



**T.C.**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**

**CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ**

**KULAK BURUN BOĞAZ ANABİLİM DALI**

**LARENKS KANSERİNDE TOLL LIKE  
RESEPTÖR 2,3,4 GEN EKSPRESYONUNUN  
TÜMÖR İNVAZYONUNA ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Çağlar EKER**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof.Dr. Emin KARAMAN**

**İstanbul-2018**



Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi  
Tarafından Desteklenmiştir.

Proje numarası: 27974, proje kodu: TTU-2018-27974'tür.

## ÖNSÖZ

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

Tezimin hazırlanma süreci başta olmak üzere, asistanlık hayatım boyunca çok şey öğrendiğim, bilgisini ve cerrahi tecrübesini her daim ilgiyle izleyerek kendime örnek aldığım, tez asistanı olduğum için ayrıca mutlu olduğum abim, Prof. Dr. Emin KARAMAN hocama sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Uzmanlık eğitim sürecinde eşi benzerini görmediğim sabrı, özverisi, bilgisi, gerek klinik içinde gerek klinik dışında bana yaptığı abiliğiyle ve güzel kalbiyle hep yanımda olan, birlikte çalışma fırsatını elde ettiğim için kendimi çok şanslı hissettiğim, hayatımın geri kalanında hep abim olarak göreceğim Doç. Dr. Haydar Murat YENER hocama sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

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

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

Klinikte çalıştığım 4 yıllık süre boyunca, her derdimi paylaştığım, birlikte iyi kötü, üzüntülü, komik, stresli hayatım boyunca hatırlayacağım günlerimi geçirdiğim, her daim bana destek olan ve benim de her daim destek olmaya hazır olduğum, başta tez sürecinde çok desteğini gördüğüm Dr. H. Caner İNAN ve dostum Dr. Elif Emel GÜNAY olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma, baş asistanlarımız Op. Dr. Emine Deniz GÖZEN'e ve Op. Dr. Yetkin Zeki YILMAZ'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak; beni büyük fedakârlıklarla yetiştirip bu günlere gelmemi sağlayan, onlardan çok uzakta olmama rağmen varlıklarını ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, haklarını ne yapsam ödeyemeyeceğim annem Nuray EKER'e, babam Faruk EKER'e ve kardeşim Didem ÇAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Çağlar EKER

İstanbul - 2018



# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	v
TABLolar LİSTESİ .....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	x
GRAFİKLER LİSTESİ.....	xi
SEMBOLLER ve KISALTMALAR .....	xii
ÖZET .....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Larenks Anatomisi ve Embriyolojisi .....	3
2.1.1. Larenks Kıkırdakları .....	3
2.1.2. Larenks Eklemleri.....	5
2.1.3. Larenks Kasları .....	6
2.1.3.1. Ekstrensik kaslar.....	6
2.1.3.2. İntrensik kaslar .....	7
2.1.4. Larenks Damarları .....	7
2.1.5. Larenks Lenfatikleri.....	8
2.1.6. Larenks Ligamentleri ve Membranları .....	8
2.1.7. Larenks Nöroanatomisi.....	8
2.1.8. Larenks Boşluğu( Endolarenks).....	9

2.1.8.1.	Supraglottik Bölge.....	9
2.1.8.2.	Glottik Bölge .....	10
2.1.8.3.	Subglottik Bölge.....	10
2.1.8.4.	Endolarenks Mukozası .....	11
2.1.9.	Laringeal Membranlar ve Boşluklar .....	11
2.2.	Vokal Kord Histolojisi .....	12
2.3.	Larenks Fonksiyonları.....	13
2.4.	Larenks Kanseri .....	13
2.4.1.	Epidemiyoloji.....	13
2.4.2.	Etyoloji.....	14
2.4.2.1.	Tütün ve alkol.....	14
2.4.2.2.	Diğer toksinler .....	14
2.4.2.3.	Diyet .....	14
2.4.2.4.	Human Papilloma Virüs (HPV).....	14
2.4.2.5.	Laringofarengeal reflü .....	15
2.4.3.	Klinik prezentasyon .....	15
2.4.4.	Tanı ve değerlendirme .....	15
2.4.5.	Görüntüleme .....	17
2.4.6.	Evreleme .....	18
2.5.	Larenks skuamöz hücreli karsinomlarının tedavisi.....	21
2.5.1.	Glottik Kanseri Tedavisi.....	21
2.5.1.1.	Erken evre glottik (evre 1 veya 2) skuamöz hücreli karsinom tedavisi.....	21

2.5.1.2.	İleri evre glottik (evre 3 veya 4) skuamöz hücreli karsinom tedavisi	23
2.5.2.	Supraglottik Kanserlerin Tedavisi	24
2.5.2.1.	Erken evre supraglottik larenks kanserlerinde tedavi	24
2.5.2.2.	İleri evre supraglottik larenks kanserlerinde tedavi	25
2.5.3.	Subglottik Kanserlerin Tedavisi	26
2.5.4.	Transglottik Kanserlerde Tedavi	27
2.6.	Toll like reseptör ailesi	27
2.6.1.	Genel Özellikler	27
2.6.2.	TLR Ailesi	28
2.6.2.1.	TLR2	29
2.6.2.2.	TLR3	29
2.6.2.3.	TLR4	29
2.6.2.4.	TLR lokalizasyon ve ligandları	30
2.6.2.5.	TLR Sinyalizasyonu	31
2.6.2.5.1.	MyD88 Aracılıklı Sinyal Yolu	32
2.6.2.5.2.	TRIF-Bağımlı Yol	32
2.6.2.6.	TLR ve Kanser	33
2.6.2.7.	TLR ve Larenks Kanseri	34
<b>3.</b>	<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>35</b>
3.1.	Gereç	35
3.1.1.	Çalışma Grubu	35
3.1.2.	Kullanılan Cihazlar	36
3.1.3.	Kullanılan Ticari Kitler	36

3.1.4.	Kullanılan Primerler .....	37
3.2.	Yöntem.....	37
3.2.1.	Dokudan RNA Eldesi .....	37
3.2.2.	Spektrofotometrik Analiz .....	38
3.2.3.	cDNA Eldesi .....	38
3.2.4.	TLR-2, TLR-3 ve TLR-4 Genlerinin İfade Analizi .....	39
3.2.5.	Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi .....	40
<b>4.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>41</b>
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>52</b>
<b>6.</b>	<b>SONUÇ .....</b>	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>59</b>



## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 2-1.</b> TNM sınıflamasına göre larenks kanserlerinde T evresi(2017 AJCC/UICC TNM sınıflaması).....	19
<b>Tablo 2-2.</b> TNM sınıflamasına göre bölgesel lenf nodu (N) evresi.....	20
<b>Tablo 2-3.</b> TNM sınıflamasına göre uzak metastaz (M) evresi.....	20
<b>Tablo 2-4.</b> Laringeal kanserlerin evreleri .....	20
<b>Tablo 2-5.</b> Toll-like reseptör ailesinin endojen ve eksojen ligandları .....	31
<b>Tablo 3-1.</b> Gerçek zamanlı PZR için kullanılan TLR-2, TLR-3, TLR-4 ve G6PD primer dizileri .....	37
<b>Tablo 3-2.</b> cDNA sentez bileşenleri ve döngü koşulları.....	38
<b>Tablo 3-3.</b> İfade analizi için gerçek zamanlı PZR karışımı .....	39
<b>Tablo 3-4.</b> Gerçek zamanlı PZR döngü programı .....	39
<b>Tablo 4.1.</b> Hastaların demografik özellikleri, sigara ve alkol kullanım durumları .....	41
<b>Tablo 4.2.</b> Hastaların tümör bölgesi, radyoterapi öyküsü, operasyon tipi ve boyun diseksiyonu türüne göre sınıflaması.....	42
<b>Tablo 4.3.</b> Hastaların histopatolojik inceleme sonuçları .....	43
<b>Tablo 4.4.</b> Normal doku ve tümörlü dokularda TLR-2, TLR-3, TLR-4 ekspresyon miktarı .....	44
<b>Tablo 4.5.</b> TLR-2, TLR-3 ve TLR-4 mRNA ifade düzeylerinin dağılımı .....	45
<b>Tablo 4.6.</b> Larenks kanserli hastalarda TLR-2 mRNA ifade düzeyleri ve klinikopatolojik özellikleri.....	46
<b>Tablo 4.7.</b> Larenks kanserli hastalarda TLR-3 mRNA ifade düzeyleri ve klinikopatolojik özellikleri.....	48
<b>Tablo 4.8.</b> Larenks kanserli hastalarda TLR-4 mRNA ifade düzeyleri ve klinikopatolojik özellikleri.....	50

## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1.** Larenks İskeletinin Anterior ve Posterior bakışta (Netter FH: Atlas of Human Anatomy, 2. Baskıdan Çeviri, Cumhuriyet M) ..... 5
- Şekil 2.2.** Larenks İskeletinin sağ lateral bakışta ve sagittal kesitte görünümü (Netter FH: Atlas of Human Anatomy, 2. Baskıdan Çeviri, Cumhuriyet M) ..... 6
- Şekil 2.3.** Larenksin İntrensek Kasları Lateralden Krikotiroid Kas ve Tiroid Kartilaj Laminası Alındıktan Sonraki Görünümü ve Posterior Bakışta Görünümü (Netter FH: Atlas of Human Anatomy, 2. Baskıdan Çeviri, Cumhuriyet M) ..... 7
- Şekil 2.4.** Endolarenksin Posterior Bakışta Görünümü (Netter FH: Atlas of Human Anatomy, 2. Baskıdan Çeviri, Cumhuriyet M) ..... 11

## GRAFİKLER LİSTESİ

<b>Grafik 4-1.</b>	Tümörlü ve normal doku örneklerinde G6PD mRNA ekspresyon eğrileri .....	45
<b>Grafik 4-2.</b>	Tümörlü ve normal doku örneklerinde TLR-2 mRNA ekspresyon eğrileri .....	47
<b>Grafik 4-3.</b>	Tümörlü ve normal doku örneklerinde TLR-3 mRNA ekspresyon eğrileri .....	49
<b>Grafik 4-4.</b>	Tümörlü ve normal doku örneklerinde TLR-4 mRNA ekspresyon eğrileri .....	51

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR

AJCC	: American Joint Committee on Cancer
RLS	: Rekürren larengeal sinir
SHK	: Skuamöz hücreli karsinom
HPV	: Human Papilloma Virüs
LFR	: Laringofarengeal reflü
BT	: Bilgisayarlı tomografi
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
TLR	: Toll-like reseptör
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
LRR	: Lösinden zengin tekrar motifleri
TIR	: Toll/interlökin 1 reseptör
PRR	: Pattern Tanıma Reseptör
PAMP	: Patojenle- İlişkili Moleküler Patern
DAMP	: Tehlike ile İlişkili Moleküler Pattern
Ds-RNA	: Double-stranded RNA
LPS	: Lipopolisakkarid
HSP	: Isı-şok proteinleri
MyD88	: Miyeloid differensiyasyon faktör 88
TIRAP	: TIR ilişkili protein
TRAM	: TRIF ile ilişkili adaptör molekül
TRIF	: IFN-beta indükleyen adaptör proteini

IRAK	: IL-1 reseptör bağlantılı kinaz kompleksi
PET	: Pozitron emisyon tomografi
18-FDG	: 18 F-florodeoksiglukoz
UICC	: Union for International Cancer Control
TNM	: Tümör Nod Metastaz
RT	: Radyoterapi
KRT	: Kemoradyoterapi
SKPL	: Suprakrikoid parsiyel larenjektomi
KHEP	: Krikohyoidoepiglottopeksi
ESM	: Ekstraselüler matriks
2 <sup>ΔΔCT</sup>	: Ekspresyon artış değeri
Ng/ml	: Nanogram/mililitre

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, son yıllardaki tüm gelişmelere rağmen sağ kalım oranlarında artış olmayan hastalıklardan biri olan larenks kanserlerinde, Toll-like reseptör 2,3,4 genleri ekspresyonunun araştırılması ve hastalığın klinikopatolojik özellikleri ile olan ilişkilerin ortaya konmasıdır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışma 2016-2018 tarihleri arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda larenks skuamöz hücreli karsinomu nedeniyle açık cerrahi yöntemle total ve parsiyel larenjektomi yapılan 50 hasta üzerinde retrospektif olarak yapılmıştır. Hastaların normal doku ve tümör doku örneklerinde gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Toll-like reseptör 2,3,4 ekspresyon değerleri ölçülmüştür. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından Desteklenmiştir. Proje numarası: 27974, proje kodu: TTU-2018-27974'tür.

**Bulgular:** Hastaların yaşları 34 ile 84 arasında değişmekte olup ortalama  $60,56 \pm 9,67$ 'dir. Hastaların 47'si (%94) erkek; 3'ü (%6) kadındır. 50 hasta incelendiğinde  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değeri TLR-2 geni için; normal dokularda 1, tümörlü dokuda  $0,1 \pm 0,1$ , TLR-3 için; normal dokuda 1, tümörlü dokuda 0, TLR-4 için; normal doku 1, tümörlü doku  $1 \pm 1$  olarak bulunmuştur. Tümör dokularında normal dokuya göre ekspresyonu her üç gen için de azalmıştır ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ). TLR-2, TLR-3, TLR-4 ekspresyonu aynı kalan veya artan grupta, ekspresyonu azalmış grup arasında, hastaların klinikopatolojik özellikleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

**Sonuç:** Bu çalışmada elde ettiğimiz veriler ışığında larenks skuamöz hücreli kanserlerinde TLR 2,3,4 ekspresyonları azalmaktadır. İleride yapılacak çalışmalarda bu geni hedef almak hastalığın tanı ve tedavisinde faydalı sonuçlar verebilir.

**Anahtar kelimeler:** Larenks kanseri, Toll-like reseptör 2,3,4

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study is to investigate the expression of the Toll-like receptor 2,3,4 genes in laryngeal cancers, one of the diseases with no increase in survival rates despite all the recent developments, and to reveal the relationship with the clinicopathologic features of the disease.

**Material and Method:** This study was retrospectively performed on 50 patients who underwent total and partial laryngectomy by open surgical technique for laryngeal squamous cell carcinoma of the Otorhinolaryngology Department of Cerrahpasa Medical Faculty between 2016-2018. Toll-like receptor 2,3,4 expression levels were measured in normal tissue and tumor tissue samples of patients by Real-time Polymerase Chain Reaction. This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Coordination Unit. Project number: 27974, project code: TTU-2018-27974.

**Results:** The ages of the patients ranged from 34 to 84, with a mean of  $60.56 \pm 9.67$ . Forty-seven (94%) of the patients were male; 3 (6%) were females. When 50 patients were examined, for the TLR-2 gene of  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ; 1 for normal tissues,  $0,1 \pm 0,1$  for tumorous tissue, for TLR-3; 1 for normal tissue ,0 for tumorous tissue , for TLR-4;1 for normal tissue ,  $1 \pm 1$  for tumorous tissue. Expression of tumor tissues compared to normal tissues was decreased for all three genes and the difference was statistically significant ( $p < 0.001$ ). There was no statistically significant relationship between TLR-2, TLR-3, and TLR-4 expression in the group with the same or increased expression and decreased expression in terms of clinicopathologic characteristics of the patients.

**Conclusion:** As a result of this study, TLR 2,3,4 expression in laryngeal squamous cell carcinoma is decreased. Targeting the TLR 2,3,4 gene in future studies may provide beneficial results in the diagnosis and treatment of the disease.

**Key words:** Laryngeal cancer, Toll-like receptor 2,3,4

# 1. GİRİŞ

Larenks kanserleri, baş boyun kanserleri arasında 2. en sık görülen malignite olup, 5 yıl ve üzeri sağ kalım %67'dir. Bu tümörlerle ilgili önemli özelliklerden biri özellikle ileri evrelerde lokal invazyon (lenfatik invazyon, vasküler invazyon, perinöral invazyon, kartilaj invazyonu vb.) ile lokal ileri hastalığa yol açıp çevre dokulara yayılım riski ve bölgesel ve/veya uzak metastaz riskidir. Tümörjenez ve invazyon, tümör mikroçevresine sitokin ve kemokin salınımı, doku proteazlarının aktivasyonu ve bunların sonucu olarak apoptoz inhibisyonu, anjiyogenez ve proliferasyonun aktivasyonu gibi birçok mekanizmanın iç içe girdiği kompleks bir durumdur. Tümör mikroçevresinde ki inflamatuvar hücrelerden salınan çeşitli endojen Toll-like reseptör (TLR) ligandları, prekanseröz hücrelerdeki TLR sinyal yolunu aktive ederek sitokinlerin (IL-1, 6, 8 ve 18), büyüme faktörlerinin, anjiogenik faktörlerin ve ekstrasellüler matriksi yıkan proteazların (metalloproteinazlar) açığa çıkmasını sağlar.<sup>1 2</sup> Böylece kanser gelişimini ve kanserin ilerlemesini destekleyen mikro çevresel şartları oluşturur. Hem onkogen hem de tümör süpresör genleri posttranskripsiyonel düzeyde regüle eden mikroRNA'lar ile TLR arasındaki ilişki de kanser oluşumunda önemlidir. Çeşitli in vitro çalışmalarda, TLR tetiklemesinin insan meme kanseri hücrelerinde, melanom hücrelerinde ve berrak hücreli renal karsinom hücrelerinde, servikal ve prostat kanserlerinde apoptozu indüklediğini gösterilmiştir.<sup>34</sup> Oral kavite kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada ise, yüksek TLR3 ekspresyonu, kötü diferansiasyon ve perinöral invazyonlütümörü olan hastalar ile anlamlı korelasyon göstermiştir.<sup>5</sup> Başka bir baş-boyun kanserli hastalarda yapılmış çalışmada ise TLR3 yalnızca baş ve boyun tümör dokusunda saptanırken, komşu dokuda veya lökopastik dokuda tespit edilmemiştir. Ayrıca TLR-3 ekspresyonunun inhibe edilmesi sonrası c-myc onko-protein inhibisyonu ve hücre proliferasyonu inhibisyonu olduğunu saptamış ve invaziv karsinomaya yol açan fenotipe katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur.<sup>6</sup>

Bu çalışmadaki amacımız ise Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) yöntemini kullanarak larenks kanserlerinde TLR 2-3-4gen ekspresyonunu göstermek, tümürlü ve normal dokulardaki ekspresyonları karşılaştırmak, farklı tümör evrelerinde tümürlü dokularda TLR 2-3-4 ekspresyonunu belirlemek, bu genlerin ekspresyon düzeyi ile invazyon arasındaki ilişkiyi ortaya koymak ve prognostik özelliğini incelemektir. Larenks kanserli hastalarda bu proteinlerin ekspresyonları sınırlı sayıda çalışmada



değerlendirilmiştir. Bu çalışmayla larenks kanserli hastalarda TLR 2,3,4 ekspresyonları değerlendirilecek, prognozu ön görmede kullanılacak bir marker olarak kullanılabilir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Larenks Anatomisi ve Embriyolojisi

Larenks, boynun ön kısmında yerleşen nefes alma, ses oluşumu ve üst solunum yollarının aspirasyondan korunması gibi fonksiyonları olan önemli bir organdır. Larenks embriyolojik olarak iki farklı taslaktan gelişir. Bukkofaringeal tomurcuktan supraglottis, trakeobronşiyal tomurcuktan ise glottis ve subglottis gelişim gösterir. Frazer 1909 yılında supraglottisin bukkofaringeal tomurcuktan orta hat birleşmesi olmadan geliştiğini göstermiş olup; larenksin cerrahi olarak bölünmesinin anatomik ve embriyolojik olarak uyumlu olduğunu belirtmiştir. Tarihsel olarak tümörün invazyon ve davranışlarını öngörmeye bu bölünme değer taşımaktadır. Larenksin gelişimi postnatal dönemde de devam eder, 25 yaşlarında kemikleşmeye başlar ve 65 yaş civarında bu kemikleşme tamamlanır.<sup>7</sup>

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

#### 2.1.1. Larenks Kıkırdakları

**Tiroid kıkırdak:** Larenks kıkırdaklarının en büyüğüdür ve orta hatta birleşen iki laminadan oluşmaktadır. Bu iki lamina erkeklerde 90<sup>0</sup>, kadınlarda ise 120-140<sup>0</sup> 'lik bir açı oluşturacak şekilde birleşirler. Laminaların süperiorda inkomplet birleşmesi sonucu tiroid çentik oluşur. Her iki laminanın arka sınırında yukarı ve aşağı doğru uzantıları vardır. Yukarı doğru olan uzantıya superior kornu, aşağı doğru olan uzantıya ise inferior kornu denir. İnférieur kornu, krikoid kıkırdak ile eklem yaparken; superior kornu lateral tirohyoid ligaman ile hyoid kemiğe bağlanır.<sup>8</sup>

