidir. Mikroskopik olarak iki komponentten oluşur. Yassı hücreli karsinom komponenti çoğu zaman belirgin değildir ve belirgin olduğu durumlarda da in situ karsinom odakları tarzında görülür. İğsi hücrelerden oluşan pleomorfik sarkom komponenti ise tümörün büyük bir kısmını oluşturur (27)

Larenksin tükrük bezi tümörleri: En sık görülen tipi adenoid kistik karsinomdur. Yavaş büyürler ancak sonuçta fataldirler. Bu kategoriye giren diğer neoplaziler, mukoepidermoid karsinom, asinik hücreli karsinom, pleomorfik adenom ve myoepitelyomadır (27).

Karsinoid tümör: Morfolojik, immünohistokimyasal ve ultrastrüktürel olarak bronşial karsinoidlere benzerlik gösterir. En sık supraglottik bölgeye özellikle de aritenoid kıkırdak ve ariepiglottik folda yerleşir. Prognozu genellikle iyidir. Lenf nodu metastazı ve uzak metastazlar yapması nedeniyle agresif seyreder (27).

Paraganglioma: Genellikle supraglottik bölgede lokalize olup aynı taraf ariepiglottik folda yayılım gösterir. Çoğu non-fonksiyonedir (27).

Larenksin Az Görülen Tümörleri: Anjiyosarkom, granüler tümör, myofibromatozis, rabdomyom, rabdomyosarkom, leiomyom, kıkırdak tümörleri, osteosarkom, liposarkom, malign fibröz histiyositom, malign melanom, lenfoid tümörler (27).

2.2.1 LARENKS KANSER TİPLERİ:

Larenks kanserleri lokalizasyonlarına göre supraglottik, glottik, subglottik ve transglottik olarak 4 grupta incelenir.

Supraglottik kanserler; epiglotun serbest kenarından ventriküle kadar olan alana lokalize tümörlerdir. Supraglottik bölgenin lenfatikten zengin olması nedeniyle lenfatik yayımları kolay olan tümörlerdir. Kolayca tiroid kıkırdağa penetre olabildiklerinden ve preepiglotik alana yayılabildiklerinden prognozu kötüdür.

Glottik kanserler; genellikle vokal kordu ve ön komisürü tutarlar. İyi diferansiye tümörler olmaları ve kordların lenfatikten fakir olması nedeniyle prognozu iyidir.

Subglottik kanserler; ön komisürde vokal kordların serbest kenarının 2-4 mm ve vokal çıkıntılarının ucundan 5-7 mm kadar aşağısından başlayarak krikoid alt kenarına uzanırlar.

Transglottik kanserler; supraglottik ya da subglottik bölgeyi tutan ve ventrikülü vertikal olarak geçen kanserlerdir. Erken dönemde paraglottik alana yayıldıklarından prognozları kötüdür (28,29)

2.3. Larenks Kanserlerinde Tanı

Larenks kanseri tanısında anamnez, fizik muayene, radyolojik inceleme ve endoskopinin yeri vardır. Hikayede ses kısıklığı, boğaz ağrısı, disfaji, odinofaji sık rastlanılan semptomlardır. Ses kısıklığı glottik kanserlerde erken belirti olmasına rağmen subglottik ve supraglottik kanserlerde geç belirtidir. Boğaz ağrısı ve disfaji supraglottik kanserlerde erken belirtidir (30). Hemoptizi ve yansıyan kulak ağrısı daha nadir rastlanılan semptomlardandır. Dispneye hava yolunu tıkayan büyük kitlelerde rastlanır. Boyun metastazları da özellikle supraglottik kanserlerde sık rastlanan bulgulardır. Larenks muayenesine indirekt

larenoskopisi ile başlanmalıdır. Lezyonun yeri, uzandığı bölgeler ve vokal kord hareketleri hakkında yeterli bilgi veren bir muayene yöntemidir. Palpasyon özellikle larenks dışına taşmış tümörlerde değerlidir. Larengeal krepitasyonun kaybı postkrikoid bölge tutulumunu akla getirmelidir. Video larenoskopik muayeneye erken larengeal kanserleri değerlendirme ve dokümantasyon şansımız artmıştır. Larenks kanserli vakalarda tümörün yayılma bölgeleri hakkında tedavi öncesi yeterli bilgiye sahip olmak gerekmektedir. Supraglottik kanserlerde, preepiglottik boşluk, paraglottik boşluk, piriform sinüs ve aritenod tutulumu tedaviyi etkileyebilir. Glottik kanserlerde ise ön kommissür, ventrikül, paraglottik boşluk ve subglottik yayılım önemlidir. Subglottik kanserlerde ise trakea, özefagus yayılımı gözden kaçırılmamalıdır (30). Bilgisayarlı tomografi tümörün hacmi, uzanımı, kıkırdak tutulumu ve muayenede görülemeyen bölgelerin durumu hakkında çok değerli bilgiler verir. Manyetik rezonans görüntüleme ise submukozal tümör uzanımını bilgisayarlı tomografiden daha iyi gösterir; ama bugün iki nedenle bilgisayarlı tomografi manyetik rezonansa görüntülemeye tercih edilmektedir. Bunun nedenleri bilgisayarlı tomografi çok daha ucuzdur ve boyun metastazlarını göstermekte ikisinin değeri aynıdır. Genel anestezi altında yapılan direkt larenoskopisi ameliyat öncesi evrelendirme için çok önemlidir. Bu sırada biyopsi de alınır. Biyopsi alınırken şüpheli lezyonların yüzeylerinden alınan biyopsilerin enflamatuvar olabileceği ve derindeki malign lezyonların gözden kaçabileceği unutulmamalıdır. Diagnostik larenoskopide ventrikül ve subglottik bölge tartışmalı iki bölgedir. Özellikle vejetan büyük tümörlerde bu bölgeler hakkında kesin tanı cerrahi eksplorasyon sonrası konur ve konservatif cerrahi kararı bu sırada verilebilir. Rutin olarak özefagus, bronşiyal sistem, trakea ikinci primer tümörler açısından gözden geçirilmelidir (30).

2.3.1. Ayırıcı Tanı

Kronik larenjit, benign tümörler, tüberküloz ve sifiliz öncelikle ayırıcı tanısı yapılması gereken hastalıklardır. Organize olmuş hematoma, kontakt ülser, amiloidozis, lenfoma gibi nadir hastalıklar larenks kanseri ile karışabilir ancak görünüşleri ve biopsi ile kolaylıkla ayırıcı tanıları yapılabilir(30).

2.4 LARENKS TÜMÖRLERİNDE EVRELEME

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

Tablo 1: Larenks ca TNM evrelemesi (AJCC,2012)

Primer tümör (T)	
Tx	Tümör değerlendirilemedi
To	Primer tümör yok (klinik, radyolojik ve patolojik tetkikler yapılmış ve tümör bulunamamış)
Tis	Karsinoma in situ
Supraglottik tümör	
T1	Tümör supraglottisin bir alt bölgesine sınırlıdır, vokal kord hareketleri normaldir
T2	Tümör supraglottisin birden fazla alt bölgesinin mukozasını veya glottisi veya supraglottis dışındaki bir bölgeyi (örneğin dil kökü mukozası, vallekula, piriform sinüs medial duvarı) tutmuştur, kord hareketleri normaldir
T3	Tümör larenks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır ve/veya post-krikoid bölge, preepiglottik dokular, paraglottik alan invazedir ve/veya minör tiroid kıkırdak invazyonu vardır.
T4a	Tümör tiroid kıkırdagı tam kat invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara taşmıştır (trakea, dilin derin ekstrinsik kasları, prelarengeal kaslar, tiroid veya özefagus gibi boyun yumusak dokuları)
T4b	Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemistir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir

Glottik Tümör	
T1	Tümör vokal kordlara sınırlıdır ve kord hareketleri normaldir T1a: Tümör tek bir vokal korddadır. T1b: Her iki vokal korda da tümör mevcuttur.
T2	Tümör supraglottis ve/veya subglottise uzanmakta ve/veya kord hareketleri kısıtlanmaktadır.
T3	Tümör larinks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır ve/veya paraglottik alan invazyonu vardır
T4a	Tümör tiroid kıkırdağı tam kat invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara taşmıştır (örneğin trakea, dilin derin ekstrinsik kasları, prelarengeal kaslar, tiroid veya özefagus gibi boyun yumusak dokuları)
T4b	Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze.

Subglottik Tümör	
T1	Tümör subglottise sınırlıdır
T2	Tümör vokal kordlara uzanmakla birlikte kord hareketleri normal veya kısıtlanmıştır.
T3	Tümör larenks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır.
T4a	Tümör tiroid kıkırdağı tam kat invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara taşmıştır (örneğin trakea, dilin derin ekstrinsik kasları, prelarengeal kaslar, tiroid veya özefagus gibi boyun yumuşak dokuları)
T4b	Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir.

Bölgesel lenf nodları (N)	
Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilememektedir
No	Bölgesel lenf nodu metastazı yoktur
N1	En büyük çapı 3 cm'yi geçmeyen tek bir ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır
N2a	En büyük çapı 3-6 cm. arasında tek ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır
N2b	Hiçbirinin çapı 6 cm.'yi geçmeyen multipl ipsilateral lenf nodlarında metastaz vardır
N2c	Hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen bilateral veya kontralateral lenf nodlarında metastaz vardır
N3	Bir lenf nodunda 6 cm'den büyük metastaz vardır

Uzak metastazlar (M)	
Mx	Uzak metastazlar değerlendirilememektedir
Mo	Uzak metastaz yoktur
M1	Uzak metastaz vardır

Evreleme	
Evre 0	Tis N0 M0
Evre 1	T1 N0 M0
Evre 2	T2 N0 M0
Evre 3	T3 N0 Mo / T1,2,3 N1 M0
Evre 4a	T4a N0 M0 / T4a N1 Mo / T1,2,3,4a N2 M0
Evre 4b	T4b Herhangi N M0 / Herhangi T N3 M0
Evre 4c	Herhangi T / Herhangi N M1

2.5 LARENKS KANSERLERİNDE YAYILIM

Larenks kanseri direkt invazyon, lenfatik, hematojen ve perinöral yollar ile yayılım gösterir. Direk invazyon bölgeleri tümörün başlangıç yerine göre değişiklikler gösterir. Suprahyoid epiglot lezyonları, epiglot serbest kenarını tutup vallekula ve dil köküne; infrahyoid epiglot lezyonları preepiglottik bölgeye; ariepiglottik plika lezyonları paraglottik boşluğa ve sinüs priformise; band ventrikül lezyonları epiglot, ön komissür, aritenoid, ariepiglottik plika ve paraglottik boşluğa yayılma eğilimi gösterirler (29).

Glottik lezyonlar ventrikül yolu ile paraglottik boşluğa, ön komissürden tiroid kıkırdağa ve subglottik bölgeye yayılabilirler (29). Konus elastikus ve quadrangular membran, tümörün yayılması için bariyer görevi görse de ileri evre tümörlerde köprü görevi görmektedirler. Tümör bir kez bu bariyerleri aştımı boyun yumuşak dokularına ve larenks içinde vertikal olarak yayılabilir. Preepiglottik bölge özellikle ileri evre supraglottik tümörlerde, paraglottik bölge ise çoğunlukla ileri evre glottik tümörlerde tutulmaktadır. Bu kompartimanlardan biri tutulduğunda tümör aşağı ve yukarı yönde serbestçe hareket edebilmekte ve sıklıkla vokal kord mobilitesini etkilemektedir.

Anterior kommissür tendonu , her iki vokal ligaman önde birleştikten sonra tiroid kıkırdağa tutunur. Bu bölgede tiroid kıkırdağın iç perikondriumu yoktur. Bu bölgeye 'Bagatelli bölgesi' denir. Bu durum anterior kommissür lezyonlarının kolayca tiroid kıkırdağa invazyon yapmasını sağlar. Anterior kommissür tendonu lateral subglottik tümörler için sınırlayıcı olmasına rağmen büyük glottik ve orta hatta yerleşmiş supraglottik tümörler için bir geçiş yoludur.

Subglottik lezyonlar krikotiroid aralık yoluyla larenks dışına taşıp tiroide yayılabilirler. Lümende trakeaya doğru gelişim gösterebilirler. Krikoid kıkırdağı invaze edebilir ve tiroaritenoid kası tutarak vokal kord fiksasyonuna sebep olabilirler (32).

2.5.1 Lenfatik Yayılım

Larenks kanserlerinde en önemli prognostik faktör boyun metastazıdır. Supraglottik kanserler yüksek oranda palpabl ve okkült metastaz yapan kanserlerdendir (34). Bu bölgenin servikal metastaz oranları T1 lezyonlarda %6-25, T2 lezyonlarda %30-70, T3 ve T4'lerde %65-80 olarak çeşitli serilerde gösterilmiştir (33) Okkült metastaz oranları %20 ile %50 arasında T evresine göre değişmektedir. En sık tutulan lenf bezi grupları level II, III ve IV seviyedeki lenf bezleridir. N0 vakalarda yapılan radikal boyun diseksiyonlarında %1-6 oranında I. ve V. bölgelerde metastaza rastlanmıştır. Bu bulgulara dayanarak N0 ve N1 supraglottik kanserlerde II. ve IV. Bölgeleri içine alacak diseksiyonlar yeterlidir. Radikal boyun diseksiyonu N2-3 ve T4 supraglottik kanserlere uygulanmalıdır (33).

Glottik bölge kanserlerinin servikal metastaz yapma riski düşüktür. T1 kanserlerde metastaz %5'den az, T2 kanserlerde %5-10, T3 kanserlerde %10-20, T4 kanserlerde %25-40 civarındadır. Yine en çok II, III ve IV. bölgelere metastaz olur. Ekstensif subglottik veya supraglottik tümör olmadıkça kontralateral ve bilateral metastazlar nadirdir.

Subglottik tümörlerde boyun metastazı %20 civarında olmasına rağmen paratrakeal, mediastinal lenf bezi metastazı olabileceği unutulmamalıdır (34).

2.5.2 Uzak Metastazlar

Larenks kanserli hastada uzak metastazın ilk semptom olması oldukça nadirdir; ama ilk muayene sırasında en sık akciğerlerde olmak üzere %1-5 uzak metastaz saptanmıştır. Larenks kanserli hastalarda yapılan otopsi çalışmalarında %44 uzak metastaz saptanmıştır (34). Uzak metastaz ile T ve N evresinin, diferansiyasyon derecesinin ilişkili olduğu gösterilmiştir. N evresinin uzak metastazla ilişkisi T evresinden fazladır. En sık uzak metastaz akciğer ve kemiklere olmaktadır (34).

2.6 LARENKS KANSERLERİNDE TEDAVİ

2.6.1 Tedavide Genel Prensipler

Larenks kanserlerinin tedavisinde, cerrahi ve radyoterapi olmak üzere geçerli iki ana tedavi yöntemi mevcuttur (35). Her tedavi yönteminin avantaj ve dezavantajları vardır. Tümörün yayılımı, yeri, evresi, boyun metastazlarının varlığı, hangi tedavi yöntemi ile en çok kür şansının tanınabileceği, larenks işlevlerinin ne kadar korunabileceği önemlidir.

Tedavi seçimini etkileyen hastayla ilgili faktörler; hastanın yaşı, iş durumu, mental durumu, genel sağlık durumu, hastanın istekleri, mesleğinde sesini kullanması, kardiopulmoner durumudur (egzersiz toleransı, solunum fonksiyon testleri). İdeal yaklaşım şekli; Kulak Burun Boğaz, Radyasyon Onkolojisi, Medikal Onkoloji, Radyoloji, Patoloji uzmanlarının katılımıyla, multidisipliner olarak her hastanın ayrı olarak değerlendirilmesi ve tedavi yönteminin belirlenmesidir

2.6.2 CERRAHİ TEDAVİ

Cerrahi tedavide primer tümörün rezeksiyonu (larenjektomiler) ile birlikte bölgesel lenf nodlarının eksizyonun (boyun diseksiyonları) yapılması esastır.

A) Primer Tümörün Rezeksiyonu (Larenjektomiler)

Genel olarak parsiyel ve total larenjektomiler olarak ikiye ayrılabilir.

1) Parsiyel larenjektomiler: Kendi içinde konservatif ve nonkonservatif tedaviler olarak ikiye ayrılabilir.

a) Konservatif parsiyel larenjektomiler: Larenksin üç ana fonksiyonun (fonasyon, solunum ve sfinkter) da korunduğu tedaviler olup bunlarda yine kendi arasında ikiye ayrılabilirler.

Endoskopik rezeksiyon: Soğuk aletlerle ve CO2 laser kullanımı ile yapılmaktadır. Erken evre glottik ve supraglottik kanserlerde etkin bir rezeksiyon sağlamaktadır (36).

Açık teknikler: Vertikal, horizontal veya her iki planda da rezeksiyon olanağı veren teknikler olup laringofissür kordektomi, vertikal hemilarenjektomi, frontolateral hemilarenjektomi, frontal anterior hemilarenjektomi, 3/4 larenjektomi, horizontal glottektomi, supraglottik larenjektomi, suprakrikoid larenjektomi bu grup içinde değerlendirilmektedir (37).

b) Non konservatif parsiyel larenjektomi: Larenksin fonasyon ve sfinkter

fonksiyonlarının korunduğu ancak ağız solunumunun korunamaması nedeniyle hastada kalıcı trakeostomi bırakılan near total larenjektomi bu bölümde yer alır(37).

2) Total larenjektomi: Tüm larenksin, hiyoid kemiğin, üst trakeal halkaların ve sıklıkla prelarengeal adelelerin de rezekedildiği ve kalıcı trakeostomiye de içeren cerrahi tedavi yöntemidir. İleri evre larenks kanserlerinde öngörülen tedavi yöntemi total larenjektomidir (37).

B) Larenks kanserlerinde bölgesel lenf nodlarının eksizyonu (Boyun disseksiyonları)

Larenks kanserlerinde N(+) olgularda terapotik, N(-) olgularda profilaktik amaçlı olarak boyun disseksiyonları uygulanmaktadır. Yapılış şekline göre boyun disseksiyonları kapsamlı ve seçici olabilir (37). Larenks kanserinde boyun metastazının evresine göre boyun disseksiyonları uygulanabilir .

T1,T2 Erken evre glottik kanserlerde boyun metastazı insidansı son derece düşüktür ve elektif boyun disseksiyonun yeri yoktur. Erken evre supraglottik larenks kanserlerinde patolojik lenf nodu negatif olsa bile, yüksek oranda ve çift taraflı boyun metastazı yapma potansiyeline sahiptir. Dolayısıyla tedavi planı her iki boynu da içermelidir. Çift taraflı boyun disseksiyonuyla (genellikle selektif yeterlidir) birlikte uygulanan parsiyel larenjektomiler hastalığın patolojik olarak kesin evrelemesini ve gerekirse ek tedavi planlarının yapılabilmesini sağlar.

T3,T4 İleri evre glottik kanserler bölgesel metastaz yapma potansiyeline sahiptir. Boyun N(-) lerde tümörün evresine göre ipsilateral veya çift taraflı

boyun diseksiyonu uygulanır. N (+) lerde N1 ise selektif boyun diseksiyonu, N2 veya N3 ise modifiye radikal veya radikal boyun diseksiyonu yapılır.

İleri evre supraglottik kanserlerde çift taraflı boyun metastazı riski yüksek olduğundan boyun diseksiyonları evreye bakılmaksızın çift taraflı yapılmalıdır. Palpable lenf nodu olmadığı sürece ipsilateral selektif boyun diseksiyonu yeterlidir. Palpable lenf nodu mevcutsa modifiye radikal veya radikal boyun diseksiyonu yapılmalıdır.

2.6.3 RADYOTERAPİ (RT)

Tümörün yayılım bölgeleri, hastanın tıbbi durumu, hasta ve yakınlarının seçimi ile tedaviyi yapacak merkezin deneyimleri ve olanaklarına göre larenks kanserlerinde radyoterapi, primer tedavi şekli olarak ya da kemoterapi ve/veya cerrahi tedavi ile birlikte kombine olarak kullanılmaktadır. Erken evre supraglottik ve glottik kanserlerde konservatif parsiyel larenjektomi ile radyoterapinin eşit sağkalım sağladığı yönünde birçok çalışma vardır. Rezektabl lokal ileri evre tümörlerde klasik yaklaşım postoperatif radyoterapi iken son yıllarda organ koruyucu kemoradyoterapi protokolleri de artan sıklıkta kullanılmaya başlanmıştır. Bu protokollerin başarısızlığında ise kurtarma cerrahisi yapılmaktadır. Subglottik kanserlerde ise genel olarak kombine (cerrahi + radyoterapi) tedavi önerilmektedir (38).

2.6.4 KEMOTERAPİ (KT)

Larenks kanserlerinde kemoterapi bugün için tek başına küratif değildir. Uzak metastazlı olgularda tek seçenek olarak kalabilir. En sık kullanılan kombinasyon Cisplatin+5-Fluorouracil'dir. Organ koruyucu protokoller ile gündeme gelen neoadjuvan kemoterapi ile primer tümörün önemli oranlarda küçüldüğü tespit edilmekle beraber, bu uygulamanın sağkalıma ek bir katkısı henüz gösterilememiştir (38).

2.7 LARENKS KANSERLERİNDE PROGNOZ, PROGNOSTİK ve PREDİKTİF FAKTÖRLER

2.7.1 PROGNOZ

Larenks karsinomlarında beş yıllık yaşam oranı uygulanan tedavi yöntemine göre değişmektedir. Erken evre T1 glottik tümörlerde 5 yıllık yaşam oranı %88 iken T2'de %75-100 arasında değişmektedir (39). Erken evre supraglottik tümörlerde beş yıllık yaşam oranı %84-89 arasında değişmektedir (40). İleri evre (T3-T4) glottik tümörlerde 5 yıllık yaşam oranı %72-81 arasında değişmektedir (41). İleri evre supraglottik tümörlerde beş yıllık yaşam oranı %64-74 arasında değişmektedir (39). Subglottik kanserlerde ise beş yıllık yaşam oranı %42-70 arasında değişmektedir (42).

2.7.2 PROGNOSTİK VE PREDİKTİF FAKTÖRLER

Baş boyun kanserlerin önemli prognostik faktörleri mevcuttur. Bunlar; tümörün tipi, diferansiyasyonu, invazyon paterni, dokunun tümöre karşı enflamatuvar cevabı, perinöral invazyonu, kan ve lenf damarı invazyonu, tümörün lokalizasyonu, boyutu ve kalınlığı, kemik ve kıkırdak invazyonu, rezeksiyon sınırların durumu, lenf nodülü metastazı ve uzak metastazlardır.

Tüm kanserlerde olduğu gibi baş boyun kanserlerde de önemli prediktif faktörler mevcuttur. Bu prediktif faktörler tedavi öncesinde hastalığın evrimini, daha erken evrelerde tanısının bulunmasına yardımcı olur. Tedavi protokolünün bu faktörlere göre uygulanmasıyla hastanın tedavi sonucunu ve sağkalımı için daha iyi sonuçlar verecektir. Mevcut onkolojik ve biyogenetik çalışmalar sonucunda prediktif faktörler şöyle sıralanabilir.

Tümör ile ilgili faktörler: TNM evresi ve tümörün uzanımı

Histopatolojik faktörler: Hücresel diferansiyasyon, mitotik aktivite, vasküler invazyon, kapsüler invazyon, peritümöral infiltrasyon, servikal lenf nodu metastazı.

