

T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı

**LARİNGS SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMUNDA P53 VE P63
GEN EKSPRESYONUNUN KLİNİK VE HİSTOPATOLOJİK
PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİ**

Dr. ŞİRİN BAŞPINAR

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. ÖZDEN ÇANDIR

2005 - ISPARTA

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım süresince sonsuz katkı ve desteklerinden dolayı tez danışmanım Patoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Özden Çandır'a, eğitimimde emeği geçen değerli öğretim üyeleri başta Doç. Dr. Nilgün Kapucuoğlu'na, Yrd. Doç Dr. Sema Bircan'a, Yrd Doç Dr. Nermin Karahan'a, Yrd. Doç. Dr. Metin Çiriş'e, asistanlığım boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve laboratuarda görevli çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr. Şirin Başpınar

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Larinksin embriyolojisi	2
2.2. Larinksin anatomisi	3
2.3. Larinksin histolojisi	6
2.4. Larinks, farinks ve trakeaya ait tümörlerin histolojik sınıflaması	8
2.5. Larinks kanserlerinde TNM evrelemesi	11
2.6. Larinks kanserlerinde epidemiyoloji	13
2.7. Larinks kanserlerinde etiyoloji	13
2.8. Larinks kanserlerinde patogenezi	14
2.9. Larinks kanserlerinde yayılım tedavisi ve prognoz	21
2.10. Larinks skuamöz hücreli karsinomunun moleküler biyolojisi	23
2.11. p53 geni	25
2.12. p63 geni	28
3. MATERYAL VE METOD	31
4. BULGULAR	35
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇLAR VE YORUM	60
ÖZET	62
SUMMARY	63
KAYNAKLAR	64

1. GİRİŞ

Larinks kanseri baş ve boyun bölgesinin en sık görülen kanseridir ve erişkinlerde tüm kanserlerin %2'sini oluşturur¹⁻³. Ülkemizde erkekler arasında en sık rastlanan ikinci kanserdir⁴. Larinks kanserlerinde prognoz anatomik yayılım, histolojik diferansiyasyon ve tümörün lokalizasyonu ile ilişkilidir. Bununla birlikte aynı anatomik bölgeden köken alan, benzer histolojik diferansiyasyon gösteren larinks karsinomlu hastalarda davranış farklılıkları saptanması nedeniyle tümör davranışını daha net belirleyebilmek için daha farklı parametreler gerekmektedir. Moleküler patoloji alanındaki gelişmelere bağlı olarak tümör oluşumu ile ilişkili çok sayıda moleküler tümör belirleyicileri ortaya çıkmaktadır^{5,6}. Günümüzde larinks kanserlerinde prognoz ve tedavi şeklinin belirlenmesinde yardımcı olacak yeni histopatolojik parametreler ve immunohistokimyasal belirleyiciler kullanılmaktadır.

İnsan kanserlerinde en sık mutasyona uğradığı bilinen p53 geni normal hücre siklusu düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir^{5,7}. Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlarının %39-80'inde p53 gen mutasyonu olduğu saptanmıştır^{4,8}.

Bizim çalışmamızda immunohistokimyasal olarak p53 tümör süpresör gen ve p53 genine yapısal olarak benzerlik gösteren p63 gen ekspresyonları ile larinks kanseri arasındaki ilişki araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

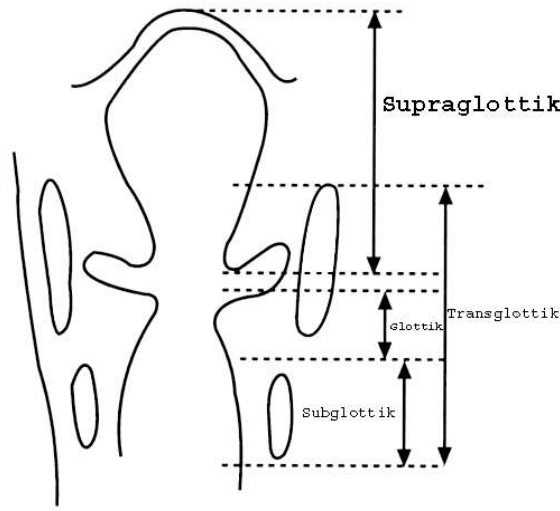
2.1. LARİNKİN EMBRİYOLOJİSİ

Larinks epiteli laringotrakeal tbn kranyal ucunun endoderminden gelişir. Larinksin kıkırdakları dördüncü ve altıncı brankial yay çiftlerindeki kıkırdaklardan gelişir. Laringeal kıkırdaklar nöral krista hücrelerinden köken alan mezenkimden gelişirler. Laringotrakeal tbn kranyal ucundaki mezenkim hızla çoğalarak aritenoid Őiřkinlik (tuber aritenoideum) çiftlerini meydana getirir. Dile doğru gelişen bu Őiřkinlikler yarık Őeklindeki deliği (glottis primitiva- ilkel dil) T harfi biçimli laringeal girişe ve gelişmekte olan laringeal lümeni dar bir yarığa dönüştürür. Laringeal epitelin hızla çoğalması geçici olarak laringeal lümenin tıkanmasıyla sonuşlanır. Onuncu haftaya kadar larinks yeniden kanalize olur. Yeniden kanalize olma işlemi sırasında, laringeal ventriküller oluşur. Bu girintiler ses tellerini (prika vokalis) ve vestibüler katlantıları (prika vestibularis) oluşturan müköz membran katlantıları ile sınırlanır. Epiglot çnc ve dördüncü faringeal yayların ventral ucunda mezenkim çoğalmasıyla meydana gelen hipobrankiyal kabartının kaudal kısmından gelişir. Bu kabartının rostral kısmı dilin orta 1/3 'lk kısmı olan faringeal kısmı oluşturur. Laringeal kaslar faringeal yayların dört ve altıncı çiftlerindeki myoblastlardan geliştiği için, bu yayları destekleyen nervus vagusun laringeal dalları ile inerve olurlar. Larinks ve epiglotun büyümesi doğumdan sonraki ilk  yılda hızlıdır. Bu zaman içinde epiglot yetişkin Őeklini kazanır⁹.

Embriyolojik olarak supraglottik bölge, üçüncü ve dördüncü brankiyal arklardan gelişir. Glottik ve subglottik bölgeler ise altıncı brankiyal arktan geliřir¹⁰. Bocca ve arkadaşları¹¹ larinksi köken aldıkları farklı embriyolojik yapılar ve bağımsız lenfatik dolaşımlarını temel alarak superior ve inferior olmak üzere iki hemilarinkse ayırmışlardır. Laringeal karsinomun yayılımını da bu embriyolojik kökenle ilişkilendirerek tartışmışlardır. Her bir larinks diğerinden bağımsız bir kanserle invaze olabilir ve kanserin yayılımı sıklıkla embriyolojik olarak tanımlanan blgelerce sınırlanır¹¹.