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

Tiroid kıkırdağın üst kenarına tirohyoid membran, alt kenarına krikotiroid membran ve ligaman yapışır.<sup>9</sup>

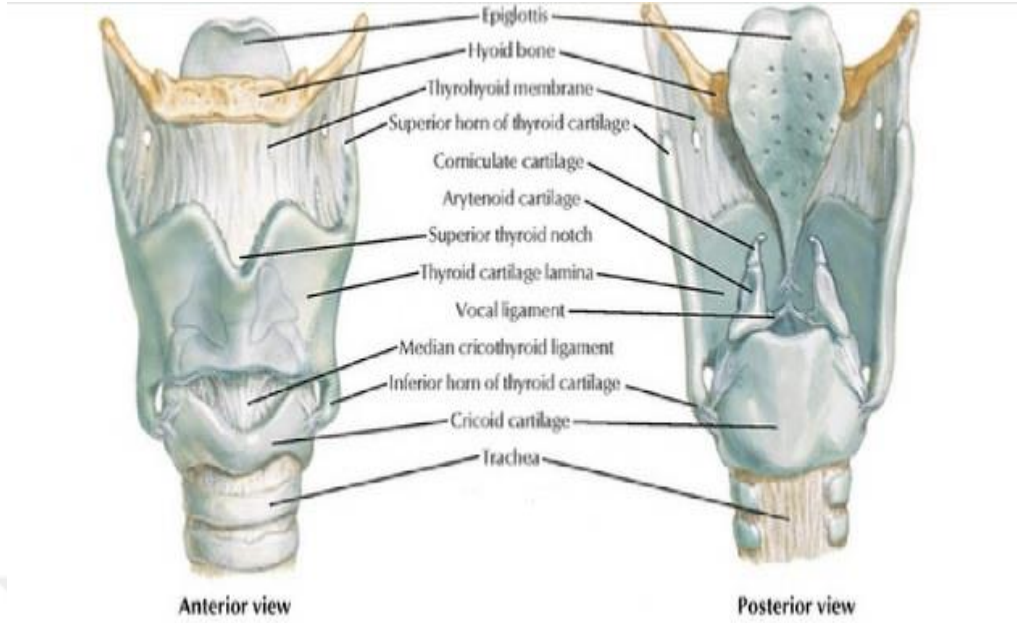
**Krikoid kıkırdak:** Hyalin yapıda olan bu kıkırdak, tiroid kıkırdağın hemen altında bulunmaktadır. Larenks kıkırdaklarından en sağlam ve en kalın olanıdır. Tiroid kıkırdaktan farklı olarak, larengeal havayolunu çevreleyen tam bir halka şeklindedir. Ön kısım yüksekliği 5-7 mm, arka kısım yüksekliği ise 20-30 mm arasında değişir. Tiroid ve aritenoid kıkırdak ile eklem yaptığı yüzeylere sahiptir (Şekil 2-1).<sup>8</sup>

**Epiglot:** Elastik kıkırdak yapısında olan epiglot kıkırdak yaprak şeklindedir. Dil kökü ve hyoid kemik korpusunun arkasında yer alır ve larenks girişini oluşturur. Petiolus adı verilen bir sapı vardır. Petiolus, ön kommisürün üzerinde tiroid laminaya yapışır. Epiglotun ön orta kısmı median glossoepiglottik ligaman ve lateral glossoepiglottik ligamanlar aracılığıyla dile tutunur. Bu plikalar arasında bulunan çukurlara vallekula denilmektedir. Epiglot hyoide ön alt yüzeyinde hyoepiglottik ligaman ile bağlanır. Epiglotun lateralinden farenks lateral duvarına uzanan kıvrıma farengoepiglottik plika adı verilir. Epiglotun larengeal parçasının ön kısmında tabanı tiroepiglottik ligaman ile sınırlanan bir yağ yastığı vardır ve yutkunma esnasında epiglot yukarı ve öne doğru hareket ederek larenksin girişini kapatır, bolusun geçmesini sağlar.<sup>9</sup>

**Aritenoid kıkırdaklar:** Çift kıkırdakların en büyükleridir ve fonksiyon olarak krikoid ile birlikte larenksin en önemli yapısal elamanlarıdır. Fibroelastik yapıda olup apeks kısımları hariç hyalin yapıdadırlar. Şekil olarak üç yüzlü piramide benzerler. Krikoid kıkırdak posterior laminası üzerindeki krikoaritenoid eklem yüzlerinde otururlar. Öne doğru olan çıkıntı vokal çıkıntı olarak adlandırılır ve bu bölgeye vokal kordların posterior bölümleri bağlanır. Lateraldeki çıkıntıya muskuler çıkıntı denir ve bu bölgeye posterior krikoaritenoid, lateral krikoaritenoid, oblik aritenoid ve tiroaritenoid kaslar yapışır (Şekil 2-2).<sup>8</sup>

**Kornikulat kıkırdaklar:** Santorini kıkırdakları da denilen bu küçük kıkırdaklar, aritenoid kıkırdaklarının tepesi ile eklem yapar.<sup>9</sup>

**Kuneiform kıkırdaklar:** Wrisberg kıkırdağı da denilen bu kıkırdaklar, kornikulat kıkırdağın hemen önünde ariepiglottik plika içinde olup pasif destek fonksiyonları vardır.<sup>9</sup>



**Şekil 2.1.** Larenks İskeletinin Anterior ve Posterior bakışta (Netter FH: Atlas of Human Anatomy, 2. Baskıdan Çeviri, Cumhuriyet M)

**Hyoid Kemik:** Tam olarak larenksin bir parçası değildir ancak larengeal fonksiyonlarda yer alır. Preepiglottik mesafenin ön bölümünü oluşturur. Erişkinde hipofarenks ön duvarı ve dil kökünün ön-alt bölümünde tiroid kıkırdağın hemen üzerinde 3. servikal vertebra seviyesinde bulunur. Gövdesinin her iki tarafta kornu majus ve kornu minus olarak adlandırılan boynuzları vardır. Vertikal olarak tirohyoid membran ve superior kornu ile tiroid kıkırdağa tutunur. Suprahyoid ve infrahyoid kaslar arasında asılıdır. Başka kıkırdak veya kemik yapılar ile eklem yapmaz.<sup>8</sup>

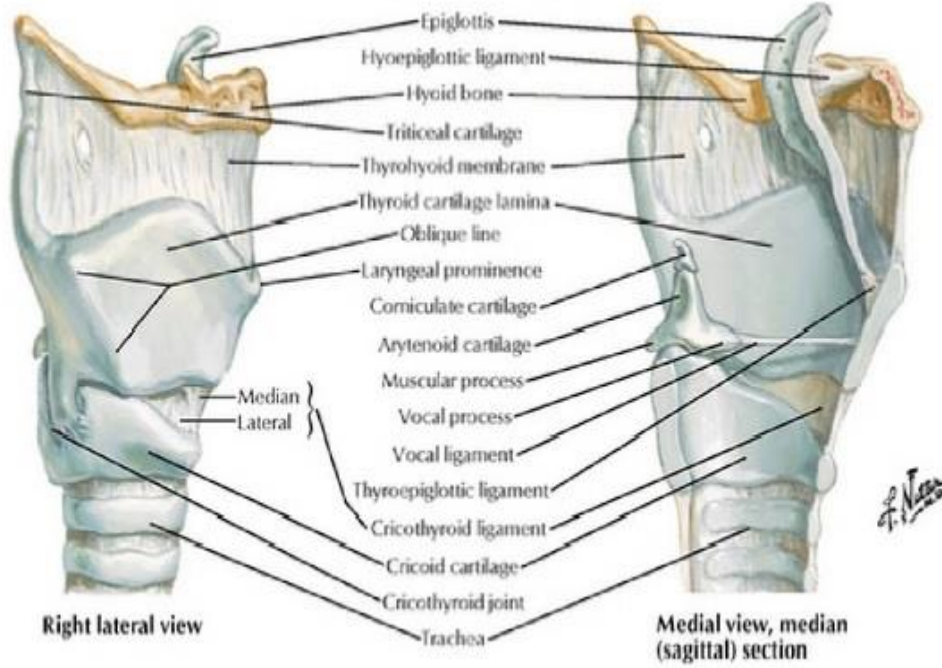
### 2.1.2. Larenks Eklemleri

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

**Krikotiroid eklem:** Tiroid kıkırdağın alt kornusu ile krikoid kıkırdağın eklem yüzeyi arasında bulunur. Sesin kalınlaşmasından sorumlu bu eklem, her iki alt kornu üzerinden geçen bir hat üzerinde rotasyon hareketi ile kornu üzerinde öne ve arkaya, sınırlı bir kayma hareketi yapar.<sup>10</sup>

**Krikoaritenoid eklem:** Aritenoid kıkırdak tabanı ile krikoid kıkırdak laminası üst köşesindeki eklem yüzeyi arasındadır. Eklem rotasyon ve kayma hareketi vardır.

Arka, üst ve içten, alt ön ve dışa doğru uzanan oblik bir hatta meydana gelen rotasyon hareketi ile vokal kordlar abduksiyon ve adduksiyon hareketini yaparlar.<sup>8</sup>



**Şekil 2.2.** Larenks İskeletinin sağ lateral bakışta ve sagittal kesitte görünümü (Netter FH: Atlas of Human Anatomy, 2. Baskıdan Çeviri, Cumhuriyet M)

### 2.1.3. Larenks Kasları

Larenksin kasları intrinsik ve ekstrinsik kaslar olarak iki grupta incelenmektedir.

#### 2.1.3.1. Ekstrinsik kaslar

Larenksin bir bütün halinde hareketi ve fiksasyonu ile ilgilidirler. Suprahyoid ve infrahyoid kaslar olarak iki gruba ayrılırlar. Suprahyoid kaslar hyoid ve larenksi yukarı ve öne, infrahyoid kaslar ise aşağı çeker.<sup>9</sup>

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

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

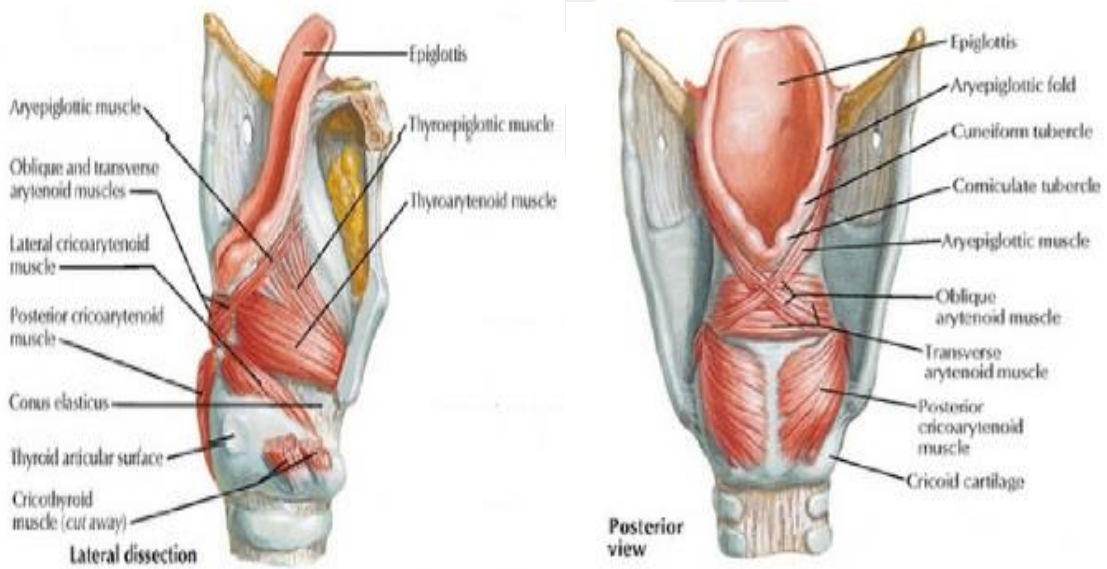
### 2.1.3.2. İntrensik kaslar

Larenks fonksiyonlarından esas sorumlu kaslardır(Şekil 2-3). Krikotiroid kas hariç tümü vagusun rekürren larengeal dalı ile innerve edilir. Fonksiyonlarına göre şu şekilde sınıflandırılır:

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

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

**Tensör (Gerici) kaslar:** Krikotiroid kas(eksternal tensör) ve vokalis kası da denilen internal tiroaritenoid kas(internal tensör) rol alır.<sup>8</sup>



**Şekil 2.3.** Larenksin İntrensek Kasları Lateralden Krikotiroid Kas ve Tiroid Kartilaj Laminası Alındıktan Sonraki Görünümü ve Posterior Bakışta Görünümü (Netter FH: Atlas of Human Anatomy, 2. Baskıdan Çeviri, Cumhuriyet M)

### 2.1.4. Larenks Damarları

Larenksin kanlanması superior ve inferior tiroid arterin larengeal dallarından sağlanır. Superior larengeal arter, superior larengeal sinirle birlikte tirohiyoid membranı delerek larenkse girer. Vokal kordlara kadar olan larenks bölgesini ve piriform sinüsü

besler. Tiroservikal trunkusun inferior tiroid arter dalının bir devamı olan inferior larengeal arter, rekürren sinir ile birlikte trakea ve özefagus arasındaki olukta yukarı doğru ilerler. Rekürren sinir ile birlikte, alt konstrüktör kasın derininden geçerek larenkse girer. Vokal kordların serbest kenarlarının altında kalan bölümünü kanlandırır. İki arterin dalları arasında anastomozlar vardır. Venöz drenaj arterlere eşlik eden süperior ve inferior larengeal venler aracılığı ile internal juguler vene ve tiroservikal trunkusa boşalır.<sup>8</sup>

### **2.1.5. Larenks Lenfatikleri**

Pratik olarak glottik bölgenin lenfatik drenajının olmadığı ya da çok az olduğu kabul edilmektedir. Larengeal lenfatiklerin en yoğun olduğu supraglottik bölgenin lenfatik drenajı tirohiyoid membranı geçerek üst ve orta derin servikal zincire doğru olurken; subglottik bölgenin lenfatik drenajı krikotiroid membranı geçerek önce pretrakeal ve prelarengeal (delphian nodülü), buradan da orta derin servikal zincire doğru olmaktadır. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, epiglot orta hat yapısı olduğundan lenfatik akımı bilateraldir.<sup>8</sup>

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

Hiyoepiglottik ligament, epiglotun ön yüzü ile hiyoidin arka üst parçası arasında yer alır. Krikotrakeal ligament, krikoid ile birinci trakea halkası arasındadır. Farengoepiglottik ligament, epiglotun yan kenarlarından yanlara farenks fasyasına doğru uzanır. Krikotiroid membran, tiroid kartilajın alt kenarından krikoid kartilajın üst kenarına kadar uzanır. Tirohiyoid membran, tiroid kıkırdağın üst kenarından başlayıp hiyoid kemiğin hemen altından geçip hiyoidin üst kenarında sonlanır. Krikovokal membran (konus elastikus), glottik ve subglottik mesafeyi paraglottik mesafeden ayırır. Kuadreguler membran epiglotun serbestkenarına tutunarak başlar ve arkaya doğru ilerleyerek aritenoid kıkırdağın medial yüzüne yapışır.<sup>8</sup>

### **2.1.7. Larenks Nöroanatomisi**

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

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

İnferior(Rekürren) laringeal sinir (RLS) krikotiroid kasın dışındaki larenksin tüm intrensik kaslarının motor innervasyonunu ve glottik ile subglottik larenksin duysal innervasyonunu sağlar. Seyri boyunun her iki tarafında farklıdır. Sağda Subklavyan arter ve solda arkus aortayı dönerek yeniden boyuna yükselen bir yol izlediklerinden rekürren adını alır. Sağ RLS subklavian arterin önünde vagustan ayrılır. Subklavian arterin etrafında, önden arkaya doğru ilerler ve ardından trakeözefagial oluk içinde yukarı doğru yönelir. Sol RLS ise, arkus aortayı döner, arkus aortanın arkasındaki ligamentum arteriosum lateralinde geçer ve trakeözefagial oluğa girer. Tiroid bezinin alt ucunda inferior tiroid arterin dalları arasında ilerler. Genelde sinir arterin derinindedir, ancak çok çeşitli varyasyonlara rastlanabilir. Her iki taraftaki RLS, tiroid loblarının posteriorunda trakeaya paralel olarak ilerleyerek farenksin alt konstriktör kasının hemen altında krikotiroid eklemde larenkse ulaşır.<sup>11</sup>

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

Larenks kavitesi farenksle ilişkili olan laringeal girişiten, trakea ile devam eden krikoid kırıkta alt kenarına kadar devam eder. Endolarenkste kenarlardan kaynaklanıp ve iç kısma doğru uzanan sağlı sollu bir çift plika vardır. Üstteki plikalara ventriküler band, alttakine vokal kord denir. Vokal kordlar larenksi üç bölgeye ayırır (Şekil 2-4).<sup>8</sup>

#### **2.1.8.1. Supraglottik Bölge**

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



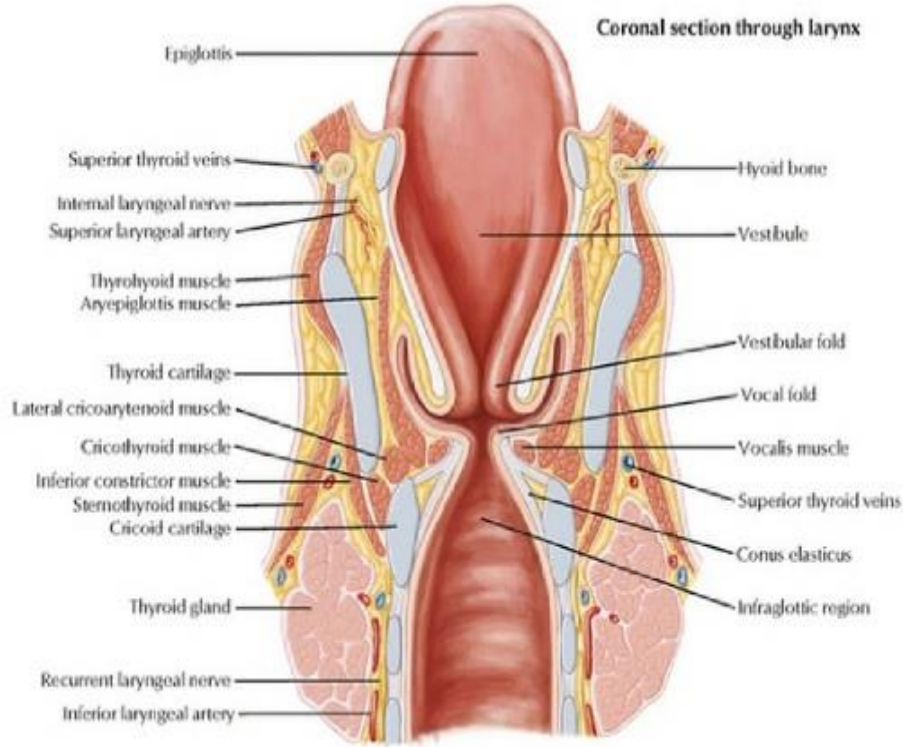
Histolojik olarak supraglottik bölge siliyalı kolumnar epitelyum ile kaplıdır. Sadece epiglot serbest kenarları ve ariepiglottik plikalar çok katlı yassı epitel ile kaplıdır.<sup>8</sup>

### **2.1.8.2. Glottik Bölge**

Glottik bölge, her iki yanda vokal kordlar, önde ön komissür ve arkada arka komissür tarafından sınırlanan bölgedir. Alt sınır apeksin 1 cm altından geçen horizontal çizgidir. Vokal kordlar, ön komissürde Broyle ligamanyla tiroid kartilaj iç yüzüne yapışır ve bu bölgede perikondrium bulunmamaktadır. Arka komissür ise esas olarak aritenoid çıkıntılar, interaritenoid kas ve krikoid posterior laminası tarafından sınırlanır. Bölge histolojik olarak çok katlı yassı epitelle kaplıdır. Yetişkin erkekte glottisin ortalama uzunluğu 23 mm, yetişkin bayanda ortalama 17mm kadardır. Yetişkinlerde üst solunum yolunun en dar kısmıdır.<sup>8</sup>

### **2.1.8.3. Subglottik Bölge**

Glottik bölgenin alt sınırından krikoid kartilajın alt kenarına kadar uzanan bölgedir. Üst sınır olarak vokal kordların alt yüzeyindeki skuamöz epitel-silyalı respiratuar epitel geçiş zonu ya da vokal kordların 0,5-1 cm altı önerilmektedir. Bölgenin destek yapıları krikoid kıkırdak ve konus elastikustur. Primer olarak buradan başlayan tümörler son derece nadirdir, genellikle glottik kanserler bu bölgeye uzanır.<sup>8</sup>



**Şekil 2.4.** Endolarenksin Posterior Bakışta Görünümü (Netter FH: Atlas of Human Anatomy, 2. Baskıdan Çeviri, Cumhur M)

#### 2.1.8.4. Endolarenks Mukozası

Larenks mukozası silyalı çok katlı kolumnar epitel ve çok katlı yassı epitelden oluşur. Yukarıda ağız ve hipofarenks mukozası ile devam eder. Çoğunluğu respiratuar epitel ile döşeli olmakla birlikte epiglotun suprahoid kısmı, ariepiglottik kıvrımların üst kısımları ve vokal kordların serbest kenarları çok katlı yassı epitel ile kaplıdır. Epitelin altında değişken bir bazal membran ve bu ikisini ayıran gevşek bir fibröz stroma tabakası mevcuttur. Bu fibröz tabaka vokal kordlarda, epiglotun larengeal yüzünde mevcut değildir.<sup>8</sup>

#### 2.1.9. Laringeal Membranlar ve Boşluklar

**Reinke Boşluğu:** Vokal kordun mukozasının altında bulunan, fibröz yapılardan zayıf subepitelyal konnektif doku tabakasıdır. Yukarıda vokal ligamentin superolateral kenarı boyunca, ventrikül tabanına doğru ilerler. Etrafı sağlam fibröz doku ile çevrelenmiştir. Kordun serbest kenarından 2 mm kadar uzaklıktadır. Vokal kord kanserlerinin bu aralığa girmesi, lenfatik geçişin başladığını gösterir.<sup>8</sup>

**Tirohyoid membran:** Tiroid kıkırdağın üst kenarı ile hyoid kemik arasındaki elastik fibröz yapıdır. Kenarlarda daha kalındır. Preepiglottik boşluğun ön yüzünü oluşturur.