Biyolojik faktörler: P53 modifikasyonları, KI-67 nükleer antijeni, Bcl-2 protoonkogeni, EGFR ve VEGF gibi büyüme faktörler...vb.

2.8 LARENKS KANSERİNİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Kanser; kendini göstermesi, gelişimi ve sonuçları açısından bir hastadan diğerine çok değişken olan karmaşık bir hastalıktır. Aynı heterojenlik ve çeşitlilik hücresel ve moleküler düzeyde de kendini gösterir. Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve nihai olarak da uzaktaki dokuları da istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri çok basamaklı bir süreçtir. Bu değişiklikler hücre çoğalmasını ve ömrünü, komşu hücrelerle ilişkileri ve immün sistemden kaçma kapasitesini kontrol eden genetik programlardaki modifikasyonların birikmesiyle ortaya çıkar. Bu süreç, regülasyonu bozulmuş normal hücre büyümesini ve davranışını denetleyen kurallara uymadıkları için "asi" olarak nitelendirilebilecek hücrelerden oluşan bir kitlenin oluşumuna yol açar. Böylesi bir kitle uzun bir süre asemptomatik kalabilir. Bununla birlikte sonunda büyüyerek fizyolojik işlevleri altüst edecek, kitlenin yerine ve büyüklüğüne bağlı olarak çok sayıda semptom ve kanser hücrelerinin organizma içinde yayılmasına yol açacaktır (43,44).

2.8.1 NORMAL ve KANSERLİ HÜCRE BİYOLOJİSİ

A. Normal hücre çoğalmasının bazı özellikleri

Normal dokularda çoğalan hücre sayısı organizmanın ihtiyaçlarının bir fonksiyonudur. Azalmış hücre çoğalması veya artmış ölüm hızı herhangi bir aşırı artışı önler.

1. Hücre siklusu Hücrenin kendine benzer iki hücreye çoğalması (replikasyonu) dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan bir seri fazlardan geçer ve hem dış hem de iç büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bazı onkogenler ve hücre siklusuna özgü proteinler hücre siklusu boyunca senkronize bir şekilde aktifleştirilir ve ardından inaktifleştirilirler (43).



Şekil 3 Hücre siklusu

- a. G0 fazında (istirahat fazı)**, hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek üzere programlanırlar.
- b. G1 fazında (ara faz, interfaz)**, spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve RNA sentezlenir. Geç G1 fazında bol miktarda RNA sentezlenir. Ayrıca DNA sentezi için gereken birçok enzim üretilir.
- c. S fazında (DNA sentezi fazı)** hücre içindeki DNA'nın miktarı ikiye katlanır.
- d. G2 fazında** DNA sentezi durur, protein ve RNA sentezi devam eder, mitotik "spindle"ların mikrotübüler prekürsörleri üretilir.
- e. M fazında (mitozis)** protein ve RNA sentez hızı aniden yavaşlar, genetik materyal oluşan iki yeni hücreye dağılır. Mitozisi takiben oluşan yeni hücreler ya G0 ya da G1 fazına girerler.

2. Siklinler: Bunlar hücre siklusunun çeşitli fazlarını aktive eden spesifik proteinlerdir. Bölünme yeteneğine sahip çoğu normal hücre büyüme faktörleri,

bazı hormonlar ve hücre yüzey reseptörlerini etkileyen antijen-histokompatibilite kompleksleri gibi dış uyarılara karşı yanıt olarak bölünür. Bu hücre yüzey reseptörleri alınan sinyali iletir ve hücre bölünür. Tirozin kinazlar hücre dışı büyüme faktörlerinden nukleusa kadar olan bir kaskad (arka arkaya gelen bir dizi süreç) şeklinde ilerleyen proliferatif sinyal sürecinin çok önemli bir parçasıdır. Siklinler; kendilerine spesifik olan ve siklin-bağımlı kinazlar olarak adlandırılan tirozin kinazlarla kombine olurlar, onları aktiveleştirirler ve etkilerini düzenlerler. Hücre siklusunda çeşitli fazlarda çeşitli siklinler sentezlenir ve düzeyleri senkronize bir şekilde siklusun çeşitli fazları boyunca azalır ya da artar (43-45).

3. Hücre siklusunu kontrol noktaları (“checkpoints”): Çoğalma kapasitesine sahip hücreler siklusun belirli noktalarında dururlar. Bunların en önemlileri, ilki DNA sentezinden hemen önce ve ikincisi mitozisden hemen öncedir. Bu histolojik olarak dinlenme periodları olasılıkla siklin bağımlı kinazların ve tümör supressor proteinlerin aktivitelerinin azalmasıyla gerçekleşir. Gerçekte bu fazdaki hücreler hücre siklusunun bir sonraki fazına girecek proteinleri sentezlediklerinden biyokimyasal olarak aktiftirler. Bu geçiş (kontrol) noktalarında varsa genetik defektler düzeltilir. Sonuç olarak hücre siklusunu boyunca ilerlerken iki kontrol noktasında durur ve kontrol edilmiş olur (43).

a. Normal hücreler DNA diziminde oluşan hataları saptayan mekanizmalara sahiptirler. DNA hasarlandığı zaman bir grup tamir mekanizması hasarlı nükleotidleri normal moleküllerle değiştirir. Bu mekanizmalar oluşan iki yeni hücredeki genetik materyalin ana hücredeki materyalle kesinlikle aynı olmasını sağlarlar (44-46).

b. İlk kontrol noktası Geç G1 fazında, S fazına girmeden hemen önce gelir. DNA sentezi için uygun ekstrasellüler sinyaller ve tüm mekanizma işler durumda olsa bile hücrenin G1 fazını terketmeden önce DNA'nın doğru (hasarsız) bir durumda olması gerekir. Eğer herhangi bir lezyon saptanırsa hücreler ya hasarı onarır ya da apoptozise giderek ölürler(43).

c. İkinci kontrol noktası Hücreler M (mitozis) fazına girmeden hemen önce gelir. Hücre siklusunu inhibitörleri; hücreyi yeni oluşacak hücrelerin doğru genetik kopyaya sahip olacaklarından emin oluncaya kadar durdurur. DNA replikasyonu tamamıyla ve doğru şekilde tamamlanamamışsa veya beraberindeki tüm

proteinler, iplikçik materyalleri ve mitozisin tamamlanması için gerekli diğer tüm maddeler eksiksiz olarak tamamlanmamışsa hücre bu kontrol noktasında herşey başarıyla düzenleninceye kadar durur ve ardından M fazına girer (43).

4. Normal hücre popülasyonunun küçük bir miktarı ölümsüz (sınırsız sayıda çoğalabilen, “immortal”) hücrelerdir. Bu hücreler organizmanın diğer kısımlarından gelen sinyallerin etkisiyle kendilerini yenileme ve ayrıca olgunlaşan ve organizmanın gerekli fonksiyonlarını görmek üzere diferansiye olabilen yeni hücreler oluşturma yeteneğine sahiptirler. Sadece birkaç doku tipi diferansiye olabilmesine rağmen, çoğu hücre tipi diferansiye olurken yaşamsal özelliklerini kaybederler, yaşlanıp istirahat fazına girerler ve sonunda ölürlər. Ökaryotlarda aşağıdaki gibi 4 hücre popülasyonu bulunur (43).

a. Germ hücreleri. Sınırsız sayıda çoğalabilme yetenekleri vardır. Bunun nedeni olasılıkla mayozisle bölünmeleridir. Kanser hücrelerinin aksine bu hücreler ölümsüz hücre dizisi oluşturmak üzere mayoz bölünmeye girmelidirler.

b. Stem (kök) hücreleri. İki işlevleri vardır. Birincisi, tekrar oluşmak (çoğalmak). İkincisi ise diferansiye olmak ve böylece organizma için gerekli özgün işlevleri yerine getirmek. Kanser hücrelerinin aksine, bu hücrelerin tekrar oluşmak üzere girdikleri siklus sayısı sınırlıdır.

c. Kısmen diferansiye olmuş hücreler. Bunlar da sınırlı sayıda çoğalma kapasitesine sahiptir ve kendilerinden oluşan yeni hücreler sonunda tam diferansiye ve çoğalma yeteneği olmayan hücreler haline gelirler.

d. Terminal diferansiye (permanant) hücreler. Bu hücreler postnatal yaşamda proliferasyon göstermezler.

5. Diferansiyasyon immortalite (ölümsüzleşme) ile ters ilişkilidir. İmmortal kanser hücresi dizilerinin aksine, diferansiye olmuş normal hücreler, hücrelerin ne sayıda bölündüğünü sayan biyolojik bir saate sahiptir. Belli bir sayıya ulaşıldığında hücre artık daha fazla bölünemez(43).

2.8.2 KANSER HÜCRELERİNİN BAZI EŞSİZ ÖZELLİKLERİ

1. Klonal orijin: Çoğu kanser hücresi tek bir anormal hücreden doğar. Bazı kanserler birden fazla sayıda malign klonlardan doğar. Bu klonlar ya bir saha hasarı “field defect” sonucu (dokunun birden fazla sayıda hücresi karsinogene maruz kalmasıyla) ya da bazı genlerdeki kalıtsal defektler sonucu oluşurlar (43).

2. İmmortalite: Çoğu normal hücrenin bölünme sayısı sınırlıdır. Kanser hücreleri ise sınırsız sayıda bölünürler (çoğalırlar) ve bitmez tükenmez miktarda hücre oluştururlar. İmmortalitenin mekanizmalarından biri kromozom uçları olan telomerlerdir. Hücre diferansiye olurken çoğu normal hücre tipinde telomerler gittikçe kısalır. Fakat kanser hücrelerinde ve stem hücrelerde telomerler telomeraz enziminin etkisiyle yenilenirler. Bu enzim normal olarak hücreler diferansiye olurken bir taraftan programlı bir şekilde gittikçe azalır. Tamamıyla diferansiye olmuş bir hücre istirahat durumuna girer ve sonunda çoğalma kapasitesini yitirdiğinden ölür. Oysa birçok kanser tipinde telomeraz etkinliğini sürdürür veya aktive edilir. Sonuçta telomerlerin uzunluğu sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda çoğalır (immortal kalır) (43).

3. Genetik instabilite. Bu durum DNA tamirindeki ve DNA yanlış eşleşmelerini (mismatche) tanımadaki defektlerden dolayıdır ve kanser hücrelerinin heterojen olmasına yol açar. Kanser hücreleri proliferasyon kontrol mekanizmalarına gittikçe daha az yanıt veren klonlar oluştururlar. Bu klonların ayrıca yabancı ortamlarda yaşama yeteneği de gittikçe artar ve böylece metastaz yaparlar (43).

4. Kontakt inhibisyonun ve büyüme özelliklerinin kaybı. Kültür ortamında büyüyen normal hücreler; hücrelerin normalde yapıştığı substratuma yapışamazlarsa bölünemezler. Normal hücreler çoğalıp üzerinde büyüdükleri tüm yüzeyi tek tabaka halinde doldurduklarında da bölünme özelliklerini kaybederler. Hatta besiyerleri bölünmeleri için gerekli tüm büyüme faktörleri ve diğer besin elemanlarını ihtiva etse bile bölünmezler. Kanser hücreleri ise, yarıkatı bir besiyerinde substratuma yapışmaya gereksinim duymadan bağımsız

olarak bölünmeye (büyümeye) devam edebilirler. Hatta hücre kültürlerinde birden fazla tabaka oluşsa bile büyüme devam edebilirler (43).

5. Proliferasyonun büyüme faktörlerinden ve nütrientlerden bağımsız olarak devamlı artışı. Bu durum kültür ortamındaki kanser hücrelerinin bir özelliğidir. Kanser hücreleri beslenmeleri için gerekli besin faktörlerini tüketmelerine rağmen büyüme devam ettiklerinden aslında kendi kendilerini öldürmektedirler.

6. Metastaz Benign tümörlerde veya normal hücrelerde bulunmayan bir özelliktir. Metastaz; ekstrasellüler matrikse yapışmaktan sorumlu hücrel proteinlerin kaybı anormalliklerinden, hücreler arası interaksiyonun bozukluğundan ,hücrelerin bazal membrana tutunmalarındaki anormalliklerden, bazal membranın üretimindeki anormalliklerden, metaloproteaz gibi bazı enzimlerle (kollejenazlar) bazal membranın yıkılmasından dolayı gerçekleşir (43).

2.8.3 KANSER HÜCRESİ AŞIRI ÜRETİMİNİN NEDENLERİ

A.ANORMAL HÜCRELERİN APOPTOSİZE GİDEMEMESİ

Apoptozis, programlı hücre ölümü demektir.

1. Apoptozis anormal DNA'lı hücreleri yok eder. Anormal DNA'lı hücreler ya tamiri olanaksız DNA hasarı oluşmuş ya da yanlış, eksik veya gereksiz olarak fazla transkrip olmuş DNA'dan oluşur. Buradaki apoptozis, belli bir tür için gerekli kromozom sayısının uygun miktarda devam ettirilmesinde ve anoploidinin önlenmesinde ana mekanizmadır. Böylece DNA'sını sadece doğru bir şekilde ve tam olarak replike etmiş hücrelerin mitozise girmesi sağlanır (43-47).

2. Apoptozis normal doku kaybından sorumludur. Apoptozis yaşanmış ve yararsız hale gelen normal hücrelerin ortamdaki eliminasyonlarını sağlar. Apoptozis organizmanın kendi dokularını tanıyan T hücrelerinin eliminasyonunda da rol alır. Böylece bu hücrelerin organizmaya karşı immün atağı önlenir (43).

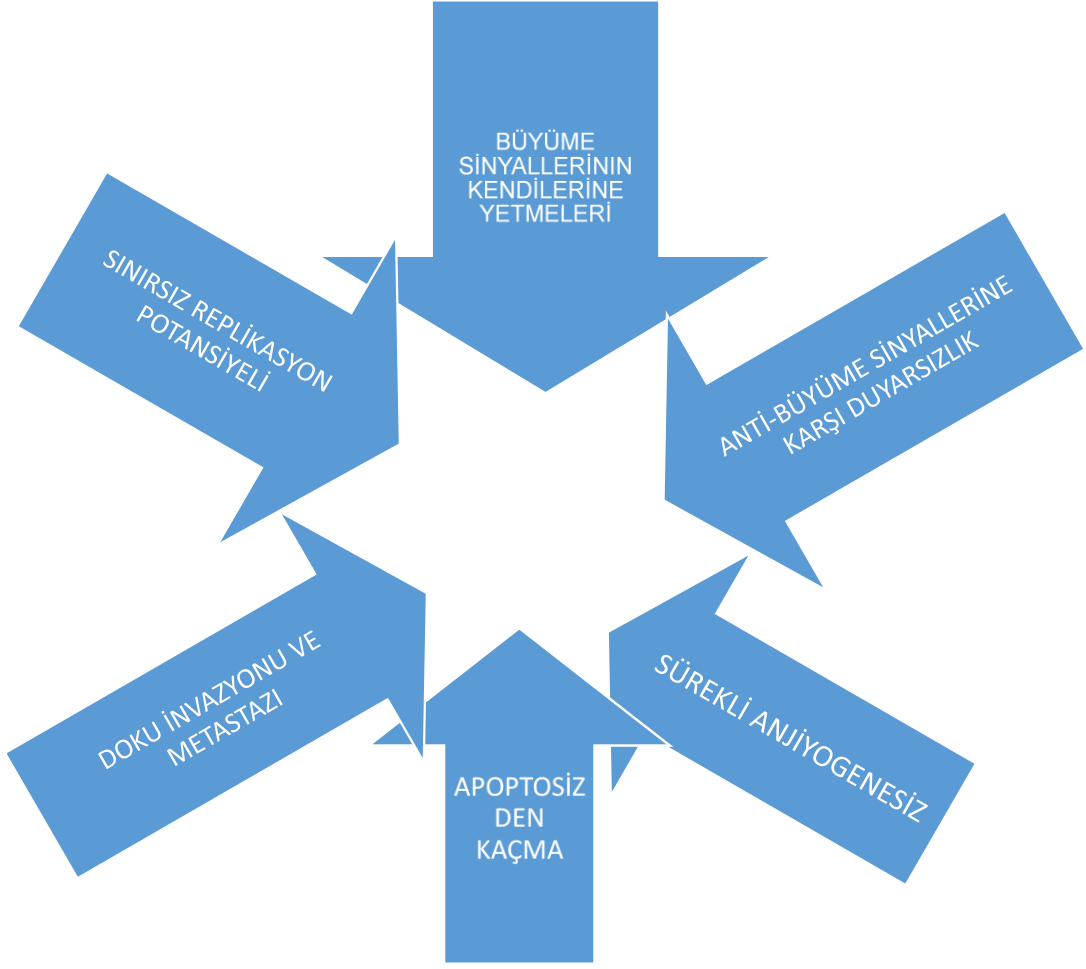
3. Apoptotik hücreler mikroskopik olarak tanınabilir. Bu hücrelerde intrasellüler organeller biraraya toplanırlar. Nukleus yoğunlaşır (kondens hale gelir) ve fragmanlara ayrılır. Hücreler apoptotik cisimciklere ayrıldığında, bu cisimcikler fagositozla komşu hücreler ya da makrofajlar tarafından alınırlar. Nekrozisin tersine, apoptozis inflamatuvar reaksiyona yol açmaz. Apoptozisde evrim sürecinde korunan bazı spesifik proteinlerin sentezi gerçekleşir (43,47).

Kanser hücrelerinde apoptozis mekanizması bozuk olduğundan anormal kanser hücreleri çoğalmaya devam edecektir.

B. Hücre proliferasyonunu anormal şekilde uyaran genetik bozukluklar

Genetik değişiklikler kanserin kösetaşlarıdır. İnsan genomunun bütününün diziliminin belirlenmesi, kanserlerdeki genetik değişimlerin şimdiye dek görülmemiş ayrıntılarla tanımlanabilmesini mümkün kılmıştır. İnsan kanserlerinde 300 kadar farklı genin aynı sıklıkla mutasyon geçirdiği gösterilmiştir. Bu katalog içerisinde 20-30 kadar gen hemen hemen tüm kanser çeşitlerinde sık sık mutasyona uğrar görünmektedir. Bu genler, hücre bölünmesinin kontrolü için gerekli çok temel işlevleri kontrol eden “ana genler” olarak görülebilir. Bu genler sayesinde kanser hücreleri eşsiz büyümelerine devam etmektedirler.

Birçok kanserde hücreler normal hücrelere kıyasla çok daha yüksek bir oranda mutasyon biriktirirler, bu özelliğe “Mutasyoncu Fenotip” adı verilir. Dönüşüme uğramış bu özelliğinin kanser gelişiminin yanı sıra kanser tedavilerine karşı direncin gelişmesinde önemli olduğu düşünülmektedir (47).



Şekil 4. Kanser hücrelerinin oluşumunu sağlayan faktörler

2.9 BİYOMARKERLAR (Tümör Belirteçleri)

Kanser gelişimi sırasında hem hücre morfoloji hem de moleküler imzalar değişir. Bu değişiklikleri biyomarkerlerin yardımıyla hassas olarak fark edilebilir, tekil kanserler erken yakalanabilir ve iyileştirilebilir. Biyomarkerler, karsinogenezis sürecinin bir tümör oluşumuna giden yolda ne kadar yol aldığını gösteren kilometre taşlarıdır. Biyomarkerler, gelecekte tıbbın bireyler için kişiselleştirilmesinin başlıca aracıdır ve hedefe özgü molekülleri temel alacaktır.

2.9.1 Biyomarker (Biyobelirteç) Arayışı

Genlerin ve proteinlerin keşfedilmesini hızlandırmak için yüksek hacimli teknolojilerin geliştirilmesinde çok büyük bir ilerleme kaydedilmiştir. Fakat sorun hastalığın daha erken bir göstergesi olabilecek ve kestirim kapasitesi mevcut klinik yöntemlere göre daha güvenilir ve kesin olan biyomarkerlerin tanımlanmasıdır. Bileşenlerin görülmemiş bir hızla envanterlerinin çıkarılması için araçları sağlayan teknolojiler, serumdaki farklı tip proteinler konusundaki bilgileri artırmış ve kansere tanı konmasına yönelik yeni teknolojilerin yolunu açmıştır.

Kanser belirteç testleri bağlamında bir biyomarkerın duyarlılığı, biyomarker için pozitif çıkan vaka öznelerinin (hastalığı teyit edilmiş olan bireyler) oranına atıfta bulunmaktadır. Seçicilik (özgüllük) biyomarker için negatif çıkan kontrol öznelerinin (hasta olmayan bireyler) oranına atıfta bulunmaktadır. İdeal bir biyomarker testinin duyarlılığı ve seçiciliği %100 olacaktır. Yani; kanserli olan her bireyin testi pozitif, kanser olmayan her bireyin testi negatif olacaktır. Duyarlılık ne kadar düşükse, kanserli bireylerin saptanamama sıklığı o kadar fazla olur. Seçicilik ne kadar düşükse kanser olmayan bireylerin testinin pozitif çıkması sıklığı o kadar fazla olur. Mevcut biyomarkerlerin hiçbiri %100 seçiciliğe ve duyarlılığa erişememiştir. Örneğin prostat kanserinin tanımlanmasında en iyi serum biyomarkeri olan prostata özgü antijenin (PSA) duyarlılığı yüksek (%90'dan fazla) fakat seçiciliği düşüktür (yaklaşık %25); bu da saptanabilir bir prostat kanseri olmayan erkeklere biyopsi yapılması sonucunu vermektedir (48-49). Meme kanserine yönelik serum tümör biyomarkeri CA 15.3'ün duyarlılığı sadece %23 ve seçiciliği %69'dur ve sadece ileri meme kanseri ya da tekrarlamasına yönelik terapilerin izlenmesinde yararlıdır (50).