2.2. LARİNKSİN ANATOMİSİ

Dil kökü ve trakea arasında bulunan larinks, solunum yanısıra ses oluşumu ve yabancı cisimlerin solunum yoluna geçişini engelleme gibi önemli fonksiyonlara sahiptir. Boynun damar sinir paketi arasında ve 3.-6. servikal vertebraların alt kenarları seviyesinde bulunur. Çocuklarda ve kadınlarda biraz daha yukarıda yer alır^{12,13}. Larinks fonksiyonel olarak supraglottik, glottik ve subglottik olmak üzere üç bölümden oluşur (Şekil 1).



Şekil 1: Larinksin kompartmanları

Supraglottik bölge epiglotun tepesinden gerçek kordlara kadar uzanır. Bu bölge aritenoepiglottik (ariepiglottik) foldlar, yalancı vokal kordlar ve ventrikülü içerir.

Glottik bölge gerçek kord vokal ve anterior komissürü içerir.

Subglottik bölge gerçek vokal kordların alt sınırı ile ilk trakeal kıkırdak arasındaki bölgedir^{10,14}.

Larinksin major kıkırdakları hyalin tipte olan krikoid, tiroid ve çift aritenoid kıkırdaklardır. Buna karşın epiglot elastik kıkırdaktır. Tiroid ve krikoid kıkırdaklar erkeklerde 2. dekada, kadınlarda daha geç kalsifiye olur. Yaşlılarda tiroid kıkırdak sıklıkla ossifiye olur. Tiroid kıkırdağın ossifiye olması larinks karsinomunun yayılımı açısından önemlidir. Bu kıkırdak sadece ossifiye olduğunda tümörle invaze edilebilir veya metastatik karsinom gelişebilir. Hyalin kıkırdak tahminen anjiogenez inhibe edici faktörler içerdiğinden, büyük ölçüde tümörün yayılımına dirençlidir¹⁰.

Larinksin eklemleri:

1) *Krikotiroid eklem*: Tiroid ve krikoid kıkırdaklar arasında yer alır. Eklem her tarafını saran, iç yüzeyi ince bir sinovyal zarla kaplı kapsülü vardır. Tiroid kıkırdağın rotasyon ve kayma hareketlerini sağlar.

2) *Krikoaritenoid eklem*: Aritenoid kıkırdaklar ve krikoid kıkırdak arasında yer alır. Bu eklemden yapılan hareketlerin en önemlisi aritenoid kıkırdağın vertikal eksen etrafında yaptığı rotasyon hareketleridir. Rotasyon sırasında prosesus vokalisler içe ya da dışa doğru hareket ederler^{12,13}.

Larinksin membranları:

1) *Tirohyoid membran*: Tiroid kıkırdak ile hyoid kemik arasında uzanır. Bu membranın lateralindeki boşluktan arter, ven ve sinirler geçer.

2) *Konus elastikus*: Krikoid kıkırdaktan vokal ligamente uzanan elastik bir membrandır. Glottik ve subglottik alanı paraglottik mesafeden ayırır.

3) *Kuadrangüler membran*: Aritenoid kıkırdak ve epiglot arasında uzanan ince submukozal bağ dokusundan oluşur.

4) *Krikotiroid membran*: Tiroid kıkırdak alt kenarından krikoid kıkırdak üst kısmına uzanır¹³.

Larinksin kasları:

1) *Ekstresek kaslar*: Komşu yapılardan larinkse uzanan hiyoid altı ve hiyoid üstü kaslardır. Larinksin tümünün pozisyonunu ayarlarlar.

Omohyoid, sternohyoid ve sternotiroid kaslar inspiyum sırasında larinksi aşağı çekerler.

Stilohyoid, digastrik, milohyoid, geniohyoid, tirohyoid ve stilofaringeus kasları yutma sırasında larinksi yukarı kaldırır.

2) *İntrensek kaslar*: Larinks kıkırdakları arasında uzanırlar. Bu kasların hareketi sonucunda ses tellerinin durumu değişir.

Krikoaritenoid posterior: Rima glottisi açar

Krikoaritenoid lateralis kası, Tiroaritenoid kas, İnteraritenoid kas: Rima glottisi kapatır

Krikotiroid kas: Plika vokalisi uzatır ve gerer^{12,13}.

Larinksin İç Anatomisi:

Larinks yalancı ve gerçek kordlar ile birbirinden ayrılan üç kompartmandan oluşur Vestibül, ventrikül ve infraglottik kavite.

Vestibül: Epiglotun uç kısmı ile vestibüler kıvrım arasında kalan kısımdır. Üst bölümü geniş, alt bölümü dardır^{12,13}.

Ventrikül: Larinks boşluğunun ortada kalan en küçük bölümüdür. Gerçek ve yalancı vokal kordlar arasındadır. Ventrikülün ön kısmında laringeal sakkül denilen cep şeklinde bir kese bulunur. Laringeal sakkül tiroid kıkırdak ve vestibüler kıvrım arasında yukarıya doğru uzanır. Buraya müköz bezler açılır^{12,13}.

İnfraglottik Kavite: Larinks boşluğunun gerçek vokal kordlardan krikoid kıkırdak alt kenarına kadar uzanan bölgedir^{12,13}.

Vokal Kıvrımlar: Ses oluşumu ile ilişkilidirler. Aritenoid vokal proçesi ile ön komissür arasında bulunur. Vokal kıvrımlar arasındaki açıklık Rima Glottis olarak adlandırılır^{12,13}.

Vestibüler Kıvrımlar: Bu kıvrımlar tiroid ve aritenoid kıvrımlar arasında bulunur. Ses oluşumunda rolleri az veya yoktur. Yalancı vokal kord olarak da adlandırılırlar. Bu kıvrımlar arasındaki açıklık Rima Vestibuli olarak adlandırılır. Yutma sırasında larinksin kapanarak yiyeceklerin solunum yollarına geçmemesine katkıda bulunur^{12,13}.

Larinksin damar sinir ve lenfatikleri:

Larinks besleyen esas arterler A. Laringea superior (A. Tiroidea superior'un dalı) ve A. Laringea inferior'dur (A. Tiroidea inferior'un dalı)¹².

Venleri arterler ile birlikte uzanır. V. Laringea superior, V. Tiroidea superior'a bu da V. Jugularis internaya açılır. V. Laringea inferior ise V. Tiroidea inferior'a, bu da V. Brakiosefalika'ya açılır¹².