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

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

**Preepiglottik Boşluk:** Preepiglottik boşluk adından da anlaşılacağı üzere epiglotun anteriorunda yer almaktadır ve epiglot bu boşluğun arka sınırını oluşturmaktadır. Sınırları üstte hyoepiglottik ligaman ve vallekula mukozası, altta tiroepiglottik ligaman ve önde tirohyoid membran ve tiroid laminanın iç yüzeyleridir. Lateralde preepiglottik boşluk paraglottik boşluklara açılmaktadır. Epiglotun infrahyoid parçasından köken alan tümörler bu yapıyı delebilir ve preepiglottik boşluğa yayılabilir.<sup>8</sup>

**Paraglottik Boşluk:** Paraglottik boşluk, glottik bölgenin her iki yanında yer almaktadır. Yalancı ve gerçek vokal kordların hem altında hem de üstünde yer alır ve tümörlerin transglottik ve ekstralaringeal yayılımı açısından önemlidir. Boşluk medialde kuadrangüler membran, ventrikül ve konus elastikus; lateralde tiroid laminanın perikondriyumu ve krikotiroid membranla sınırlıdır. Ön üst kısımda preepiglottik boşluğun posterior parçasına açılır. Piriform sinüs mukozası ise arka sınırını oluşturur. Paraglottik boşluğun komşulukları bu alanı laringeal kanserlerin yayılımında önemli bir duruma getirmektedir. Bu boşluğa giren supraglottik tümörler kolayca ekstralaringeal yayılım gösterebilirler.<sup>8</sup>

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

## 2.2. Vokal Kord Histolojisi

Vokal kordlar histolojik olarak şu tabakalardan oluşur:

1. Keratinize olmayan çok katlı yassı epitel

2. Lamina propria:

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

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

### **2.3. Larenks Fonksiyonları**

Larenksin primer ve en ilkel fonksiyonu, solunum esnasında alt hava yollarını korumaktır. Diğer fonksiyonları, öksürük, Valsalva manevrası ve akciğerlere giren çıkan havanın kontrolü ve düzenlenmesidir. Larenks ayrıca solunum kontrolünü ve kardiyovasküler fonksiyonları etkileyen birçok refleksin aferent ayağını oluşturan duyuusal bir organdır.<sup>9</sup>

### **2.4. Larenks Kanseri**

#### **2.4.1. Epidemiyoloji**

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2016 yılı içinde 13,430 larenks kanseri vakasının tanı alacağı ve yaklaşık 3620 hastanın bu hastalık nedeniyle yaşamını yitireceği tahmin edilmektedir. Larenks kanseri erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülmektedir (sırasıyla 5.8/100,000 ve 1.2/100,000).<sup>12</sup> Hastaların yaklaşık %60'ı ileri evrede (evre 3 veya 4) tanı almaktadırlar. Ne yazık ki larenks kanseri, 5 yıllık sağ kalım oranı geçen 40 yıl içinde azalan birkaç kanser türünden bir tanesidir. Toplam insidansı azalmasına rağmen 5 yıllık sağ kalım %66'dan %63'e düşmüştür.<sup>12</sup> Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı verilerine göre en sık görülen kanserler sıralamasında 7.7/100,000 ile 6. Sırada gelmektedir.<sup>13</sup> Hastalık çoğunlukla 6. Ve 7. dekatta ortaya çıkmaktadır.

Larenkste birçok malignite görülebilmemesine rağmen, vakaların %95'inden fazlası larenksi kaplayan epitelden köken alan skuamöz hücreli karsinomdur (SHK).

## **2.4.2. Etiyoloji**

### **2.4.2.1. Tütün ve alkol**

Tütün ve alkol kullanımı larenks kanseri için iki önemli risk faktörüdür. Alkol ve tütün kullanımının süresine ve miktarına bağlı olarak risk artmakta; kullanımın bırakılmasından sonra yavaşça düşmekte fakat en az 20 yıl boyunca bazal risk seviyesine inmemektedir. Sigara içenler içmeyenlere göre 10-15 kat daha fazla riske sahiptirler ve yoğun sigara kullanımı olanlarda bu oran 30 kata kadar çıkmaktadır.<sup>14</sup> Zuo ve ark.'ları<sup>15</sup> yıllık 40 paket veya üstü sigara kullanımı öyküsü olan bireylerde kanser riskinin 9 kat arttığını raporlamışlardır. Alkol ve tütünün birlikte kullanımı sinerjistik etki göstermektedir. Alkol tüketimi özellikle supraglottik karsinomlar için risk faktörüken, tütün glottik karsinomlarla ilişkilidir.

### **2.4.2.2. Diğer toksinler**

Bazı çevresel faktörlere maruziyetin larenks SHK riskini arttırdığı düşünülmektedir. Bunlar asbest, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, sülfirik asit, hasırdal gazı, metal tozları, asfalt ve tekstil tozlarıdır.<sup>16</sup>

### **2.4.2.3. Diyet**

Sebze ve meyve tüketiminin artması ile kırmızı et ve yağ ürünlerinin tüketiminin azalması baş boyun kanserleri açısından koruyucu etkiye sahiptir.<sup>17</sup>

### **2.4.2.4. Human Papilloma Virüs (HPV)**

Larenks SHK açısından bir diğer önemli faktör HPV enfeksiyonudur. Çok sayıda türü olmasına rağmen oral kavite ve farenks bölgesinde ortaya çıkan epidermoid kanserlerin gelişiminde rol oynayan HPV 16 olarak bildirilmektedir.<sup>18</sup> Son yayınlanan bir metaanalizde larenks SHK olan hastaların %28'inde HPV enfeksiyon bulunmuştur.<sup>19</sup> Xu ve ark.'larının 674 larenks kanseri hastasını incelediği bir çalışmada bu oran %4,9 olarak raporlanmıştır.<sup>20</sup> Erken evre (evre 1-2) tümörlerin, geç evre (evre 3-4) tümörlerden, glottik tümörlerin, supraglottik tümörlerden daha yüksek oranda HPV pozitifliği gösterdiği saptanmıştır.<sup>21</sup>

#### **2.4.2.5. Laringofarengeal reflü**

Larenksin kronik iritasyonu, larenks kanseri açısından risk faktörü olarak kabul edilmektedir ve özellikle sigara ve alkol tüketimi olmayan hastalarda etken olarak düşünülmektedir. Asit içeriğın laringofarengeal reflüsü (LFR)' nün kanser gelişiminde rolü olabileceğı düşüncesi 1980'lerde ortaya çıkmıştır. Geniş hasta sayısıyla yapılan bir çalışmada LFR'nin, sigara ve alkol kullanımından bağımsız olarak larenks ve farenks kanseri riskini orta derecede yükselttiğı belirtilmiştir.<sup>22</sup> Alkalın safra reflüsü bir diğer faktör olabilir. Bir çalışmada gastrektomi yapılanlarda kontrol gruplarına göre larenks kanseri insidansı artmış olarak bulunmuştur.<sup>23</sup>

#### **2.4.3. Klinik prezentasyon**

Larenks SHK'nın semptomları primer tümörün köken aldığı yere bağılı olarak değişmektedir. Glottik SHK'ların ana semptomu ses kısıklığıdır. Çok küçük lezyonlarda dahi vokal kordların titreşim özellikleri bozulduğundan bu bölgenin tümörleri erken bulgu verirler. Fakat şikâyetler dikkate alınmazsa ve hastalık ilerlerse dispne ve stridor ortaya çıkabilir. Glottik tümörler, doğal bariyerlerden ve lenfatiklerin azlığından dolayı uzun süre bu bölgede sınırlı kalırlar.<sup>24</sup> Supraglottik tümörler vokal rezonansı bozmadan disfoni yapabilirler. Disfaji, odinofaji, stridor, dispne, otalji ve hemoptizi diğer semptomlardır. Supraglottik tümörü olan hastalar larengeal semptomlar olmadan ilk olarak boyunda lenfadenopati ile gelebilirler. Subglottik SHK çoğunlukla ileri evrede tanı alır ve dispne ile stridor en sık görülen semptomdur.<sup>25</sup>

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

#### **2.4.4. Tanı ve değerlendirme**

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

**Fizik Muayene:** Palpasyonda larenksin ağırlı ve hassas olması, larenks iskeletinde genişleme, fizyolojik krepatasyonun kaybolması gibi bulgular tespit edilebilir. Tirohyoid ve krikotroid membran bölgesinde dolgunluk olabilir. Bu tümörün, tiroid kıkırdak veya tirohiyoid membran bariyerini aşıp dışa doğru cilt altına (bazen ciltten de dışarı çıkar) yayıldığı zaman görülür ve bu durum hastalığın ileri evrede olduğunu gösteren bir bulgudur.

Dil kökü palpe edilmelidir. Vokal kord fiksasyonu olan bir hastada, rekürren sinir fonksiyonunun bozulması ile direkt krikoaritenoid eklem tutulumuna bağlı fiksasyon ayırt edilmelidir. Lenf nodu metastazı açısından supraklavikular bölge üstünde kalan tüm boyun alt bölgeleri dikkatli bir şekilde palpe edilmelidir.<sup>11</sup>

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

**İndirekt larengoscopi:** Tanının ilk basamağıdır. Larenks aynası ile yapılır. Larenksin ana görüntüsü ve dil kökünü iyi gösterir. Tümörün yeri, yayılımı, görünümü, vokal kordların mobilitesi iyice gözden geçirilmelidir. Ancak anterior komissür, subglottik bölge, preepiglottik bölge, paraglottik bölge ve kıkırdak invazyonlarının değerlendirilmesinde güçlük yaşanabilir.<sup>8</sup>

**Endoskopik larenks muayenesi:** Özellikle son yıllarda, larenksin endoskopi ile değerlendirilmesi rutin muayene haline gelmiştir. İndirekt ayna ile değerlendirilemeyen larenks bölgeleri ve aşırı öğürme refleksi olan hastaların muayenesini oldukça kolaylaştırmıştır. Daha pahalı ve ileri bir teşhis metodu olan fleksibl nazofaringoskop kullanımı da gittikçe yaygınlaşmaktadır. En sık kullanılan teleskoplar çocuklarda 2,7mm ve erişkinlerde 4mm çaplı 70 derece teleskoplardır.<sup>8</sup>

**Mikrolarengoscopi:** Preoperatif teşhiste en önemli basamaklardan biridir. Bu yöntemle, tümörün yeri ve yaygınlığı, ventrikül ve sinüs piriformis gibi gizli köşelerin durumu ve tümörün yüzeysel karakteri (nodüler, ekzofitik, granülomatöz, ülsere vb. gibi) hakkında çok değerli bilgiler elde etmek mümkündür. Hastalığın histopatolojik tanısının da konması için bu aşamada biyopsi alınmalıdır.<sup>70 ve 90 derecelik açılı endoskoplarla ariepiglottik foldlar, epiglot, aritenoidler, interaritenoid bölge, yalancı vokal kordlar, gerçek vokal kordlar yanında subglottis, band ventrikül, anterior komissür gibi rutin muayene ile değerlendirilemeyen bölgeler incelenebilmektedir. Eğer mümkünse hipofarenksin alt bölümleri de değerlendirilmelidir.<sup>8</sup></sup>

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

#### 2.4.5. Görüntüleme

Larengeal malignensi şüphesi olan bir hastanın değerlendirmesinde radyolojik görüntüleme önemlidir. Bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG) larenks tümörlerinin değerlendirilmesinde en faydalı bilgileri verir.<sup>26</sup>

MRG bazı durumlarda daha üstün olmasına rağmen, BT en sık kullanılan yöntemdir. Ossifiye kartilaj ve kalsifikasyon gibi kemik yapıların görüntülenmesinde BT daha üstündür. Kartilaj invazyonunun tespiti ve yumuşak doku değerlendirmesinde ise MRI daha üstündür. MRG'nin BT'ye göre dezavantajları artmış hareket artefaktının artmasına yol açan ve çözünürlüğü azaltan uzun görüntüleme zamanı, kemik invazyonunun tespitinde düşük yeteneği ve artmış maliyettir. Ayrıca MRG, pacemaker kullanan hastalarda veya diğer ferromanyetik yabancı cisim olanlarda kontraendikedir. Reaktif inflamatuvar değişiklikler ve tümör arasında tam ayırım yapamadığından yalancı pozitiflik oranı yüksektir.<sup>27</sup>

BT incelemeleri, ekstralarengeal yapıları ve lenf nodlarının değerlendirmek için boynu taramakta, 1mm aralıklarla kesitler alarak detaylı incelemeye olanak sağlamakta ve multiplanar rekonstruksiyona izin vermektedir. Aksiyel kesitler tümör lokalizasyonunu ve boyutunu doğru tespit edebilmek için vokal kordlara paralel olarak çekilmelidir. Primer tümör sıklıkla kontrast tuttuğundan, intravenöz kontrast kullanılması önemlidir. Yağ baskılı sekans gibi özel MRG serileri, özellikle paraglottik ve preepiglottik boşlukların değerlendirilmesinde faydalıdır.<sup>11</sup>

Radyoaktif madde işaretli glukoz (18 F-florodeoksiglukoz (FDG)) kullanılarak çekilen pozitron emisyon tomografi (PET) malignensi ve inflamasyon gibi diğer patolojik hastalıklar arasında ayırımı yapmakta kullanılabilir. PET, BT ile beraber çekildiğinde (PET-BT) şüpheli alanların anatomik lokalizasyonunu mükemmel şekilde verir. PET'in faydaları: bölgesel ve uzak metastazları tespit ederek malign tümörlerin evrelemesi, primeri bilinmeyen tümörlerin tanısı, senkron tümörlerin belirlenmesi ve özellikle larenkse radyoterapi tedavisi uygulanmış hastalarda rezidüel veya rekürren kanserleri tespit etmesidir.<sup>11</sup>



Radyoloji larengeal SHK'larının evrelemesinde önemli bir role sahiptir. Çünkü klinik ve endoskopik muayene primer tümörün derin invazyonunu belirlemede yetersiz kalmaktadır. Primer tümörün evrelemeyi belirleyen bazı özellikleri (preepiglottik boşluk, paraglottik boşluk, tiroid veya krikoid kartilaj, ekstralarengeal dokular, prevertebral fasya, mediastinal yapılar ve karotis invazyonu) görüntüleme olmadan değerlendirilemez.<sup>26</sup>

Preepiglottik boşluk invazyonuna BT'de bu bölgedeki yağ dokusunun kaybı ve orta derecede kontrast tutan bir kitleyle yer değiştirmesiyle tanı konur. MRG preepiglottik bölge ve dil köü invazyonunun tespitinde yüksek sensitiftir ve BT'ye üstündür. Tiroid ve krikoid kartilajların radyolojik görüntüsü ossifikasyonun derecesine bağlı olarak değişir. BT kemik ve kalsiyumun görüntülemesinde MRG'ye üstün olmasına rağmen; larenks kartilajlarının belirlenmesinde MRG daha üstündür. MRG kartilaj invazyonu açısından yüksek sensitiviteye ve yüksek negatif prediktif değere sahiptir. Fakat reaktif tümör ve inflamasyon arasındaki ayrımı tam yapamaması düşük spesifite ve %70'lere varan düşük pozitif prediktif değerlere yol açmaktadır.<sup>11</sup>

BT kartilaj invazyonunun tanısında MRG'ye göre daha az sensitiftir. BT'de görülen ekstralarengeal yayılım, sklerozis, erozyon ve lizis kartilaj invazyonunu düşündürür. Yine MRG subglottik tümörlerde krikoid invazyonunun tespitinde daha üstündür. Kartilaj invazyonunun doğru tanısı oldukça önemlidir çünkü erken evre bir tümörü T3 veya T4 bir tümöre dönüştürebilir. Bu tümörler RT'ye kötü cevap, kötü lokal kontrol ve artmış osteokondronekrozis riski taşırlar.<sup>11</sup>

#### **2.4.6. Evreleme**

Malign tümörlerin evrelemesinde, AJCC (American Joint Committee on Cancer) ve Union for International Cancer Control (UICC) 1943 yılında Pierre Denoix tarafından geliştirilen Tümör Nod Metastaz (TNM) sınıflamasını kullanmaktadır. TNM sınıflaması primer tümörün yayılımını (T), bölgesel lenf nodlarının varlığını veya yokluğunu ve yayılımını (N) ve uzak metastaz olup olmadığını (M) içermektedir. Larenks kanserlerinin sınıflamasında 2017 yılında yayınlanan AJCC/UICC TNM sınıflama sistemi kullanılmaktadır (Tablo 2-1, 2, 3).<sup>28</sup> Bu sistem kullanılarak T, N ve M değişik kombinasyonlarına göre tümörler evrelere ayrılmaktadır (Tablo 2-4). Tümörler klinik olarak (kTNM) veya patolojik (pTNM) olarak sınıflanabilir.