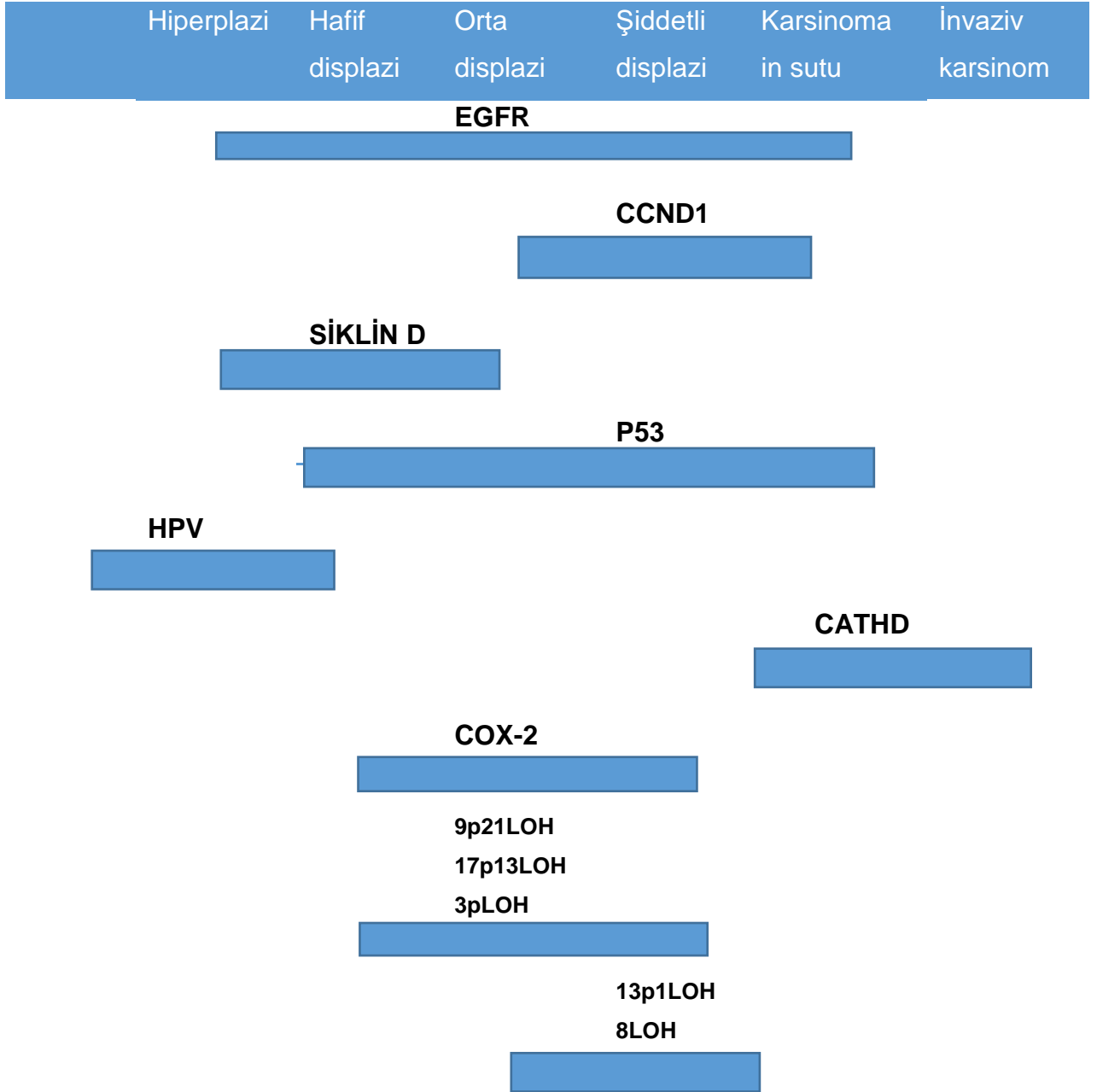
Herhangi bir kanser türü için aday biyomarkerler bir kez tanımlandıktan sonra erken yakalama, tanı ya da prognoz gibi hedeflenen klinik amaca ulaşabileceğini doğrulamak için numune referans kümelerine tabi tutulur. Hedeflenen amaç için önceden belirlenen kriterler karşılanıyorsa, markerlar bir sonraki aşamaya geçerler ve seçiciliğini yükseltmeye yönelik çalışmalar yapılır.

2.9.2 Gelecekteki Yönelimler

Tek bir biyomarkerin erken yakalamada yararlı olabilecek kadar duyarlılığı ve seçiciliği olmayabileceği için, muhtemelen tek bir tanısal markerden daha iyi sonuç verecek şekilde markerlerin çoğullanmasına ilgi duyulmaktadır (yani eş zamanlı kullanılmak üzere bir markerler paneli oluşturulması). Bazı biyomarkerlerin tek bir platformda analizine olanak sağlayan esnek teknoloji platformları geliştirmektedir. Bu çoğul platformlar bir protein ya da nükleik asit biyomarkerleri panelini eşzamanlı olarak analiz etmek üzere tasarlanmaktadır. Bu çoğullama yaklaşımı numunelerin zaman alan elle işlenmesi sorununu ortadan kaldırmakta, analizlerin daha hızlı daha verimli ve daha kolay yapılmasını sağlamakta ve gerçek zamanlı veri eldesine ve etkili numune karşılaştırmasına olanak sağlamaktadır.

Sürekli bir dikkat, destek, disiplinli, çok kuruluşlu işbirliği ile kanseri erken yakalamada doğru ve yararlı olacak biyomarkerlerin bulunacaktır ve böylece kanser riski azaltılacaktır. Uzun zamandır beklenen, yeni, daha az invaziv olan araçlar klinik kullanıma sokulacaktır.

Baş boyun kanserlerinde ve özellikle larenks kanserlerinde geçmişten günümüze onkolojik ve biyogenetik çalışmalar sonucunda birçok biyomarker bulunmuştur. Bunlardan bazıları normal mukozadan invaziv karsinom aşamasına kadar hangi aşamada daha etkili olduğu saptanmıştır. (Şekil 5)



Şekil 5. Larenks kanserlerinde çalışılmış bazı biyomarkerlar

2.10 KANSERDE YER ALAN GENLERİN GRUPLANDIRILMASI

Kanserde yer alan genler Onkogenler, tümör süpresör genler ve diğerleri. olmak üzere üç temel alt gruba ayrılmaktadır.

2.10.1 ONKOGENLER

Onkogen; fonksiyon veya ekspresyon değişimiyle hücre bölünmesi ve proliferasyonun anormal stimülasyonuna yol açan bir mutant bir gen dir. Aktive edici mutasyon; onkogenin kendisinde, onun regülatuar elementlerinde ya da onkogen ürünün regüle edilemeyen fonksiyonuna veya artmış ekspresyonuna neden olan onkogenin genomik kopya sayısındadır. Onkogenler hücre sel seviyede dominant etkiye sahiptirler; yani aktive edildiklerinde veya ekspresyonları artığında tek bir mutant alel bir hücreyi normalden malign fenotipe dönüştürmeye yetebilir (Tablo 2) (51).

Tablo 2. Bazı Onkogenler

ONKOGEN	KODLADIĞI FAKTÖR	İLGİLİ DOKU
PDGF	Plateletten türemiş büyüme faktörü	Gliom
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü	Glioblastoma ve meme
ERBB2	Bir büyüme faktörü	Meme, tükrük bezi, over
RET	Bir büyüme faktörü	Tiroid kanseri
KRAS	Bir büyüme ve çoğalma faktörü	Akciğer, over, kolon, pankreas
NRAS	Bir büyüme ve çoğalma faktörü	Lösemiler
MYC1	Transkripsiyon faktörü	Lösemiler, meme, mide, akciğer
NMYC	Transkripsiyon faktörü	Nöroblastoma, glioblastoma
LMYC	Transkripsiyon faktörü	Akciğer
BCL2	Apoptosizi bloke eden faktör	Foliküler B hücresi lenfoma
PRAD1	Siklin D1	Meme, kafa ve boyun kanserleri
CTNB1	Beta-katenin	Karaciğer
MDM2	p53 proteinin antagonistini	Sarkoma

2.10.2 TÜMÖR SÜPRESÖR GENLER

Tümör supresör genler hücre çoğalmasını engelleyecek ürünler üretirler. Tümör supresör genlerin fonksiyonu hücre büyümesini düzenlemektir. Tümör oluşmasını engellemek değildir. Bu genlerin kaybı birçok insan tümörlerinde anahtar rolü oynadığı için ilk bulduklarında bu genlere tümör supresör genler ya da antionkogen denilmiştir. İlk çalışılan tümör supresör geni retinoblastomadır. Bu alışmalar sonucunda retinoblastomaların % 60'ının sporadik, % 40'ının ise kalıtımsal olduğu ortaya çıkmıştır. Kalıtımsal ve sporadik olarak iki değişik şekilde ortaya çıkışı açıklamak için iki-vuruş (two-hit) hipotezi ortaya atılmıştır. Buna göre kalıtımsal retinoblastomada; bir genetik değişiklik kalıtımsal olarak anne-babadan birinden alınır ki bu ilk-vuruşdur (first-hit). İkinci mutasyon sporadik olarak ortaya çıkar, bu da ikinci vuruşdur (second-hit). Sporadik retinoblastomada ise iki mutasyon da aynı hücrede sporadik bir şekilde görülür, daha sonra bu hücrede tümör oluşturur (52,53).

Tümör supresör genlerin protein rnleri: Büyümeyi inhibe eden faktörlerin de aynı büyüme faktörleri gibi bir sinyal ileti sistemleri olduğu düşünülmektedir. Mitojenik sinyallere benzer şekilde büyümeyi inhibe eden sinyallerin de hücre dışında başlayıp reseptörleri, sinyal ileten proteinleri hücre siklusunu ve nükleer transkripsiyonu düzenleyen faktörleri kullanarak görevlerini yaptıkları düşünülmektedir. En sonunda; bütün pozitif ve negatif sinyaller nükleusda toplanırlar ve burada bölünme ya da bölünmeme kararı verilir. Bununla bağlantılı olarak bazı tümör supresör genlerinin ürünleri nükleusda bulunurlar.(Tablo 3).

Tablo 3. Bazı Tümör Süpresör Genler

TÜMÖR SÜPRESÖR GENLER	KODLADIĞI FAKTÖR	İLGİLİ DOKU
APC	Beta -katenin	Kolon ve mide
DPC4	Mitosizi inhibe eden molekül	Pankreas
NF -1	Ras proteini inhibe eden protein	Nörofibroma, feokromositoma
NF-2	Ras proteini inhibe eden protein	Meningioma, ependimoma, schwannoma
CDKN2A	p16 proteinini	Çok çeşitli kanserlerle ilgili
RB1	pRB proteinini	Retinoblastoma, mesane, küçük hücreli akciğer, meme
TP53	p53 protein	Çok çeşitli kanserlerle ilgili
WT1	Hücre bölünmesi kontrolü	Karaciğerde Wilms tümörü
BRCA1	Genomik stabilite	Meme ve over
BRCA2	Genomik stabilite	Meme
VHL	Hücre bölünmesi kontrolü	Renal hücre

2.10.3 DİĞER PROTEİNLER

2.10.3.1 ADEZYON MOLEKÜLLERİ

Adezyon molekülleri hücrelerin özgül olarak dokulara yönelmelerinde, birbirlerini tanımalarında, embriyogenez, hücre büyümesi, hücre farklılaşması ve enflamasyon gibi olguların düzenlenmesinde görev alırlar (54,55). Adezyon molekülleri integrinler, selektinler, immünglobulin süper ailesine dahil adezyon molekülleri ve kaderinler olmak üzere dört sınıfta incelenmektedirler. Bir de fonksiyonel olarak adezyon görevi gören ama yukarıdaki gruplar içerisinde sınıflandırılmayan adezyon molekülleri vardır (55).

A.Kaderinler

Moleküler ağırlıkları 120.000-140.000 kDa arasında değişen yapı ve fonksiyonları açısından kalsiyuma bağımlı transmembranöz proteinlerdir (56). Kaderinler yapısal olarak birbirleri ile benzerlik gösterirler. Kalsiyuma bağlanmada önem taşıyan geniş bir hücre dışı N-ucu ile, kaderinler arasında çok iyi korunan sitoplazmik bölümlerle bağlantılı tek bir transmembranöz kısımdan oluşurlar. Kaderinler üzerinde buldukları dokulara göre isimlendirilirler ve bugün bilinen beş kaderin grubu vardır (57).

E-kaderinler: Epitel hücrelerinde eksprese olurlar.

P-kaderinler: Plasentada eksprese olurlar ancak belirli dönemlerde diğer dokularda da buldukları bildirilmiştir.

V-kaderinler: Endotel hücreleri üzerinde eksprese olurlar.

N-kaderinler: Nöral dokularda ve kas hücrelerinde eksprese olurlar.

H-kaderinler: Kalp kasında eksprese olurlar (53).

B.Ki-67 Proteini

Ki-67 Proteini, 319-358 kDa ağırlığında, 10. kromozom üzerinde nükleer bir protein ve bir proliferasyon belirleyicisidir. İlk defa 1983'te Gerdes ve arkadaşları tarafından tanımlanan bir proliferasyon belirleyicisidir. Ki-67 reaktivitesi diğer hücre kinetik ölçüleriyle korelasyon gösterdiği için yaygın proliferasyonu gösteren önemli bir markerdir (58,59). Tümördeki Ki-67 pozitif hücre fraksiyonu hastalığın klinik gidişi ile paraleldir ve monoklonal bir antikor olan MIB-1 ile immünohistokimyasal olarak boyanan Ki-67 (+) hücrelerin tüm hücrelere oranının hesaplanması ile elde edilir(60).

İnsan Ki-67 proteinine karşı antikorların mikroenjeksiyonu sonrasında hücre bölünmesinde azalma izlenmiştir. Bu bulgu sonucunda Ki-67'nin hücre proliferasyonunda önemli rol oynadığı saptanmıştır (61).

Ki-67 çoğalan hücrelerde görülen bir çekirdek proteini. Esas olarak G1, S, M ve G2 fazında görülür. G0 fazında yoktur. Hücre proliferasyonunun morfolojik özelliklerini iyi bir şekilde gösteren protein olup, mitotik indeks ve tümör gradelemesinde sıklıkla kullanılır.

2.11. SİTOGENETİK İNCELEMELER

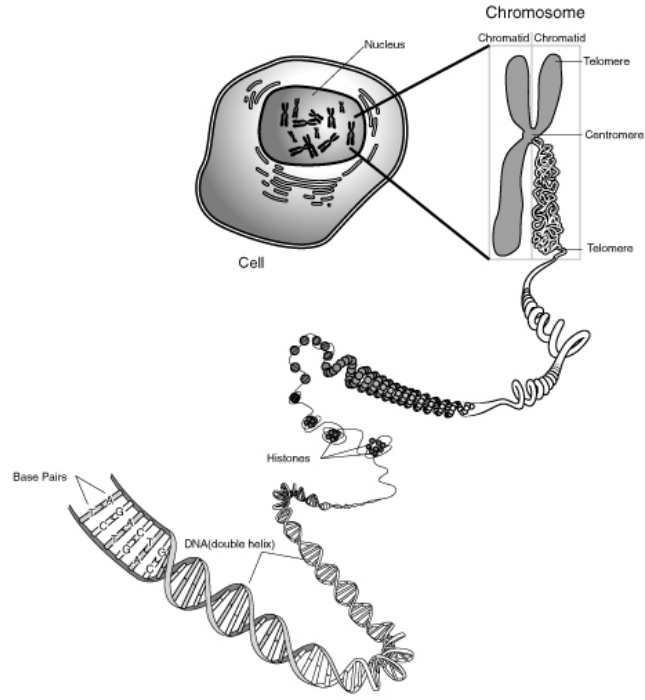
Sitogenetik, fenotipik özelliklerin kromozomlarla olan ilişkisini inceleyen bilim dalıdır. Sitoloji ve genetik bilimlerinin birleşmesiyle ortaya çıkmıştır. Genetik materyalin hücresel düzeyde incelenmesini esas alır. Amacı DNA'da meydana gelen yapısal, sayısal değişiklikleri ve köken farklılıklarını saptayarak elde edilen sonuç ile fenotip ve genotip arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir (62). Konvansiyonel sitogenetik analizler insan kromozomları üzerinde çalışılarak yapılmaktadır.

İnsan kromozomları ilk kez 1857 yılında Virchow tarafında görülmüş fakat kromozom sözcüğü 1888 yılında Waldeyer tarafından kullanılmıştır. Tjio ve Levan 1956'da insan fetal akciğer fibroblastları ile yaptıkları kültürlerde kolşisin kullanarak insan kromozomlarının sayısının 46 olduğunu bulmuşlardır (62). Kromozomlar bölünme halindeki bir hücreye ait olan kromonema ipliklerinin kısalıp kalınlaşması ve spiralleşerek etraflarında bir matrix oluşturmasıyla meydana gelen genetik materyali taşıyan yapılardır. Bölünme halindeki her kromozomda 2 çift kromatid bulunur. Bu kromatid çiftleri sentromerde birbirleri ile birleşirler. Kromozomlar ışık mikroskobu kullanılarak hücre bölünmesinin metafaz evresinde çok rahat incelenebilirler. Bir kromozom genel hatlarıyla şu bölgelere ayrılır:

Sentromer (Primer boğum): Heterokromatin yapıda özel DNA dizisi içeren kısımdır. Kromozomlar sentromer bölgesinde boyuna bölünüp ayrılırlar. Sentromerlerin üzerinde uçları kutuplara dönük olan özelleşmiş protein komplekslerine kinetokor denir. Bölünme esnasında kromatitler bu noktalardan kutuplara çekilirler.

Satellit: Belirli bazı kromozomların kısa kollarına ince bir sapla bağlanan kromatin materyalidir.

Sekonder Darlık: Sentromerden farklı olarak oluşan küçük bir darlıktır. Özellikle 1, 3, 6, 9, 11 ve 16. kromozomlarda görülürler (62).



Şekil 6. Kromozomun genel yapısı

Kromozomlar sentromerlerinin lokalizasyonu dikkate alınarak sınıflandırılır. Buna göre tüm kromozomlar kendi içlerinde morfolojik olarak 4 gruba ayrılırlar:

Metasentrik: Sentromeri ortada olan ve iki kolu birbirine eşit olan kromozomlardır.

Submetasentrik: Sentromeri merkezden uzak ve iki kolunun uzunluğu da birbirine eşit olmayan kromozomlardır.

Akrosentrik: Sentromer bölgesi kromozomun bir ucuna daha yakın olan kromozomlardır.

Telosentrik: Sentromer kromozomun bir ucuna çok daha fazla yakın ve ikinci kolun görünmediği kromozomlardır (106).

Rutin çalışmalarda en çok tercih edilen hücre tipi periferik kan lenfositleridir. Çünkü lenfositler hastadan elde edilmesi kolay, döngü süresi nispeten kısa, çoğaltılması kolay ve vücudumuzda bulunan kromozomal aberasyonları en kolay ortaya koyabileceğimiz genetik materyaldir. Sitogenetik

incelemelere başlamadan önce alınan materyal bir takım işlemlere tabi tutulur. Bu işlemleri sıralamak gerekirse, öncelikle alınan kan örnekleri kültür ortamına alınarak hücrelerin bölünmeye devam etmesi ve metafaz evresinde durması sağlanır. Hücrelerin metafaz evresine gelmesi için uygun zaman beklendikten sonra materyal kültür ortamından çıkarılarak boyanıp incelenmeye hazır hale getirilir. Çeşitli boyalarla boyanan kromozomlar artık mikroskopta incelenebilirler.

Kültürü yapılan hücreleri incelemek için kullanılan teknikleri konvansiyonel ve moleküler sitogenetik teknikler olarak 2 ana başlık altında inceleyebiliriz.

2.11.1.KONVANSİYONEL SİTOGENETİK İNCELEMELER

Kromozomal düzeyde ortaya çıkan genetik değişiklikler, konvansiyonel sitogenetik yöntemlerle (KSY) belirlenmektedir. Konvansiyonel sitogenetik incelemeler başlıca bantlama yöntemleri ,Frajil bölge tespiti, X Kromatini Tespiti ve Mikronükleus Tekniğidir. Biz çalışmamızda Mikronükleus Tekniğini kullanarak hücrelerdeki MN,NPB ve NBUDS sıklıklarını inceledik.

2.11.1.1 MİKRONÜKLEUS, NÜKLEOPLAZMİK BRİDGES VE NÜKLEER BUDS

A. Mikronükleus

Mikronükleus (MN)'lar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlar olarak tanımlanmaktadır. Bu oluşumla genellikle hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanmaktadır. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol

açarak; klastojenler(ultraviyole,arsenik,benzen vb.) ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar. Bu nedenle hücrelerde MN sayısında artış saptanması somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (63). MN testi; skorlanması oldukça kolay, ekstra kültür işlemi basamağı olmadan uygulanabilen ve farklı hücre tiplerinde kullanılabilen bir testtir. MN testi, klastojenik etkili bileşikler tarafından oluşturulan kromozomal hasarların değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan standart genotoksisite test sistemi içerisinde yer alır ve in vivo ve in vitro olarak uygulanabilir. MN'ler hücre döngüsü boyunca meydana gelen hasar nerede olursa olsun hücre bölünmesi süresince oluşur. Aksine, kromozomal aberasyonlar, hücre döngüsü aşamalarının herhangi birinde meydana gelebilir (64). Ayrıca, sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajları sayesinde yaygın kullanım alanı bulan bir tekniktir (65).

MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde ve daha sonra kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır (53).

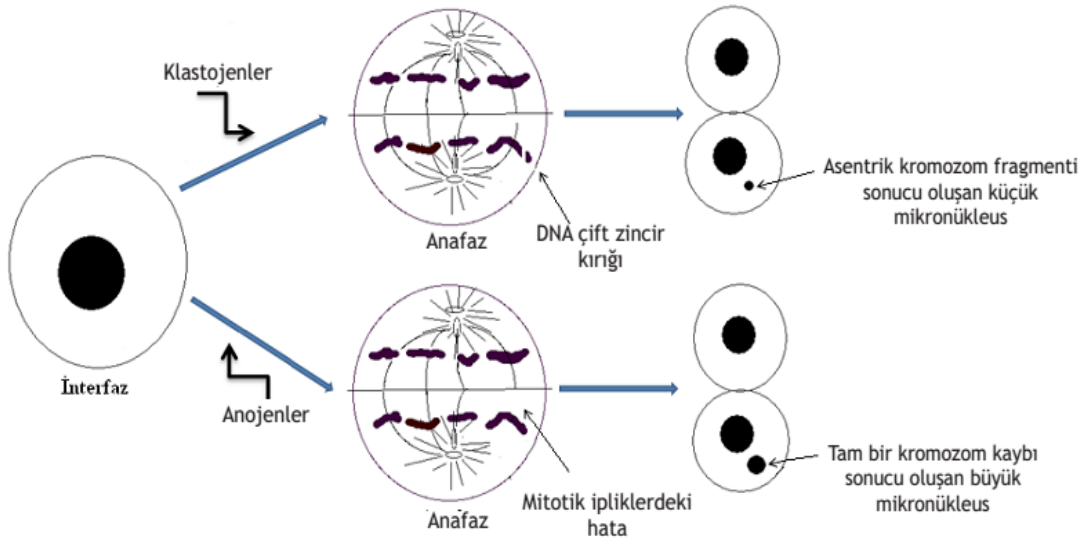
1980'den sonra özellikle deney hayvanlarıyla gerçekleştirilen kontrollü çalışmalarda, kimyasal ve fiziksel ajanların sebep olduğu sitogenetik harabiyetin güvenilir bir göstergesi olarak kullanılan MN çalışmalarının sayısı çok hızlı bir şekilde artmıştır. Günümüzde MN testi genotoksik, sitotoksik ve karsinojenik ajanların hücre genomu ve viabilitesi üzerine etkilerinin analizinde başarıyla kullanılmaktadır (66). MN testi başlıca; kromozomları etkileyebilecek fiziksel etkenlerin (UV ve irradyasyon gibi) ve her türlü kimyasal maddenin genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin tespitinde, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada, kanserden korunmada ve kanserin izlenmesinde bir biyoizlem testi olarak yaygın kullanılmaktadır (66). Kullanım alanlarından biri olan kanser genetiğinde de hastalığın tanısının konulması ve takibinin yapılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Bu teknik hücrelerin morfolojik bozukluğunu, kromozom kırıklarını, premalign değişiklikleri ve kanseri

gösterebildiğinden bir biyomarker olarak değerlendirilebilmekte ve karsinogenlere maruz kalmış bireylerde artmış kanser riskini göstermek amacıyla kullanılabilir (67). Tedavinin yanı sıra hastalığın ilerlemesi ile ortaya çıkan ikincil kromozomal değişikliklerin tespiti için oldukça kullanışlı bir yöntemdir (68). Ayrıca iyonize radyasyonun ve mikro dalga ışınların klastojenik etkisinin ortaya çıkarılmasında da geniş bir yer tutmaktadır (69). MN testi sigara, pestisitler, nanomateryaller, gıda katkı maddeleri ve diğer birçok kimyasal maddeler, parazitik enfeksiyonlar gibi çevresel ve mesleki etkileri değerlendirebilmek için de kolaylıkla kullanılmaktadır (70). İlaçların genotoksik etkilerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bu test, hem yeni üretilen ilaçların mutajenik etkilerinin önceden gözlenebilmesini hem de ilaç kullanan kişilerdeki genotoksik etkilerin belirlenmesini sağlamasından dolayı ilaç şirketleri ve farmakolojik çalışmalar için giderek değeri artan bir test haline gelmiştir. Ayrıca ilaçların genotoksik bakımdan güvenilirliğini gösterdiğinden insan sağlığı için de önemi büyüktür.

Çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilen ve kolay uygulanabilen in vivo ve in vitro MN testi, organizmayı etkileyen ajanların sitogenetik etkilerini belirlemek için yapılabilecek her türlü tarama çalışmasında güvenle kullanılabilir bir genotoksisite testidir.

Birçok araştırmacı MN testi için çeşitli teknikler kullanmışlardır. Bunların başında lenfosit hücre kültürleri ve direkt kemik iliği veya periferik kan hücrelerinin analizi gelmektedir. Bazı araştırmacılar geliştirdikleri modifiye metotlarla anöploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MN büyüklük farkından yararlanmışlardır. Klastojenlerce uyarılan hücrelerde asentrik kromozomal fragmentler içeren küçük ebatlı MN'ler oluşmasına rağmen, anojenlerce (tam kromozom kaybına yol açan maddeler) uyarılan hücrelerde tam kromozom içeren daha büyük ebatlı MN'ler ortaya çıkmaktadır (71) (Şekil 7). Eastmond ve Tucker aynı amaçla antikinetokor antikorları kullanarak kinetokor pozitif MN'lerin tam bir kromozom, kinetokor negatif MN'lerin ise asentrik kromozom fragmenti içerdiğini ve bu yöntemin anöploidi uyaran ajanları klastojenlerden ayırmada daha kesin bir yol olduğunu vurgulamışlardır (72) .

Daha sonra Fenech ve Morley tarafından, küf mantarlarının metabolitlerinden olan sitokalsin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanan ve bir hücre siklusunu tamamlayan hücrelerin binükleer görünümüleriyle ayırt edilmesine olanak sağlayan modifiye bir teknik geliştirilmiştir (73) . (Şekil 8). Cyt-B, bölünen hücrenin ikiye ayrılmasını uyarıcı mikrofamentleri oluşturacak olan aktin molekülüne bağlanarak aktin polimerizasyonunu inhibe etmektedir. Bu inhibisyondan dolayı aktine bağlı tüm hareketler engellenmekte ve sitokinez inhibe olmaktadır. Sitokinezi bloklama metodu ile bazı kinetik problemler ortadan kalkmış ve in vitro MN tekniğinin uygulanmasındaki güvenilirlik artmıştır (74). Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B eklenmesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücrelerde, MN bulduran hücrelerin oranı tespit edilmektedir. Sitokinezi bloklanmış hücrelerde binükleat hücreler ve MN sayımında şu kriterler kullanılmaktadır (75):

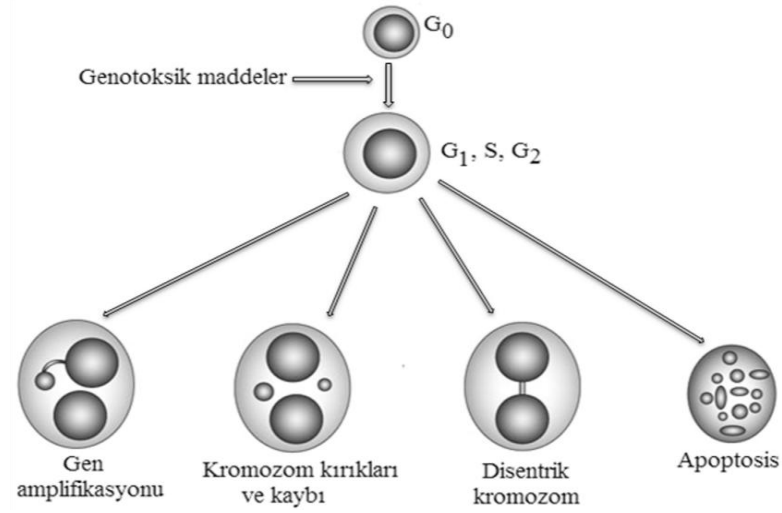


Şekil 7. Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN'ler.

(V. Sekeroglu, 2011)

1. Hücreler çift nükleusa sahip olmalıdır ve belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak veya oval görünümüne olmalıdır.
2. Nükleuslar belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak veya oval olmalıdır.
3. MN çapı ana nükleusun 1/3'ü kadar veya daha küçük olmalıdır.
4. MN'ler yuvarlak ve oval şekillerde olmalıdır.
5. MN'ler ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır veya mikronükleer sınırlar nükleer sınırlardan ayırt edilebilir olmalıdır.
6. Boya alma yoğunluğunun ana nükleus ile aynı olmalıdır.
7. Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması esas alınmalıdır.

Bu modifiye yöntem ile hücrelerin sadece MN içerip içermediği saptanmakta ve bu sayım işlemi kromozom anormallikleri testine göre daha hızlı gerçekleşmektedir. Bütün halde kromozom şeklinde MN oluşumuna neden olan ve kromozomal anormallik testleriyle çalışılması güç olan anöploidiyi indükleyici ajanlar da bu testle kolaylıkla saptanabilmektedir (76). Ayrıca kimyasal bir madde uygulanmış hücrelerden oluşan yavru hücrelerdeki MN'lerin incelenmesi, en az bir hücre bölünmesi yoluyla yavru hücrelere geçen genetik hasarı ifade etmektedir. Yani iki çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması ile hücrenin bir kez bölünmüş olduğu ispatlanmış olur. Sitokinezi bloklanmış hücrelerde MN yöntemi kullanılarak kromozom kırıkları, kromozom kaybı, disentrik kromozom oluşumu gibi yeniden düzenlenmeler, gen amplifikasyonu ve apoptosis gibi olayların frekansı da değerlendirilebilir. MN içeriğindeki kromozomal fragmentler, direkt DNA kırıklarından veya DNA sentez hatalarından kaynaklanabilir. Onarılmamış kromozom kırıkları, bir disentrik kromozom ve bir asentrik fragment oluşumu ile yeniden düzenlenmelere öncüllük edebilir. Genellikle disentrik kromozomların sentromerleri anafazda nükleuslar arasında nükleoplazmik köprü oluşturur ve asentrik fragment MN'yi oluşturur. Asentrik fragmentlerin ve kromatid veya kromozom kırıklarının veya tam bir kromozomun anafazda geri kalması sonucu oluşan MN'ler, telofazdaki nükleusların dışında kalan küçük nükleuslar olarak görülmektedir (77).



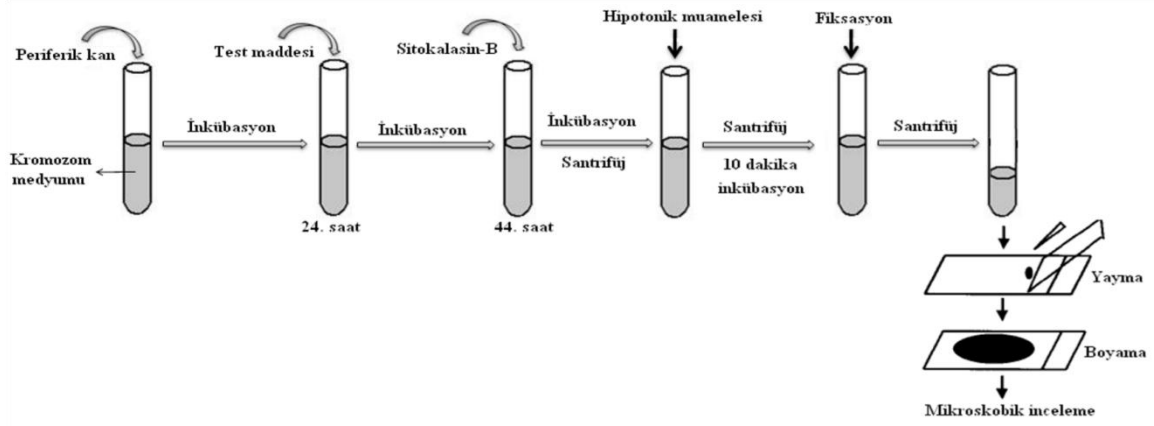
Şekil 8. Sitokinezi bloklanmış MN yöntemi ile bazı sitogenetik anormalliklerin tayin edilmesi (V. Sekeroglu, 2011)

MN testi mitoz geçiren tüm bitki, hayvan ve insan hücrelerinde, fiziksel ve kimyasal ajanların oluşturduğu genotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılabilir. Daha çok kan ve kemik iliği hücrelerine uygulanan bir yöntem olmasına rağmen, çeşitli çalışmalarda karaciğer, akciğer, solungaç, böbrek, bağırsak, embriyo, ağız epitel hücreleri, üriner epitel hücreleri, deri fibroblastları ve yumurtalık hücreleri gibi pek çok hücreye de MN testi uygulanmıştır. Farklı hücre çeşitlerine uygulanabilen MN testi, farklı organizmalar üzerinde de kullanılmaktadır. Bu amaçla insan lenfositleri, fare, sıçan, balık, kurbağa, midye, salyangoz ve bitkiler test organizması olarak kullanılmıştır (77). MN testi insanlarda genotoksisiteyi belirlemek amacıyla çoğunlukla periferal kan lenfositlerinde uygulanır. Çünkü yapılan çalışmalarda, kanser hastalarından alınan periferal kan lenfositlerindeki MN frekansında belirlenen artış, kanser oluşan hedef dokudaki MN frekansı kadar bulunmuştur. Lenfosit kültürlerindeki çalışmalara paralel olarak MN tekniği, eksfoliyatif hücrelere de uygulanmıştır (78). Bu teknik sayesinde ağız, burun, bronş ve ürotelyal eksfoliyatif hücrelerde

kimyasalların ve enfeksiyonların etkilerini değerlendirmek mümkün olmuştur (79).

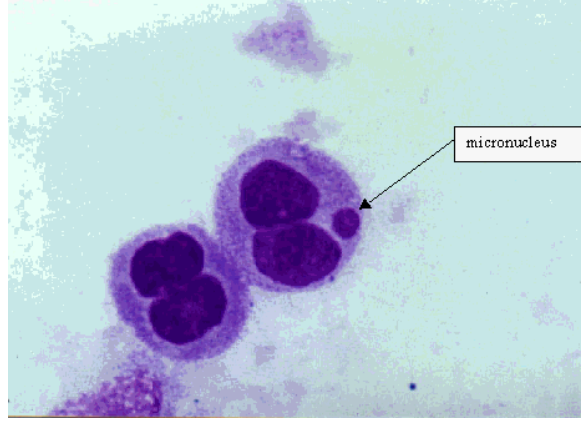
In Vitro MN Testi In vitro MN testinde, hücrelerin mitoz bölünme geçirmesini sağlayan kromozom medyumunu bulanan steril tüplere, periferik kan örneklerinden alınan yeterli miktar steril şartlarda ekilir ve hücre kültürü inkübasyona bırakılır. Eğer kimyasal bir maddenin genotoksik etkisi incelenmek isteniyorsa, kültürler genellikle 24. saatte test bileşiği ilave edilir ve 48 saat boyunca test maddesi ile muamele edilir. Kültür tüpleri inkübasyona bırakıldıktan sonra, sitokinezi engelleyerek iki nükleuslu hücre oluşumunu sağlamak için, kültürün bitimine 24 saat kala (inkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra) bütün tüplere Cyt-B ilave edilir. Kültür süresinin bitiminde tüpler santrifüjlenerek süpernatant atılır ve tüplere hipotonik eriyik ilave edilerek yaklaşık 10 dakika 37°C'de inkübasyona bırakılır. Süre sonunda tüpler santrifüjlenerek, tüplere glasiyal asetik asit ve metanol karışımından oluşan fiksatif ilave edilir İlk fiksatif ile oda sıcaklığında muamele edildikten sonra tüpler tekrar santrifüj edilir ve bu işlem tüpte kalan sıvının berraklaştığı görülünceye kadar 2-3 kez tekrarlanır. Daha sonra tüplerdeki sıvı lamaların üzerine damlatılarak preparatlar hazırlanır. MN'lerin boyanması için preparatlar Giemsa-tampon boya eriyiğinde boyanır ve ışık mikroskobu ile incelenir (80) (Şekil 8).

MN Sayısının Saptanması : MN sayısını belirlemek amacıyla her bir preparatta en az 1000 binükleat hücre incelenir ve bu hücreler içerisinde MN taşıyanlar belirlenir. Ayrıca incelenen binükleat hücrelerde toplam MN sayısı saptanarak, MN taşıyan binükleat hücrelerin oranı ve toplam MN sayısının incelenen binükleat hücre sayısına bölünmesiyle hücre başına düşen MN ortalaması ve % MN hesaplanır (81).

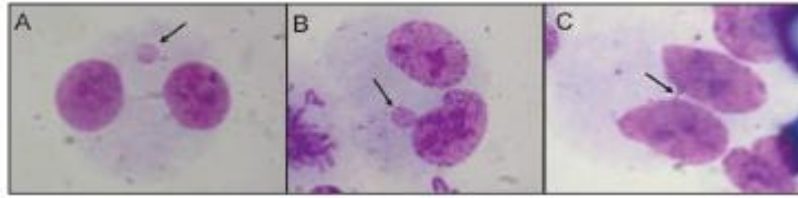


Şekil 9. In vitro MN test protokolü. (V. Sekeroglu, 2011)

Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi: Sitotoksiste, büyük oranda DNA'daki bazların modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Nükleer bölünme indeksi (NBI) ve mitotik indeks (MI) yeterli hücre proliferasyonu ve sitotoksiteyi göstermek için kullanılan indikatör testlerdir. MI ve/veya NBI'daki bir azalma hücre döngüsündeki bir inhibisyonu ve hücrenin proliferasyon kapasitesindeki bir kaybı yansıtır. Bu testler bazı kimyasalların hücrelerdeki etki mekanizması hakkında önemli bilgiler de vermektedir. Ayrıca sitotoksiste ve tümör oluşumu arasındaki ilişki pek çok araştırmada gösterilmiştir. Her bir test maddesi için hazırlanan preparatlardan genellikle 1000 hücre sayılarak, bu hücreler arasından mononükleat (bir nükleuslu), binükleat (iki nükleuslu), trinükleat (üç nükleuslu) ve tetranükleat (dört nükleuslu) olanların oranı saptanır. Bu orandan yola çıkarak aşağıdaki formüle göre NBI hesaplanır. NBI'nın hesaplanması kimyasal veya fiziksel bir maddenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (82).



Şekil 10. Mikronukleus görünümü

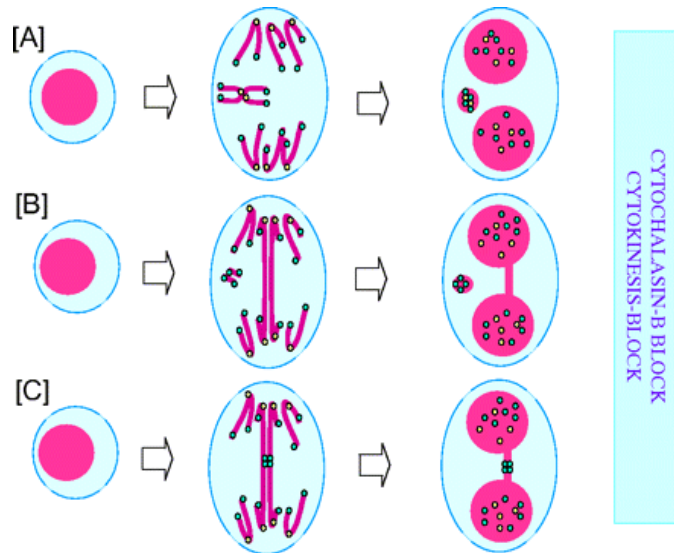


Şekil 11. Işık mikroskopunda A)MN, B)NBUDS ve C)NPB görünümü

B.Nükleoplazmik Bridges(NPB)

NPB, mitozun anafaz safhasında disentrik kromozom sentromerlerinin zıt kutuplara çekilmesi sırasında oluşur. Anafaz köprüleşmesinde kırılma olmadığı takdirde nükleer membran yavru nükleusu çevreler ve bu sayede NPB oluşur. NPB çoğu zaman sitokinez esnasında bozunur bununla birlikte sitokinez inhibitör cytochalasin-B aracılığıyla bloke hücrelerde biriktirilebilir (83). Disentrik kromozomlar , kromozom kırıklarının yanlış onarımından ya da telomerler arası uç füzyonlarından köken alırlar (83). Bahsi geçenlerden ikincisi , telomeri kapsülleyen ve aşırı telomer kısalmasından ve/ve ya delesyonundan ya da telomer sekanslarındaki temel hasarlardan koruyan telomere protein yapısının uygunsuz katlanmasından kaynaklanır (83). NPB formasyonunun iki mekanizması telomer problemleri kullanan sitokinezi bloke binükleer hücrelerde ayırt edilebilir. Telomer sonlarındaki füzyonda -eğer telomer sekansında kalmışlarsa ve/ ve ya füzyonlar telomer harabiyeti olmaksızın telomer bağlayıcı

proteinlerin disfonksiyonundan kaynaklanıyorsa NPB artışı beklenir; bununla birlikte füzyon telomer sekansının komple erozyonundan kaynaklanıyorsa böyle bir mekanizmadan kaynaklı NPB, telomerik tekrar sekansına bitişik subtelomerik bölgede hibride olan spesifik bir prob vasıtasıyla saptanabilir (83). Buna karşıt olarak; DNA kırıklarının yanlış tamiri neticesinde NPB oluşumu telomerik sekanslarda pek olası değildir ve bu sebeple genellikle telomer negatiftir. Bunlara ek olarak DNA kırıklarının yanlış tamirindeki NPB artışı, yanlış tamir esnasında ortaya çıkan asentrik fragmanlardan köken alan bir MN ile birlikte bulunma eğilimi gösterir (83). Asentrik fragmandan köken alan bir MN her zaman telomer uç bölge füzyonu olayıyla ilişkili olmak zorunda değildir çünkü ikinci durum DNA sarmalı kırılmaksızın ya da yanlış tamir olmaksızın gerçekleşebilir. NPB formasyonu artışı endojen oksidanlar, ionize radyasyon, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, sigara dumanı karsinojeni 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, vanadium pentaoksit maruziyetlerinin ve folat-selenyum eksikliğinin de dahil olduğu pek çok durumda gösterilmiştir (83).



Şekil 12. Nükleoplasmik Bridge (NPB) oluşumu

Pansentromerik ve telomerik problemler; (i) total kromozom kaybından köken alan MN ile (A)asentrik kromozom fragmanından köken alan MN'yi (B) ; (ii) disentrik kromozomların DNA ipliğindeki yanlış tamir kaynaklı NPBlar (B)ile telomer bitiş noktası füzyonu kaynaklı olanları (C) birbirinden ayırır. Bir sonraki aşamada; bu sistemin telomeri kapayan proteinlerin organizasyonundaki defekt neticesinde oluşan, telomer sekansı kaybıyla birlikte telomer disfonksiyonunun yol açtığı telomer bitiş noktası füzyonlarını saptayabildiğini belirtmek önem arz eder. Telomer sekansının total kaybı neticesinde oluşan, telomer bitiş noktası füzyonundan kaynaklı NPB'ler telomer tekrar sekansına bitişik subtelomerik bölgede hibride spesifik bir prob aracılığıyla gösterilebilir.

C.Nükleer BUDS (NBUDS)

Geçen on yıllar neticesinde, NBUDS olarak bilinen bir başka eşsiz nükleer anomali kromozomal instabilite ile ilişkilendirildi. NBUD çok seçici koşullarda yetiştirilen gen ampifikasyonu artırılmış kültürlerde (orta seviye folik asit eksikliği) gözlemlendi (83). Shimuzi ve arkadaşları, memeli hücreleriyle in vitro deneyler yaparak güçlendirilmiş DNA'nın seçici bir şekilde belirli bölgelerde konumlandığını ve periferde yapılarak nükleer tomurcuklanmayı nükleer siklusun S fazında elmine ettiğini göstermiştir (83). Güçlendirilmiş DNA, homolog bölgeler ile asentrik ve atelomerik DNA'nın güçlendirilmiş sekanslarının mini dairelerinin rekombinasyonu aracılığıyla kromozomlardan elemine edilebilir. NBUDS, NBP ile bir fark dışında aynı morfolojiye sahiptir; nukleusa tomurcuklanmanın safhasına göre değişen dar ya da geniş bir nukleoplasmik materyalden oluşan bir sap ile bağlıdır. Nükleer tomurcuklanma süresi ve MN ekstrüzyonu çok daha detaylı olarak hızlandırılmış canlı hücre modellerinde çalışılmıştır (83). MN ortaya çıkmasında gama-radyasyonunda etkili olabileceği ayrıca bildirilmiştir (83). Bu işlemde Rad-rekombinant proteini 3 saat sonra tüm nükleus boyunca saptanabilir ve sonrasında farklı lokasyonlardan NBUD olarak çıkartılmadan önce konsantre olur. NBUD, NPB iki nukleus köprüsü arasındayken de gösterilebilir ve kalıntıları küçülerek nukleusa döner (83).

Lindbergh ve arkadaşları sentromer ve telomer problemleri kullanarak nükleer tomurcuklanmada MN mekanizmalarını ve nükleer tomurcuk formasyonunu folik asitten fakir hücrelerde incelemişlerdir (83) ; bu çalışmalar MN ve NBUD in kısmen farklı mekanizmal kökenleri olduğunu göstermiştir. Sentromer ya da telomer etiketleri olmaksızın intersitisyel DNA açıkça NBUD da (%43) MN ye nazaran (%13) daha yaygındır. Tek başına telomerik DNA ya da hem sentromerik hem telomerik DNA MN de çok daha sıktır (sırasıyla %62 ve %22) NBUD da ise bu oranlar sırasıyla %44 ve %10'dur. Folat kısıtlamasında NBUD ve MN nin telomerik DNA'ya, NBUD'ın intersitisyel DNA'ya ve ayrıca NBUD ve MN'nin ikisinin birlikte sentromerik ve telomerik DNA'ya yataklık ettiği görülmüştür. Lindbergh ve arkadaşlarının önerdiği modele göre MN, binükleer lenfositlerde birincil olarak mitoz esnasında kromozomal gecikme ve terminal asentrik fragmanlardan derive olur ve bununla birlikte NBUD çoğunlukla intersitisyel ya da terminal asentrik fragmanlardan köken alır. Bunun dışındaki NBUD muhtemelen nükleer bölünme sonrası sitoplazmada sıkışık kalmış DNA'dan ya da nükleusdan dışarı atılmış DNA'dan kaynaklanır. NBUD'in diğer mekanizmaları ne olursa olsun anöploididen kurtarıma olarak bilinen süreçteki rolleri hala net olarak aydınlatılamamış, hipotezlere ilişkin kanıtlar oldukça sınırlı kalmıştır (83). Sonuç olarak en akla yatkın durum NBUD'in NPB kırılmasına müteakip anlık olarak ortaya çıktığıdır.