Sinirleri: N. vagus'un dalları olan superior laringeal sinir ve reküren laringeal sinirdir¹².

Larinksin lenfatikleri derin ve yüzeysel olmak üzere iki gruba ayrılır. Yüzeysel lenfatikler tüm mukoza yüzey ağını oluşturur. Derin lenfatikler ise submukoza ve altındaki dokuları kapsar. Gerçek vokal kordlar birkaç lenfatik kanal içerir bu nedenle glottik karsinomlar nadiren bölgesel metastaz yaparlar. Kordlardan servikal lenfatiklere

drenaj krikoid membran boyunca olur. Subglottik lenfatikler Delphian nodu ya da prelaringeal nod içine direne olur ve pretrakeal, paratrakeal ve supraklavikuler lenf nodlarına dökülür. Supraglottik alan lenfatiklerden zengindir ve bu drenaj tirohyoid membran boyunca üst servikal lenf nodlarına ve anterosuperior lenf grupları içindedir. Priform sinüs lenfatiklerden zengin bir bölgedir. Direnaji lateral olarak derin servikal lenf nodlarına ve bazı durumlarda paratrakeal lenf nodlarına olur¹⁵.

2.3. LARİNKİN HİSTOLOJİSİ

Larinksin epiteli lokalizasyona göre stratifiye skuamöz epitel ile psödostratifiye silialı silindirik epitel arasında değişiklik gösterir. Epiglotun lingual (anterior) kısmı stratifiye skuamöz epitle örtülüdür. Laringeal (posterior) kısmının üst kısmında stratifiye skuamöz epitel izlenirken alt kısmında solunum yolu epiteli izlenir. Larinksin genel histolojisi, Şekil 2 ve 3’de gösterilmiştir.

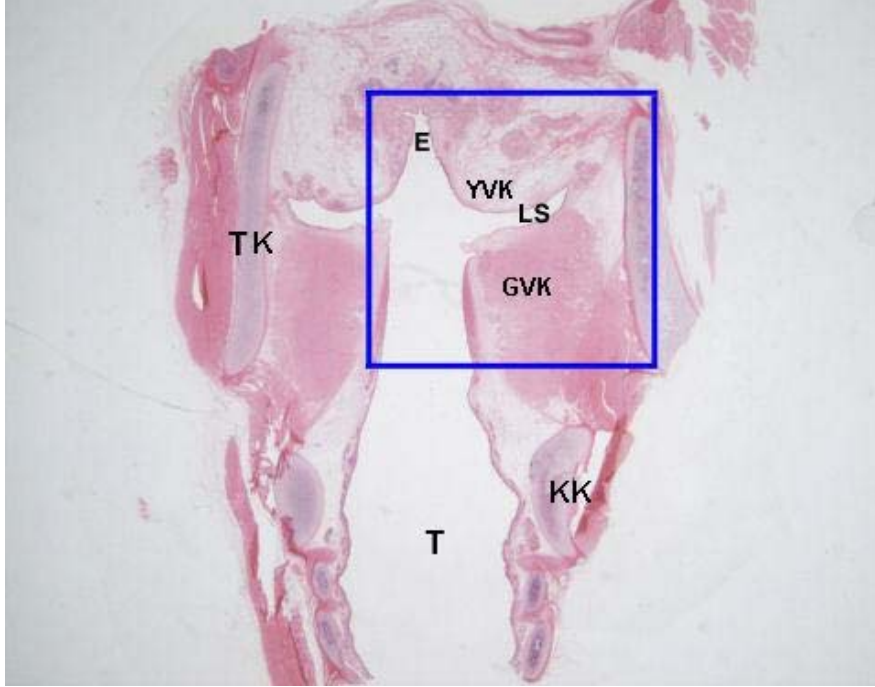
Histolojik olarak supraglottik bölge üst solunum yolunun büyük bir bölümüne benzer şekilde psödostratifiye silialı silindirik epitel ile döşelidir.

Glottik bölgede, kord vokaller stratifiye skuamöz epitel ile döşeli iken, subglottik bölgede vokal kordların kenarlarından aşağıya doğru psödostratifiye epitele dönüşmektedir^{10,14,15}. Sigara içmeyen erişkinlerin yaklaşık yarısında hem supraglottik hem de infraglottik bölgelerde silialı epitel ile karışık skuamöz epitel adaları izlenir. Sigara içenlerde larinksin silialı solunum epiteli sıklıkla tamamen skuamöz epitele değişir¹⁰.

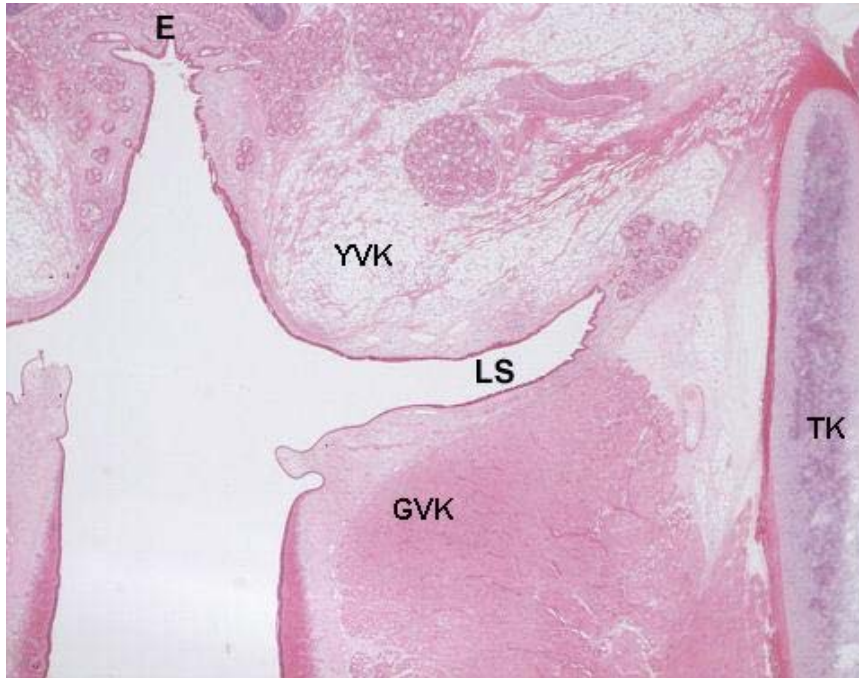
Reinke boşluğu, skuamöz epitelin tabanı ile vokal ligament arasında sınırlı olan gerçek vokal kordun lamina propriasına verilen addır^{10,14}. Reinke boşluğunda kapillerler ve serömüsinöz glandlar seyrek ve lenfatikler bulunmaz. Bu bölgedeki sınırlı damar yapısından dolayı, gerçek vokal kord yerleşimli tümörler lokalize kalma eğilimindedir ve radyoterapi, cerrahi tedaviye yanıt verirler¹⁰.