**Tablo 2-1.** TNM sınıflamasına göre larenks kanserlerinde T evresi(2017 AJCC/UICC TNM sınıflaması)

<b>TNM sınıflaması</b>	
<b>Primer tümör (T)</b>	
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümöre ait herhangi bir bulgu yok
Tis	Karsinoma in situ
<b>Supraglottis</b>	
T1	Normal vokal kord hareketleriyle birlikte supraglottisin bir kesimine sınırlı tümör
T2	Larenks fiksasyonu olmadan supraglottisin birden fazla alt bölgesine veya glottise ya da supraglottis dışında bir bölgeye (Dil kökü, valleküla, priform sünüşün medial duvar mukozası, vb) invaze tümör
T3	Vokal kord fiksasyonu ile birlikte larenkse sınırlı ve/veya postkrikoid alanın, preepiglottik boşluk, paraglottik boşluktan herhangi birine ve/veya tiroid kırdağın iç korteksine invaze tümör
T4a	Orta düzeyde lokal ileri hastalık Tiroid kartilaj ve/veya larenks dışında herhangi bir dokuya (trakea, dilin ekstrinsik kasları dahil boyun yumuşak dokusu, strap kası, tiroid veya özefagus vb) invaze tümör
T4b	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık Tümör prevertebral boşluğa invaze veya karotid arteri sarmış
<b>Glottis</b>	
T1	Normal vokal kord hareketleriyle beraber vokal kord(lar)a sınırlı (anterior veya posterior komissürü tutabilir) tümör
T1a	Bir vokal korda sınırlı tümör
T1b	Her iki vokal kordu tutmuş tümör
T2	Supraglottis ve/veya subglottise uzanan tümör ve/veya vokal kord hareketinde bozukluk
T3	Vokal kord fiksasyonu ile birlikte larenkse sınırlı ve/veya paraglottik boşluğa invaze ve/veya tiroid kartilajın iç korteksine invaze tümör
T4a	Orta düzeyde lokal ileri hastalık Tiroid kartilaj dış korteksine ve/veya larenks dışında herhangi bir dokuya (trakea, dilin ekstrinsik kasları dahil boyun yumuşak dokusu, strap kası, tiroid veya özefagus vb) invaze tümör
T4b	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık Tümör prevertebral boşluğa invaze veya karotid arteri sarmış
<b>Subglottis</b>	
T1	Subglottise sınırlı tümör
T2	Tümör vokal korda uzanıyor ve vokal kord hareketleri normal ya da bozulmuş
T3	Vokal kord fiksasyonu ile birlikte larenkse sınırlı tümör
T4a	Orta düzeyde lokal ileri hastalık Krikoid veya tiroid kartilaja ve/veya larenks dışında herhangi bir dokuya (trakea, dilin ekstrinsik kasları dahil boyun yumuşak dokusu, strap kası, tiroid veya özefagus vb) invaze tümör
T4b	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık Tümör prevertebral boşluğa invaze veya karotid arteri sarmış

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

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

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

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

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

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

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

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

Larenks kanserlerinde çeşitli tedavi yöntemleri olmasına rağmen cerrahi ve radyoterapi (RT) iki en önemli tedavi şeklidir. Son 30 yılda larenks koruyucu cerrahiler (parsiyel larenjektomiler) ve kemoterapi ile kombine edilen radyoterapi (kemoradyoterapi (KRT)) tedavide kullanılmaktadır. Genel olarak erken evre larenks kanserleri (evre 1 veya 2) tek tedavi yöntemiyle (tek başına cerrahi veya radyoterapi) tedavi edilmektedir. İleri evre larenks kanserlerinde (evre 3 veya 4) ise kombine tedavi yöntemleri (primer cerrahi sonrası RT veya KRT veya primer KRT veya RT sonrası kurtarma cerrahisi) kullanılmaktadır. Hangi yöntemin kullanılacağına hastaya, hastalığa veya merkeze bağlı faktörlere göre karar verilmektedir.<sup>8</sup>

### **2.5.1. Glottik Kanserlerin Tedavisi**

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

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

Erken glottik kanserlerin cerrahi tedavisi larenksin korunmasını hedeflemektedir ve larenks koruyucu cerrahi veya parsiyel larenjektomi olarak adlandırılır. Eksternal yaklaşımla yapılan iki klasik açık cerrahi teknik laringofissür kordektomi ve vertikal parsiyel larenjektomidir.<sup>11</sup>

**Laringofissür kordektomi:** Laringofissür ile birlikte kordektomi vokal kordların eksizyonuna olanak veren tirotoni girişimidir. Anatomik nedenlerle endoskopik rezeksiyonun yapılamadığı T1 glottik kanserlerde uygundur. Hastalığın bulunduğu korda mükemmel görüş sağlar ve gerekli durumlarda tiroid kartilaj gibi komşu dokuların rezeksiyonuna da olanak sağlar.<sup>11</sup>

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

Vertikal parsiyel larenjektominin daha genişletilmiş halinde ön komissür de rezeksiyona dahil edilir. Karşı kordun bir kısmının da rezeke edilmesi gereken durumlarda laringofissür orta hattın karşı tarafından, tiroid ala üzerinden alttaki vokal kordu içine alacak şekilde yapılabilir (frontolateral vertikal larenjektomi).<sup>8</sup>

**Suprakrikoid parsiyel larenjektomi (SKPL):** Her iki membranöz vokal kord ve komşu paraglottik mesafe ile tüm tiroid kartilaj çıkartılır. Epiglot tabanı da rezeksiyona dahil edilir ve bant ventriküllerle birlikte bir aritenoidi, tüm epiglotu ve preepiglottik mesafeyi de içine alacak şekilde genişletilebilir. Petiolün üzerinde kalan epiglotun korunduğu olgularda yapılan rekonstrüksiyona krikohyoidoepiglottopeksi (KHEP), epiglot çıkartıldığında yapılan rekonstrüksiyona krikohyoidopeksi denilir. Laccourreye ve ark.'ları ön komissür tutulumu olan ve SKPL yaptıkları hastalarda lokal kontrol oranını %98 olarak raporlamışlardır.<sup>29</sup>

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

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

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

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

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

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

Seçilmiş vakalarda konservasyon cerrahisi yapılabilir. Konservasyon cerrahisinde uygun bir rekonstrüksiyonla fonksiyone edilebilen larenks için bulunması gereken en küçük birim "aritenoid birimidir". Aritenoid birimi, hareketli aritenoid, ona bağlı vokal kord ve ventriküler bandın bir bölümü ve sağlam krikoid bölgeden oluşur. Krikoid bölgesi konservasyon cerrahisinin sınırındadır. Krikoid bölgesinde lenfatik drenaj sirküler olup parsiyel rezeksiyona onkolojik yönden olanak tanımaz.<sup>8</sup>

Geçmişte T3 tümörler tek tedavi modalitesi olarak total larenjektomi ile tedavi edilmekteydi. Açık vertikal hemilarenjektomi ve daha geniş parsiyel larenjektomiler, seçilmiş vakalarda günümüzde kullanılan metodlardır. Kirchner ve Som açık parsiyel larenjektomi yaptıkları hastalarda 2 yıllık sağkalımı %60 olarak bulmuşlardır.<sup>31</sup>

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

**Total Larenjektomi:** Standart ve genişletilmiş rekonstrüktif parsiyel larenjektomi tekniklerine rağmen aşırı ilerlemiş tümörler onkolojik olarak ancak total larenjektomi ile tedavi edilebilir. Total larenjektomi, solunum ve sindirim yollarının tam olarak ayrılması ve larenksin servikal trakea 3. ve 4. halkaları ile birlikte en blok rezeksiyonu ile uygulanan klasik cerrahi tekniktir. Günümüzde uygun endikasyon ve hasta seçimi ile total larenjektomi oranı %15-30'a kadar indirilebilir. Artık total larenjektomi larenks kanser cerrahisinde altın standart cerrahi değil endikasyonda başvurulacak en son cerrahi girişimdir.<sup>8</sup>

**Radyoterapi:** İleri evre glottik tümörlerde radyoterapi birçok merkezde kür amaçlı veya kemoradyoterapi ile birlikte kombine tedavi şeklinde uygulanmaktadır. Küratif amaçlı primer radyoterapi taraftarları radyoterapi ile hastanın larenksinin

korunabileceğine, ancak başarısız kalındığında cerrahinin gerektiğine inanmaktadır. T3 glottik tümörlerde radyoterapinin tek başına kür şansı %20-30 olup kurtarma cerrahisi ile birlikte %50'ye ulaşmaktadır. Radyoterapiden önce mevcut olan konservasyon cerrahisi şansı, kurtarma cerrahisinde kaybolmaktadır. Ayrıca radyoterapiden sonra yara iyileşme sorunu vardır. Bütün bu nedenler kurtarma cerrahisini total larenjektomi şekline dönüştürür. Hasta tek ve daha uygun tedavi yerine iki kere tedavi almak zorunda kalmaktadır.

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

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

Erken T1-T2N0 glottik kanserlerde boyuna gizli metastaz olasılığının düşük olmasına rağmen T3-T4N0 tümörlerde gizli metastaz olasılığı yüksektir. Özellikle supraglottik, subglottik ve paraglottik uzanımı olan tümörlerde bu bölgelerin zengin lenfatik ağı nedeniyle risk daha fazladır. T3 ve T4 tümörlerde boyun metastazı oranları %20-65 dolayındadır.<sup>32</sup> Transglottik tümörlerde bu oran %30-50 düzeyine çıkmaktadır. Klinik olarak lenf nodu metastazı saptanmamış hastalarda primer tümöre cerrahi yapılacaksa T3 ve T4 tümörlerde elektif boyun diseksiyonu yapılmalı, 2-4. Bölgeler temizlenmelidir. Primer tümöre RT uygulanan hastalar da ise aynı bölgeler elektif olarak ışınlanmalıdır.<sup>8</sup>

## **2.5.2. Supraglottik Kanserlerin Tedavisi**

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

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

**Supraglottik larenjektomi:** Ventrikülün tabanından itibaren yukarıya doğru bütün larengeal yapılar çıkarılmaktadır. Vokal kordlar, aritenoidler, dil kökü ve hyoid kemik korunmaktadır. Açık supraglottik larenjektomi için kontraendikasyon oluşturan durumlar genel fiziksel durumda bozukluk veya komorbiditeler (ileri yaş, akciğer hastalığı, disfaji veya aspirasyon ve nörolojik hastalıklar), glottik tutulum, bozulmuş vokal kord hareketi veya fiksasyonu, tiroid veya krikoid kıkırdak tutulumu, sirkumvallat papillara 1 cm'den yakın tutulum olması ve derin dil kaslarının tutulmasıdır. Eğer tümör tutulumuna bağlı olarak epiglot lingual yüzü, dil kökü veya aritenoidler rezeksiyona katılmışsa genişletilmiş supraglottik larenjektomi adını alır. Erken evre supraglottik kanserlerde SGPL'nin lokal kontrol oranı %80-100 arasında raporlanmaktadır.<sup>33</sup>

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

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

**Radyoterapi:** T1-T2 hastalarda kullanılan diğer tedavi yöntemidir. Spriano ve arkadaşları tarafından primer RT ve parsiyel larenjektomi sonuçları karşılaştırılmıştır. Cerrahi grupta 5 yıllık hastalısız sağ kalım %88, RT grubunda %76 raporlanmıştır.<sup>34</sup>Bu nedenle supraglottik tümörlerde kontraendikasyon yoksa primer tedavi olarak cerrahi düşünülmelidir.

### 2.5.2.2. İleri evre supraglottik larenks kanserlerinde tedavi

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

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



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

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

**Boyun tedavisi:** Supraglottik kanserli hastalarınızın dönem sağ kalımını etkileyen en önemli faktörlerden birisi boyundaki lenfatiklerin tutulumudur. Gizli veya klinik olarak saptanabilen metastaz durumunda hastaların yaşam şanslarında %50'lik bir azalma meydana gelmektedir.<sup>35</sup>

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

Klinik olarak N0 boyundaki tutulum tartışmalı olmasına rağmen gizli metastaz oranları %30 civarındadır. Bu nedenle günümüzde daha çok genel tutum hastalara elektif boyun diseksiyonu uygulanmasıdır. Lateralize tümörlerde kontralateral boyun metastazı %10'un altında bildirilmesine rağmen en sık nükslerin opere edilmeyen boyunda olmasından dolayı primer odağa cerrahi uygulanan bütün vakalarda bilateral seviye 2-4 boyun diseksiyonu önerilmektedir.<sup>35</sup> İntraoperatif bulgulara göre 1. ve/veya 5. Bölgede diseksiyona eklenebilir.<sup>8</sup>

### **2.5.3. Subglottik Kanserlerin Tedavisi**

Primer subglottik kanserler, tüm larenks kanserlerinin sadece %4'ünü oluşturur. Tedavisi total larenjektomi ve postoperatif RT'yi içermektedir. Ayrıca ipsilateral tiroidektomi ve paratrakeal lenf nodu diseksiyonu önerilmektedir. Stell ve Tobin serilerinde %44 mortalite raporlamışlardır.<sup>36</sup>

## 2.5.4. Transglottik Kanserlerde Tedavi

Transglottik terimi glottik veya supraglottik tümörün ventrikülü atlayarak larenksin iki bölümündeki tümörü ifade eder. İki taraflı transglottik tümörlerde sadece total larenjektomi önerilirken, günümüzde konservasyon cerrahileri (horizontal vertikal larenjektomi, suprakrikoid subtotal larenjektomi, neartotal larenjektomi) seçilmiş tümörlere başarıyla uygulanmaktadır.<sup>8</sup>

## 2.6. Toll like reseptör ailesi

### 2.6.1. Genel Özellikler

İmmün sistem, doğal ve edinilmiş olmak üzere iki ana bölümde incelenir. Evrim sırasında gelişen ve tüm hayvan ve bitki sınıflarında var olan doğal immünite patojenlerin tanınması için toll benzeri reseptörler (toll like receptors, TLR) ailesini kullanır. Toll geni ilk defa 1985'te Nobel ödüllü Christiane Nüsslein-Volhard, Eric Weischaus ve arkadaşları tarafından bir meyve sineği olan *Drosophila melanogaster*'de tanımlanmıştır. İlk olarak toll geninin bu sineklerin dorsal-ventral akslarının embriyogenezinde önemli rol oynadığı ortaya konulmuştur. Takip eden yıllarda bu genin memelilerde de var olduğu ve hem memeliler hem omurgasızlarda doğal immünite için gerekli olduğu anlaşılmıştır. Bu gen ve reseptör ailesinin adı 1985'te bu geni ilk bulan ekipten olan Nüsslein-Volhard'ın meyve sineği larvasının dorsal vücut bölümüne göre az gelişmiş olan ventral bölgesini fark ettiğinde hayretini dile getirmek için söylediği "Das ist ja toll" cümlesinden gelmektedir. Almanca'da toll "inanılmaz" veya "harika" demektir.

İnsanlarda TLR ilk Nomura ve arkadaşları tarafından 1994'te tanımlanmıştır. TLR'ün insanlarda edinilmiş immün sistemi de harekete geçirebileceği 1997'de Janeway ve Medzhitov tarafından gösterilmiştir.<sup>37</sup> TLR4'ün lipopolisakkaritleri algılayan bir reseptör olarak işlev gördüğünü gösteren Dr. Beutler ve Dr. Hoffmann 2011'de bu keşifleri ile Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir.

Memelilerde bulunan tüm TLR'ler, ekstraselüler alanda ligand-bağlama bölgelerinde ortak yapısal özelliklere sahiptirler. Bu reseptörlerin amino-terminal ekstraselüler domain'leri lösinden zengin tekrar motiflerini (LRR) içermektedir. Bu motifler tek bir transmembran domaini ile devam eder ve sonrasında Toll/interlökin 1

reseptör (TIR) domaini olarak adlandırılan globüler bir sitoplazmik domain ile sonlanır. Kristallografi çalışmalarında LRR'lerin, reseptörün ekstraselüler domain'inin at nalı görünümünde olmasına neden olduklarını, ligand bağlanmasını takiben iki ekstraselüler domain'in "m" şeklinde bir dimer yapı oluşturdukları belirlenmiştir. Bu dimer yapılanmayı takiben her iki reseptörün transmembran ve sitoplazmik domain'leri de sinyal iletim kaskadını başlatmak üzere birbirine oldukça yakın devam etmektedir. Tüm TLR ailesi üyeleri evrimsel süreçte sıkı korunmuşlardır ve buda, TLR'lerin normal fizyolojik süreçte ne kadar önemli olduklarını göstermektedir.

Doğal bağışıklık sistemi, patojen tehditlerini tanıyan ve onlara karşı yanıtı harekete geçiren germ-line şifreli Pattern Tanıma Reseptör (PRR)'leri içermektedir. PRR'ler, mikrobiyal patogeneze, sağ kalım ve replikasyonda kritik role sahip olan, Patojenle-İlişkili Moleküler Patern (PAMP)'ler olarak adlandırılan mikrobiyal komponentleri tanımada görev almaktadırlar. İntegral hücre membranı ve hücre duvarı komponentleri, bakteriyel toksinler, DNA, RNA vb moleküller PAMP'lara en iyi örneklerdir. PRR'lerin PAMP'ları tanıma kaskadı, enfeksiyonu önleyen ya da enfeksiyonla savaşan ve kazanılmış immün yanıtı harekete geçiren konak defansını aktive eder.<sup>38</sup> PRR'le; TLR, Nükleotit bağlayan Oligomerizasyon Domain (NOD)-benzeri reseptörler (NLR), Retinoik Asit ile Uyarılan Gen I (RIG-I) benzeri reseptörler (NLR) ve DNA sensörleri olmak üzere dört aileden oluşmaktadır.<sup>39</sup> PRR'lerin en iyi bilinen grubunu, yukarıda da bahsedildiği üzere birçok memeli hücrelerinde eksprese edilen TLR'ler oluşturmaktadır. Her bir TLR, mikrobiyal komponentlerin spesifik patternlerini tanımaktadır. Mikrobiyal komponentlerin TLR'ler tarafından tanınması farklı genlerin ekspresyonlarını uyararak doğal immunitenin aktivasyonunu tetiklemektedir. Doğal immunitenin TLR aracılı aktivasyonu, antijen spesifik kazanılmış bağışıklığın gelişimi için zorunlu gözükmektedir.<sup>40</sup> TLR'ler yalnızca ekzojen PAMP'lar ile değil ayrıca tehlike sinyalleri olarak adlandırılan endojen ligandlar ile de aktive olabilmektedirler. Bu konak-kökenli TLR ligandları Tehlike ile İlişkili Moleküler Pattern (DAMP)'lar olarak adlandırılmaktadır.<sup>41</sup>

### **2.6.2. TLR Ailesi**

Günümüzde insanlarda 12 adet fonksiyonel TLR ve bu reseptörler için birçok ligand tanımlanmıştır. TLR 1, 2, 4, 5, 6 ve 10 çoğunlukla hücre yüzeyinde lokalize olup

patojenlere spesifik molekülleri tanirlar. TLR 3, 7, 8 ve 9 ise intraselüler organellerin içinde lokalize olurlar.

### **2.6.2.1. TLR2**

Hem gram-negatif hem de gram-pozitif bakteriler üzerinde bulunan lipoproteinlerin TLR2'nin tanınması sonucunda hücreleri aktive ettiği gösterilmiş ve TLR2'nin ağırlıklı olarak lipoproteinleri tanıyan reseptör olduğu düşünülmüştür.<sup>42</sup>

TLR2 peptidoglikan, lipoteikoik asit, gram-pozitif LPS ve bir grup gram-pozitif makromolekül ile bağlanıp cevap verebilmektedir. Tek bir TLR nin birden fazla molekülünü tanımasının nedeni diğer TLR'ler ile dimerize olabilme yeteneğinden gelmektedir. Peptidoglikan, TLR2 ve TLR6'nın dimer oluşturduğu reseptör aracılığı ile sinyal iletirken, lipoproteinler TLR6'ya ihtiyaç duymadan TLR2'yi aktive edebilmektedir.<sup>43</sup>

Sadece TLR2, TLR1 ve TLR6 ile heterodimerize olarak farklı molekülleri tanıma kapasitesini artırırken, aktive olmak için heterodimerizasyon gerekmeyen TLR4 için bu görevi muhtemelen MD2 ve CD14 gibi diğer yardımcı moleküller yürütmektedir.<sup>44</sup>

### **2.6.2.2. TLR3**

Enfekte hücrelerde viral replikasyon, immun hücreleri stimüle edebilen çift sarmallı RNA (double-stranded RNA, dsRNA)'nın oluşması ve Tip 1 interferon'un indüklenmesiyle sonuçlanır. TLR3'ten yoksun farelerde yapılan çalışmalarda viral RNA kopyasına karşı oluşan cevapların azalması, TLR3'ün dsRNA'nın tanınmasında rol oynadığını göstermiştir.<sup>45</sup>

### **2.6.2.3. TLR4**

İnsanda en çok araştırılan ve fonksiyonu aydınlatılan TLR olan TLR4 lipopolisakkaridler (LPS)'in tanınmasında rol almaktadır. TLR4'ün bir LPS reseptörü olduğu ortaya çıkarılmıştır. TLR4 fonksiyonel olarak hücre yüzeyinde CD14, MD2 ve LPS-bağlayıcı proteini içeren bir molekül kompleksini oluşturmakta ve bu moleküllerden herhangi birisi eksik olan farelerde LPS cevabının da eksik olduğu gözlenmektedir.

CD14, TLR4'ü ve ekstraselüler aksesuar bir protein olan MD2'yi içeren bir kompleksle birleşmektedir. Hem TLR4 hem de MD2'nin LPS yapılarının ayırımında önemli olduğu bilinmektedir. TLR4'ün LPS dışında, konağa ait olan veya olmayan birçok molekülü tanıyabildiği bilinmektedir.<sup>46</sup>

#### **2.6.2.4. TLR lokalizasyon ve ligandları**

TLR'ler, Tip I transmembran proteinlerdir ve hücre içerisinde farklı lokalizasyonlarda bulunmaktadır. TLR1, TLR2, TLR4 ve TLR6 hücre yüzeyinde eksprese edilirken, TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9 ise endozom gibi hücre içi komponentlerde eksprese olmaktadır.