2.11.2. MOLEKÜLER SİTOGENETİK İNCELEMELER

Moleküler sitogenetik inceleme için, kromozomlar çeşitli floresan boya- larla işaretlenip analiz için hazırlanır. Bu yöntem FISH (Fluorescence In Situ Hybridisation) adı verilir. Kromozomlar amaca göre farklı bölgelerinden işaret- lenip analiz edilebilirler. FISH yönteminin avantajı kromozomlar elde edilme- den direk hücre çekirdeğine uygulanabilmesidir. Prenatal tanı ve preimplantasyon genetik tanıda paneller halinde uygulandığında bir seferde 5, iki seferde toplam 9 kromozoma kadar (13, 16, 18, 21, 22 ve 15, 17, X, Y) in- celenebilir (84).

- FISH Analizi yapılabilen örnekler
 - Periferik Kan
 - Fetal Kan (Bebek kordon kanı)
 - Amniyon
 - CVS (Koryon Villus Biyopsi)
 - Tahliye Materyali (Düşük Materyali)
 - Doku, cilt biyopsisi
 - Sperm
 - Blastomer
- FISH uygulamaları
 - Mikrodelesyon sendromları için hücre kültüründen spesifik problemlerle FISH analizi (kan, cilt dokusu)
 - Prader-Willi/Angelman Sendromu
 - DiGeorge Sendromu
 - Williams Sendromu
 - Retinoblastoma
 - BCR/ABL
 - Amnion sıvısından spesifik problemlerle FISH analizi
 - Amnion sıvısından FISH ile hızlı anöploidi incelemesi (13, 18, 21, X ve Y)
 - Marker kromozomlar için FISH analizi
 - Blastomerlerde anöploidi testi ve translokasyonlar için spesifik problemlerle FISH analizi (Preimplantasyon genetik tanı)
 - Sperm FISH analizi

2.12. PESTİSİTLER

İnsan nüfusu, çok hızlı ve kontrolsüz bir şekilde artmaktadır. Buna rağmen bu artışı karşılayacak oranda gıda ürünü sağlanamamakta ve gıda

ihtiyacı giderek artmaktadır. Bu sorunun giderilmesi, birim alanda verimi ve kalitesi yüksek ürünler elde edilebilecek, maliyeti oldukça düşük, en önemlisi de çevre kirliliğine neden olmayacak önlemlerin alınması ile mümkündür. Bugün yurdumuzda ve dünyada ürün artışını sağlayabilmek için çeşitli zararlılarla mücadelede "pestisit" adı verilen kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Bu maddelerin kullanılmasıyla gerçekten de ürün miktarında artışlar gözlenmektedir. Ancak bu pestisitler suda, toprakta, meyva ve sebzeler üzerinde uzun süre bozulmadan kalarak çevre kirliliğine neden olmakta ve dolayısıyla besin zinciri yoluyla insana kadar ulaşabilen çeşitli zararlar oluşturmaktadır (85).

Pestisitlerin sınıflandırılması çok farklı şekillerde yapılmaktadır (86). Bunlar;

I. Hedef alınan organizmaya göre gruplandırma

- a. Akarisitler (akarları öldüren pestisitler)
- b. İnsektisitler (böcekleri öldüren pestisitler)
- c. Nematisitler (nematotları öldüren pestisitler)
- d. Rodentisitler (fare gibi kemirgenleri öldüren pestisitler)
- e. Fungusitler (bitki üzerindeki mantarları öldüren pestisitler)
- f. Herbisitler (yabancı otları öldüren pestisitler)

II. Kullanma şekillerine göre gruplandırma

- a. Gaz
- b. Toz
- c. Püskürtme

III. Etkili maddelerine göre gruplandırma

- a. İnorganik maddeler
- b. Doğal Organik maddeler
 - Bitkisel maddeler
 - Petrol yağları
- c. Sentetik organik maddeler
 - Organik fosforlu maddeler
 - Organik klörlü maddeler
 - Diğer sentetik organik maddeler

Pestisitler de diğer ksenobiyotikler gibi vücutta bir takım enzimatik olaylara katılmaktadır (87). Enzimatik olaylar, kimyasal değişimin türüne göre dört ana grupta toplanırlar. Bunlar; oksidasyon, redüksiyon, kopma ve konjugasyon reaksiyonlarıdır.

Pestisitlerin teratojenik ve mutajenik etkilere sahip oldukları saptanmıştır. Teratojenik etkinin oluşmasında doz ve stresin varlığı önemli etkindir. Teratojenik etkiye sahip pestisitler 2,4,5-T ve 2,4-D herbisitler, organik fosforular, kaptan, folpat ve difolatan'dır. Mutajenik etkiye sahip pestisitler (diazinon, ziram v.b) kromozomal kırılmalara neden olurlar.

Dünyada ve ülkemizde tarım alanındaki zararlıları yok etmek ve kaliteli ürün elde etmek amacıyla pestisitler yoğun olarak kullanılmaktadır. Tarımsal savaşta kullanılan pestisitler hedef organizmaları yok ederek ürün artışına neden olabildikleri gibi, hedef olmayan canlılarda da hasarlara yol açmaktadırlar. Ülkemizde besinlerin pestisitlerce ne ölçüde zarar gördüğü yeterince araştırılmamıştır. Pestisitlerin bitkisel ve hayvansal besinlerle insan dokularındaki kalıntı yoğunluğunun belirlenmesi, alınacak önlemler açısından zorunlu hale gelmiştir. Son günlerde çok güçlü çevre kirliliğine neden olduğu belirtilen pestisitlerin (özellikle organik klorlu pestisitler) lipofilik karaktere, yüksek biyolojik birikime ve östrojenik aktiviteye sahip olmaları nedeniyle meme kanseri için "risk faktörü" teşkil ettiği düşünülmektedir (89). Tümörejenik etkili pestisitler arilhidrokarbon (Ah) benzeri bir reseptöre bağlanarak sinyal iletimin kompleks işlevlerini hızlandırmakta, hücre farklılaşması ve büyümesi üzerine pleiotropik etki göstermektedir. Bu şekilde meydana gelen hücresel sinyal iletimindeki düzensizlikler dokularda pestisit rezüdülerinin birikimine neden olmaktadır. Pestisitler herhangi bir yolla (oral, deri ve inhalasyon) vücuda alındıktan sonra daha sistemik sirkülasyona geçmeden, hepatik sitokrom P450 monooksijenaz sistemi ile metabolize olmaktadır. Metabolitler glukuronidasyon sistemleri ile detoksifike edilir. Alternatif olarak, reaktif metabolit protein, DNA gibi önemli doku makromolekülleri ile bağlantı oluşturabilir. Bu şekilde kovalent bağlanma, toksisite, karsinojenite, mutajenite ve teratojeniteye neden olmaktadır. Pestisitlerin kullanımı ile kanser insidansı arasında bir korelasyon saptanmıştır . Tarım işçilerinde kanser insidansı genellikle düşüktür. Bununla

birlikte son yıllarda tarım işçilerinde spesifik kanser tiplerinin riski artmaktadır. Bu spesifik kanser tipleri lösemi, Hodkin's hastalığı, non-Hodkin's lenfoma, multiple myeloma ile dudak, mide, prostat, beyin ve meme kanserleridir. Pestisitlerin karsinojenik etkilerini araştırmak için sıçan diyetine karışım halinde 19 organik fosforlu pestisit ve 1 organik klorlu pestisit karıştırılarak 8 hafta verilmiştir. Bu şekilde oluşturulmak istenen karaciğer modelinde pestisitlerin, daha önceden dietilnitrozamin tarafından oluşturulan preneoplastik lezyonların alanını ve sayısını arttırdığı bildirilmiştir (88). Yaygın olarak kullanılan bazı pestisidlerin (ditiyokarbamat, methidation, paration-metil, paration, vinklozolin, fenarimol v.b) karaciğer ksenobiyotik enzim sistemine ve oksidatif hasarın bir indeksi olan karaciğer DNA'sında 8-OH-2-guanozin düzeyine etkileri araştırılmıştır (90). Söz konusu pestisitler 10 gün sıçana verildikten sonra düşük dozlarda ve yüksek dozlarda pestisitlerin serbest DNA hasarına neden oldukları gösterilmiştir.

N-nitroso bileşikler alkilaminler, diğer kimyasalları içeren reaksiyonlar sonucu oluşur. Bazı N-nitroso bileşiklerinin ilk kez roket yakıtı yapımında kullanıldıkları, ancak bu üretim bittiğinde roket yakıtı tesisinin yakınında hava, su ve toprakta yüksek düzeylerde buldukları tespit edilmiştir. N-nitroso bileşikleri düşük seviyelerde nitrit ile tedavi hava, su ve gıda ürünlerinde bulunabilir. Nitrit ile tedavi ile Bazı N-nitroso bileşikleri besinlerin sindirimi sonrası midede oluşur. N-nitroso bileşiklerinin diğer kaynakları şampuan ve temizlik dahil, banyo malzemesi ve kozmetik ürünlerdir. N-nitroso bileşikleri pestisitler, kauçuk ürünleri ve lastik üretim tesislerinde bulunmaktadır. Bunların dışında balık işleme tesisleri, dökümhaneler, boya üretim tesislerinde de bulunmaktadır. N-nitroso bileşiklere bu bileşikleri içeren yiyecekler(özellikle konserve balık, peynir, pastırma ve işlenmiş etler), tütün ve alkol kullanımı, bazı kozmetik ve banyo malzemelerinden maruz kalınabilir. Bu bileşiklerin ölüme yol açan ciddi karaciğer hasarına neden olduğu yapılan hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Yiyecek ya da içme suyunda uzun süre maruz kalmanın hayvanlarda karaciğer, özefagus ve nazal kavite kanserine yol açtığı görülmüştür (91).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada 2009-2015 yılları arasında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalında tanı ve tedavisi gerçekleşmiş 51 larenks larenks karsinomlu olgu ve 51 kontrol grubu olmak üzere toplam 102 hasta değerlendirildi. Larenks kanseri tanısıyla tedavisi uygulanan ve takibe alınan hastaların dosyaları, epikrizleri ve takip notları incelendi. Kanserli hastaların yaş ve cinsiyeti, mesleği, tarım ilacı maruziyeti, klinik öyküsü, ek hastalıkları, hastalığın tuttuğu anatomik bölgeleri, sigara alışkanlıkları, operasyon öyküsü, radyoterapi ve kemoterapi alıp almadığı ile fizik muayene bulguları TNM klasifikasyonuna göre kayıt edildi. Tümör evresini değerlendirmede AJCC'nin 2002'de yayınladığı sınıflama kullanıldı. Tüm hastalara videolaringoskopik muayene yapıldı. Boyunda lenf nodu pozitifliği, boyun palpasyonu ile birlikte boyun USG ile değerlendirildi. Uygulanan tedavi tipi, nüks ve metastaz görülme sıklığı rapor edildi. Lenf nodu yayılımı ve tümör grade'i değerlendirildi. Patoloji raporları incelendi. Hastalar cinsiyetlerine ve sigara kullanım öykülerine göre karşılaştırıldı (Tablo 1,2). Larenks kanserli hastalarda pestisid kullanımı öyküsü olan hastalar ayrı bir kategoride değerlendirildi ve veriler pestisid kullanmayan grup ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Özellikle kırsal kesimde yaşayan ve tarımla uğraşan hastalardan ilaçlama yapanlar veya herhangi bir nedenle tarım ilacına maruz kalanlar pestisid kullanan gruba dahil edildi. Hastaların büyük çoğunluğu meyve, domates ve zeytin üretimi yapmaktaydı. Çeşitli tarım ilaçları kullanmakla birlikte 24 hastanın 20'sinden böcek ilaçları (insektisit) ve mantar ilaçları(fungisit)kullandığı öyküsü alındı. Hastalardan ilaç isimleri ve dozları hakkında yeterli veri toplanamamakla birlikte meyve ve zeytin bahçelerinde en sık kullanılan pestisit olarak fungisitlerden bordo bulamacı(göztaşı+sönmüş kireç karışımı), meyve monilyası (luna), ve kurşuni küf (boscalid+pyraclostrobin); insektisitlerden ise en sık yaprak biti (mospilan), şeftali güvesi (malathion) ve cypermethrin kullanılmaktaydı. Hastalara kullanım dozları sorulduğunda yeterli veri alınamadı. Hastaların ortalama pestisit maruziyet süreleri 3 yıl olarak

hesaplandı. Herhangi bir dönemde çok kısa süreli pestisit maruziyeti olan hastalar da kullanan gruba dahil edildi. 2 hasta ömründe sadece 1 kez pestisit maruziyeti olduğunu belirtti, diğer hastaların pestisit maruziyet öyküsü en az 1 yıldır. Kırsal kesimde ve kentte yaşayan hastalar ayırt edildi. Hastaların meslekleri riskli ve risksiz meslek grubu olarak iki grupta incelendi. Hastalarımızdan çiftçi, marangoz, kahveci, ormancı, ve fırıncı olanlar riskli meslek grubuna, memur, esnaf ve aşçı olanlar risksiz meslek grubuna dahil edildi (Tablo). Larenks kanserli hastalar tümör evrelerine (T1,T2), tümörün anatomik lokalizasyonuna (supraglottik, glottik, subglottik), yapılan cerrahi operasyona (parsiyel, total larenjektomi ,mikrolarengoskopik rezeksiyon), radyoterapi öyküsüne, boyunda patolojik lenf nodu pozitifliğine göre gruplandırıldı. Radyoterapi alan ve almayan grupta MN, NPB ve NBUDS değerleri karşılaştırıldı. Kontrol grubu olarak çalışmaya 40 yaş ve üzeri, tarım ilacı maruziyeti bulunmayan, ek hastalığı olmayan, herhangi bir nedenle ilaç kullanmayan ve ailesinde kanser öyküsü olmayan hastalar dahil edildi. Hastaların sigara, alkol alışkanlıkları sorgulandı ve videolarengoskopik muayeneleri yapıldı.

Tanı aşamasında kan örnekleri alınarak MN, NPB ve NBUDS değerleri karşılaştırıldı. Tüm hastaların peliferik lenfositlerindeki MN, NPB ve NBUDS varlığı araştırıldı. Her bireyden hasta onamları alınarak steril plastik enjektörler aracılığıyla 5 ml intravenöz kan örneği alındı. Alınan kan örnekleri 1/10 (0,2 ml) oranında heparinize edildi ve vacoteinerli tüplere konuldu. Örnekler, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Bölümü Laboratuvarına getildi ve lenfosit kültürü oluşturuldu.

Preparatların Hazırlanması

Biyoloji Bölümü Genetik Laboratuvarına getirilen kan örneklerinden aşağıda belirtilen yöntemle preparatlar hazırlanmıştır:

1. Enjektörler hafifçe sallanarak kan örnekleri homojenize edildi.
2. Flow kabinde, içerisinde 2,5 ml kromozom medyumunu bulunan kültür tüplerine

altışar damla (0,2 ml) kan ekimi yapıldı.

3. Tüpler alimünyum folyo ile sarılarak eğik bir şekilde 44 saat 37 °C'de inkübe edildi.

4. İnkübasyonun sonunda tüplere 0,7 µg/ml'lik Sitokalasin B ilave edildi.

5. Tüpler tekrar alimünyum folyo ile sarılarak eğik durumda 24 saat 37 °C'de inkübe edildi.

6. İnkübatörden çıkarılan tüpler 800 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi.

7. Santrifügasyondan sonra tüplerdeki süpernatant kısım atıldı.

8. Tüplerin dip kısmında kalan ve hücrelerin bulunduğu 0,5-0,7 ml'lik sıvı vorteksle homojenize edildi.

9. Vorteks'le homojenize edilirken hipotonik çözültiden damla damla yaklaşık 5 ml ilave edildi. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun preparatlar hazırlanamamaktadır.

10. Tüpler 5 dakika buzdolabında bekletildikten sonra 800 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi.

11. Tüplerin dip kısmında 0,5-0,7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant kısım atıldı.

12. Tüplere vorteks uygulamasıyla 5 ml'lik soğuk fiksatif damla damla ilave edildi.

13. Tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildikten sonra 800 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi.

14. Tüplerin dip kısmında 0,5-0,7 ml'lik sıvı kalacak şekilde süpernatant kısım atıldı.

15. Tüplere vorteks ile ikinci fiksatif uygulaması yapıldıktan sonra 2-3 damla %2'lik formaldehit ilave edildi.

16. Tüpler 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tekrar 800 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi.

17. Santrifügasyon sonrası tüplerdeki süpernatant kısım atıldı.

18. Vorteks ile üçüncü fiksatif uygulaması yapıldıktan sonra tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülüp 800 rpm'de 8 dakika son kez santrifügasyon yapıldı.

19. Santrifügasyondan sonra tüplerdeki süpernatant kısım atılarak 0,5-0,7 ml'lik sıvı içindeki hücreler homojen olarak dağıtıldı.

20. Bu sıvıdan pasteur pipeti ile bir miktar sıvı çekilerek homojen hale getirildi ve yaklaşık 10 cm yüksekliğinden lamlar üzerine farklı alanlara birer damla düşecek şekilde üç damla damlatıldı. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edildi.
21. Her kan örneği için üç adet preparat hazırlandı.
22. Etiketlenen preparatlar üzerleri kapatılarak oda sıcaklığında 24 saat kurumaya bırakıldı.
23. Preparatlar %5' lik Giemsa ile boyandı
24. Kuruyan preparatların üzerine birer damla entellan damlatılarak preparatlar daimi saklanabilecek hale getirildi.
25. Preparatlar ışık mikroskobunda 1000'lik büyütmede incelendi. En az 1000 adet binükleat hücrede MN, NPB ve NBUDS sayısı larenks kanserli hastalarda ve kontrol grubunda incelendi ve ortalamaları alınarak karşılaştırma yapıldı.

3.1. İstatistiksel Değerlendirme

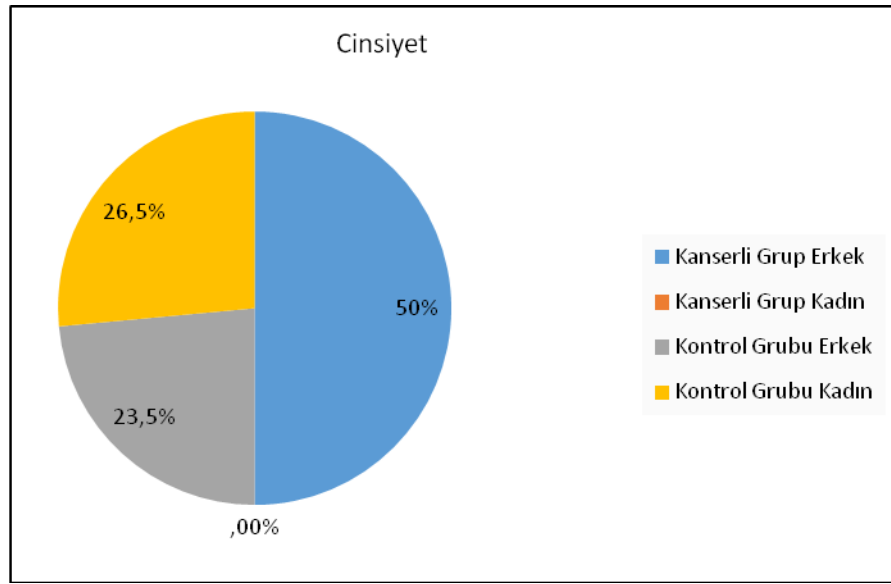
Çalışmamızda frekans dağılımı, tek örneklem t testi, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve korelasyon analizi kullanıldı. Verilerimiz SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)10.0 istatistik programı ile değerlendirildi . Kolmogorow-Smirnov goodness-of-fit test uygulanarak verilerin normal dağılımları kontrol edildi. Ayrıca larenks kanserli gruba ve kontrol grubuna ait MN, NPB ve NBUD sıklıkları karşılaştırıldı ve aralarında fark olup olmadığı ortaya konuldu. Sonuçlar $p < 0.05$ olacak şekilde anlamlı olarak kabul edildi.

3.2. BULGULAR

Bu çalışmada Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı'nda 2010-2015 yıllarında tanısı konmuş ve tedavisi düzenlenmiş, 51 adet larenks karsinomu ve 51 adet kontrol grubu değerlendirilmeye alındı. Olguların yaş ortalaması 64 (38-81) idi. Çalışmamızda kanserli grupta yer alan hastaların tamamı erkek iken, kontrol grubunda yer alan hastaların %47,1'i erkek ve %52,9'u kadındı (Tablo 4).

Tablo 4. Kanserli ve kontrol grubundaki hastaların cinsiyetlerine göre dağılımı

		n	%
Kanserli Grup	Erkek	51	100,0
	Kadın	-	-
Kontrol Grubu	Erkek	24	47,1
	Kadın	27	52,9

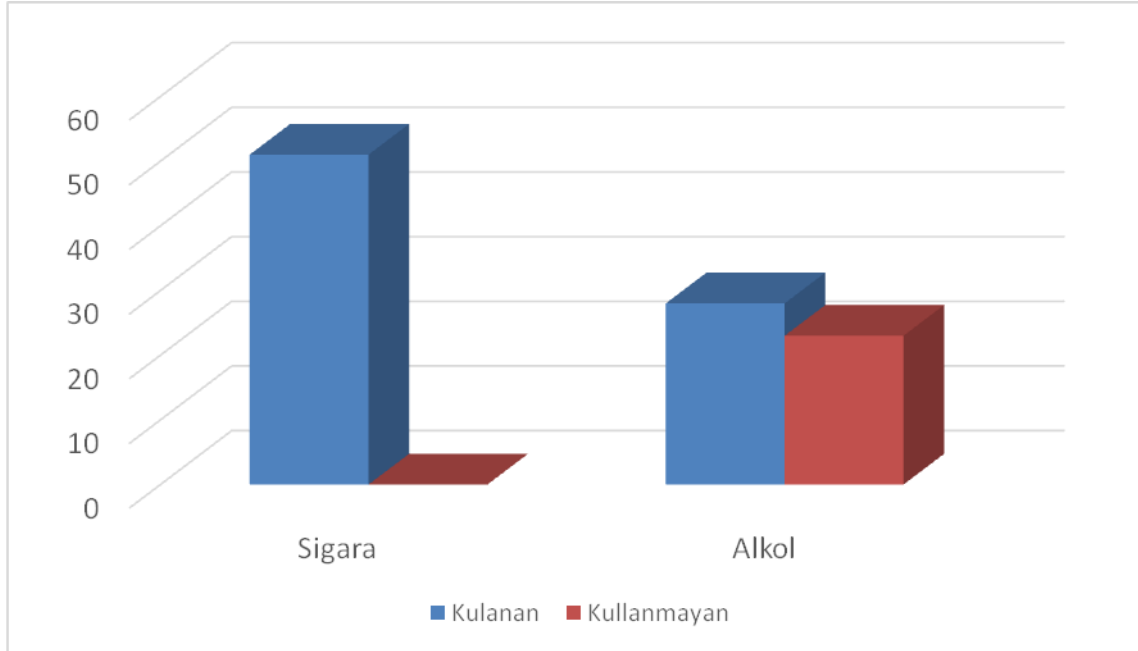


Şekil 13. Cinsiyet durumuna göre hasta ve kontrol grubunun dağılımı

Çalışmamızda kanserli grupta yer alan hastaların tamamı sigara kullanmaktaydı. 28 hastada(%54) alkol kullanımını mevcutken 23 hastada (%46) alkol kullanım öyküsü yoktu (Tablo 5).