Ön komissür gerçek kordların aksine belirgin kapillerler, lenfatikler ve serömüsinöz glandlar içerir. Gerçek kordlarda serömüsinöz glandlar daha belirgindir. Epiglotun elastik kıkırdağındaki fenestrasyonlar belirgin glandlarla doludur. Bu glandlar tamamı ile kıkırdak içine penetre olur ve supraglottik karsinomun yayılımı için hazır bir

yol sağlar. Larinksin serömüsinöz glandlarında onkositik metaplazi sık ve yaşa bağlı görülen bir değişikliktir. Elli yaş üstündeki kişilerin %80'inde görülür¹⁰.



Şekil 2: Larinks histolojisi (HE, 1X). TK: Tiroid kıkırdağı, E: Epiglot, YVK: Yalancı vokal kord, GVK: Gerçek vokal kord, LS: Lateral sakkul, KK: Krikoid kıkırdağ, T: Trakea



Şekil 3: Larinks histolojisi (HE, 10X). TK: Tiroid kıkırdağı, E: Epiglot, YVK: Yalancı vokal kord, GVK: Gerçek vokal kord, LS: Lateral sakkul.

2.4. LARİNK, FARİNK, TRAKEAYA AİT TÜMÖRLERİN HİSTOLOJİK SINIFLAMASI

1. Epitelyal tümörler ve prekanseröz lezyonlar

1.1 Benign

1.1.1 Papillom-papillomatozis

1.1.2 Pleomorfik adenom

1.1.3 Bazal hücreli (bazaloid) adenom

1.2 Displazi ve karsinoma in situ

1.2.1 Skuamöz hücreli displazi

1.2.1.1 Hafif displazi

1.2.1.2 Orta derecede displazi

1.2.1.3 Ağır displazi

1.2.2 Karsinoma İn situ

1.3 Malign

1.3.1 Skuamöz hücreli karsinom

1.3.2 Verrüköz skuamöz hücreli karsinom

1.3.3 İğsi hücreli karsinom

1.3.4 Adenoid skuamöz hücreli karsinom

1.3.5 Bazoloid skuamöz hücreli karsinom

1.3.6 Adenokarsinom

1.3.7 Asinik hücreli karsinom

1.3.8 Mukoepidermoid karsinom

1.3.9 Adenoid kistik karsinom

1.3.10 Pleomorfik adenomda karsinom

1.3.11 Epitelyal-miyoepitelyal karsinom

1.3.12 Şeffaf hücreli karsinom

1.3.13 Adenoskuamöz karsinom

1.3.14 Dev hücreli karsinom

1.3.15 Tükrük bezi kanalı karsinomu

1.3.16 Karsinoid tümör

1.3.17 Atipik karsinoid tümör

1.3.18 Küçük hücreli karsinom

1.3.19 Lenfoepitelyal karsinom

2. Yumuşak doku tümörleri

2.1 Benign

2.1.1 Agresiv fibromatozis

2.1.2 Miksoma

2.1.3 Fibröz histiyositom

2.1.4 Lipom

2.1.5 Leiomyom

2.1.6 Rabdomyom

2.1.7 Hemanjiom

2.1.8 Hemanjioperistom

2.1.9 Lenfanjiom

2.1.10 Nörilemmom

2.1.11 Nörofibrom

2.1.12 Granüler hücreli tümör

2.1.13 Paraganglioma

2.2 Malign

2.2.1 Fibrosarkom

2.2.2 Malign fibrözhistiyositom

2.2.3 Liposarkom

2.2.4 Leiomyosarkom

2.2.5 Rabdomyosarkom

2.2.6 Anjiosarkom

2.2.7 Kaposi sarkomu

2.2.8 Malign hemanjioperistom

2.2.9 Malign sinir kılıfı tümörü

2.2.10 Alveolar soft part sarkom

2.2.11 Sinovyal sarkom

2.2.12 Ewing sarkomu

3. Kemik ve kıkırdak tümörleri
 - 3.1 Benign
 - 3.1.1 Kondrom
 - 3.2 Malign
 - 3.2.1 Kondrosarkom
 - 3.2.2 Osteosarkom
4. Malign lenfomalar
5. Çeşitli tümörler
 - 5.1 Benign
 - 5.1.1 Matür teratom
 - 5.2 Malign
 - 5.2.1 Malign melanom
 - 5.2.2 Malign germ hücreli tümörler
6. Sekonder tümörler
7. Sınıflanamayan tümörler
8. Tümör benzeri lezyonlar
 - 8.1 Kistler
 - 8.2 Hamartom
 - 8.3 Heterotopik tiroid dokusu
 - 8.4 Kord vokal nodülü ve polibi
 - 8.5 Fibroinflamatuvar psödotümör
 - 8.6 İnfektif granülomlar
 - 8.7 Wegener granülomatozis
 - 8.8 Psödoepitelyamatöz hiperplazi
 - 8.9 Skuamöz hücre hiperplazisi
 - 8.10 Keratozis
 - 8.11 Nekrotizan siyalometaplazi
 - 8.12 Onkositik metaplazi ve hiperplazi
 - 8.13 Piyojenik granülom
 - 8.14 Entübasyon granülomu
 - Kontakt ülser
 - 8.15 Elastik kartilaj metaplazisi

- 8.16 Trakeopati osteokondroplastika
- 8.17 Relapsing polikondrit
- 8.18 Anevrizmal kemik kisti
- 8.19 Lenfoid hiperplazi
- 8.20 Plazma hücreli granülom
- 8.21 Malakoplaki
- 8.22 Langerhans hücreli histiyositozis
- 8.23 Rosai-Dorfman hastalığı
- 8.24 Amiloid depolanması
- 8.25 Gut tofusü
- 8.26 Lipoid proteinozis¹⁶

2.5. LARİNKS KANSERLERİNDE TNM EVRELEMESİ

Primer Tümör (T):

Tx: Primer tümör saptanamamaktadır.

To: Primer tümöre ait kanıt bulunmamaktadır.

Tis: Karsinoma in situ

Supraglottik bölge

T1: Normal vokal kord hareketleri ile birlikte supraglottik bölgenin bir tarafında sınırlı tümör

T2: Normal vokal kord hareketleri ile birlikte supraglottik veya glottik bölgenin bir tarafında daha yaygın izlenen tümör

T3: Vokal kord fiksasyonu ile birlikte larinkste sınırlı ve /veya postkrikoid bölge, piriform sinüs medial duvarı veya preepiglottik dokuları tutan tümör.