Her bir TLR'ye özgün ligandlar ve bu ligandların köken aldıkları orijinler mevcuttur. TLR1 ya da TLR6 ile heterodimer oluşturan TLR2, gram pozitif bakterilerin ve mikoplazmanın peptidoglikan, lipopeptit ve lipoproteinlerini içeren çeşitli bakteriyel komponentleri tanımaktadır. TLR3'ün ligandı replike olan virüslerin ürettiği çift-zincir RNA (dsRNA) molekülüdür. Gram negatif bakterilerde bulunan LPS'nin TLR4'ün ligandı ve bakteriyal flagellin ise TLR5 ligandı olduğu belirlenmiştir. Mikrobiyal ligandlara ek olarak, birçok endojen ligandların da TLR'leri uyardıkları belirlenmiştir. Bu endojen ligandlara ısı-şok proteinleri (HSP) (HSP60 ve HSP70), hiyaluronan oligosakkaritleri, sürfaktan protein A ve heparan sülfat, fibronektin, endoplazmin gibi farklı ekstraselüler matriks ürünleri ve bu matriks ürünlerinin fragmanları verilebilir.<sup>47</sup>

**Tablo 2-5.** Toll-like reseptör ailesinin endojen ve eksojen ligandları

Reseptör	Endojen ligandlar	Ekzojen ligandlar	Başlıca sentezlenen inflamatuarsitokin ve kemokinler
TLR1		Triasil lipopeptitler Soluble faktörler (N.meningitidis)	IL-6, IL-10, TNF-alfa
TLR2	HSP70 HMGB1 HSP60 Nekrotik hücreler Apolipoprotein CIII Okside LDL SerumAmiloidAAmilo idbeta	Bakteriyel Lipoproteinler / Lipopeptitler Peptidoglikan Zymosan (mantar) Viral zarf glikoproteinleri Sentetik bileşikler (Diacil ve triasil lipopeptitler	IL-6, TNF alfa, IL-1beta, IL-10
TLR3	mRNA	Viral dsRNA Sentetik bileşikler (Poly-I,C)	IFN-gama
TLR4	HSP60 HSP70 Fibronektin Hyaluronan Heparan Sulfat Fibrinojen Beta-Defensin 2 Okside LDL Akciğer surfaktan protein-A Tenascin C	Lipopolisakkaritler Viral zarf glikoproteinleri Sentetik bileşikler (Monophosphoryl lipid A)	IFN-gama, IL-1beta
TLR5		Bakterial flagellin	IL-6, TNF-alfa, IL-10
TLR6		Diacil lipopeptitler (Mycolpasma)	IL-1beta
TLR7	ssRNA	ssRNA (Virus) Sentetik bileşikler (Imidazoquinoline, RNA, loxoribine, bropirimin)	IFN-gama
TLR8	ssRNA	ssRNA (Virus) Sentetik bileşikler (Imidazoquinoline)	IFN-gama
TLR9	CpG DNA	CpG DNA (bakteri ve virus) Sentetik bileşikler (CpG Oligonukleotidler)	IFN-gama

#### 2.6.2.5. TLR Sinyalizasyonu

TLR sinyalizasyonunda, myeloid differensiyasyon faktör 88'e (MyD88) bağımlı ve bağımsız sinyal yolu olmak üzere 2 yol tanımlanmıştır. Bu sinyal yollarında başlıca

dört adaptor molekül rol oynar: MyD88, TIR bölgesi IFN-beta indükleyen adaptör proteini (TRIF), TRIF ile ilişkili adaptör molekül (TRAM) ve TIR ilişkili protein (TIRAP).<sup>48</sup>

#### **2.6.2.5.1. MyD88 Aracılıklı Sinyal Yolağı**

MyD88, TLR3 dışındaki tüm TLR tiplerinde, TLR aracılığı ile oluşan doğal immün yanıtın aktivasyonu için başlıca elemandır. Bu yolda başlangıçta CD14, bakteriyel LPS'yi tanır, TLR4 ve MD2 ile bir kompleks oluşturarak sinyalizasyonu başlatır. CD14, bakteriyel LPS'nin ve diğer PAMP'ların tespit ve tanınmasında, TLR4 ve MD2 ile birlikte yardımcı reseptör olarak görev alır. MD2, ekstraselüler bir protein olup, TLR4'ün hücre yüzeyine lokalizasyonu ve LPS ile indüklenen uygun TLR4 cevabı için gereklidir.

MyD88 TIRAP varlığında TLR4'e bağlanır ve komplekse IRAK'ı katar. Daha sonra MyD88 terminal bölgedeki karboksil (COOH) kısmından IL-1 reseptör bağlantılı kinaz kompleksi (IRAK) ile birleşir. IRAK otofosforile olup kompleksten ayrılır, TRAF-6 bağlanarak aktifleşir. TRAF6'da TAK1'i (TGF-beta active kinase 1) aktifler. TAK1, TAB1 (TAK1 bağlanma proteini 1) ve TAB2 (TAK1 bağlanma proteini 2) ile bir sinyal kompleksi oluşturarak NF- $\kappa$ B inhibitör protein [I $\kappa$ B] kinaz (IKK) kompleksini aktive eder. Bu kompleksle düzenleyici genler aktive olur. NF- $\kappa$ B nükleusa geçer ve  $\kappa$ B bölgesine bağlanır. Sonuç olarak, NF- $\kappa$ B aktivasyonu, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, iNOS ve MCP-1 gibi inflamatuvar düzenleyici genlerin ekspresyonuna neden olur.<sup>49</sup>

#### **2.6.2.5.2. TRIF-Bağımlı Yolak**

Bir sitoplazmik protein olan MyD88, tüm IL-1R ve TLR ailesi ile etkileşime geçebilir ve TLR ailesinin sinyal mekanizması için MyD88'in gerekli olduğu gösterilmiştir.<sup>50</sup> Ancak MyD88 olmayan farelerde, LPS ile ortaya çıkan NF- $\kappa$ B ve MAPK kaskadı aktivasyonunun geç başlaması, TLR4'un bu kaskadları aktive etmede MyD88'den bağımsız bir şekilde de hareket edebildiğini göstermektedir.

MyD88 bağımsız sinyal yolu başlıca TLR 3 ve 4 tarafından kullanılmaktadır. TLR4 ile uyarılmış IRF-3 aktivasyonu sonucunda IFN- $\beta$  üretimi gerçekleşir. Ardından IFN- $\beta$  STAT1 (signal transducer and activator of transcription)'i aktive ederek IFN ile uyarılan çeşitli genlerin ekspresyonlarında artışa neden olmaktadır. TLR3 uyarımı ile de

IRF-3 aktivasyonu gerçekleşmekte ve TRIF-bağımlı yoldan IFN-  $\beta$ 'nin uyarımı sağlanmaktadır.<sup>48</sup>

#### 2.6.2.6. TLR ve Kanser

Larenks kanserleri baş boyun kanserleri arasında 2. en sık görülen malignite olup, 5 yıl ve üzeri sağ kalım %67'dir. Bu tümörlerle ilgili önemli özelliklerden biri özellikle ileri evrelerde lokal invazyon (lenfatik invazyon, vasküler invazyon, perinöral invazyon, kartilaj invazyonu vb.) ile lokal ileri hastalığa yol açıp çevre dokulara yayılım riski ve bölgesel ve/veya uzak metastaz riskidir. Tümörojenez ve invazyon, tümör mikroçevresine sitokin ve kemokin salınımı, doku proteazlarının aktivasyonu ve bunların sonucu olarak apoptoz inhibisyonu, anjiyogenez ve proliferasyonun aktivasyonu gibi birçok mekanizmanın iç içe girdiği kompleks bir durumdur. Tümör mikroçevresinde ki inflamatuvar hücrelerden salınan çeşitli endojen TLR ligandları, prekanseröz hücrelerdeki TLR sinyal yolunu aktive ederek sitokinlerin (IL-1, -6, -8 ve -18), büyüme faktörlerinin, anjiyogenik faktörlerin ve ekstrasellüler matriksi yıkan proteazların (metalloproteinazlar) açığa çıkmasını sağlar.<sup>51</sup> Böylece kanser gelişimini ve kanserin ilerlemesini destekleyen mikro çevresel şartları oluşturur. Hem onkogen hem de tümör süpresör genleri posttranskripsiyonel düzeyde regüle eden mikroRNA'lar ile TLR arasındaki ilişki de kanser oluşumunda önemlidir.<sup>52</sup> Çeşitli in vitro çalışmalarda, TLR tetiklemesinin insan meme kanseri hücrelerinde, melanom hücrelerinde ve berrak hücreli renal karsinom hücrelerinde ve servikal ve prostat kanserlerinde apoptozu indüklediğini gösterilmiştir.<sup>3</sup>

TLR 2-3-4 genleri değişik tümörler de eksprese edilmektedir ve çeşitli metodlarla ölçülebilmektedir(RT-PCR analizli, cDNA klonlaması, immüno blot ve immunohistokimya). TLR-2 kolon ve mide kanserinde, TLR-3 meme, kolon kanserinde ve melanomda, TLR-4 Kolon, mide, akciğer hepatoselluler, over kanserinde ve Melanomda araştırılmış ve artmış ekspresyonu bulunmuştur.2001 yılında Yoshioka ve ark.'ları yaptığı çalışmada kültürlenmiş insan kolon kanseri hücre dizilerinde CD14 / TLR-2 aracılı TGF-beta ve HGF üretimiminin indüklendiğini ortaya koymuşlardır.<sup>53</sup> 2007 de He W. ve ark.'larının çalışmasında ise TLR4'ün insan akciğer kanseri hücreleri üzerinde sentezlendiğini, fonksiyonel olarak aktif olduğunu ve immunsupresif sitokinler indükleyerek ve apoptoz direnci yaratarak insan akciğer kanseri hücrelerinin immun sistemden kaçmasında önemli rol oynayabileceğini göstermişlerdir.<sup>54</sup> 2010 yılında



Gonzalez-Reyes ve ark.'ları Meme kanseri hastalarında, güçlü TLR3 ekspresyonu olan tümörlerin, metastaz olasılığının olmayan tümörlere göre daha yüksek olduğunu yayınlamışlardır.<sup>55</sup> 2011 yılında Salaun ve ark.'ları TLR3 pozitif meme kanserli hastalarda adjuvan dsRNA tedavisinin metastatik nüks riskini TLR3 negatif meme kanserli hastalara göre önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir.<sup>56</sup>

2012'de Hui-Ching Chuang ve ark.'ları oral kavite skuamöz hücreli karsinom tanısı ile rezeksiyon yapılmış 153 hastada RT-PCR yöntemiyle tümör dokularında TLR-3 ekspresyon düzeyini incelemiştir. Yüksek TLR3 ekspresyon düzeyi kötü diferansiasyon ve perinöral invazyonu olan hastalar ile anlamlı korelasyon göstermiştir.<sup>5</sup>

2008'de Pries ve ark.'nın yaptığı çalışmada TLR3 yalnızca baş ve boyun tümör dokusunda saptanırken, komşu dokuda veya lökopastik dokuda tespit edilmemiştir. Ayrıca TLR-3 ekspresyonunun inhibe edilmesi sonrası c-myc onko-protein inhibisyonu ve hücre proliferasyonu inhibisyonu olduğunu saptamış ve invaziv karsinomaya yol açan fenotipe katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur.<sup>6</sup>

#### **2.6.2.7. TLR ve Larenks Kanseri**

Literatüre bakıldığında, TLR-2 kolon ve mide kanserinde, TLR-3 meme, kolon kanserinde ve melanomda, TLR-4 Kolon, mide, akciğer, hepatoselluler, over kanserinde ve melanomda araştırılmış ve artmış ekspresyonu bulunmuştur. Meme kanseri üzerine yapılan bir çalışmada TLR3 ekspresyonu olan tümörlerin, metastaz olasılığının olmayan tümörlere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Diğer bir çalışma da ise TLR3 pozitif meme kanserli hastalarda adjuvan dsRNA tedavisinin metastatik nüks riskini TLR3 negatif meme kanserli hastalara göre önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Oral kavite kanserlerinde yapılmış bir çalışmada TLR3 ekspresyonu, tümörlerinde kötü diferansiasyon ve perinöral invazyon olan hastalarda anlamlı artmış olarak saptanmıştır.

Larenks kanserli hastalarda bu proteinlerin ekspresyonları sınırlı sayıda çalışmada değerlendirilmiştir. Bu çalışmayla larenks kanserli hastalarda TLR 2,3,4 ekspresyonları değerlendirilecek, prognozu ön görmede kullanılacak bir marker olarak kullanılabilir. Eğer larenks kanserli hastalarda TLR 2,3,4 ekspresyonları tespit edilirse bu durum aynı meme kanserlerinde olduğu gibi hedefe yönelik tedavi edici ajanların larenks kanserlerinde de kullanımının incelenmesine temel sağlayacaktır.

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Gereç

#### 3.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan etik onayı 93777809-604.01.01-429320 nolu yazı ile alınmış, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (Proje numarası: 27974, proje kodu: TTU-2018-27974) desteklenmiştir.

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda, larenks skuamöz hücreli karsinomu tanısı almış ve total/parsiyel larenjektomi yapılan 50 hasta çalışmaya alındı. Çalışmadan dışlanma kriterleri olarak; daha önce kemoterapi almış, serolojisi pozitif, başka bir malignite öyküsü olan hastalar çalışmaya alınmadı. Hastalardan cerrahi işlem öncesi aydınlatılmış onam formu imzalatıldı ve çalışmaya katılmayı kabul eden bireylerden doku örnekleri alındı.

Alınan tümör ve normal dokulardan total RNA elde edilerek cDNA'ya çevrildi. cDNA örnekleri, ifade analiz çalışmaları yapılincaya kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Hastaların histopatolojik bulguları değerlendirilerek, TNM evreleme sistemine göre patolojik evrelemeleri yapıldı.

Hastalarda aşağıdaki klinik parametreler değerlendirmeye dahil edildi;

1. Cinsiyet
2. Yaş
3. Sigara-alkol kullanımı
4. Tümör lokalizasyonu
5. Patolojik T evresi
6. Patolojik N evresi
7. Tümör evresi
8. Perinodal yayılım
9. Histolojik grade
10. Kan damarı invazyonu
11. Lenfatik invazyon

12. Perinöral invazyon
13. Kartilaj invazyonu

### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- ✓ LightCycler 480-II Gerçek Zamanlı PZR cihazı (Roche, ALMANYA)
- ✓ Applied Bio Systems 9700 Termal Döngü Cihazı (PZR) (ABI, SİNGAPUR)
- ✓ NanoDrop Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD)
- ✓ Otoklav (Hırayama, JAPONYA)
- ✓ Derin Dondurucu (-20) (Arçelik, TÜRKİYE)
- ✓ Derin Dondurucu (-80) (Sanyo, JAPONYA)
- ✓ Distile Su Cihazı (Nüve, TÜRKİYE)
- ✓ Etüv (Hybaid, İNGİLTERE)
- ✓ Bullet Blender Storm Homojenizatör (Avarill Park., ABD)
- ✓ Hassas Terazi (Shimadzu, JAPONYA)
- ✓ Otomatik Mikropipetler (Eppendorf, ABD)
- ✓ Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich, ALMANYA)
- ✓ Vortex (Velp Scientifica, ABD)

### 3.1.3. Kullanılan Ticari Kitler

- **PureLink RNA Mini Kit (Life Technology, NY, ABD)**  
Parçalama tampon, Yıkama tamponu I- II, RNaz içermeyen su, spin kartuşu, toplama tüpleri, geri kazanım tüpleri
- **cDNA Sentez Kiti (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD)**  
RevertAid ters transkriptaz (200 U/μl), ribolock RNaz engelleyici (20 U/μl), 5X tepkime tamponu, 10mM dNTP karışımı, oligo (dT) primer (100 μM), random hexamer primer (100 μM), ileri GAPDH primer (10μM), geri GAPDH primer (10μM), control GAPDH RNA (0,05 μg/μl), nükleaz içermeyen su.

### 3.1.4. Kullanılan Primerler

Hedef ve referans genlerin ifade analizlerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile yapılabilmesi için, primer dizileri tasarlandı ve ticari olarak sentezletirildi (Tablo 3-1). Liyofilize formda gelen primerler 100 µM ana stok elde edebilmek için uygun miktarda distile su ile sulandırıldı ve -20°C’de saklandı.

**Tablo 3-1.** Gerçek zamanlı PZR için kullanılan TLR-2, TLR-3, TLR-4 ve G6PD primer dizileri

<b>TLR-2</b>	İleri Primer: 5'-GGTGTCGGAATGTCACAGGACA-3'
	Geri Primer: 5'-GCATCATAGCAGATGTTCCCTGCT-3'
<b>TLR-3</b>	İleri Primer: 5'-TGGAGCCAGAATTGTGCCAGA-3'
	Geri Primer: 5'-GGATTGAGTTGGACATGAGATGGA-3'
<b>TLR-4</b>	İleri Primer: 5'-TGC GTGGAGGTGGTTCTTAAT-3'
	Geri Primer: 5'-AAGCTATAGCTGGCTAAATGCCTG-3'
<b>G6PD</b>	İleri Primer: 5'-ATGCCTTCCATCAGTCGGATACA-3'
	Geri Primer: 5'-ATAGCCCACGATGAAGGTGTTTTC-3'

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Dokudan RNA Eldesi

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

- ✓ 30-50 mg doku üzerine 500µl parçalama tamponu+5µl β-merkaptotanol eklenip homojenizatörde parçalandı.
- ✓ Lizat, 2600 g’de 5 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Ayırı bir mikrosantrifüj tüpe alınan üst sıvı üzerine (1:1) oranında %70’lik soğuk etanol eklendi. Mikrosantrifüj tüplerindeki karışım filtreli tüplere aktarıldı.
- ✓ 12 000 g’de 30 saniye santrifüj edildi.

- ✓ Santrifüj edildikten sonra filtrelili tüpler yeni toplama tüplerine yerleştirildi. Üzerine 700 µl yıkama tamponu I eklendi.
- ✓ 12 000 g'de 30 saniye santrifüj edildi.
- ✓ Filtrelili tüpler yeni toplama tüplerine konulduktan sonra üzerine 500 µl yıkama tamponu II eklendi.
- ✓ Sırasıyla, 12 000 g'de 30 saniye ve 12 000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Filtreler yeni mikrosantrifüj tüplere yerleştirildi. Üzerine 80 µl RNaz içermeyen su eklendikten sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
- ✓ 12 000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Elde edilen total RNA spektrofotometrede ölçüldü.

### 3.2.2. Spektrofotometrik Analiz

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

### 3.2.3. cDNA Eldesi

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

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

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

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

### 3.2.4. TLR-2, TLR-3 ve TLR-4 Genlerinin İfade Analizi

Larenks kanserli hastaların tümör ve normal dokularında TLR-2, TLR-3 ve TLR-4 genlerinin ifade analizi LightCycler 480 II cihazında gerçek zamanlı PZR yöntemi ile analiz edildi. Normalizasyon için referans gen olarak Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) geni kullanıldı.

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

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

	İlk Derişim	Hacim	Son Derişim
Eva Green Master Karışımı	2X	7,5 µl	1X
dH <sub>2</sub> O		3,5 µl	
İleri Primer	100µM	1 µl	10µM
Geri Primer	100µM	1 µl	10µM
cDNA		2µl	200ng
Toplam Hacim: 15 µl			

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

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

	Döngü Sayısı	Hedef Sıcaklık	Bekletme Süresi
Ön-kuluçka ( <i>pre-incubation</i> )	1	95°C	15 dk
Çoğalma ( <i>amplification</i> )	40		
Bozunma ( <i>denaturation</i> )		95°C	15 sn
Bağlanma( <i>annealing</i> )		61°C	30 sn
Uzama	1	72°C	3 dk
Soğuma ( <i>cooling</i> )	1	50°C	10 sn

### **3.2.5. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi**

İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistic 21.0 programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler; sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma, minimum, maksimum, kategorik değişkenler için sayı ve yüzde olarak verildi. Graplarda oranların karşılaştırılması Ki Kare Analizi ile yapıldı. İstatistiksel alfa anlamlılık seviyesi  $p < 0,05$  olarak kabul edildi.