Tablo 5. Kanserli gruptaki hastaların sigara ve alkol kullanma durumlarına göre dağılım

		n	%
Sigara	Kullanıyor	51	100
	Kullanmıyor	-	-
Alkol	Kullanıyor	28	54
	Kullanmıyor	23	46



Şekil 14. Kanserli hastalarda sigara ve alkol kullanımı

Çalışmamızda sigara kullanan kontrol grubu hastalarının MN ortalamaları 13,4 iken, sigara kullanmayan hastalarda Mn ortalaması 15,5 olarak hesaplanmış olup ortalamalar arasındaki fark 0,05 önem düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Sigara kullanan kontrol grubu hastalarının NPB ortalamaları 0,15 iken, sigara kullanmayan hastalarda 0,75 olarak hesaplanmış olup ortalamalar arasındaki fark 0,05 önem düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Sigara kullanan kontrol grubu

hastalarının NBUDS görülmezken, sigara kullanmayan hastalarda 0,08 olarak hesaplanmış olup ortalamalar arasındaki fark 0,05 önem düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 6).

Tablo 6. Kontrol grubunda yer alan hastaların sigara kullanma durumlarına göre MN, NPB ve NBUDS değerlerinin karşılaştırılması

		Sigara	N	Ortalama±SS	p
Sigara Kullanımı	MN	Kullanıyor	39	13,44 ±3,17	0,27
		Kullanmıyor	12	15,50 ±6,08	
	NPB	Kullanıyor	39	0,15± 0,43	0,14
		Kullanmıyor	12	0,75 ±1,28	
	NBUDS	Kullanıyor	39	0,00	0,33
		Kullanmıyor	12	0,08 ± 0,29	

Çalışmamızda kanserli hastaların %35,3'ü riskli meslek gruplarından (Çiftçi, marangoz, kahveci, ormancı, fırıncı, boyacı vb.), %64,7'si risksiz kabul edilen meslek gruplarındandı (Memur,aşçı, vb.). Kanserli hastaların %47,1'i pestisit ile temas ederken, %52,9'u ise pestisite maruz kalmamaktadır. Kanserli hastaların 26'sı(%51) kırsal alanda yaşarken 25'i(%49) kentte yaşamaktadır (Tablo 7).

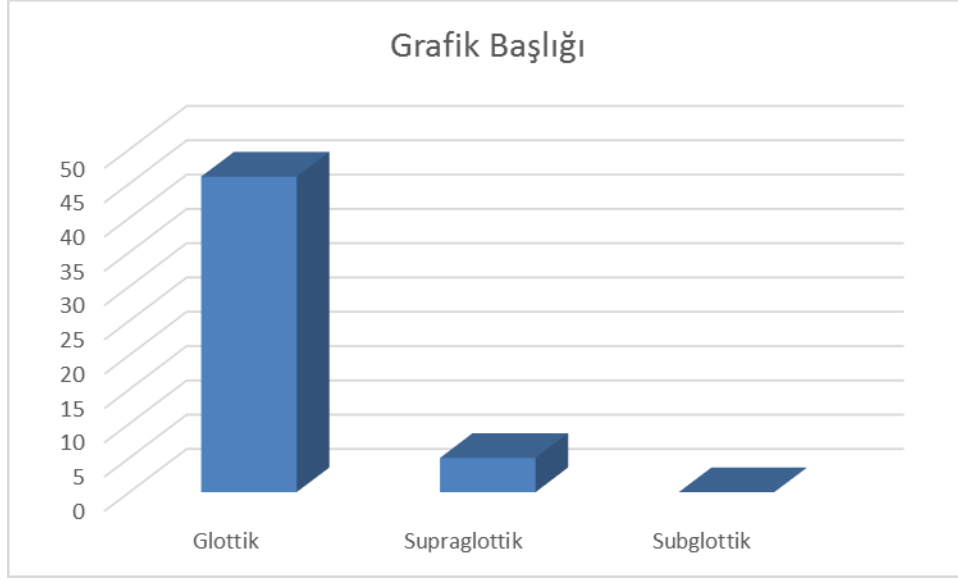
Tablo 7. Kanserli Hastalara İlişkin Bilgiler

Kanserli Grup		n(sayı)	%
Meslek	Riskli Meslek Grupları	18	35,3
	Risksiz Meslek Grupları	33	64,7
Pestisit	Var	24	47,1
	Yok	27	52,9
Kırsal Hayat	Var	26	51,0
	Yok	25	49,0

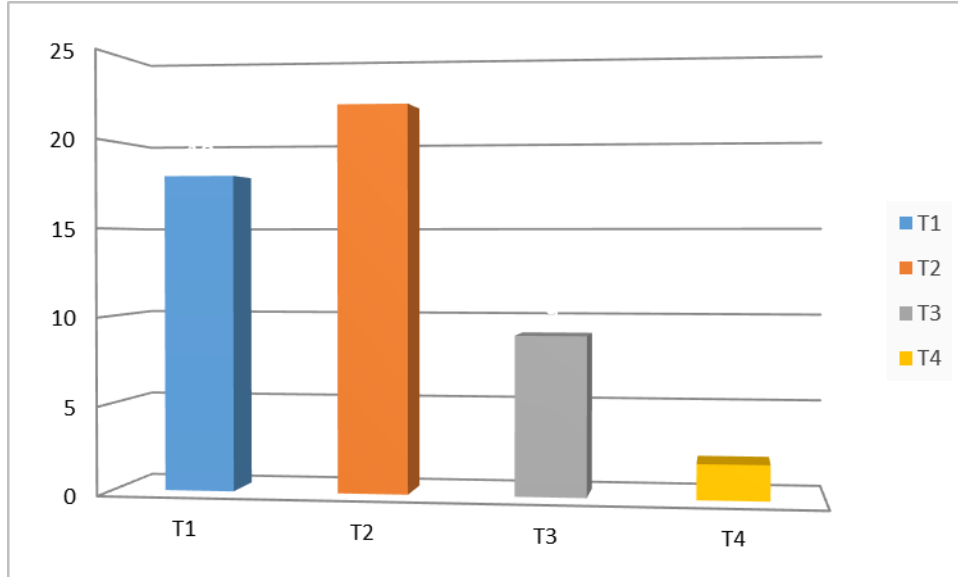
Çalışmamızda hastaların %35,3'ü T1, %43,1'i T2, %17,6'sı T3, %3,9'u ise T4 evresindedir. Tümör yeri incelemesinde hastaların %90,2'sinde glottik, %9,8'inde supraglottik tümör saptanmıştır. Kanserli hastaların %11,8'ine total larenjektomi, %45,1'ine parsiyel, %39,2'sine mikrolarengoskopik cerrahi uygulanırken %3,9'una herhangi bir cerrahi müdahale yapılmamış, radyoterapi uygulanmıştır. Kanserli hastaların %47,1'i radyoterapi alırken, %52,9'u radyoterapi(RT) almadı. %10'u hem radyoterapi hem kemoterapi almıştır. Hastaların %21,6'sında patolojik lenf nodu pozitifliği mevcutken, %78,4'ünde saptanmadı (Tablo 8).

Tablo 8.Kanserli Hastalara İlişkin Bilgiler

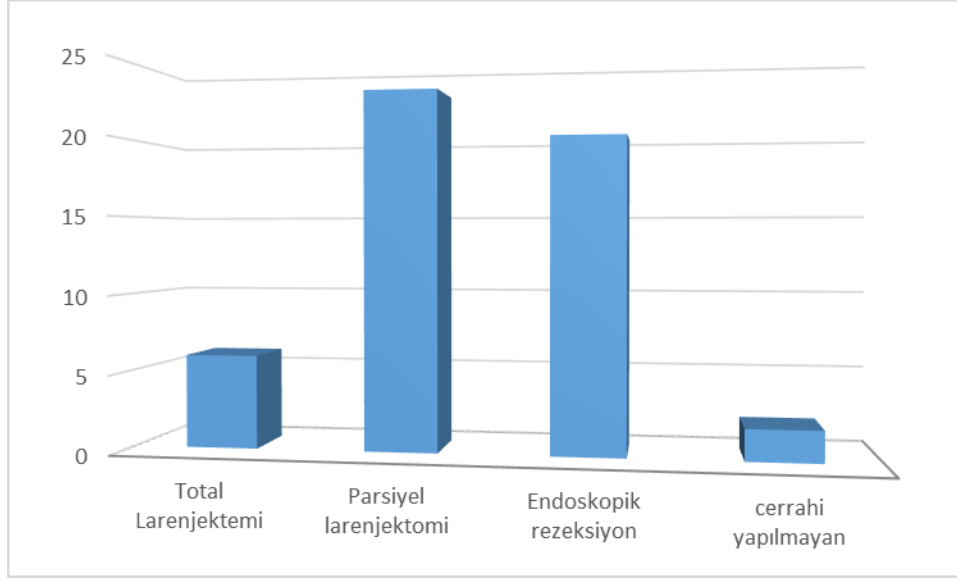
Kanserli Grup		n(sayı)	%
Tümörün Evresi	T1	18	35,3
	T2	22	43,1
	T3	9	17,6
	T4	2	3,9
Tümör Yeri	Glottik	46	90,2
	Supraglottik	5	9,8
Cerrahi	Total Larenjektomi	6	11,8
	Parsiyel	23	45,1
	Endoskopik Rezeksiyon	20	39,2
	Yok	2	3,9
Radyoterapi(RT)	Var	24	47,1
	Yok	22	43,1
RT+KT	Var	5	10
Boyun lenf nodu	Var	11	21,6
	Yok	40	78,4



Şekil 15. Tümörün yerine göre hastaların dağılımı



Şekil 16. Tümör evresine göre hastaların dağılımı



Şekil 17. Cerrahi tedavi şekline göre hastaların dağılımı

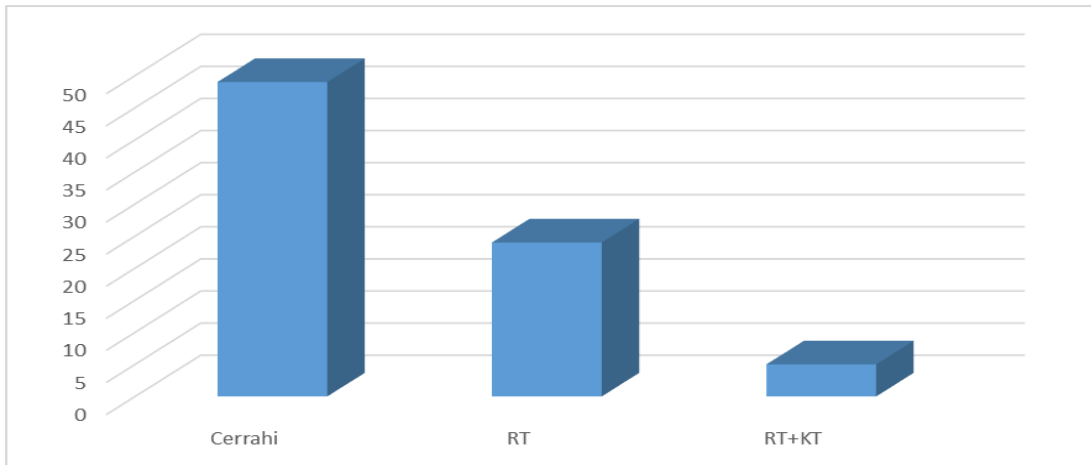
Hastalara uygulanan tedavi incelendiğinde 49'una cerrahi (22'sine sadece cerrahi, 5'ine hem cerrahi hem RT ve/veya KT), 24 hastaya RT (1'ine tek başına ,23'üne cerrahiye ek olarak), 5 hastaya KT ve RT birlikte verildi. 8 hastaya (3'si glottik, 5'i supraglottik) boyun disseksiyonu yapıldı. Hastaların 5'inde (%9,8) nüks görüldü. Bunların 1'inde(%20) lokal nüks, 3'ünde(%60) rejyonel nüks , 1'inde (%20) uzak metastaz(akciğer) görüldü. Nüks görülen 5 hastanın tümörün anatomik yerleşimine göre 3'ü(%60) supraglottik ,2'si(%40) glottik yerleşimliydi. Patolojik diferansiyasyonuna bakıldığında 3'ü (%60) az diferansiye, 2'si(%40) iyi diferansiyeydi. TNM evrelemesine göre 3 hasta T2, 2 hasta T3'dü. Bu hastaların tedavisinde 2'sine total larenjektomi, 2'sine supraglottik larenjektomi, 1'ine vertikal larenjektomi yapılmıştı. 2 hasta(%3,9) klinik takipleri devam ederken eks oldu. Eks olan 2 hastanın 1'i akciğere uzak metastaz sonucunda, 1'i dış merkezde radyoterapi tedavisi uygulandığı dönemde eks olmuştur. Eks olan

hastaların tümörün anatomik yerleşimine göre 1'i supraglottik, 1'i glottikti. Nüks görülen 5 hastanın MN,NPB ve NBUD ortalamaları sırası ile 29, 1,2 ve 3'idi ve Nüks görülmeyen hastalarla aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.. Eks olan her iki hastanın pestisite maruziyet öyküsü olup MN değerleri ortalaması 31, NPB değerleri ortalaması 9 ve NBUD değerlerinin ortalaması 15'ti. Eks olan her iki hastanın pestisite maruziyet öyküsü olup MN değerleri ortalaması 31, NPB değerleri ortalaması 9 ve NBUD değerlerinin ortalaması 15'ti.

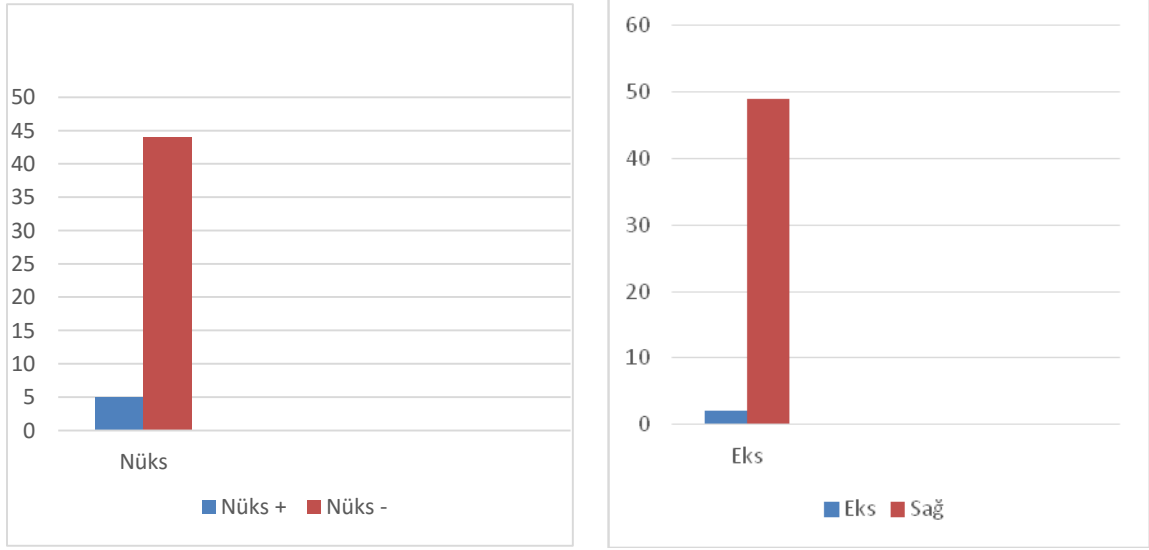
Olguların ortalama sağkalım değeri %96 idi. Tümörlerin anatomik yerleşimine göre sağkalım oranı supraglottik tümörler için %80, glottik tümörler için %90,1 bulundu.

Tablo 9. Kanserli hastalarda Nüks durumuna göre hastaların MN,NPB ve NBUD ortalamaları

Larensk ca	MN	NPB	NBUD
Nüks +	27,2	1,2	3,2
Nüks -	28,5	1,4	3



Şekil 18. Kanserli hastalara uygulanan tedavi yöntemleri



Şekil 19. Kanserli hastalarda nüks ve sağkalım oranları

Çalışmamızda MN, NPB ve N.BUD değerlerinin kanserli grup ve kontrol grubu arasında karşılaştırıldı. Kanserli grupta ortalama MN sayısı 28,1 olarak bulunurken kontrol grubunda bu sayı 13,9 olarak saptandı ve ortalamalar arasında gözlenen matematiksel fark 0,05 önem düzeyinde istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Kanserli grupta ortalama NPB sayısı 1,31 olarak bulunurken kontrol grubunda bu sayı 0,29 olarak saptandı ve ortalamalar arasında gözlenen matematiksel fark 0,05 önem düzeyinde istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Kanserli grupta ortalama NPB sayısı 3,33 olarak bulunurken kontrol grubunda bu sayı 0,02 olarak saptandı ve ortalamalar arasında gözlenen matematiksel fark 0,05 önem düzeyinde istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Tablo 10).

Tablo 10. MN, NPB. ve NBUDS değerlerinin kanserli grup ve kontrol grubu bazında incelenmesi

		N	Ortalama±SS	p
MN	Kanserli grup	51	28,1 ± 15,4	0,00*
	Kontrol grubu	51	13,9 ± 4,07	
NPB	Kanserli grup	51	1,31 ± 2,28	0,004*
	Kontrol grubu	51	0,29 ± 0,75	
NBUDS	Kanserli grup	51	3,33 ± 3,60	0,00**
	Kontrol grubu	51	0,02 ± 0,14	

* Ortalamalar arasındaki fark 0,05 önem düzeyinde anlamlı.

Çalışmamızda kanserli grupta yer alan hastalardan tümör yeri glottik olan hastalarda Mn ortalama değeri 28,74 iken supraglottik olan hastalarda MN ortalama değeri 22,40'dır. Ortalamalar arasındaki matematiksel fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olup tümör yerinin MN ortalaması üzerinde önemli etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Tümör yeri glottik olan hastalarda NPB ortalama değeri 1,43 iken supraglottik olan hastalarda bu ortalama 0,20 olup, ortalamalar arası gözlenen fark 0,05 önem düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Buna göre, tümör yeri glottik olan hastalarda NPB değerleri supraglottik olanlara göre daha yüksekti. Tümör yeri glottik ve supraglottik olan hastaların NBUDS değerleri sırası ile 3,22 ve 4,40 olup ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 11).

Tablo 11. Kanserli grupta yer alan hastaların tümör yerlerine göre MN, NPB. ve NBUD değerlerinin incelenmesi

		N	Ortalama±SS	p
MN	Glottik	46	28,7 ± 7,1	0,38
	Supraglottik	5	22,4 ± 5,72	
NPB	Glottik	46	0,20 ± 0,44	0,004**
	Supraglottik	5	1,43 ± 2,37	
NBUDS	Glottik	46	3,22 ± 3,74	0,26
	Supraglottik	5	4,40 ± 1,81	

** : Ortalamalar arasındaki fark 0,05 önem düzeyinde anlamlı.

T1 olan kanserli hastalarda MN ortalaması 25,17 iken T2 olan hastalarda 28,41, T3 olan hastalarda 33,22 ve T4 olan hastalarda 28,50 olarak elde edilmiş olup ortalamalar arasında gözlenen fark 0,05 önem düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olup tümörün evresinin MN ortalaması üzerinde önemli etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

T1 olan kanserli hastalarda NPB ortalaması 0,50 iken T2 olan hastalarda 1,45, T3 olan hastalarda 1,78 ve T4 olan hastalarda 5,00 olarak elde edilmiş olup ortalamalar arasında gözlenen matematiksel fark 0,05 önem düzeyinde istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Hangi tümör evresinin NPB ortalamaları arasında farka neden olduğunu belirlemek için Post-Hoc testlerinden TUKEY uygulanmış ve tümörün birinci evresinde olan hastalarda NPB değeri T4 evrede olan hastalara göre daha düşük gözlenmiştir.

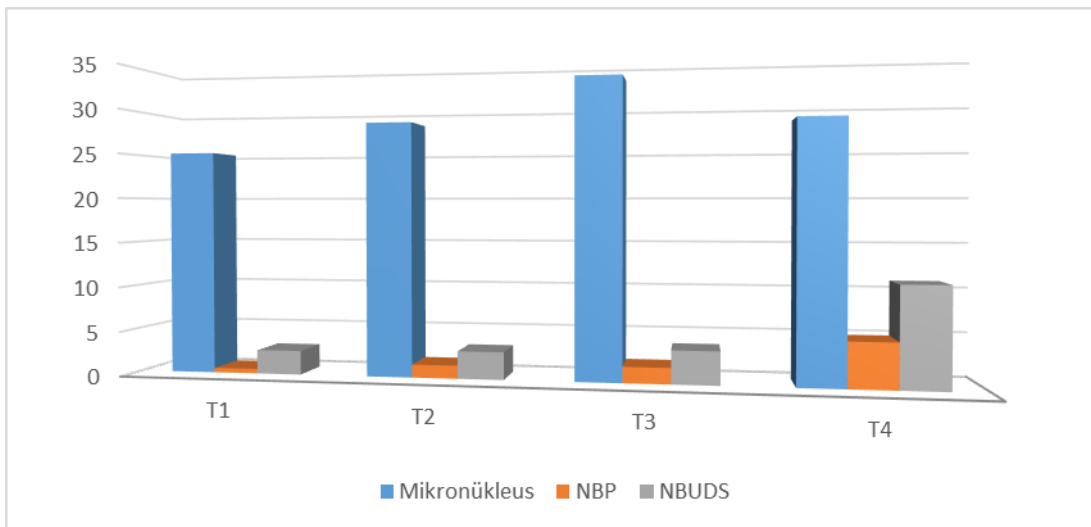
T1 kanserli hastalarda NBUDS ortalaması 2,67 iken T2 olan hastalarda 3,05, T3 olan hastalarda 3,67 ve T4 olan hastalarda 11,00 olarak elde edilmiş olup ortalamalar arasında gözlenen matematiksel fark 0,01 önem düzeyinde istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Hangi tümör evresinin NBUDS ortalamaları arasında farka neden olduğunu belirlemek için Post-Hoc

testlerinden TUKEY uygulanmış ve T4 olan hastalarda NBUDS değerlerinin diğer evredekilere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 12).

Tablo 12. Kanserli grupta yer alan hastaların tümör evrelerine göre MN, NPB ve NBUDS değerlerinin incelenmesi

		N	Ortalama±SS	p
MN	T1	18	25,1 ± 6,98	0,66
	T2	22	28,4 ± 16,1	
	T3	9	33,2 ± 25,5	
	T4	2	28,5 ± 2,12	
NPB	T1	18	0,50 ± 1,09	0,04*
	T2	22	1,45 ± 2,08	
	T3	9	1,78 ± 2,68	
	T4	2	5,0 ± 7,07	
NBUDS	T1	18	2,67±2,54	0,015*
	T2	22	3,05±2,85	
	T3	9	3,67 ± 3,16	
	T4	2	11 ± 12,7	

*Ortalamlar arasındaki fark 0,05 önem düzeyinde anlamlı.