T4: Tiroid kıkırdağı tutan ve /veya orofarinks, boyun yumuşak dokuları gibi larinks dışındaki dokuları tutan tümör.

Glottik bölge

T1: Normal hareketlilikte ve vokal kord(lar)da sınırlı tümör (ön ve arka komissür tutulabilir)

T1a: Tümör bir vokal kordda sınırlıdır

T1b: Tümör her iki vokal kordu tutmuştur.

T2: Normal veya azalmış kord hareketleri ile birlikte supraglottik ve/veya subglottik yayılan tümör

T3: Tümör larinkste sınırlı fakat vokal kord fiksasyonu vardır.

T4: Tiroid kıkırdağa invaze ve/veya orofarinks, boyun yumuşak dokuları gibi diğer dokulara uzanan tümör.

Subglottik bölge

T1: Tümör subglottik bölgeye sınırlı

T2: Normal veya zayıflamış kord hareketleri ile vokal kordlara yayılan tümör.

T3: Vokal kord fiksasyonu ile birlikte larinkste sınırlı tümör

T4: Tümör kıkırdak destrüksiyonu veya ekstansiyonu ile larinks sınırını taşımış.

Bölgesel lenf nodları (N)

Nx: Lenf nodları değerlendirilememiştir.

No: Bölgesel lenf nodu metastazı yoktur.

N1: En büyük boyutu 3 cm veya daha küçük tek ipsilateral lenf nodu metastazı

N2: Klinik olarak 3 cm'den büyük ancak 6 cm'den küçük lenf nodu metastazları

N2a: 3 cm'den büyük ancak 6 cm'den küçük tek ipsilateral lenf nodu metastazı

N2b: 6 cm'den büyük olmayan çok sayıda ipsilateral lenf nodu metastazı

N2c: 6 cm'den büyük olmayan bilateral veya kontralateral lenf nodlarında

metastaz

N3: En büyük çapı 6 cm'den büyük lenf nodu metastazı

Uzak Metastaz (M):

Mx: Uzak metastaz saptanamamıştır

Mo: Uzak metastaz yoktur

M1: Uzak metastazlar vardır.

EVRELEME:

Evre 0: Tis N0 M0

Evre I: T1 N0 M0

Evre II: T2 N0 M0

Evre III: T3 N0 M0

T1 N1 M0

T2 N1 M0

T3 N1 M0

Evre IV: T4 N0 M0

T4 N1 M0

Herhangi T N2 M0

Herhangi T N3 M0

Herhangi T herhangi N M1

American Joint Committee Cancer (AJCC), 1992¹⁷.

2.6. LARİNKS KANSERLERİNDE EPİDEMİYOLOJİ

Larinks kanseri baş ve boyun bölgesinde en sık görülen kanserdir. Batı ülkelerinde görülen kanserlerin %2'sini oluşturur². Larinks kanserinin insidansı ve mortalite oranları erkekler ve kadınlar arasında coğrafik değişiklikler gösterir. Erkeklerde Fransa, İtalya, Brezilya ve İspanya'da insidans yüksektir. Kadınlarda Japonya, Ekvator ve İspanyada insidans düşük iken Tayland ve Küba'da insidans yüksektir¹⁸. Türkiye'de erkeklerde ikinci en sık görülen ve erkekler arasında tüm ölümlerin %7'sinden sorumlu olan kanserdir⁴. Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl yaklaşık 11000 yeni olgu tanımlanmaktadır¹⁹. Tüm dünyada erkeklerde kadınlara oranla 15-20 kat daha sık görülür¹⁸. Erkek kadın oranı ülkeler arasında 4:1- 20:1 arasında değişir, fakat en sık 6:1–10:1 oranındadır². Hastaların çoğu 50–70 yaş arasındadır⁴.

Larinks kanserlerinin neredeyse tümü yüzey epitelinden köken alır ve %95'inden fazlası skuamöz hücreli karsinomdur (SHK) . Çoğu iyi veya orta derecede diferansiyedir. Nadiren adenokarsinomlar ve verrüköz karsinoma rastlanır. Diğer tip kanserler çok nadir görülür².

2.7. LARİNKS KANSERİNDE ETİYOLOJİ

Sigara ve alkol kullanımı larinks kanserinde en önemli etiyolojik faktörlerdir^{18,20,21}. Sigara hem başlatıcı hem de ilerletici olarak etkili olan en yaygın çevresel etkendir²². Kadınlarda sigara içenlerin oranı erkeklere oranla daha düşüktür¹⁸. Pasif içicilerin de aynı riski taşıdığı düşünülmekte ise de henüz tam olarak kanıtlanmamıştır^{21,23}. Mesleki olarak asbest, ağır metaller, kömür tozu ve talaşa maruz kalma da larinks kanseri riskini artırmaktadır^{2,22-24}. Sebze ve meyvelerde bulunan vitamin C, folat ve flavonoidler gibi antioksidanların larinks kanseri riskini azalttığı

gösterilmiştir^{2,21,23}. Larinks kanserinde androjenlerin karsinojenik etkili, östrojenlerin koruyucu etkili olduğu ileri sürülse de bu görüşü destekleyen yeterli kanıt yoktur¹⁸. Düşük sosyoekonomik durum, laringeal papillomatozis ve aile öyküsü varlığı diğer etiyolojik faktörler arasındadır^{2,18}. Gastroözefagial reflüye bağlı larinkste ortaya çıkan kronik inflamasyon kronik larenjit ve kanser için etiyolojik faktör olarak ileri sürülmüştür²¹. Baş ve boyun SHK'de HPV 16, 18, 31, 33 gibi serotiplerin varlığı saptanmıştır. Bu serotipler p53 ve retinoblastom tümör supresör genlerini inaktive ederek karsinogeneze katılan E6 ve E7 viral onkoproteinlerini üretirler. Larinks kanserinde HPV enfeksiyonunun etkisi hala tam anlaşılammıştır²¹.

2.8. LARİNKS KANSERLERİNDE PATOGENEZ

Karsinojen ve karsinojen olmayan ajanlarla larinks epitelinde oluşan hücresel zedelenme başlangıçta geçici ve geri dönüşümlüdür. Yalancı kord, ventrikül ve subglottik bölgede zedelenme, silialı kolumnar epitelin yüzey tabakasının altındaki rezerv hücrelerin hiperplazisi ile başlar. Rezerv hücreler ilerleyerek epitelin tüm kalınlığını kaplar ve komplet skuamöz metaplazi oluşturur. Stratifiye skuamöz epiteldeki zedelenmede hiperkeratoz ve parakeratoz belirgindir¹⁵. Blackwell ve arkadaşları çalışmalarında nükleer pleomorfizm, mitotik aktivite, anormal mitotik figürler ve stromal inflamasyonun invaziv karsinom gelişimi ile ilişkili olduğunu, ancak yüzey epitelindeki morfolojik değişikliklerin veya koilositozun ilişkili olmadığını belirtmişlerdir²⁵.