## 4. BULGULAR

Bu çalışma 2016-2018 tarihleri arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda larenks skuamöz hücreli karsinomu nedeniyle açık cerrahi yöntemle total veya parsiyel larenjektomi yapılan 50 hasta üzerinde retrospektif olarak yapılmıştır. Hastaların yaşları 34 ile 84 arasında değişmekte olup ortalama  $60,56 \pm 9,67$ 'dir. Hastaların 47'si (%94) erkek; 3'ü (%6) kadındır. (Tablo 4-1)

Hastaların sigara ve alkol kullanım durumlarına bakıldığında, 38'si (%76) alkol kullanmamakta; 12'ü (%24) alkol kullanmakta idi. Sigara kullanımı 0 paket/yıl ile 120 paket/yıl arasında değişmekte olup; ortalama  $42,82 \pm 22,76$  paket/yıl'dır. (Tablo 4-1)

**Tablo 4.1.** Hastaların demografik özellikleri, sigara ve alkol kullanım durumları

	Sayı (n: 50)	Yüzde (%)	
<b>Yaş (yıl)</b>	Ortalama: $60,56 \pm 9,67$		
	Minimum: 34		
	Maksimum: 84		
<b>Cinsiyet</b>			
	Erkek	47	94
	Kadın	3	6
<b>Alkol kullanımı</b>			
	Var	12	24
	Yok	38	76
<b>Sigara kullanımı (Paket/yıl)</b>	Ortalama: $42,82 \pm 22,76$		
	Minimum: 0		
	Maksimum: 120		

Tümör bölgesi 17 (%34) hastada glottik bölgede, 17 (%34) hastada supraglottik bölgede, 16 (%32) hastada ise transglottik bölgede yerleşim göstermektedir. 2 (%4) hasta daha önceki dönemde larenks kanseri nedeniyle primer radyoterapi tedavisi almıştır. 29 (%58) hastaya parsiyel larenjektomi; 21 (%42) hastaya total larenjektomi operasyonu yapılmıştır. (Tablo 4-2)



**Tablo 4.2.** Hastaların tümör bölgesi, radyoterapi öyküsü, operasyon tipi ve boyun diseksiyonu türüne göre sınıflaması

	Sayı (n: 50)	Yüzde (%)
<b>Tümör bölgesi</b>		
Glottik	17	34
Supraglottik	17	34
Transglottik	16	32
<b>Radyoterapi öyküsü</b>	2	4
<b>Operasyon tipi</b>		
Parsiyel larenjektomi	29	58
Total larenjektomi	21	42

Histopatolojik inceleme sonrası patolojik T evresine bakıldığında 1 (%2) hasta T1, 5 (%10) hasta T2, 7 (%14) hasta T3 ve 37 (%74) hasta T4 evresindedir. Erken evre (T1 ve T2) hasta sayısı 6; ileri evre (T3 ve T4) hasta sayısı 44'tür. Patolojik N evresine bakıldığında 26 hasta N0 (%52), 8 (%16) hasta N1, 6 (%12) hasta N2 ve 10 (%20) hasta N3'tür. Hastaların 24'ünde (%48) lateral boyunda lenf nodu metastazı bulunmaktaydı. (Tablo 4-3). Histopatolojik grade; 1 (%2) hastada grade 1, 29 (%58) hastada grade 2, 20 (%40) hastada grade 3'tür. (Tablo 4-3)

TNM sınıflamasına göre hastalık evresi 1 (%2) hastada evre 1, 5 (%10) hastada evre 2, 7 (%14) hastada evre 3 ve 37 (%74) hastada evre 4'tür. 6 (%12) hasta evre 1 ve evre 2 hastalığa sahipken, 44 (%88) hasta evre 3 ve evre 4 hastalığa sahiptir. (Tablo 4-3)

Boyun metastazı olan hastalar incelendiğinde 11 (%22) hastada perinodal yayılım görüldü. (Tablo 4-3)

25 (%50) hastada kan damarı invazyonu, 43 (%86) hastada lenfatik invazyon, 22 (%44) hastada perinöral invazyon, 22 (%44) hastada ise tiroid kartilaj invazyonu görüldü. (Tablo 4-3)

**Tablo 4.3.** Hastaların histopatolojik inceleme sonuçları

		Sayı (n: 50)	Yüzde (%)
<b>Patolojik T evresi</b>			
	T1	1	2
	T2	5	10
	T3	7	14
	T4	37	74
<b>Patolojik N evresi</b>			
	N0	26	52
	N1	8	16
	N2	6 N2a:2 (%4)	12 N2c:4 (%8)
	N3	10 N3b:10 (%20)	20
<b>Histopatolojik grade</b>			
	Grade 1	1	2
	Grade 2	29	58
	Grade 3	20	40
<b>Hastalık evresi</b>			
	Evre 1	1	2
	Evre 2	5	10
	Evre 3	7	14
	Evre 4	37	74
<b>Perinodal invazyon</b>			
	Var	11	22
	Yok	39	78
<b>Kan damarı invazyonu</b>			
	Var	25	50
	Yok	25	50
<b>Lenfatik invazyon</b>			
	Var	43	86
	Yok	7	14
<b>Perinöral invazyon</b>			
	Var	22	44
	Yok	28	56
<b>Tiroid kartilaj invazyonu</b>			
	Var	22	44
	Yok	28	56

Çalışmamızda; TLR2 gen ifade değeri 1 hastada belirlenemediği için istatistiksel analizler 49 hasta; TLR-3 ve TLR-4 için 50 hasta üzerinden hesaplanmıştır. TLR-2, TLR-3 ve TLR-4 gen ifade değerleri  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi ile değerlendirildiğinde toplam çalışma grubundaki  $2^{-\Delta\Delta CT}$  ortalama değerleri sırası ile 0.1, 0 ve 1 olarak bulunmuştur. Paired sample T-test ile yapılan analizde her üç gen için de  $p < 0,001$  olarak bulunmuştur ve sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu sonuca göre TLR-2, TLR-3, TLR-4 ekspresyonu, tümör hücrelerinde normal dokuya göre anlamlı oranda azalmıştır. (Tablo 4-4)

**Tablo 4.4.** Normal doku ve tümörlü dokularda TLR-2, TLR-3, TLR-4 ekspresyon miktarı

		$\Delta CT$ ORT $\pm$ SS	$\Delta\Delta CT$ ORT $\pm$ SS	$2^{-\Delta\Delta CT}$ ORT $\pm$ SS	*p
<b>TLR-2</b>	<b>TÜMÖR</b>	1,8 $\pm$ 2,3	3,8 $\pm$ 3,5	0,1 $\pm$ 0,1	<0,001
	<b>NORMAL</b>	-2 $\pm$ 2,4	0	1	
<b>TLR-3</b>	<b>TÜMÖR</b>	3,2 $\pm$ 2,6	4,7 $\pm$ 5	0	<0,001
	<b>NORMAL</b>	-1,5 $\pm$ 4,4	0	1	
<b>TLR-4</b>	<b>TÜMÖR</b>	7,8 $\pm$ 2,9	4,8 $\pm$ 4,3	1 $\pm$ 1	<0,001
	<b>NORMAL</b>	3 $\pm$ 3	0	1	

ORT: Ortalama, SS:Standart Sapma, p: Anlamlılık değeri

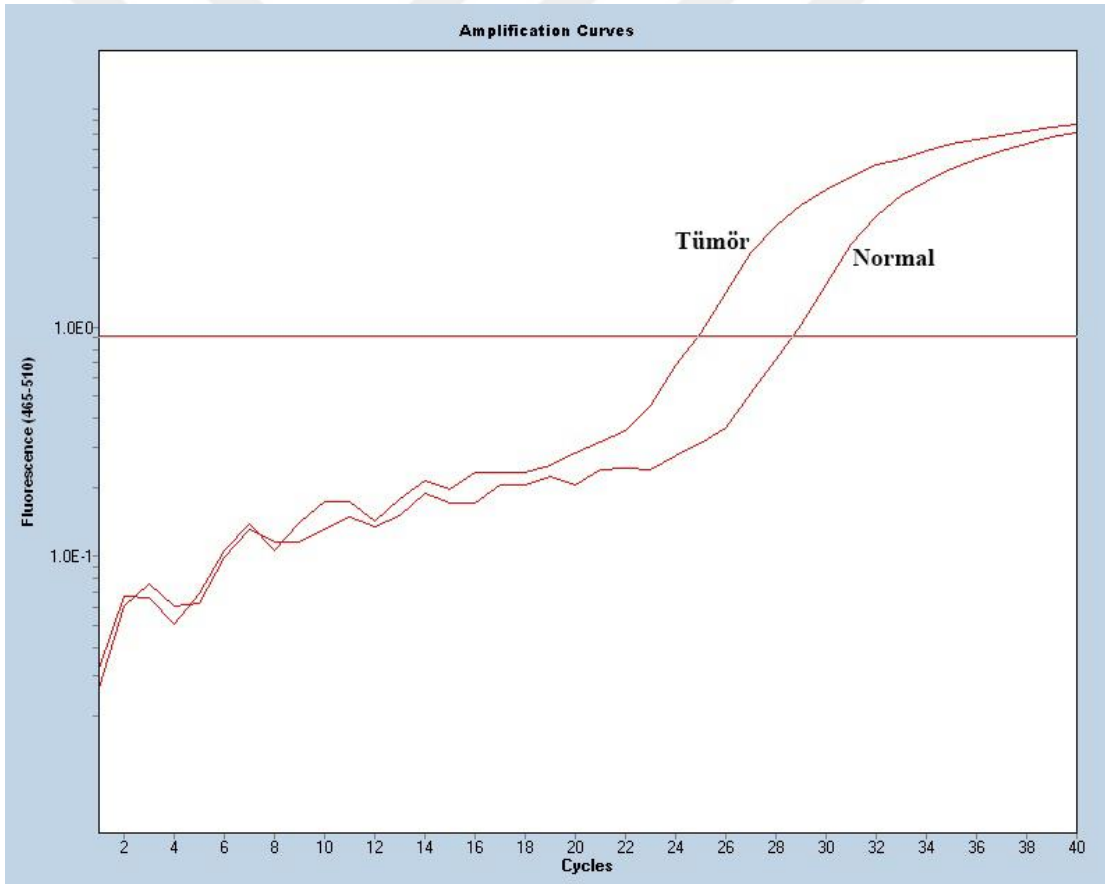
\*Statistiksel analizler Paired Sample T-Test kullanılarak analiz edildi

50 hastada yapılan değerlendirmede, tümörlü ve normal dokudaki mRNA ifade düzeylerinin dağılımına bakıldığında TLR-2 geni için normal dokuya göre tümörlü dokuda 42 (%85,7) hastada azalmış, 1 (%2) hastada değişmemiş, 6 (%12,3) hastada ise artmış gen ifadesi, TLR-3 geni için 42 (%84) hastada azalmış, 1 (%2) hastada değişmemiş, 7 (%14) hastada artmış gen ifadesi, TLR-4 geni için 41 (%82) hastada azalmış, 1 (%2) hastada değişmemiş, 8 (%16) hastada artmış gen ifadesi tespit edilmiştir. (Tablo 4-5)

**Tablo 4.5.** TLR-2, TLR-3 ve TLR-4 mRNA ifade düzeylerinin dağılımı

mRNA İfade	TLR-2	TLR-3	TLR-4
Azalmış n(%)	42 (85,7)	42 (84)	41 (82)
Değişmemiş n(%)	1 (2)	1 (2)	1 (2)
Artmış n(%)	6 (12,3)	7 (14)	8 (16)

TLR-2, TLR-3, TLR-4 ekspresyonu aynı kalan veya artan grupla, ekspresyonu azalmış grup arasında; cinsiyet, yaş, sigara ve alkol kullanımı, tümör lokalizasyonu, T evresi, hastalık evresi, boyun N evresi, perinodal yayılım, histopatolojik grade, kan damarı invazyonu, lenfatik invazyon, perinöral invazyon, kartilaj invazyonu arasında anlamlı fark bulunmamıştır. (Tablo 4-6), (Tablo 4-7), (Tablo 4-8)

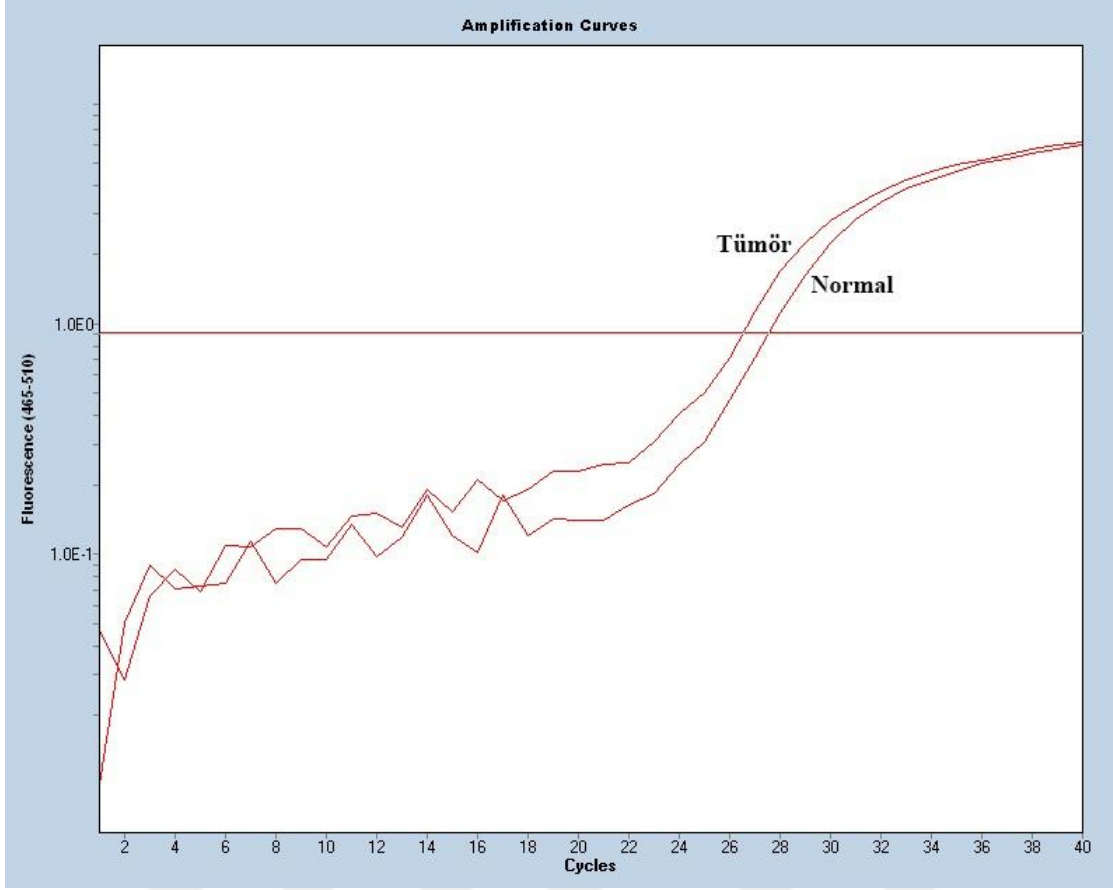


**Grafik 4-1.** Tümörlü ve normal doku örneklerinde G6PD mRNA ekspresyon eğrileri

**Tablo 4.6.** Larenks kanserli hastalarda TLR-2 mRNA ifade düzeyleri ve klinikopatolojik özellikleri

		Hasta n (%)	TLR-2 İfade n (%)			*p değeri
			Azalmış	Değişmemiş	Artmış	
Tümör yeri	Glottik	16(32,7)	13 (26,5)	1 (2)	2 (4,1)	0,494
	Supraglottik	17(34,7)	16 (32,7)	0 (0)	1 (2)	
	Transglottik	16(32,7)	13 (26,5)	0 (0)	1 (2)	
Patolojik T Evre	T1	1 (2)	1 (2)	0 (0)	0 (0)	0,968
	T2	5 (10,2)	5 (10,2)	0 (0)	0 (0)	
	T3	7 (14,3)	6 (12,2)	0 (0)	1 (2)	
	T4	36(73,5)	30 (61,2)	1 (2)	5 (10,2)	
Patolojik N Evre	N0	26(52)	22 (44,8)	1 (2)	2 (4)	0,498
	N1	8(16)	8 (16,3)	0 (0)	0 (0)	
	N2	6(12)	4 (8,1)	0 (0)	2 (4)	
	N2a	2(4)	1(2)	0(0)	1(2)	
	N2c	4(8,1)	3(6)	0(0)	1(2)	
	N3 (N3b)	10(20)	9 (18,3)	0 (0)	1 (2)	
Histolojik grade	Grade 1	1 (2)	1 (2)	0 (0)	0 (0)	0,885
	Grade 2	28(57,1)	23 (46,9)	1 (2)	4 (8,2)	
	Grade 3	20(40,8)	18 (36,7)	0 (0)	2 (4,1)	
Vasküler invazyon	Var	25 (51)	20 (40,8)	1 (2)	4 (8,2)	0,418
	Yok	24 (49)	22 (44,9)	0 (0)	2 (4,1)	
Lenfatik invazyon	Var	42(85,7)	37 (75,5)	1 (2)	4 (8,2)	0,343
	Yok	7 (14,3)	5 (10,2)	0 (0)	2 (4,1)	
Perinöral invazyon	Var	21(42,9)	17 (34,7)	1 (2)	3 (6,1)	0,459
	Yok	28(57,1)	25 (51)	0 (0)	3 (6,1)	
Kartilaj invazyonu	Var	21(42,9)	18 (36,7)	1 (2)	2 (4,1)	0,459
	Yok	28(57,1)	24 (49)	0 (0)	4 (8,2)	
Perinodal yayılım	Var	11 (22)	9 (18,3)	0 (0)	2 (4)	0,482
	Yok	39 (78)	33 (67,3)	1 (0)	4 (8)	
Cinsiyet	Kadın	3 (6,1)	2 (4,1)	0 (0)	1 (2)	0,506
	Erkek	46(93,9)	40 (81,6)	1 (2)	5 (10,2)	
Yaş	≤50	6 (12,2)	5 (10,2)	0 (0)	1 (2)	0,881
	>50	43(87,8)	37 (75,5)	1 (2)	5 (10,2)	
Sigara	Var	44(89,8)	38 (77,6)	1 (2)	5 (10,2)	0,815
	Yok	5 (10,2)	4 (8,2)	0 (0)	1 (2)	
Alkol	Var	12(24,5)	10 (20,4)	0 (0)	2 (4,1)	0,745
	Yok	37(75,5)	32 (65,3)	1 (2)	4 (8,2)	