Şekil 20.Tümör evresine göre MN, NPB ve NBUD dağılımı

Çalışmamızda kanserli grupta yer alan 51 hastanın boyun metastazı durumlarına göre MN, NPB. ve NBUDS değerleri karşılaştırıldı. Lenf nodu metastazı olan 11 hastada mikronükleus sayısı 27,17 olarak bulunurken lenf nodu tutulumu olmayan 40 hastada mikronükleus sayısı 28,35 olarak saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi. Lenf nodu metastazı olan 11 hastada NPB sayısı 2,91 olarak bulunurken lenf nodu tutulumu olmayan 40 hastada 0,88 olarak saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi. Lenf nodu metastazı olan 11 hastada NBUDS sayısı 5,73 olarak bulunurken lenf nodu tutulumu olmayan 40 hastada 2,68 olarak saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo 13).

Tablo 13. Kanserli grupta yer alan hastaların boyun metastazı durumlarına göre MN, NPB. ve NBUDS değerlerinin karşılaştırılması

		N	Ortalama ± SS	p
MN	N+	11	27,3 ± 11,6	0,84
	N-	40	28,3 ± 16,4	
NPB	N+	11	2,91 ± 3,75	0,10
	N-	40	0,88 ± 1,47	
NBUDS	N+	11	5,73 ± 5,95	0,12
	N-	40	2,68 ± 2,35	

Çalışmamızda kanserli grupta yer alan hastaların radyoterapi alma durumlarına göre MN, NPB. ve NBUDS değerlerini karşılaştırdık. MN sayısı radyoterapi alan grupta ortalama 32,79 olup radyoterapi almayan grupta 23,96 olarak saptandı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. NPB, radyoterapi alan grupta ortalama 1,88 olup radyoterapi almayan grupta 0,81 olarak saptandı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Nükleer BUDS sayısı radyoterapi alan grupta ortalama 4,13 olup radyoterapi almayan grupta 2,63 olarak tespit edildi ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 14).

Tablo 14. Kanserli grupta yer alan hastaların radyoterapi alma durumlarına göre MN, NPB. ve NBUDS değerlerinin incelenmesi

		N	Ortalama ± SS	p
MN	Var	24	32,7 ± 20,6	0,06
	Yok	27	23,9 ± 6,5	
NPB	Var	24	1,8 ± 2,8	0,11
	Yok	27	0,8 ± 1,4	
NBUDS	Var	24	4,13 ± 4,52	0,14
	Yok	27	2,63 ± 2,41	

Çalışmamızda kanserli grupta yer alan hastaların kırsal alan yaşantısı olup olmadığına göre MN, NPB ve NBUDS değerleri incelendi. Kırsal alanda yaşayanlarda mikronükleus değeri 35,88 iken olmayanlarda 20,04 olarak tespit edildi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Kırsal alanda yaşayanlarda NPB değeri 1,92 bulunurken olmayanlarda 0,68 olarak tespit edildi ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı. Kırsal alanda yaşayanlarda NBUDS değeri 4,5 iken olmayanlarda 2,12 olarak saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 15).

Tablo 15. Kanserli grupta yer alan hastaların kırsal yaşantısı olup olmadığına göre MN, NPB ve NBUDS değerlerinin incelenmesi

	Kırsal	N	Ortalama±SS	p
MN	Var	26	35,8 ± 17,6	0,00*
	Yok	25	20,1 ± 6,1	
NPB	Var	26	1,92 ± 2,77	0,50
	Yok	25	0,68 ± 1,43	
NBUDS	Var	26	4,50 ± 4,5	0,017*
	Yok	25	2,12 ± 1,76	

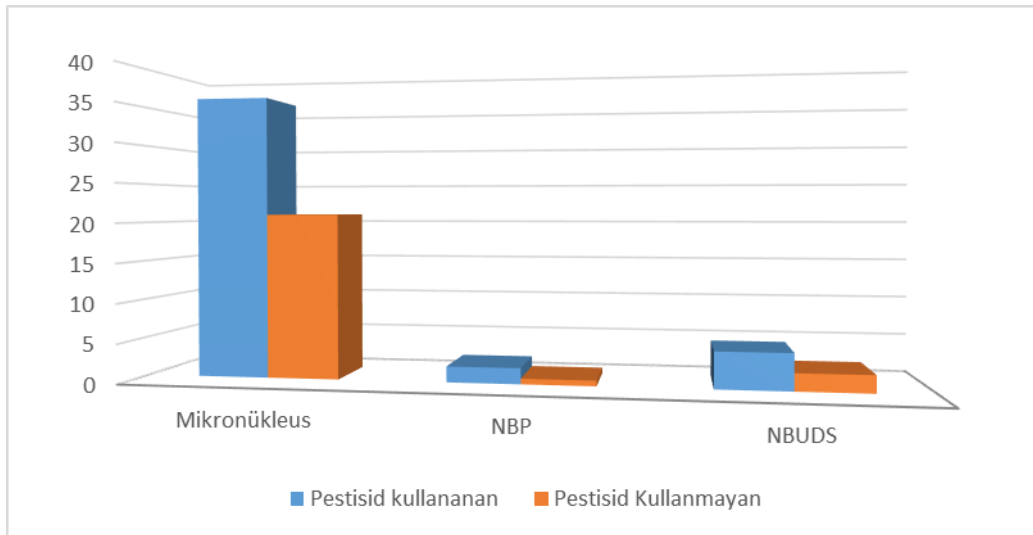
* Ortalamalar arasındaki fark 0,05 önem düzeyinde anlamlı.

Çalışmamızda kanserli grupta yer alan hastalardan tarım ilacı kullananlarda MN ortalama değeri 36,00 iken tarım ilacı kullanmayanlarda MN ortalama değeri 21,11'dir. Ortalamalar arasındaki matematiksel fark istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuş olup pestisit kullananlarda MN ortalaması daha yüksektir ($p < 0,05$). Pestisit kullanan ve kullanmayan kanserli hastaların NPB değerleri sırası ile 1,92 ve 0,78 olup ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). Kanserli grupta yer alan hastalardan tarım ilacı kullananlarda NBUD ortalama değeri 4,63 iken tarım ilacı kullanmayanlarda NBUD ortalama değeri 2,19'dur. Ortalamalar arasındaki matematiksel fark istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuş olup tarım ilacı kullananlarda NBUD ortalaması daha yüksektir (Tablo 16).

Tablo 16. Kanserli grupta yer alan hastaların tarım ilacı kullanma durumlarına göre MN, NPB. ve N.BUDS değerlerinin incelenmesi

	Pestisit maruziyeti	n	Ortalama±SS	p
MN	Var	24	36,0 ± 17,7	0,00*
	Yok	27	21,1 ± 8,4	
NPB	Var	24	1,92 ± 2,82	0,09
	Yok	27	0,78 ± 1,52	
NBUDS	Var	24	4,63 ± 4,61	0,02*
	Yok	27	2,19 ± 1,81	

* Ortalamalar arasındaki fark 0,05 önem düzeyinde anlamlı.



Şekil 20. Pestisit kullanan ve kullanmayan grupta MN, NPB ve NBUDS değerlerinin karşılaştırılması

5.TARTIŞMA

Larenks kanserleri en sık görülen baş boyun kanseridir. Primer korunma zararlı davranış ve çevreden kaçınarak kolayca gerçekleştirilebilir. Ancak her larenks kanserli hastada önceden bilinebilen risk faktörleri veya klinik olarak tanı konulmuş prekanseröz lezyonlar mevcut olmayabilir. Karsinojene maruz kalma ile invaziv kanser oluşana kadar geçen süre içinde riskli mukozada oluşan değişiklikler, klinik bulgu vermeden önce, tümör belirleyicileri ile erkenden saptanabilir. Moleküler ve immunohistokimyasal tümör belirleçleri larenks kanseri riski taşıyan hastaların ve larenks mukozasının risk taşıyan alanlarının belirlenmesinde yardımcı olur. Marker'lar ve sitogenetik çalışmalar kanser önleyici tedavide hangi ilaçlarla hangi hedeflere yöneleceğimizi de gösterir (91).

Larenks kanserinde tümörün davranışı hakkındaki öngörüü ve uygulanacak tedavi şeklini , lezyonun yerleşim yeri ve metastazlarını gösteren TNM evreleme sistemi ile histolojik derecelendirme sistemi yönlendirmektedir. Ancak aynı yaş grubunda, lokalizasyonu aynı olan ve tedavi girişimleri benzer hastalardaki sonuç farklılıkları, bu sistemlerin bazı yetersizlikleri olduğunu göstermektedir. Ayrıca kemoterapi, radyoterapi ve konservatif cerrahideki gelişmeler, larenks kanserli hastanın yaşam kalitesini önemli ölçüde yükseltmekle birlikte sağkalım süresini fazla etkilememiştir. Bu nedenlerle larenks kanserine klinik yaklaşımda yenilikler gerekmektedir. Bu da çalışmaları yeni prognostik faktörler araştırmaya yöneltmiştir. Prognostik belirteç çalışmaları, kanser önleyici tedaviye katkılarının yanısıra tümör ve konakçının biyolojik davranışları ile ilgili veriler sağlayarak en uygun tedavinin sunulmasını amaçlar (91). Örneğin, erken evre larenks kanserinde tümörün radyorezistans derecesi 'marker'çalışmaları ile önceden belirlenerek ve çeşitli ilaçlarla artırılarak, larenjektomi gibi hasta yaşamını çok zorlaştıran bir operasyon önlenebilir (92).

Larenks kanseri, nükslerin ve sekonder primer kanserlerin sık görüldüğü bir hastalıktır. Bu durum 'alan kanserizasyonu' teorisiyle açıklanmaktadır. Prognostik belirteçler, tümör rekürrensi ve oluşabilecek sekonder kanserleri de önceden tahmin ederek tedavi etme şansını verebilir.

Etyopatogeneizde sigara bağımlılığının en sık görülen bağımsız risk

faktörü olduğu bilinmektedir. Agudelo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sigara bağımlılığı olan hastalarda larenks kanser sıklığının daha fazla olduğu ve progresyonunun daha hızlı olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da larenks kanserli hastaların tamamının sigara öyküsü mevcuttu. 51 hastadan oluşan kontrol grubunda ise sigara kullanan 39 hasta ile kullanmayan 12 hasta bulunmaktaydı. Bu hastaların MN, NPB ve NBUDS değerleri incelendi ve kontrol grubunda sigara kullanan hastalarla kullanmayan hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Larenks kanseri en sık 5-7. dekadlar arasında görülmektedir . Ortalama yaş 59-60 arası bulunmuştur. Bizim çalışmamızda olguların yaşları 38 ile 81 arasında değişmekte olup ortalama yaş 64 olarak görüldü.

Yapılan çalışmalarda larenks kanserli hastaların cinsiyete göre görülme sıklığı erkeklerde %90,6-%97,7 arasında, kadınlarda ise %2,3-%9,4 arasındadır. Bir başka çalışmada ise batı hemisferde yaklaşık erkekler için insidans 9/100.000, bayanlarda ise 1,5/100.000'dir . Bizim çalışmamızda ise olguların tamamı erkekti.

Nordgren ve arkadaşları , tümör yerleşimini anatomik olarak larenkste % 72,09 glottik, %27,9 supraglottik olarak belirtmişler. Weinstein ve ark. , %84 glottik, %16 supraglottik kanser saptamışlardır. Cordes ve arkadaşları supraglottik (41.5%), glottik (50.9%) ve subglottik (5.7%)kanser saptamışlardır. Olgularımızın histopatolojik incelemesinde tümör bölgesine göre dağılımlara bakıldığında; Tümör yeri incelemesinde hastaların %90,2'sinde glottik, %9,8'inde supraglottik tümör görülürken, subglottik yerleşimli tümörü olan hasta yoktu. Tüm bu araştırmaların sonuçlarında da görüldüğü gibi, en fazla glottik, daha sonra supraglottik, en az sıklıkla da subglottik tümörler saptanmıştır.

Taş ve ark. (93), çalışmasında tümörlerin patolojik evrenmesinde yaklaşık yarısı erken evre(T1-T2) iken, diğer yarısı geç evre (T3-T4)'di. Finizia ve ark. (94), çalışmasında ise %17,8'i T1, %35,7'si T2, %32,1'i T3, %14,2'si T4 olduğu saptanmıştır. Weinstein ve ark (95) çalışmasında ise %6'sı T1, %48'i T2, %23'ü T3, %23'ü T4 olarak bildirildi. Bizim çalışmamızda ise olguların patolojik evrelendirilmesinde . Hastaların %35,3'ü tümörün 1'nci evresinde, %43,1'i 2'nci evresinde, %17,6'sı 3'üncü evresinde, %3,9'u ise 4'üncü evresinde tespit

edilmişlerdir. Literatürden farklı olarak bizim çalışmamızda tümörlerin %78,4'ü erken evre tümörler (T1-T2), % 21,6'sı ileri evre tümörler (T3-T4) olarak görüldü.

Lenf nodu metastaz varlığının baş boyun bölgesi tümörleri için en önemli bağımsız prognostik faktör olduğu bilinmektedir (96,97). Servikal LN'u metastazı olan olgularda 5 yıllık sağkalım oranını % 50 oranında azalmaktadır. Baş boyun kanserli hastalarda LN metastazının preoperatif saptanması etkili tedavinin yapılabilmesi için kritik öneme sahiptir. Primer tümörün boyutları, invazyon derinliği LN metastazı varlığı açısından her zaman belirleyici değildir. Primer tümörü çok küçük olan hastalarda da yaygın LN metastazı görülebilmektedir (96). Bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntülemesi, ultrasonografi, pozitron emisyon tomografisi ve ultrasound eşliğinde ince iğne aspirasyonu gibi yeni gelişen teknikler kullanıldığında bile mikroskopik gizli, metastazların saptanması % 80 duyarlılıkta başarılabilir (98,99). Bu nedenle LN metastazlarının saptanması için moleküler belirleyicilere olan ilgi artmıştır. Bizim çalışmamızda kanserli hastaların 11'inde(%21,6) boyun metastazı varken, %78,4'ünde boyun metastazı olmadığı görüldü. Boynun patolojik lenf nodunun değerlendirilmesinde 11 (%100) hastada N1 iken , hiçbir hastada N2 ve N3 yoktu.

Kazkayası ve arkadaşlarının (100) yaptığı çalışmada 27 larenks karsinomu olgularının tedavisi sonucunda ortalama hasta takipleri 13,2 ay olup, bu süre zarfında 4(%14,8) hastaları eks olmuştur. Ortalama sağkalım oranı %86,2'idi. Li ve arkadaşlarının 64 larenks karsinomlu olgusunda tedavi sonrası 5 yıllık takiplerinde 27 (%42) hasta eks olmuştur (101). 5 yıllık ortalama sağkalım oranını %58 bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda olguların tedavi sonrasında ortalama takip süresi 23,2 ay idi. 1 hasta (%1,9) klinik takipleri devam ederken eks oldu. Ortalama sağkalım ise %98,1' idi.

Tümör evresi, anatomik lokalizasyonu, histolojik diferansiyasyonu ve boyunda metastaz varlığı larenks kanserleri için genel prognostik faktörler olarak düşünülmele birlikte özellikle boyun metastazı varlığı kötü prognoz

göstergesi olarak kabul edilmektedir. Ancak benzer histopatolojik tanı, grade ve evresi olan tümörlerde dahi farklı tümör davranışları gözlemlenebilmesi farklı prognostik faktörlerin araştırılmasına ve yeni moleküler çalışmaların yapılmasına yönlendirmektedir. Hastalara uygulanan tedavinin belirlenmesi, nüks faktörlerinin ortaya konması giderek önem kazanmaktadır. Birçok genetik faktörün tümör gelişimi konusunda sorumlu olduğu bilinmektedir. Tümör gelişimi; tümör supresor genler ve proto-onkogenler'deki genetik bozukluklar arasında oldukça sıkı ilişki bulunmuştur (102). Baş boyun bölgesindeki bir çok tümörde bu genetik faktörler araştırılmış ve bu faktörlerin tümör prognozu üzerine etkileri incelenmiştir. Bizim çalışmamızda Hastaların 5'inde (%9,8) nüks görüldü. Bunların 1'inde(%20) lokal nüks, 3'ünde(%60) rejyonel nüks , 1'inde (%20) uzak metastaz(akciğer) görüldü. Nüks görülen 5 hastanın tümörün anatomik yerleşimine göre 3'ü(%60) supraglottik ,2'si(%40) glottik yerleşimliydi. Bu hastaların tedavisinde 2'sine total larenjektomi, 2'sine supraglottik larenjektomi, 1'ine vertikal larenjektomi yapılmıştı. 2 hasta(%3,9) klinik takipleri devam ederken eks oldu. Eks olan 2 hastanın 1'i(%50) uzak metastaz(akciğer) sonucunda, 1'i(%50) dış merkezde radyoterapi tedavisi uygulandığı dönemde eks olmuştur. Olguların ortalama sağkalım değeri %96 idi. Tümörlerin anatomik yerleşimine göre sağkalım oranı supraglottik tümörler için %80, glottik tümörler için %90,1 bulundu.

Fiziksel ajanların etkileri deneysel MN çalışmaları yanında, 13 Eylül 1987'de Goiânia'da (Brezilya) meydana gelen radyolojik kazanın genetik materyalde oluşturduğu hasarı belirlemek için kullanıldı. MN sıklığında iyonizan radyasyonun dozuna bağlı çok anlamlı bir artış gözlemlendi ve MN testinin biyolojik dozimetre olarak kullanılması önerildi. Ayrıca Goiânia kazasına maruz kalan insanlardaki sitogenetik değişiklikler iyonizan radyasyon ile yaş ve hayat tarzı (alkol tüketimi, sigara kullanımı) gibi faktörlerin etkisi birlikte ele alınarak değerlendirildi (103). Daha sonra bu konuda yapılan çeşitli araştırmalar iyonizan radyasyonun ve mikro dalga ışınlarının klastojenik etkisini açıkça ortaya koydu ve ayrıca mikro dalga ışınların, anöploidi uyaran bazı kimyasalların, karakteristik mutajen özelliklerine de sahip olduğu gösterildi.

Tarım ile uğraşan ve pestisite maruz kalan insanlarla bu bileşiklere maruz

kalmayan bireyler arasında yapılan karşılaştırmalar, maruz kalan insanlarda, yapısal ve sayısal kromozom aberasyonlar ile kardeş kromatid değişiminin yüksek oranlarda tekrarlandığını göstermektedir. İtalya'da çiçek endüstrisinde çalışan işçilerin, periferal kan kültürlerinde kromozom aberasyonları ve kardeş kromatid değişimleri insidansları üzerine yapılan bir çalışmada, çiçek endüstrisinde çalışan ve pestiside maruz kalan 32 sağlıklı birey, ilerlemiş ve hastanede yatan mesane kanserli 32 birey ve 31 birey kontrol grubu olarak oluşturulmuş, kontrol grubu ile kıyaslandığında kanserli grubun kardeş kromatid değişimi(KKD) frekansları önemli bir ölçüde yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada kromozom anomalileri de araştırılmış, kontrol grubuna göre pestiside maruz kalan sağlıklı bireylerin ve mesane kanserli bireylerin her ikisinde de yapısal kromozom anomalilerin insidanslarının yüksek olduğu gözlenmiştir. Diğer bir çalışmada gruplar, çeşitli günlerde pestisit spreyleyenler ve el ile DDT, BHC malatyon, paratyon, dimethoat, fenitrothin tatbik eden işçilerden oluşturulmuştur. Bunların aralarında günde 8 saat pestisit spreyleyenler bulunmaktadır. Bu araştırmadaki sonuçlara göre, pestisit spreyleyen bireylerde KKD frekansında önemli bir yükselme gözlenmiştir (104). Çalışmamızda pestisid kullanan larengeal kanserli hastalarda kromozom hasarının indirekt göstergeleri olan MN, NPB ve NBUDS görülme sıklığının arttığı görüldü.

Pestisite maruz kalmanın araştırıldığı çalışmalarda genellikle MN frekansında yükselme görülmesi de Meksika'da çiçek yetiştiren bir grubun çalışmasında MN frekansında 2,6 kat artış görülürken tarım pestisit üreten bir fabrikada yapılan araştırmada ise 3,9 kat artış izlenmektedir (105). Eduardo de Stefani ve ark'nın yaptığı çalışmada asbest, güçlü inorganik asitler ve pestisid maruziyetinin (özellikle fungusidlerin) larengeal kanser riskini artırdığı gösterilmiştir. W J Lee ve arkadaşlarının 2004 yılında çiftçiler arasında yaptığı vaka kontrol çalışmasında. Pestisite maruziyetin özefagus ve mide adenokarsinomları ile anlamlı ilişkisinin olmadığı saptandı (106).

N-nitrozo bileşiklerinin güçlü hayvan kanserojen ve birkaç hayvan çalışmasında nazal kavite kanserleri, özefagus ve mide kanserlerine neden olduğu gösterilmiştir. İnsan kanserojen olarak bu bileşiklerin rolü daha az

bilinmektedir. Jakszyn ve Gonzalez son zamanlarda vaka-kontrol ve kohort çalışmalarını ilişkilendirerek sistematik bir inceleme yapmış ve nitrozamin maruziyetinin özefagus ve gastrik kanserler ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Paula Jakszyn ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptığı review çalışmalarında elde edilen kanıtlar Gastrik kanser ile nitrit ve nitrozamin alımı arasında bir ilişki olduğunu desteklemiş fakat kanıtlar özefageal kanser ile ilişkisi karşısında yetersiz kalmıştır (103). Coskun ve arkadaşlarının Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi'nde yaptığı çalışmada pestisite maruz kalan ve kalmayan hastaların MN,NPB ve NBUDS değerleri karşılaştırılmış, 40-60 yaş arası kontrol grubunda ortalama MN değeri 10,25 iken pestisid kullanan grupta 11 olarak bulunmuş. Bizim çalışmamızda kontrol grubunda MN değeri 13,12 olarak bulunmuş olup literatür ile uyumluluk göstermiştir. Coşkun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada NPB ve NBUDS değerleri sırası ile 0,27 ve 0,3 olarak bulunmuş olup bizim çalışmamızda kontrol grubunda NPB ve NBUDS değerleri sırası ile 0,29 ve 0,02 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda kanserli grupta yer alan hastalardan tarım ilacı kullananlarda MN ortalama değeri 36,00 iken tarım ilacı kullanmayan kanserli grupta MN ortalama değeri 21,11'dir. Ortalamalar arasındaki matematiksel fark istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuş olup tarım ilacı kullananlarda MN ortalaması daha yüksektir. Pestisit kullanan ve kullanmayan kanserli hastaların ortalama NPB değeri sırasıyla 1,92 ve 0,78 olup ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kanserli grupta yer alan hastalardan tarım ilacı kullananlarda NBUDS ortalama değeri 4,63 iken tarım ilacı kullanmayanlarda NBUDS. ortalama değeri 2,19'dur. Ortalamalar arasındaki matematiksel fark istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuş olup tarım ilacı kullananlarda NBUDS. ortalaması daha yüksektir.