Keratozis, Displazi ve Karsinoma İn situ (KİS):

Larinksin keratozisi sıklıkla gerçek kordları ve interaritenoid alanı içine alır. Epitelyal veya skuamöz hücre hiperplazisi ile eş anlamlıdır. Sigara içenlerde ve sesini fazla kullananlarda makroskobik olarak beyaz kalınlaşmalar şeklinde izlenir. Mikroskobik olarak keratotik lezyonlar hiperkeratotik epitelle karakterizedir.

Displazi; hücresel atipi, normal matürasyon kaybı ve stratifikasyon kaybı gibi değişiklikler ile karakterizedir. Nükleer değişikliklerin derecesi ve stratifikasyon kaybı gösteren epitelin seviyesine bağlı olarak hafif, orta ve ağır olarak grade'lenir.

Hafif displazide nükleer değişiklikler hafiftir ve epitelin 1/3 bazal kısmında belirgindir. Üst tabakalardaki matürasyon ve stratifikasyon gösteren hücrelerde

değişiklik minimaldir. Parabazal tabakalarda birkaç mitoz görülebilir. Atipik mitoz yoktur. İnflamasyon ve keratozis sıklıkla eşlik eder.

Orta derecede displazide nükleer değişiklikler hafif displazide izlenene göre daha belirgindir ve epitelin alt 2/3'ünde izlenir. Nükleol belirginliği mevcuttur. Orta derecede nükleer değişiklikler yüzeye kadar devam edebilir fakat hücre matürasyonu ve stratifikasyonu üst tabakalarda belirgindir. Mitoz parabazal ve intermedier tabakalarda izlenir. Atipik mitoz yoktur.

Ağır displazide en üst yüzeyel tabakalarda hafif stratifikasyon ile epitelin 2/3'den fazlasında belirgin nükleer değişiklik ve matürasyon kaybı görülür. Nükleer pleomorfizm belirgindir ve bizar nükleuslar görülebilir. Bazı alanlarda nükleol belirginken bazı alanlarda nükleus hiperkromatiktir. Epitelin üst kısımlarında mitozlar vardır. Atipik mitozlar bulunabilir. Hücreler genellikle klasik KİS'deki kadar kalabalık değildir. Atipik hücreler arasında intersellüler köprüler ile daha diferansiye görünümündedir. En üst yüzeyel tabadaki hücrelerde bir miktar matürasyon ve stratifikasyonun olması lezyonu KİS'dan ayırır¹⁴.

Keratozisten invaziv karsinom gelişimi nadirdir ve bu eşlik eden displazi varlığına ve derecesine bağlıdır¹⁴. Larinksin displastik lezyonlarının malign transformasyon oranı %3,3–52,9 arasında değişiklik gösterir²⁶.

Karsinoma in situ: Displazi gibi tek başına veya invaziv karsinomla birlikte görülebilir. İnvaziv SHK'de %75 oranında in situ komponentin eşlik ettiği bildirilmiştir. Tanı için mikroskopik kriter yüzey matürasyonu olmaksızın epitel boyunca atipik değişikliklerin varlığıdır. Bununla birlikte bazı otörlere göre nükleer atipi yeterince belirgin ise keratinizasyon şeklinde yüzey matürasyonu varlığında da laringeal KİS tanısı verilebilir. Lezyonun her iki tipinde de anöploid patern saptanmıştır. Tedavi edilmeyen KİS vakalarında invazi karsinom gelişebilir¹⁴.

Baş ve boyun kanserli hastalarda uzun süre sigara ve alkol kullanımı söz konusudur. Tüm havayollarının bu karsinojenlere maruz kalması, bu alanlarda ikincil primer tümörlerin gelişimine neden olur^{3,27}. 1953'te Slaughter ve ark.²⁷ bu multipl havayolu tümörlerinin kökenini açıklamak için "kansersizasyonun alan etkisi" hipotezini ileri sürmüşlerdir. Bu hipoteze göre uzun süreli karsinojene maruz kalan mukozada hücrelerde mutasyon gelişerek multifokal tümörler oluşur^{3,27}. Bununla birlikte multipl primer tümörlerin tek bir mutasyona uğramış klondan gelişebileceğini ileri süren

çalışmalar da vardır. Alternatif olarak ileri sürülen bu “monoklonal köken” hipotezine göre ikincil primer tümörler, primer bölgeden göç edip ikinci bir bölgeye implante olan mikrometastatik fokusa bağlı gelişir³. Larinks karsinomlu hastalarda üst solunum yolu ile akciğerde ikincil tümör gelişim riskinin %5–35 oranında arttığı bildirilmiştir. Özofagus kanseri ikincil tümörlerden en fazla görülenidir ve bu olayda karsinojenik kofaktör olarak gastroözefagial reflünün rolü olduğu düşünülmektedir²².

Premalign laringeal lezyonların sınıflaması uterusun servikal epitelyal lezyonlarını gradele’me için kullanılan kriterlere benzerdir. Bununla birlikte larinks kanserinin farklı etiyojisi, klinik ve histolojik özellikleri bu bölgeye daha uygun bir grade’leme sistemi gerektirmektedir. Bu gereksinimi karşılamak amacıyla epitelyal hiperplastik laringeal lezyonların Ljubljana sınıflaması yapılmıştır. Bu sistem 4 grade içerir²⁸.

Basit Hiperplazi: “Prickle” hücre tabakasının artmasına bağlı skuamöz epitelin kalınlaşması izlenir. Bazal ve parabazal tabakalar değişiklik göstermez. Hücresel atipi yoktur. Bazal tabakada nadir mitoz izlenir²⁸.

Anormal Hiperplazi (bazal-parabazal hücre hiperplazisi): Epitelin alt yarısında bazal ve parabazal hücrelerde benign artış izlenirken üst yarısında *değişiklik* izlenmez. Artış gösteren bazal ve parabazal hücreler orta derecede geniş nükleus içerir. Nükleer kromatin dağılımı uniformdur. Bazal tabaka içinde veya yakınında tipik mitozlar izlenebilir. Epitel hücrelerinin %5’inden azı diskeratotik olabilir²⁸.