\*Statistiksel analizler Pearson Chi-Square test kullanılarak analiz edildi

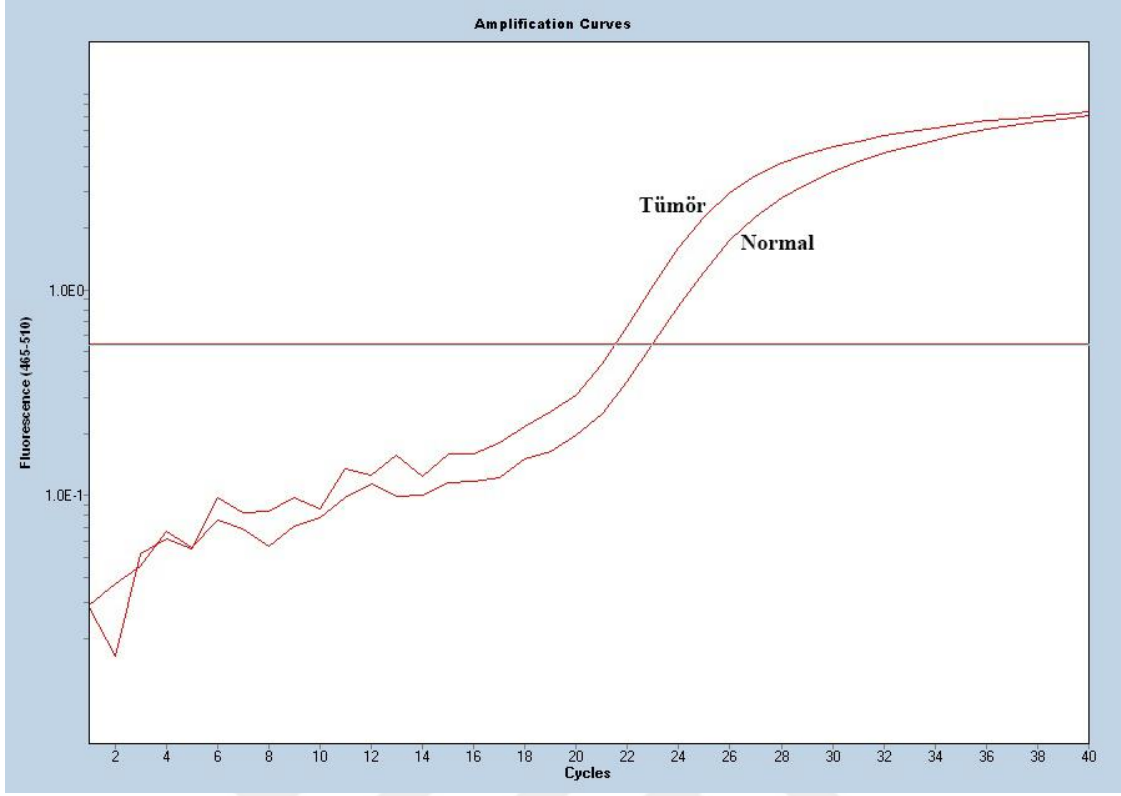


**Grafik 4-2.** Tümörlü ve normal doku örneklerinde TLR-2 mRNA ekspresyon eğrileri

**Tablo 4.7.** Larenks kanserli hastalarda TLR-3 mRNA ifade düzeyleri ve klinikopatolojik özellikleri

		Hasta n (%)	TLR-3 İfade n (%)			*p değeri
			Azalmış	Değişmemiş	Artmış	
Tümör yeri	Glottik	17 (34)	15 (30)	0 (0)	2 (4)	0,353
	Supraglottik	17 (34)	15 (30)	1 (2)	1 (2)	
	Transglottik	16 (32)	12 (24)	0 (0)	4 (8)	
Patolojik T Evre	T1	1 (2)	1 (2)	0 (0)	0 (0)	0,956
	T2	5 (10)	5 (10)	0 (0)	0 (0)	
	T3	7 (14)	6 (12)	0 (0)	1 (2)	
	T4	37 (74)	30 (60)	1 (2)	6 (12)	
Patolojik N Evre	N0	26 (52)	21 (42,8)	0 (0)	4 (8)	0,074
	N1	8 (16)	8 (16,3)	0 (0)	0 (0)	
	N2	6 (12)	3 (6)	1 (2)	2 (4)	
	N2a	2(4)	1(2)	0(0)	1(2)	
	N2c	4(8,1)	2(4)	1(2)	1(2)	
	N3(N3b)	10 (20)	9 (18,3)	0 (0)	1 (2)	
Histolojik grade	Grade 1	1 (2)	1 (2)	0 (0)	0 (0)	0,713
	Grade 2	29 (58)	24 (48)	0 (0)	5 (10)	
	Grade 3	20 (40)	17 (34)	1 (2)	2 (2)	
Vasküler invazyon	Var	25 (50)	20 (40)	1 (2)	4 (8)	0,538
	Yok	25 (50)	22 (44)	0 (0)	3 (6)	
Lenfatik invazyon	Var	43 (86)	37 (74)	1 (2)	5 (10)	0,461
	Yok	7 (14)	5 (10)	0 (0)	2 (4)	
Perinöral invazyon	Var	22 (44)	18 (36)	1 (2)	3 (6)	0,522
	Yok	28 (56)	24 (48)	0 (0)	4 (8)	
Kartilaj invazyonu	Var	22 (44)	20 (40)	0 (0)	2 (4)	0,431
	Yok	28 (56)	22 (44)	1 (2)	5 (10)	
Perinodal Yayılm	Var	11 (22)	2 (4)	0 (0)	9 (18,3)	0,697
	Yok	39 (78)	5 (10,2)	1 (2)	32 (65,3)	
Cinsiyet	Kadın	3 (6)	2 (4)	0 (0)	1 (2)	0,597
	Erkek	47 (94)	40 (80)	1 (2)	6 (12)	
Yaş	≤50	6 (12)	4 (8)	1 (2)	1 (2)	0,022
	>50	44 (88)	38 (76)	0 (0)	6 (12)	
Sigara	Var	45 (90)	39 (78)	1 (2)	5 (10)	0,204
	Yok	5 (10)	3 (6)	0 (0)	2 (4)	
Alkol	Var	12 (24)	9 (18)	2 (4)	5 (10)	0,183
	Yok	38 (76)	33 (66)	0 (0)	5 (10)	

\*Statistiksel analizler Pearson Chi-Square test kullanılarak analiz edildi



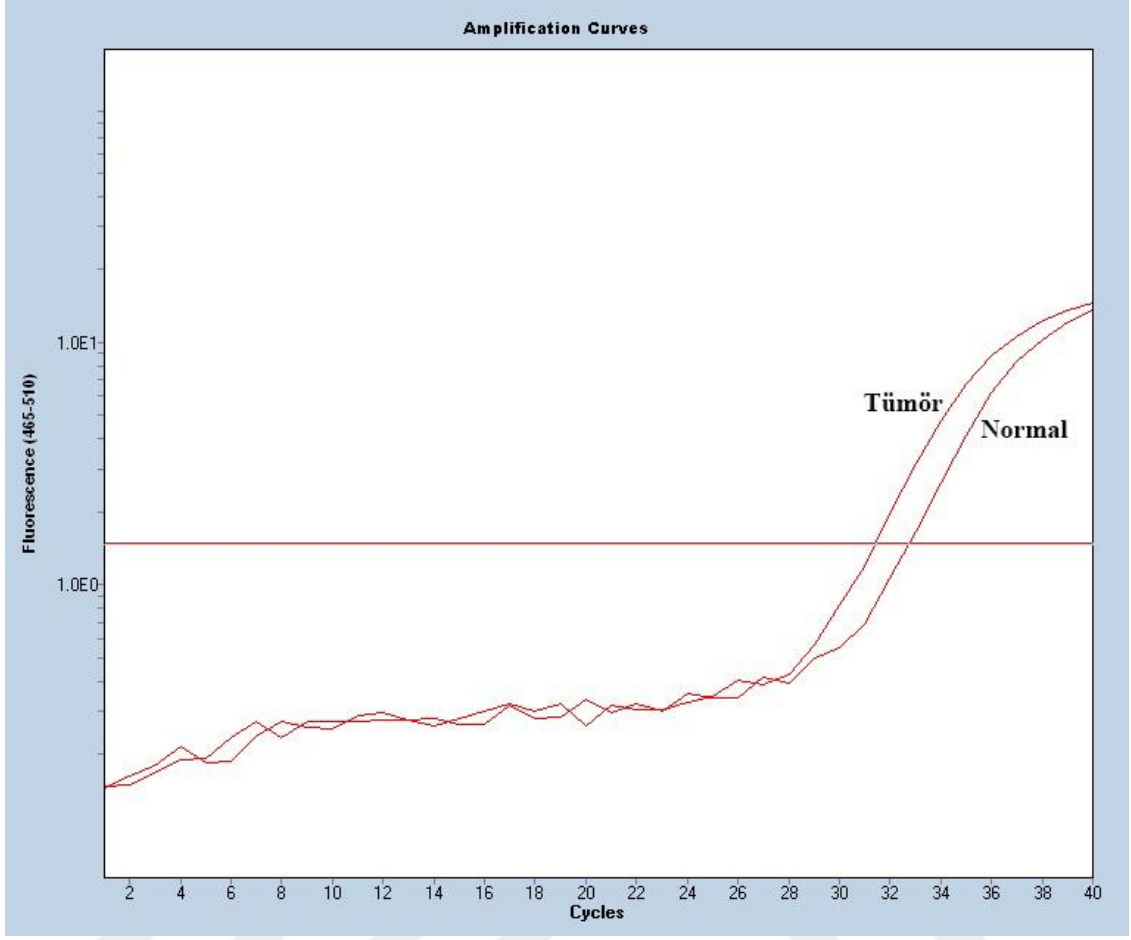
**Grafik 4-3.** Tümörlü ve normal doku örneklerinde TLR-3 mRNA ekspresyon eğrileri



**Tablo 4.8.** Larenks kanserli hastalarda TLR-4 mRNA ifade düzeyleri ve klinikopatolojik özellikleri

		Hasta n (%)	TLR-4 ifade n (%)			*p değeri
			Azalmış	Değişmemiş	Artmış	
Tümör yeri	Glottik	17 (34)	13 (26)	1 (2)	3 (6)	0,666
	Supraglottik	17 (34)	15 (30)	0 (0)	2 (4)	
	Transglottik	16 (32)	13 (26)	0 (0)	3 (6)	
Patolojik T Evre	T1	1 (2)	1 (2)	0 (0)	0 (0)	0,935
	T2	5 (10)	5 (10)	0 (0)	0 (0)	
	T3	7 (14)	6 (12)	0 (0)	1 (2)	
	T4	37 (74)	29 (58)	1 (2)	7 (14)	
Patolojik N Evre	N0	26 (52)	23 (46,9)	1 (2)	1 (2)	0,174
	N1	8 (16)	6 (8)	0 (0)	2 (4)	
	N2	6 (12)	3 (6)	0 (0)	3 (6)	
	N2a	2(4)	1(2)	0(0)	1(2)	
	N2c	4(8,1)	2(4)	0(0)	2(4)	
	N3	10 (20)	8 (16,3)	0 (0)	2 (4)	
Histolojik grade	Grade 1	1 (2)	1 (2)	0 (0)	0 (0)	0,874
	Grade 2	29 (58)	24 (48)	1 (2)	4 (8)	
	Grade 3	20 (40)	16 (32)	0 (0)	4 (8)	
Vasküler invazyon	Var	25 (50)	19 (38)	1 (2)	5 (10)	0,423
	Yok	25 (50)	22 (44)	0 (0)	3 (6)	
Lenfatik invazyon	Var	43 (86)	35 (71,4)	1 (2)	7 (14,2)	0,583
	Yok	7 (14)	6 (12,1)	0 (0)	1 (2)	
Perinöral invazyon	Var	22 (44)	17 (34)	1 (2)	4 (8)	0,473
	Yok	28 (56)	24 (48)	0 (0)	4 (8)	
Kartilaj invazyonu	Var	22 (44)	18 (36)	1 (2)	3 (6)	0,494
	Yok	28 (56)	23 (46)	0 (0)	5 (10)	
Perinodal Yayılım	Var	11 (22)	7 (14,3)	0 (0)	4 (8,1)	0,724
	Yok	39 (78)	33 (67,3)	1 (2)	4 (8,1)	
Cinsiyet	Kadın	3 (6)	3 (6)	0 (0)	0 (0)	0,704
	Erkek	47 (94)	38 (76)	1 (2)	8 (16)	
Yaş	≤50	6 (12)	5 (10)	0 (0)	1 (2)	0,933
	>50	44 (88)	36 (72)	1 (2)	7 (14)	
Sigara	Var	45 (90)	36 (72)	1 (2)	8 (16)	0,543
	Yok	5 (10)	5 (10)	0 (0)	0(0)	
Alkol	Var	12 (24)	8 (16)	0 (0)	4 (8)	0,155
	Yok	38 (76)	33 (66)	1 (2)	4 (8)	

\*Statistiksel analizler Pearson Chi-Square test kullanılarak analiz edildi



**Grafik 4-4.** Tümörlü ve normal doku örneklerinde TLR-4 mRNA ekspresyon eğrileri

## 5. TARTIŞMA

Baş boyun kanseri grubunun ana temsilcisi olan larenks kanseri, ülkemizde Sağlık Bakanlığı verilerine göre en sık görülen kanserler sıralamasında 7.7/100,000 ile 6. Sırada gelmektedir.<sup>13</sup> Bu tümörlerin % 90'ından fazlasının iyi diferansiye yassı hücreli karsinoma sahip olmasına rağmen, bu hastalık için ölüm oranları son 50 yılda önemli ölçüde iyileşmemiştir. Sigara ve ilgili alkollü içeceklerin majör etiyolojik rolünün oynadığı tipik çevresel kanserdir. İmmünolojik ve genetik özellikleri kapsamlı olarak incelenmiştir. Bu tümörlerde spesifik hücre aracılı immünitenin yanı sıra çeşitli moleküler aberasyonlarda tespit edilmiştir.<sup>5758</sup> Bununla birlikte bunların tümör büyümesi ve progresyonu üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Bu da tümör immünolojisindeki evrimsel olarak daha eski, evrimsel olarak korunan immünoloji dalına, yani hücrel immüniteye geçiş için mevcut eğilimi açıklamaktadır.

Hücrel immünite çeşitli omurgasız canlıların korunmasını sağlar, yaşamın başlangıcından itibaren aktiftir ve anti-mikrobiyal savunma için sağlam araçlara ve mekanizmalara sahiptir. Ayrıca, bilinmeyen nedenlerle, omurgasızlar hemen hemen neoplazi içermez. Neyse ki, insan dahil omurgalılarda doğuştan gelen bağışıklık mekanizmalarının çoğu korunmuştur. Toll benzeri reseptörler bu mekanizmanın iyi bir örneğidir. Başlangıçta bir *Drosophila* sineğinde tespit edilmişler ve dorso-ventral embriyonik gelişimine ve anti-fungal immüniteye dahil oldukları bulunmuştur.<sup>59</sup> TLR'ler hem hayvanlarda hem de insanda çeşitli bakteriyel, viral ve fungal patojenlerin tanınmasına katılan iyi bilinen faktörlerdir. Tümörlerdeki rolleri açık olmaktan çok uzaktır, ancak literatürde tümör büyümesi üzerinde hem pozitif hem de negatif bir etkiye sahip olduğunu iddia eden birçok rapor nedeniyle ilgi artmaktadır.

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

Szczepajski ve ark'nın<sup>57</sup> yaptığı çalışmada 43 ila 77 yaş aralığında larenks karsinomu nedeniyle total larenjektomi yapılmış 20 hasta değerlendirilmiş. Test edilen hastaların TNM evrelemesi ve tümörün histolojik olgunlaşma derecesi 11/20 (% 55) vakada T3, 9/20 vakada T4 (% 45), 4/20 (% 20) vakada N0, 9/20 (% 45) vakada N1,

vakaların 7/20 (% 35) 'inde N2, 20/20 (% 100) vakada M0, 5/20 (% 25) G1 ve 15 / 20 (% 75) idi. Kanser hücrelerinin bir kısmında TLR-2, TLR-3 ve TLR-4'ün membran ve/veya sitoplazmada ekspresyonunu ortaya koymuştur. Tümör hücrelerinde en sık ifade TLR-2'de ve en az ifade TLR-4'te görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları, laringeal karsinomun mikro ortamında TLR'lerin, yani TLR-2, TLR-3 ve TLR-4 varlığının göstergesidir. Test edilen TLR'lerin sadece inflamatuvar infiltrat hücrelerinde değil aynı zamanda tümör hücrelerinde de ifade edildiği ilgi çekici bulunmuştur.

Bizde yaptığımız çalışmada larenks kanserli hastaların tümörlü dokularından aldığımız örneklerde TLR-2, TLR-3, TLR-4 gen ekspresyonunun olduğunu ortaya koyduk. Ancak aynı hastaların normal dokularından aldığımız örnekle karşılaştırdığımızda her üç gen için ekspresyon düzeylerinde azalma olduğu tespit edildi. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur( $p < 0,001$ ). Bu durum bize TLR-2, TLR-3, TLR-4 genlerinin larenks karsinomlarında, diğer kanserler ile TLR ailesi üyelerinin ilişkisinin incelendiği çalışmalar ile kıyaslandığında tümör supresör etkisi olabileceğini düşündürmüştür. Literatürdeki TLR2, TLR3 ve TLR4 ilişkili çalışmalarda zıt sonuçlar çıkması; vaka sayılarının değişkenliği, farklı kanser türleri ile çalışılması, kullanılan yöntem farklılıkları veya etnik gruplar arasındaki değişkinlikle açıklanabilir.

Normal epiteldenayrı olarak, TLR'lerin, cilt, meme, akciğer, kolon, karaciğer, over ve diğertümörler gibi çeşitli kanser hücrelerinde eksprese oldukları gösterilmiştir.<sup>60</sup> Belirli kanser hücrelerinin çeşitli TLR'leri ifade etmesi, tümör büyümesi ve progresyonu ile ilgili bazı işlevleri yerine getirebildiklerini gösterir. Aslında, bazı araştırmacılar tarafından, TLR'lerin tümör lehine hareket edebileceği ve ilerlemesi için olumlu uyarılar sağladığı gösterilmiştir. Diğer taraftan, uygun TLR ligandları, bazı tümörlerde de görüleceği üzere, tümör büyümesini baskılayabilir. Tillman ve ark.'nın cilt orijinli bazal hücreli karsinom ve skuamöz hücreli karsinomu olan hastalarda yaptığı çalışmada, bir TLR7 analogu olan imikimod, bir merhem olarak uygulandığında cilt karsinomunun büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir.<sup>61</sup> Bir başka çalışmada ise imikimodun bu etkiyi T-hücre up-regulasyonu ile immunolojik aracılı olarak yaptığı ortaya konmuştur.<sup>62</sup>

Bizde yaptığımız çalışma sonucunda Tillman ve ark.'nın çalışmasında geçen TLR-7'nin cilt kanserlerindeki tümör supresör etkisinin bir benzerinin larenks

kanserlerinde TLR-2,3,4 için geçerli olabileceğini düşünmekteyiz. Gelecekte yapılacak yeni çalışmalar ve bu genlere yönelik geliştirilecek ajanlar ile larenks kanseri tedavisinde yeni seçeneklerin ortaya çıkabileceğine inanmaktayız.

Chuang ve ark.'nın<sup>5</sup> yaptığı çalışma ise 2001 ile 2010 yılları arasında primer cerrahi rezeksiyon uygulanan oral kavite SCC'li 153 hasta içermektedir. Hastaların ortalama yaşı 50.6 idi (range 26-77 yıl). Tüm hastaların ortalama takip süresi 54.6 ay (dağılım 2.5-121.5 ay) idi. Tümör dokularındaki TLR-3 protein ekspresyonunun sıklığını ve lokalizasyonunu incelemek için doku mikrodizisi ile immünohistokimyasal bir analiz yapıldı. 153 hastanın 112'sinde (%73,2) sitoplazmik TLR3 boyaması gözlemlendi, ancak birkaç stromal inflamasyon hücresinde de TLR3 boyaması tespit edildi. Rt-PCR analizinde mevcut toplam 153 hasta örneğinden 123 vaka (% 80) düşük TLR3 ekspresyonu kaydedildi. 30 olguda (% 20) yüksek ekspresyon tespit edildi. Yüksek TLR3 ekspresyonu, tümörleri kötü diferansiye ve perinöral invazyonu olan hastalar ile anlamlı korelasyon gösterdi. TLR3 ekspresyonu, tümör boyutu, lenf nodu metastazı, tümör nekrozu ve vasküler invazyon gibi diğer parametrelerle korelasyon göstermedi.

Bizim çalışmamızda ise rt-PCR ile analiz ettiğimiz 50 larenks kanserli hastanın 42'sinde (%84) TLR-3 ekspresyonunda normal dokulara göre azalma tespit edilmiştir. Bu azalma istatistiksel açıdan anlamlıdır ( $p < 0,001$ ). Chuang ve ark.'nın çalışmasına benzer olarak tümörlü dokularda normal dokulara göre benzer oranlarda TLR-3 ekspresyon düzeyinde azalma olduğu ortaya konmuştur. Bu da TLR-3 geninin baş boyun kanserlerinde tümör supresyonu etkisinin olabileceğine dair şüpheleri güçlendirmiştir. TLR-3 ekspresyon artışının %20 olduğu Chuang ve ark. çalışmasına uyumlu olarak biz de çalışmamızda 7 (%14) hastada artış gözlemledik. Ancak TLR-3 ekspresyon artışının olduğu 7 hastada, ekspresyon artışı kötü diferansiasyon, tümör evresi, perinöral invazyon, vasküler invazyon, lenfatik invazyon, kartilaj invazyonu, lenf nodu metastazı ve histolojik grade gibi diğer parametrelerle korelasyon göstermemiştir.