Yaşam biçimi faktörlerinin araştırıldığı çalışmalarda sadece alkol veya sadece sigara kullanımının MN frekansını belirgin derecede artırmadığı, ancak birlikte kullanıldıklarında sinerjik bir etki oluşturdukları ve MN oranının, her ikisini de kullanmayan bireylere göre 5,5 kat fazla olduğu belirtilmiştir (103).Bizim çalışmamızda kontrol grubunda sigara kullanan ve kullanmayan hastalar

karşılaştırdığında MN sıklığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Kanserli grupta yer alan hastalardan tümör yeri glottik olan hastalarda MN ortalama değeri 28,74 iken supraglottik olan hastalarda MN ortalama değeri 22,40 olup aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Dolayısıyla tümör yerinin MN ortalaması üzerinde önemli etkisinin olmadığı belirlendi. Tümör yeri glottik olan hastalarda NPB ortalama değeri 0,2 iken supraglottikte olan hastalarda bu ortalama 1,43 olup, ortalamalar arası gözlenen fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Buna göre, tümör yeri supraglottik olan hastalarda NPB değerleri supraglottikte olanlara göre daha yüksektir. Bunun da supraglottik kanserlerin daha progresif seyretmesi ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

Radyoterapinin genetik materyal üzerinde olumsuz etkileri mevcuttur. Baz çiftlerinde ve modifikasyonda bozukluklar, Hidrojen ve şeker-fosfat bağlarının kırılması, DNA-DNA veya DNA-protein molekülleri arasında oluşan çapraz bağlanmalar, tek yada çift nükleotid bağlarında kırılmalar, Guanil, timidil ve şeker radikallerin oluşumu. İyonize radyasyon ile en sık oluşan kromozomal hasar tipi kromozom kırıklarıdır. Genetik materyelin yeniden düzenlenmesi, duplikasyon veya delesyona neden olabilir. Çalışmamızda ise radyoterapi alan hastalarla almayan larenks kanserli hastalar arasında MN,NPB ve NBUDS değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı..

SONUÇ

1. Çalışmaya 51 adet larengeal skuamoz hücreli karsinom olgusu ve 51 kontrol grubu olmak üzere toplam 102 hasta dahil edildi.
2. Olguların yaş ortalaması 64 (38-81) idi.
3. Kanserli hasta grubunun tamamı erkekti ve tamamının(%100) sigara öyküsü mevcuttu. Kontrol grubunda yer alan hastaların 39'unda(%76,5) sigara öyküsü mevcutken 12 hasta(%23,5) sigara kullanmıyordu.
5. Tümörlerin yerleşim yerine göre 5'i (%9,8) supraglottik, 46'sı(% 90,2) glottikken, subglottik yerleşimli tümörü olan hasta yoktu.
6. T1 18olguda %35,3,2ü T2 22 olguda %43,1'i ,T3 9 olguda %17,6'sı ,T4 ise 2 olguda (%3,9) izlendi.
7. Kanserli hastaların 6'sına (%11,8) total larenjektomi, 23 hastaya (%45,1) parsiyel, 20'sine (%39,2) mikrolarengoskopik tümör rezeksiyonu operasyonu yapılırken, 2 hastaya(%3,9) herhangi bir cerrahi müdahale uygulanmadı.
- 8.Servikel lenf nodu metastazı 11 hastada saptandı.10 hastada N1 görülürken 1 hasta N2 idi.
- 9.Kanserli hastaların 24'ü(%47,1)'i radyoterapi alırken, 5 hasta hem radyoterapi hem kemoterapi aldı.
10. Hastaların takip süreleri incelendiğinde 2 ay ile 41 ay arasında değişmekte olup ortalama takip süresi 23,2 ay olarak bulundu.
11. Bizim çalışmamızda 5(%10) nüks (5 olgunun 1'inde(%20) lokal nüks, 3'ünde(%60) reyonel nüks, 1'inde (%20) uzak metastaz) gösteren hastanın 2'si(%4) klinik takiplerinde eks oldu.
12. Larenks kanserli hastalarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kromozomal hasarın göstergesi olan MN, NBP ve NBUDS değerlerinde **istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı**. Bu sonuçlar MN,NPB ve NBUDs'un kanser tanısı için güvenle kullanılabilir bir teknik olduğunu ve kanserli olgularda sitolojik hasarın ortaya çıktığını gösterdi.
13. Kanserli grupta yer alan hastalardan pestisit kullanan 24 hastada

kullanmayan 27 hasta ile karşılaştırıldığında MN ve NBUDS değerleri arasındaki fark **istatistiksel olarak anlamlı bulundu**. NPB ortalama değerleri karşılaştırıldığında ise aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. O halde pestisit kullanan olgularda kromozom hasarı saptanmış olup MN ve NBUDS değerleri kanser gelişimini ortaya koyabilir. Bu çalışmanın ortaya koyduğu en önemli sonuç sigara kullanımı gibi pestisit kullanımının da sitogenetik değişikliğe neden olduğu ve ayrıca kansere yol açtığı yönünde olmuştur.

KAYNAKLAR

1. Attar, E., Dey, S., Hablas, A., Ramadan, M., Rozek, L., Head and neck cancer in a developing country: A population-based perspective across 8 years. *Oral Oncology* 46 (2010) 591–596
2. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*, 2000; 455: 81-95.
3. Mahmut Coskun, Munevver Coskun, Akin Cayir, Ozturk Ozdemir Frequencies of micronuclei(MNi), nucleoplasmic bridges(NPBs) and nuclear buds(NBUDs) in farmers exposed to pesticides in Canakkale, Turkey, 2010
4. Beasley, NJP , Gullane PJ. Cancer of larynx, paranasal sinuses and temporal bone. Chapter 27: Essential Otolaryngology. Ed.: K.J. Lee. Mc GrawHill Medical Publishing Company, 2003
5. Gallus S, Bosetti C, Franceschi S et al. Laryngeal cancer in women: tobacco, alcohol, nutritional and hormonal factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003 June; 12(6):514-7.
6. Lipkin A, Miller RH, Woodson GE. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, pharynx, and larynx in young adults. *Laryngoscope*. 1985 Jul; 95(7 Pt 1):790-3.
7. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı; sayfa 26, 2010
8. Cardesa A. Malignant epithelial tumours of larynx. Baş Boyun Patolojisi Kursu, İstanbul, 2003: 6-9.
9. Rosai J. Respiratory tract. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Volume 1. 9 th ed. Elsevier, China, 2004: 335-359.
10. Wunsch Filho V. The epidemiology of laryngeal cancer in Brazil. *Sao Paulo Med J*. 2004 Sep 2; 122(5):188-94.
11. Dosemeci M, Gokmen I, Unsal M et al. Tobacco, alcohol use, and risks of laryngeal and lung cancer by subsite and histologic type in Turkey. *Cancer Causes Control* 1997; 8:729-37.
12. Tomek MS, McGuirt WF. Second head and neck cancers and tobacco usage. *J Otolaryngol*. 2003 Jan-Feb; 24(1):24-7.

13. Agudelo D, Quer M, Leon X, Diez S, Burgues J. Laryngeal carcinoma in patients without a history of tobacco and alcohol use. *Head Neck*. 1997 May;19(3):200-4.
14. To-Figueras J, Gene M, Gomez-Catalan J, Pique E, Borrego N, Caballero M, Cruellas F, Raya A, Dicenta M, Corbella J. Microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase polymorphisms in relation to laryngeal carcinoma risk. *Cancer Lett*. 2002 Dec 10;187(1-2):95-101.
15. Menvielle G, Luce D, Goldberg P, Bugel I, Leclerc A. Smoking, alcohol drinking and cancer risk for various sites of the larynx and hypopharynx. A case-control study in France. *Eur J Cancer Prev*. 2004 Jun;13(3):165-72.
16. Bosetti C, Gallus S, Franceschi S, Levi F et al. Cancer of the larynx in non-smoking alcohol drinkers and in non-drinking tobacco smokers. *Br J Cancer*. 2002 Aug 27;87(5):516-8.
17. Gallus S, Bosetti C, Franceschi S et al. Laryngeal cancer in women: tobacco, alcohol, nutritional and hormonal factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003 June; 12(6):514-7.
18. Lajtman Z, Nosso D, Romic Z, Trutin-Ostovic K, Krpan D. Laryngeal cancer and blood selenium levels. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1994;251(3):170-2.
19. Du J, Chen GG, Vlantis AC, Chan PK, Tsang RK, van Hasselt CA. Resistance to apoptosis of HPV 16-infected laryngeal cancer cells is associated with decreased Bak and increased Bcl-2 expression. *Cancer Lett*. 2004 Mar 8;205(1):81-8.
20. Major T, Szarka K, Sziklai I, Gergely L, Czegledy J. The characteristics of human papillomavirus DNA in head and neck cancers and papillomas. *J Clin Pathol*. 2005 Jan;58(1):515.
21. Almadori G, Cadoni G, Cattani P, Gali J, Busu F, Ferrandina G, Scambia G, Fadda G, Maurizi M. Human papillomavirus infection and epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3988-93.

22. Gao X, Fisher SG, Mohideen N, Emami B. Second primary cancers in patients with laryngeal cancer: a population-based study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003 Jun 1;56(2):427-35. Wunsch Filho V. The epidemiology of laryngeal cancer in Brazil. *Sao Paulo Med J.* 2004 Sep 2;122(5):188-94.
23. Dagli S, Dagli U, Kurtaran H, Alkim C, Sahin B. Laryngopharyngeal reflux in laryngeal cancer. *Turk J Gastroenterol.* 2004 Jun;15(2):77-81.
24. El-Serag HB, Hepworth EJ, Lee P, Sonnenberg A. Gastroesophageal reflux disease is a risk factor for laryngeal and pharyngeal cancer. *Am J Gastroenterol.* 2001 Jul;96(7):2013-8.
25. Sas-Korczynska B, Korzeniowski S, Skolyszewski J. Cancer of the larynx in females. *Cancer Radiother.* 2003 Dec;7(6):380-5.
26. Monteiro E, Varzim G, Pires AM, Teixeira M, Lopes C. Cyclin D1 A870G polymorphism and amplification in laryngeal squamous cell carcinoma: implications of tumor localization and tobacco exposure. *Cancer Detect Prev.* 2004;28(4):237-43.
27. ROSAI, J., Larynx and trachea. *Surgical Pathology*; 2004. . 305-358.
28. Yazıcıoğlu E. Larenksin malign neoplazmaları. In *Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi*. Ed. Çelik O. Turgut Yayıncılık ve tic AŞ. Şişli, İstanbul. 2002. 659-666.
29. Kaya S. Larenksin anatomisi ve fizyolojisi. *Larenks Hastalıkları*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi. 2002; Bölüm 1,2:s:19-75..
30. Cummings W Charles, et al. *Cummings Otolaryngology Head and Neck Surgery* (4th ed). Philadelphia. Elsevier mosby. 2005;pp:1823- 1834
31. Remacle, M., Eckel, H, E., Antonelli, A., Endoscopic cordectomy. Approposal for a classification by working comittee. European Laryngological Society. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000; 257:227-231
32. Becker, M., Zbaren, P., Laeng , H., Neoplastic invasion of laryngeal cartilage: comprasion of MR imaging, CT with histopathologic correlation. *Radiology* 1995 Mar;194(3):661-9
33. Haydaroğlu, A., Bölükbaşı, Y., Özşaran, Z., Analysis of cancer registration data in Ege University: evaluation of 34134 cases 2007;22(1):22-28

- 34.Koç, C., Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi 1. Baskı Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti, 2003: 1183-1216
- 35.Başerer, N., Larenks malign neoplazmlarında tedavi. İç: Çelik O, ed. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi Turgut Yay İstanbul 2002;667–683
36. Hoffman HT, Buatti J. Update on the endoscopic management of laryngeal cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surgery*. 2004 Dec;12(6):525–531
- 37.Erişen L, Yerci Ö, Yalçinkaya U, Koçer N, Albayram S, Engin K, Aran M, Öz F. Baş- boyun kanserlerinde boyuna yaklaşım. İç: Engin K, Erişen L, editör. Baş Boyun Kanserleri Nobel Tıp Kitabevleri İstanbul 2003;437–502
- 38.Frederick, L., Greene, J., *AJCC Cancer Staging Atlas 6th ed.* Chicago: Springer, 2006
- 39.Barthel SW,Esclamado RM:Primary radiation therapy for early glottic cancer.*Otolaryngology Headand Neck Surgery* 2001;124;35-9.
- 40.Scola, B., Fernandez , M., Martinez, T., Management of cancer of the supraglottis.*Otolaryngology head and neck surgery* 2001;124(2):195-8
- 41.Gourin CG, Conger BT,Sheils C,et al; The effect of treatment on survival in patients with advanced laryngeal carcinoma.*Laryngoscope* 2009; 119:1312-1317
- 42.Santoro , R., Turelli, M., Polli, G., Primary carcinoma of the subglottic larynx.*Eur Arch Otorhinolaryngology* 2000;257.548
43. Barry, B, L., Dennis, A., *Medical Oncology & Principles of Cancer Biology Chapter 1*
44. Merlo, L, M., Pepper, J, W., Reid, B, J., (2006).Cancer as an evolutionary and ecological process.*Nat Rev Cancer* 6: 924-935.
- 45.Oliver, M., Petitjean, A., Marcel, V., Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther Advance online yayınları* 19 September 2008. DOI: 10.1038/cgt.2008.69.
- 46.Herceg, Z., Hainut P., (2007). Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis *Molecular Oncology* 1: 26-4
- 47.Loeb, L, A., Bielas, J, H., Beckman, R, A., (2008). Cancers exhibit a mutator

- phenotype: clinical implications *Cancer Res* 68: 3551-3557.
48. Ornstein, D, K., Kang, J., (2001). How to improve prostate biopsy detection of prostate cancer (Prostst kanserinin prostat biyopsisiyle saptanmasının geliştirilmesi). *Curr Urol Rep* 2: 218-223.
49. Ito, K., Yamamoto, T., Ohi, M., (2003). Natural history of PSA increase with and without prostate cancer (Prostat kanseri olan ve olmayan PSA artışının doğal geçmisi). *Urology* 62: 64-69.
50. Li J, Zhang, Z., Rosenweigh, J., (2002). Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer (Meme kanserinin saptanmasında serum biyomarkerlerinin tanımlanmasına yönelik proteomi ve biyoinformatik yaklaşımlar). *Clin Chem* 48: 1296-1304.
51. Piccart-Gebhart, M, J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1659-1672, 2005.
52. Cotran, R, S., Kumar, V., Collins, T. Robbins Pathologic Basis of Disease. 6 th Ed., Philadelphia, 1999.
53. Tsakonas, A., Matthiew, D., Notch signaling: cell fate control and signal development, *Science* 1999;284:770-777.
54. Frenette, P, S., Denisa, D., Wagner, D, D., Adhesion molecules-Part I, *N Engl J Med* 1996;334:1527-9.
55. Holtfreter, J., Significance of the cell membrane in embrionic processes, *Ann NY Acad Sci* 1948;49:709-60.
56. Behrens, J., Cadherins as determinants of tissuemorphology and supressors of invasion, *Acta Anat (Basel)* 1994;149:165-9
57. Alattia, J, R., Tong , K, I., Takeichi, M., Ikura, M., Cadherins, *Methods Molecular Biology* 2002;172:199-210.
58. Brown, D, C., Gatter, K, C., Monoclonal antibody KI-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990;17:489-503.
59. Wilson, G, D., Saunders, M, I., Dische, S., Daley, F, M., Robunson, B, M., Direct comparison of bromodeoxyuridine and Ki-67 labelling indices in human tumors. *Cell Prolif* 1996;29:141-52

60. Scholzen, T., Gerdes, J., The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *Journal of Cellular Physiology* 2000; 182: 311-322.
61. Kropveld A, Slootweg PJ, Blankenstein MA, Terhaard CH, Hordijk GJ. Ki-67 and p53 in T2 laryngeal cancer. *Laryngoscope* 1998; 108: 1548-1552.
62. Fairbanks, Daniel J. *Relics of Eden: The Powerful Evidence of Evolution in Human DNA*. New York: Prometheus Books, 2007. 28-29.
63. Demirel S, Zamani A. MN tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 2002; 12(3): 123-7.
64. Yırtıcı Ü. Tartrazinin *Cyprinus carpio*'daki genotoksik etkisinin MN yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
65. Widel M, Kolosza Z, Jedrus S, Lukaszczyk B, RaczekZwierzycka K, Swierniak A. Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis. *Int J Radiat Biol*, 2001; 77: 631-6.
66. Choy WN. 2001. Genetic toxicology and cancer risk assessment. New York: Marcel Dekker, 2001: 163-86.
67. Olaharski A, Sotelo R, Solorza-Luna G, Gonsebatt ME, Guzman P, Mohar A et al. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2006; 27: 3317-43.
68. Wang Y, Hopwood VL, Hu P, Lennon A, Osterberger J, Glassman A. Determination of secondary chromosomal aberrations of chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004; 153: 53-6.
69. Simi S, Ballardini M, Casella M, De Marchi D, Hartwig V, Giovannetti G et al. Is the genotoxic effect of magnetic resonance negligible? Low persistence of micronucleus frequency in lymphocytes of individuals after cardiac scan. *Mutat Res*, 2008; 645: 39-43.
70. Huang Y, Gao H, Gou M, Ye H, Liu Y, Gao Y, et al. Acute toxicity and genotoxicity studies on poly (ϵ -caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly (ϵ -caprolactone) nanomaterials. *Mutat Res*, 2010; 696: 101-6.

71. Högstedt B, Karlsson A. The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutat Res*, 1985; 156: 229-32.
72. Eastmond DA, Tucker JD. Identification aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ Mol Mutagen*, 1989; 13: 34-43.
73. Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and dose X-irradiation. *Mutat Res*, 1986; 161: 193-8.
74. Aardema JM, Kirsch-Volders M. The in vitro micronucleus assay. In Choy WN, eds. *Genetic toxicology and cancer risk assessment*. New York. Marcel Dekker, 2001; 163-86.
75. Titenko-Holland N, Windham G, Kolachana P, Reinisch F, Parvatham S, Osorio AM et al. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. *Mutat Res*, 1997; 388(1): 85-95.
76. Lorge E, Lambert C, Gervais V, Becourt-Lhote N, Delongas L, Claude N. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation. Part II: Performances
77. Djomo JE, Ferrier V, Bekaert C. Amphibian micronucleus test in vivo (Jaylet Test) to evaluate the genotoxicity of petrochemical waste waters. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2000; 65: 168-74.
78. Stich HF, Stich W, Parida BB. Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: Betel quid chewers. *Cancer Lett*, 1982; 17: 125-34.
79. Rosin MP, Gilbert AM. *Modulation of genotoxic effects in humans: Mutation and the environment*. New York. Wiley-Liss, 1990; 51-9.
80. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res*, 2003; 540: 153-63.

81. Titenko-Holland N, Windham G, Kolachana P, Reinisch F, Parvatham S, Osorio AM et al. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. *Mutat Res*, 1997; 388(1): 85-95.
82. Yavuz Kocaman A, Topaktaş M. In vitro evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*, 2007; 48: 483-90.
83. Fenech M Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.*2007;2:1084-1104.
84. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molecular biology of the cell*. 4th Ed. New York. Garland Publishing 2002.
85. Vural N: *Toksikoloji*. , Ankara, A.Ü. Basımevi, 1984.
86. Pearce N, Reif JS: *Epidemiological studies of cancer in agriculture workers*. *Am J Int Med* 18:133-148,1990.
87. Kitchin KT: *An enzymatic approach to biotransformation*. *Meth Find Exptl Clin Pharmacol* 6: 303-310,1984.
88. Ito N, Hasegawa R, Imaida K et al.: *Effect of ingestion of 20 pesticides in combination at acceptable daily intake levels on rat liver carcinogenesis*. *Food Chem Toxicol* 33: 159163,1995.
89. MacMahon B: *Pesticide residues and breast cancer*. *J Natl Cancer Inst* 86:572-573,1994.
90. Peluso M, Merlo F, Munnia A et al.: *(32)P-postlabeling detection of DNA adducts in peripheral white blood cells of greenhouse floriculturist from western Liguria, Italy*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5: 361-369,1996.
91. Cincinatti, OH. *NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards*. 2003. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services
92. Almadori G, Bussu F, Cadoni G, Galli J, Paludetti G, Maurizi M. *Molecular markers in laryngeal squamous cell carcinoma: towards an integrated*

clinicobiological approach. Review. *Eur J Cancer*. 2005 Mar;41(5):683-93.

93. Nix P, Lind M, Greeman J et al. Expression of Cox-2 protein in radioresistant laryngeal cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 797-801.

94. Taş, A., Yağız, R., Karasalihoğlu, A, R., Koteç, M., Adali, M, K., Uzun, C., Assessment of quality of life in patients with laryngeal cancer after surgical treatment. *Kulak Burun Boğaz İhtis Derg.* 2004;12(3-4):84-90

95. Finizia, C., Hammerlid, E., Westlin, T., Lindstorm, J., Quality of life and voice in patients with laryngeal carcinoma: a posttreatment comparison of laryngectomy (salvage surgery) versus radiotherapy. *Laryngoscope*. 1998 Oct;108(10):1566-73

96. Charlin, B., Brazeu-Lamontagne, L., Gurrier, B., Leduc, C., Assessment of laryngeal cancer: CT scan versus endoscopy. *J Otolaryngol*. 1989 Oct;18(6): 283-8

97. Rodrigo, J, P., Dominguez, F., Suarez, V., Canel, M., Secades, P., Focal adhesion kinase and E-cadherin as markers for nodal metastasis in laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007, Feb;133(2):145-150.

98. Forastire, A., Koch, W., Trotti, A., Sidransky, D., Head and neck cancer. *N Engl J Med* 2001;345: 1890-1900.

99. Jin, Y, T., Kayser, S., Kemp, B, L., Ordonez, N, G., Tucker, S, L., Clayman, G, L., Gophert, H., Luna M, A., The prognostic significance of the biomarkers p21WAF1/CIP1, p53, and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1998, 82:2159- 2165.

100. Vanderbrekel M, W, M., Castelijns, J., A., Snow ,G, B., Diagnostic evaluation of the neck. *Otolaryngol Clin North Am* 1998;31:601-619.

101. Kazyakası, M., Hücümenoğlu, S., Şiriner, G, I., Hücümenoğlu, M., Over-expression of p53 and c-erbB-2 oncoproteins in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2001; 258: 329-335

102. Jing-Jia Li , Zhang, Z., Yang, X., Li, S., Liu, X., Yang, Q., Lia, Y., Reduced E-cadherin expression is associated with lymph node metastases in laryngeal squamous cell carcinoma, *Auris Nasus Larynx* 39 (2012) 186-192

102. Barry, B, L., Dennis, A., Medical Oncology & Principles Of Cancer Biology Chapter 2
103. Cruz AD, McArthur AG, Silva CC, Curado MP, Glickman BW. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident. *Mutat Res* 1994;313:57-68.
104. Mustafa Soyöz, Nurten Özçelik Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Isparta
105. Holland N ,Bolognesi C, Volders NK Fenech M.The micronucleus assay in human buccal cell as a tool for biomonitoring DNA damage:The HUMN roject erspective on currrent status and knowledge gaps.MUTREV 2008; 7892:16
106. W J Lee, W Lijinsky, E F Heineman, *Occup Environ Med* 2004;61:743–749. doi: 10.1136/oem.2003.011858
107. *Gastroenterol Clin North Am*. Author manuscript; available in PMC 2010 March 1.

EKLER