Atipik Hiperplazi (riskli epitel): Tümör hücrelerinde izlenen derecede olmasa da maligniteye giden değişiklikler gösteren, nükleus/sitoplazma oranı yüksek epitel hücrelerinin artışı ile karakterizedir. Epitelde stratifikasyon korunur. Epitelin alt yarısı veya daha fazlasında epitel hücrelerinde artış izlenir. Bu hücreler sıklıkla bazal membrana dik yerleşir ve çoğunun nükleusu hafif ya da orta derecede atipi gösterir. Mitozlar artmıştır fakat çok yoğun değildir. Epitelin alt 2/3’ünde izlenirler. Atipik hiperplazi spinöz hücre tipi ve bazal hücre tipi olmak üzere iki tiptir²⁸.

Karsinoma İn situ: Epitelde invazyon olmaksızın karsinom özellikleri izlenir. Epitelde stratifikasyon kaybı vardır. Epitelin yüzeyi üç veya beş tabakalı basık, yatay olarak stratifiye ve bazen keratinize hücrelerle döşelidir. Atipik hiperplazidekine benzer fakat daha belirgin ve yüksek derecede hücresel değişiklikler izlenir. Çok sayıda “Civatte” cisimcikleri ve diskeratotik hücreler izlenir. Epitel hücreleri invaziv SHK’nin

tüm özelliklerini gösterebilir. Üst 1/3'ü de içecek şekilde tüm epitel boyunca her büyük büyütme alanında 5'ten fazla mitoz izlenir. Atipik mitozlar sıklıkla görülür. KİS spinöz hücre tipi ve bazal hücre tipi olmak üzere ikiye ayrılır²⁸.

Bu grade'leme sistemini diğer sınıflamalardan ayıran en belirgin özellikler; benign lezyonların (basit hiperplazi, anormal hiperplazi) potansiyel malign lezyonlardan (atipik hiperplazi, KİS) ayrılması, KİS'nin atipik hiperplaziden kesin olarak ayrılması, yüzey keratin tabakasının prognostik anlamının olmamasıdır²⁸.

Larinksin epitelyal hiperplastik ve neoplastik lezyonlarının WHO ve Ljubljana sistemlerine göre sınıflandırılması Tablo 1'de gösterilmiştir²⁸.

Tablo 1: Larinksin epitelyal hiperplastik ve neoplastik lezyonlarında WHO ve Ljubljana sınıflamasının karşılaştırılması

	WHO	Ljubljana
Benign	Basit skuamöz hücre hiperplazisi	Basit hiperplazi Anormal hiperplazi
Prekanseröz: İnvaziv karsinom gelişimi için düşük risk	Displazi Grade I Displazi Grade II	Atipik hiperplazi
Prekanseröz: İnvaziv karsinom gelişimi için yüksek risk	Displazi Grade III Karsinoma in situ	Karsinoma in situ

Patolojik Özellikler:

Larinks karsinomu makroskobik olarak genellikle 1-4 cm çapında sıklıkla ülserle, yüzeye doğru kabarıklık yapan pembe gri renkli kitle şeklindedir. Vokal kord lezyonları keratotik görünümüne sahiptir. Mikroskobik olarak larinks karsinomlarının %90'dan fazlası SHK'dir. Keratin oluşumu ve/veya intersellüler köprülerin varlığı ile karakterize malign epitelyal tümördür. Diferansiyasyon, hücresel pleomorfizm ve mitotik aktivite derecesine göre iyi, orta ve az diferansiye olarak grade'lenir¹⁴. Larinks karsinomunda tümörün diferansiyasyon derecesi önem taşımaktadır. Az diferansiye tümörler iyi diferansiye olanlara göre daha sık ve genellikle lenfatikler yoluyla metastaz yapar²⁹.

Glottik karsinomların çoğu iyi-orta derecede diferansiye, larinksin diğer bölgelerinden köken alanlar özellikle subglottik yerleşimli olanlar orta ve az diferansiyedir. Genelde küçük tümörler iyi diferansiyedir¹⁴.

Tümörün çevre dokuya invazyon şekli, tümör invazivliği ve konak savunma sistemine bağlıdır. Diffüz infiltratif tümörler genellikle derin invazyon ve sıklıkla lenfatikler boyunca metastaz yaparlar²⁹.

Stromal invazyon bazal membranın hemen altındaki alanda sınırlı ise, bu tümörler mikroinvaziv olarak tanımlanabilir¹⁴.

Yüzeyel invaziv SHK, lamina propriayı aşmayan karsinomları tanımlar. Mikroinvaziv karsinomdan daha invazivdir¹⁴.

Derin invaziv SHK, kas ve kıkırdak invazyonu yapar. Birçok SHK derin invazivdir.

SHK immunhistokimyasal olarak keratin pozitifdir ve eksprese olan keratin tipleri tümörden tümöre değişiklik gösterir¹⁴.

Diğer Mikroskopik Tipler:

Verrüköz Karsinom

Belirgin polipoid gelişim ve iyi diferansiye mikroskopik görünümüne sahip nadir bir SHK varyantıdır. Keratinize epitelin ekzofitik aşırı büyümesi ile karakterizedir. Genelde yüzeyeldir ve yavaş büyür. Lokal invazyon yapar fakat metastaz yapmaz. Verrüköz hiperplaziden invazyon varlığı ile ayrılır¹⁴. İyi diferansiye SHK ve papiller SHK'den minimal atipisi, büyüme paterni ve metastaz yapmaması ile ayrılır. Verrüköz karsinomla birlikte konvansiyonel SHK odağının birlikte olduğu "hibrid verrüköz SHK" metastatik potansiyele sahiptir¹⁵.

Papiller SHK

Papiller KİS'in histolojik özellikleri olan ekzofitik papiller komponentli SHK'dir. İnvaziv komponenti sıklıkla belirgin değildir. Bu nedenle seri kesitler ve çok sayıda örnekleme yapmak gerekir. İnvazyon mikroinvazyon veya yüzeyel invazyon şeklindedir. Derin invaziv tümörler metastaz yapabilir^{14,16}.

Nöroendokrin Karsinomlar

Baş ve boyun nöroendokrin tümörlerinin büyük kısmı larinksten gelişir.