Yoshioka ve ark.'nın<sup>53</sup> kolon kanseri üzerine yaptıkları çalışmada, her iki hücre kültüründe de CD14 ve TLR-2 reseptörlerinin eksprese edildiğini, ancak TLR-4'ün eksprese edilmediğini göstermişlerdir. Bakteryel LPS ile tetiklenen TGF ve HGF üretiminin bir CD14 / TLR-2 kompleksi aracılığıyla olduğunu iddia etmişlerdir. Diğer çalışma sonuçlarına göre; TLR-4'ün LPS reseptörü olarak büyük rol oynadığı ortaya konmuşken, TLR-2'nin rolü daha fazla tanımlamaya ihtiyaç duymaktadır.<sup>6364</sup> Bu

çalışmanın mevcut sonuçları, TLR-2'nin LPS ile indüklenen sinyalleme aracılığı ettiği önceki bulguyla tutarlı olduğunu ve TGF $\beta$  ve HGF'nin arttırılmış üretiminin LPS tarafından uyarılan TLR-2'nin aracılığı ettiğini de ortaya koymaktadır. Tümör mikroortamındaki bakteriyel çoğalmanın, TLR-2 aktivasyonu üzerinden tümör büyümesine katkı sağladığı düşünülmektedir.

Bizim çalışmamızda ise TLR-2 ekspresyonu istatistiksel anlamlı olarak tümörlü dokuda azalmış olarak bulundu. Kolon ve larenks bakteriyel florasındaki farklılıkların, TLR-2 aktivasyonunu etkilemiş olabileceği düşünüldü. TLR-2'nin endojen ligandı olan lipopolisakkaritlerin farklı floralarda değişiklik gösterebilmesi tutarsız sonucun ortaya çıkmasına neden olmuş olabilir. Bununla birlikte; TLR-2 gen ekspresyonunun artış gösterdiği larenks kanserli örneklerin hepsinin ileri evre (Evre 4) tümör olması ve bu tümörlerde nekroza bağlı daha çok bakteriyel kontaminasyonun olması nedeniyle, daha fazla hasta ile yapılacak çalışmalar mevcut çalışmayla tutarlı sonuçların çıkmasını sağlayabilir.

Gonzales-Reyes ve ark.'nın<sup>55</sup> yaptığı çalışmada 74 meme kanserli hastada TLR-3, TLR-4, TLR-9 ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. Analiz sonucunda nüks karsinom örneklerinde TLR3, TLR4 ve TLR9'un mRNA ekspresyon seviyelerinde önemli bir artış göstermiştir. Tümörlü örneklerde özellikle TLR4 ve 9 yüksek ekspresyon göstermiştir. Tümör hücresi tarafından yüksek TLR3 ekspresyonuna sahip olan veya mononükleer inflamatuvar hücreler tarafından yüksek TLR4 ekspresyonuna sahip olan tümörler, yüksek metastaz olasılığı ile önemli ölçüde ilişkilidir. Bu sonuçlarla TLR3, TLR4 ve TLR9'un ekspresyon seviyeleri, meme kanserinde tümör agresifliğinin göstergeleri olarak klinik ilgiye sahiptir. TLR'ler meme kanserinde tedavi hedeflerini temsil edebileceği öngörülmüştür.

Bizim çalışmamızda ise TLR-3 ve TLR-4 gen ekspresyon düzeylerin denormal dokulara oranla tümör doku örneklerinde azaldığı tespit edilmiştir. TLR-4 ekspresyon düzeyleri 50 hastanın 41'inde (%82) azalmışken, 8'inde (%16) artma göstermiştir. Artma gösteren grup incelendiğinde, bu gruptaki hastaların büyük bir yüzdesinin lenfatik invazyon ve boyunda lenf nodu yayılımı gösterdiği dikkat çekmiştir. Ama bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu hasta sayısının az olması ile açıklanabilir. Larenks kanserlerinde lenfatik invazyon ve lenf nodu tutulumunun kötü prognozla ilişkili olduğu bilinmektedir. Sonuç olarak larenks kanserli hastalarda artmış TLR-4

ekspresyonunun yüksek rejyonel metastaz ve kötü prognozla ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Szczepanski ve ark.'nın<sup>65</sup> 2009'da yaptığı çalışmada 27 si larenks, 12 si oral kavite olmak üzere toplam 39 skuamöz hücreli karsinomu olan hastaları incelemişler. Bu hastaların hepsi ileri evre kanserli hasta grubuna dahillerdi (27 hasta T3, 12 hasta T4). Hastalardan alınan dokular PCR, immunhistokimya, western blot teknikleriyle analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda TLR4'ün ligandı olan LPS ile tetiklenmesi, proliferasyonun indüklenmesi, NF-nB'nin aktivasyonu, DNA'ya p65 bağlanması ve proinflamatuvar sitokinlerin (IL-6 ve IL-8), VEGF ve GM-CSF artan üretimi ile birlikte NK hücresi aracılı sitotoksositeye karşı direncin uyarılması ile tümör büyümesinin arttırıldığı sonucuna varılmıştır. Baş-boyun skuamöz hücreli karsinomların da LPS'nin tümör hücresi proliferasyonunu arttırdığı ve ilaç aracılı apoptoza veya NK-92 hücre aracılı lizise karşı tümör hücresi direncini indüklediği gösterilmiştir. Bu direnç, nukleusta NF-nB p65 alt birim translokasyonu ile MyD88 aktivasyonu ve tümör hücrelerinde IRAK-4 ekspresyonunun up-regülasyonu ile korelasyon göstermiştir. Böylece, LPS ve diğer endojen TLR-4 ligandları ile tümör hücreleri üzerinde eksprese edilen TLR4'ün tetiklenmesi, tümör büyümesinin teşvik edilmesinde ve tümörün in vivo olarak bağışıklık müdahalelerinden korunmasında rol oynayabilir. Ancak bunun aksine Apetoh ve ark. yaptığı çalışmada TLR-4 fonksiyonlarının geliştirilmesinin dendritik hücre olgunlaşmasını arttırdığını ve böylece tümör taşıyan konakçı için yararlı olduğunu öne sürmektedir. Özellikle, inflamatuvar hücreler üzerindeki TLR4 ekspresyonunun tümör büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir.<sup>66</sup>

Huang ve ark. ise tümör hücreleri üzerinde eksprese edilen TLR4'ün, doğal katil (NK) hücresinin ve efektör T-hücresi aktivitesinin tümör tarafından indüklenmiş inhibisyonunun aracılık ettiği bağışıklık kaçacağı yoluyla kolon kanseri ilerlemesini teşvik ettiği göstermişlerdir.<sup>1</sup> Sonuç olarak TLR aktivasyonu, bir yandan tümöre karşı bağışıklık sistemini güçlendiren ve diğer yandan tümör ilerlemesini destekleyen, çift kenarlı bir kılıç gibi davranır. TLR-4'ün tümör hücresi sağkalımı ve tümör hücresi proliferasyonu üzerindeki etkileri tümör tipine bağlı olarak farklı sonuçlar ortaya çıkarmıştır.<sup>5467</sup>

Aynı çalışma sonucunda TLR4 in situ ekspresyon seviyeleri tümör farklılaşması ile korele bulunmuştur. Kötü diferansiye tümörlerin çok az TLR4 ifade ettiği

görülmüştür. Aksine, iyi diferansiye ve orta derecede diferansiye tümörlerde yüksek oranda eksprese edildi. Ayrıca, TLR4 tetiklemesi güçlü koruyucu ve tümör büyümesini teşvik edici etkiler göstermiştir. İyi diferansiye baş-boyun skuamöz hücreli karsinomunda, tümör hücreleri üzerinde TLR4'ün bolca ekspresyonu, önemli biyolojik ve klinik etkilere sahip olabilir. Bu tümörler genellikle bakteri ve bakteriyel ürünler içerir. Bu nedenle, iyi diferansiye tümörlere sahip hastalarda bakteriyel ürünler tarafından tümörle ilişkili TLR4'ün in vivo aktivasyonunun, bol miktarda kronik inflamasyona yol açması, tümör büyümesini teşvik etmesi ve tümör hücrelerini apoptozdan koruyabilmesi muhtemeldir.

Erken evre larenks kanseri olan hastalar genellikle endolarengeal cerrahiye uygun olduğundan, günümüzde bu hastalara açık cerrahi yöntemler genelde uygulanmamaktadır. Bizim çalışmamızdaki hastaların %88'inin ileri evre tümörler olması bu durumun bir sonucudur. Çalışmamızda erken evre tümörlerin oranının (%12) az olması ve hastadan alınan tümörlü dokunun heterojenlik göstermesi nedeniyle, TLR-4 gen ekspresyonu ile histolojik diferansiyasyon arasında bir ilişki bulunamamıştır. Alınan örnekte inflamatuvar hücre ve tümör hücresi oranının hastadan hastaya farklılık gösterme ihtimali bu durumun ortaya çıkmasına neden olmuş olabilir.

TLR-4 gen ekspresyonunun artmış olduğu tümörlerde lenfatik invazyon ve reyonel lenf nodu tutulumunun artmış olduğunu tespit ettik. Bu da artmış TLR-4 gen ekspresyonunun kronik inflamasyona yol açması, tümör büyümesini tetiklemesi, anti-apoptotik etkiyi ortaya çıkarması ile açıklanabilir. Kemoterapiye karşı duyarlılık, tümör hücresi proliferasyonuna bağlı olduğundan, in vivo olarak TLR4 ekspresyonunun, hastaların onkolojik terapilere yanıtı üzerinde önemli bir etkisi olabileceğini varsayıyoruz. Birlikte ele alındığında, TLR4'ün fonksiyonel olarak larenks tümör hücreleri üzerinde aktif olduğunu ve TLR4 sinyalizasyonu sonucu tümör davranışını ve ilaç müdahalelerine karşı direncini/duyarlılığını değiştirdiğini, kanser progresyonunda etkili olduğunu varsayabiliriz.



## 6. SONUÇ

Larenks kanserleri son yıllardaki gelişmelere rağmen 5 yıllık sağ kalımı düşen nadir hastalıklardan birisidir. Son çalışmalar özellikle hücrel immunitenin rolü, tümör mikroçevresi ile ilgili araştırmalara kaymaktadır. Biz de çalışmamızda oral kavite, kolon, prostat, meme, cilt, akciğer gibi birçok tümörde kanser progresyonunda rolü olduğu tespit edilen Toll-like reseptör ailesinden TLR-2, TLR-3, TLR-4 genlerini larenks skuamöz hücreli kanseri olan hastalarda inceledik. Larenks kanserlerinde TLR-2, TLR-3, TLR-4 ekspresyonun normal dokulara göre azaldığını bulduk. TLR-4 ekspresyonunun arttığı vakalarda bunun, rejyonel lenf nodu tutulumunun arttığına ve kötü hastalık prognozuna neden olduğuna dair deliller tespit ettik. TLR aktivasyonu, bir yandan tümöre karşı bağışıklık sistemini güçlendiren ve diğer yandan tümör ilerlemesini destekleyen, çift kenarlı bir kılıç gibi davrandığını düşünüyoruz. Bu reseptörlerin fonksiyonel olarak larenks kanserli hücrelerde ve inflamatuvar infiltratta mevcut olduğunu, bu fonksiyonun bakteriyel kontaminasyon gibi çevresel uyarılara göre farklılık gösterebileceğini düşünmekteyiz. Gelecekte bu reseptörlere yönelik geliştirilecek ajanlar ile, tümör davranışının, ilaç müdahalelerine karşı direncin/duyarlılığın, kanser progresyonunun değiştirilebileceğine inanmaktayız.

## 7. KAYNAKLAR

1. Huang B, Zhao J, Li H, et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res.* 2005. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0784.
2. Wang R-F, Miyahara Y, Wang HY. Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy. *Oncogene.* 2008. doi:10.1038/sj.onc.1210906.
3. Paone A, Starace D, Galli R, et al. Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC-alpha-dependent mechanism. *Carcinogenesis.* 2008. doi:10.1093/carcin/bgn149.
4. Jiang Q, Wei H, Tian Z. Poly I:C enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR3 pathway. *BMC Cancer.* 2008. doi:10.1186/1471-2407-8-12.
5. Chuang H-C, Huang C-C, Chien C-Y, Chuang J-H. Toll-like receptor 3-mediated tumor invasion in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2012. doi:10.1016/j.oraloncology.2011.10.008.
6. Pries R, Hogrefe L, Xie L, et al. Induction of c-Myc-dependent cell proliferation through toll-like receptor 3 in head and neck cancer. *Int J Mol Med.* 2008.
7. Meller S. Functional anatomy of the larynx. *Otolaryngol Clin North Am.* 1984;17(1):3-12.
8. Koç C. *Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi.*; 2013.
9. Sancak B. *Fonksiyonel Anatomi. Baş-Boyun ve İç Organlar.* 7th ed.; 2013.
10. Koç C. *Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi.* 1st ed. Ankara: Güneş Kitabevi; 2003.
11. Flint PH. *Cummings Otolaryngology Head and Neck Surgery.* 6th ed. By Saunders; 2015.
12. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2016. doi:10.3322/caac.21332.
13. Sağlık Bakanlığı. *Sağlık İstatistikleri Yıllığı.*; 2014.

14. Kuper H, Boffetta P, Adami HO. Tobacco use and cancer causation: Association by tumour type. *J Intern Med.* 2002. doi:10.1046/j.1365-2796.2002.01022.x.
15. Zuo JJ, Tao ZZ, Chen C, et al. Characteristics of cigarette smoking without alcohol consumption and laryngeal cancer: overall and time-risk relation. A meta-analysis of observational studies. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology.* 2017. doi:10.1007/s00405-016-4390-x.
16. Stell PM, McGill T. ASBESTOS AND LARYNGEAL CARCINOMA. *Lancet.* 1973. doi:10.1016/S0140-6736(73)92275-7.
17. Giraldi L, Panic N, Cadoni G. Association between Mediterranean diet and head and neck cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2016;1.
18. Snow AN, Laudadio J. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. *Adv Anat Pathol.* 2010. doi:10.1097/PAP.0b013e3181f895c1.
19. Li X, Gao L, Li H, et al. Human papillomavirus infection and laryngeal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 2013. doi:10.1093/infdis/jis698.
20. Xu Y, Liu S, Yi H, et al. Human papillomavirus infection in 674 chinese patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2014. doi:10.1371/journal.pone.0115914.
21. Almadori G, Cadoni G, Cattani P. Human papillomavirus infection and epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7(12):3988-3993.
22. 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. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.03934.x.
23. Galli J, Cammarota G, Cal?? L, et al. The Role of Acid and Alkaline Reflux in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Laryngoscope.* 2002. doi:10.1097/00005537-200210000-00030.
24. Schultz P. Vocal fold cancer. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2011. doi:10.1016/j.anorl.2011.04.004.

25. Licitra L, Bernier J, Grandi C, et al. Cancer of the larynx. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003. doi:10.1016/S1040-8428(03)00017-9.
26. Becker M, Burkhardt K, Dulguerov P, Allal A. Imaging of the larynx and hypopharynx. *Eur J Radiol*. 2008. doi:10.1016/j.ejrad.2008.03.027.
27. Adolphs APJ, Boersma NA, Diemel BDM, et al. A systematic review of computed tomography detection of cartilage invasion in laryngeal carcinoma. *Laryngoscope*. 2015. doi:10.1002/lary.25145.
28. Arjani G, In H, Sano T. AJCC Cancer Staging Manual. In: Amin M, ed. *In Larynx*. 8th ed. New york: Springer; 2017.
29. Laccourreye O, Muscatello L, Laccourreye L, Naudo P, Brasnu D, Weinstein G. Supracricoid partial laryngectomy with cricohyoidoepiglottopexy for “early” glottic carcinoma classified as T1-T2N0 invading the anterior commissure. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg*. 1997. doi:10.1016/S0196-0709(97)90058-2.
30. Ambrosch P, Kron M, Steiner W. Carbon dioxide laser microsurgery for early supraglottic carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1998. doi:10.1177/000348949810700810.
31. Kirschner J, Som M. The anterior commissure technique of partial laryngectomy: clinical and laboratory observations. *Laryngoscope*. 1975.
32. Moe K, Wolf GT, Fisher SG, Hong WK. Regional metastases in patients with advanced laryngeal cancer. Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996.
33. Shah J. Larynx and Trachea. *Jatin Shah's Head Neck Surg Oncol*. 2012:356-425.
34. Spriano G, Pellini R, Romano G, Muscatello L, Roselli R. Supracricoid partial laryngectomy as salvage surgery after radiation failure. *Head Neck*. 2002. doi:10.1002/hed.10117.
35. Scola B, Fernández-Vega M, Martínez T, Fernández-Vega S, Ramirez C. Management of cancer of the supraglottis. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2001. doi:10.1067/mhn.2001.112202.
36. Stell PM, Tobin KE. The behavior of cancer affecting the subglottic space. *Can J Otolaryngol*. 1975.

37. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997. doi:10.1038/41131.
38. Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The role of TLR2 in infection and immunity. *Front Immunol*. 2012. doi:10.3389/fimmu.2012.00079.
39. Goutagny N, Estornes Y, Hasan U, Lebecque S, Caux C. Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy. *Target Oncol*. 2012. doi:10.1007/s11523-012-0213-1.
40. Konat V. Signaling by Toll-like Receptors. In: *Methods In Signal Transduction Series*. New York; 2008:222.
41. Muzio M, Fonte E, Caligaris-Cappio F. Toll-like receptors in chronic lymphocytic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012. doi:10.4084/MJHID.2012.055.
42. Sieling PA, Modlin RL. Toll-like receptors: Mammalian “taste receptors” for a smorgasbord of microbial invaders. *Curr Opin Microbiol*. 2002. doi:10.1016/S1369-5274(02)00288-6.
43. Ozinsky A, Underhill D, Fontenot J. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(1):3766-3771.
44. Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, et al. Evidence for an Accessory Protein Function for Toll-Like Receptor 1 in Anti-Bacterial Responses. *J Immunol*. 2000. doi:10.4049/jimmunol.165.12.7125.
45. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005. doi:10.1093/intimm/dxh186.
46. Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, Yoshida T, Miyake K, Nishijima M. Mouse toll-like receptor 4-MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem*. 2000. doi:10.1074/jbc.275.4.2251.
47. Ahmed A, Redmond HP, Wang JH. Links between toll-like receptor 4 and breast cancer. *Oncoimmunology*. 2013. doi:10.4161/onci.22945.

48. O'Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007. doi:10.1038/nri2079.
49. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004. doi:10.1038/nri1391.
50. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*. 1998. doi:10.1016/S1097-2765(00)80136-7.
51. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, et al. IKK $\beta$  links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 2004. doi:10.1016/j.cell.2004.07.013.
52. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci*. 2006. doi:10.1073/pnas.0605298103.
53. Yoshioka T, Morimoto Y, Iwagaki H, et al. Bacterial lipopolysaccharide induces transforming growth factor beta and hepatocyte growth factor through toll-like receptor 2 in cultured human colon cancer cells. *J Int Med Res*. 2001.
54. He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol Immunol*. 2007. doi:10.1016/j.molimm.2007.01.022.
55. González-Reyes S, Fernández JM, González LO, et al. Study of TLR3, TLR4, and TLR9 in prostate carcinomas and their association with biochemical recurrence. *Cancer Immunol Immunother*. 2011. doi:10.1007/s00262-010-0931-0.
56. Salaun B, Lebecque S, Matikainen S, Rimoldi D, Romero P. Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin Cancer Res*. 2007. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0274.
57. Szczepanski M, Stelmachowska M, Stryczynski L, et al. Assessment of expression of toll-like receptors 2, 3 and 4 in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2007. doi:10.1007/s00405-006-0215-7.

58. Lin CJ, Grandis JR, Carey TE, et al. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head Neck*. 2007. doi:10.1002/hed.
59. Quon H, Liu F, Cummings B. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*. 2001;23:147-158.
60. Zeromski J, Mozer-Lisewska I, Kaczmarek M. Significance of toll-like receptors expression in tumor growth and spreading: A short review. *Cancer Microenviron*. 2008. doi:10.1007/s12307-008-0005-4.
61. Tillman DK, Carroll MT. Topical imiquimod therapy for basal and squamous cell carcinomas: A clinical experience. *Cutis*. 2007.
62. Huang SJ, Hijnen D, Murphy GF, et al. Imiquimod enhances IFN-gamma production and effector function of T cells infiltrating human squamous cell carcinomas of the skin. *J Invest Dermatol*. 2009. doi:10.1038/jid.2009.151.
63. Yang RB, Mark MR, Gray A, et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*. 1998. doi:10.1038/26239.
64. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*. 1999. doi:10.1074/jbc.274.16.10689.
65. Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, et al. Triggering of toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. *Cancer Res*. 2009. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3838.
66. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007. doi:10.1038/nm1622.
67. Wang JH, Manning B, Wu Q, Blankson S. Endotoxin/lipopolysaccharide activates NF- $\kappa$ B and enhances tumor cell adhesion and invasion through a h1 integrin-dependent mechanism. *J Immunol*. 2003;170:795-804.