1) İyi diferansiye nöroendokrin karsinom (Tipik Karsinoid Tümör): Histolojik, immunositolojik ve yapısal olarak nöroendokrin (NE) diferansiyasyon gösteren monomorfik, yuvarlak oval hücrelerden oluşan düşük grade'li epitelyal tümördür. Tümör hyalinize olabilen fibrovasküler stroma ile ayrılan kordonlar veya kompakt adalar şeklinde dizilen üniform küçük hücrelerden oluşmaktadır. Tubuler veya rozet benzeri yapılar izlenir. Tümör hücreleri düzgün yuvarlak oval, santralde yerleşen nükleus ve granüler eozinofilik sitoplazma içerir. Bazı tümörlerde hücreler onkositik özellikler gösterir. Nekroz yoktur ve mitozlar nadirdir. İmmunohistokimyasal olarak tümör hücreleri tipik olarak sitokeratin, EMA, kromogranin, sinaptofizin ve diğer peptid hormonları eksprese eder. Tümör yavaş büyür^{15,24}.

2) Orta derecede diferansiye nöroendokrin karsinom (Atipik Karsinoid Tümör): Artmış mitotik aktivite ve nükleer atipi gösteren karsinoid tümördür. Tümör invazivdir ve metastaz yapar. Tümör hücreleri adalar, kordonlar ve glandüler yapılar oluşturan, nükleer atipi ve çok sayıda mitoz içeren hücrelerdir. Hücreler orta derecede pleomorfizm gösterir, eozinofilik sitoplazmalıdır. İntralüminal müsin sıklıkla vardır. Tümör hücreleri genellikle sitokeratin ve EMA ile pozitif (+) reaksiyon verir. NSE, kromogranin ve değişik peptid hormonları ile pozitif (+) boyanma vardır. Larinksin NE karsinomları kalsitonin ile pozitif (+) boyanma gösterebilir. Tiroid medüller karsinomuna benzeyebilir fakat daha fazla nükleer atipi ve mitotik aktivite gösterir. Bu nedenle primer tiroid tümörü klinik olarak ekarte edilmelidir^{15,24}.

3) Az diferansiye nöroendokrin karsinom (Küçük Hücreli NE Karsinom): Akciğerin küçük hücreli karsinomuna benzer histolojik özellikler gösteren küçük hücrelerden oluşan son derece malign epitelyal tümördür. Tümör dar sitoplazmalı, oval hiperkromatik nükleuslu, nükleelleri belirgin olmayan küçük hücre tabakalarından oluşur. Hücreler fibrovasküler stroma ile ayrılan adalar, anastomozlaşan şeritler ve rozet benzeri yapılar oluşturur. Mitozlar çok sayıdadır ve nekrotik değişiklikler sıktır. Tümör hücreleri genellikle düşük molekül ağırlıklı sitokeratin, EMA ve NSE eksprese eder. Kromogranin pozitifliği nadirdir^{15,24}. Tüm larinks kanserlerinin %0,5'inden azını oluşturur. Aşırı sigara içen erkeklerde 60–70 yaşlarında görülür. Servikal nodal ve distal metastazlar sıktır ve prognozu kötüdür¹⁴.

Bazaloid Skuamöz Hücreli Karsinom

Tipik in situ ve/veya invaziv SHK alanlarına eşlik eden küçük kalabalık hücre adaları ile karakterize agresiv bir tümördür. Bu tümörlerde hiperkromatik nukleuslu, dar sitoplazmalı, periferik palizatlanma yapan hücreler, küçük kistik alanlar, nekroz ve belirgin hyalinizasyon izlenir. Genel görünüm adneksiyal yapılara doğru farklılaşmayı düşündürür. Dil, farinks ve özofagusta da izlenen bu tümör, adenoid kistik karsinomla karıştırılmamalıdır. Hastaların çoğunda aşırı sigara kullanımı mevcuttur. Tümör çoğunlukla ileri evrededir ve bazen diğer alanlarda ikincil bir tümör gelişimi söz konusudur¹⁴.

Sarkomatoid Karsinom (İğsi hücreli karsinom; karsinosarkom) Polipoid gelişim gösteren tümör genelde supraglottik alanda yerleşmiştir. Mikroskopik olarak SHK ve lezyonun büyük kısmını oluşturan pleomorfik sarkom- benzeri olmak üzere iki komponenti vardır. Sarkomatoid komponent granülasyon dokusuna benzer görünümde veya malign fibröz histiyositom, malign dev hücreli tümör veya osteosarkoma benzer şekilde bizar görünümlü olabilir. Lenf nodu metastazı sadece karsinomatöz komponentten veya her iki paternden oluşabilir¹⁴.

Adenoskuamöz Karsinom: Adenokarsinom ve SHK'nin histolojik özelliklerini gösteren malign bir tümördür. Tümör yüzey epitelinden kaynaklanır. SHK olarak tanımlanan komponent in situ veya invaziv olabilir. Adenokarsinomatöz komponent bazaloid, kolumnar veya müsin sekrete eden hücrelerin döşediği glandüler yapılardan oluşur. Mukoepidermoid karsinom ve adenoid SHK'den ayrılmalıdır. Adenoskuamöz karsinom agresif büyüme ve sık metastazlar gösteren son derece malign bir tümördür¹⁴.

Adenoid SHK: Psödoglandüler boşluklar veya lümen içeren SHK'dir. Psödoglandüler yapı tümör hücrelerinin akantolizine bağlı gelişir. Gerçek glandüler diferansiyasyon veya müsin üretimine ait kanıt yoktur¹⁴.

2.9. LARİNKS KANSERLERİNDE YAYILIM TEDAVİ VE PROGNOZ

Larinks kanserleri yerleşim bölgelerine göre 4 tipe ayrılır.

1) Glottik: Tüm vakaların %60-65'ini oluşturur. Bu tümörler gerçek vokal kordlardan köken alır. Çevreleyen kıkırdak duvar ve lenfatik damarların az olması nedeniyle uzun süre boyunca lokalize kalma eğilimindedir. Zamanla ön komissürden karşı vokal korda, arka tarafta aritenoidlere, üstte supraglottik bölgeye, altta subglottik alana, önde tiroid kıkırdağa ve ön boynun yumuşak dokuları içine büyüme gösterir¹⁴. Vokal kord kasının invazyonu veya harabiyeti, krikoaritenoid kas ve eklem invazyonu veya nadiren rekürren laringeal sinirin invazyonu ile vokal kord fikse olabilir. Klinik olarak erken dönemde ses kısıklığı görülür. Bu nedenle erken dönemde tanı konabilir¹⁹. Boğaz ve kulak ağrısı, hava yolu tıkanması ise ileri evrede görülen bulgulardır². Gerçek vokal kordun lenfatiklerinin az olması nedeniyle metastatik yayılım vakaların %4-6'sında görülür¹⁹. Erken dönemde tanı konan vakalarda radyoterapi ile çok iyi sonuçlar alınır. Radyoterapi ile başarı elde edilemez ise cerrahi uygulanır. Vokal kordda yerleşen küçük yüzeysel, invaziv SHK'de tek başına kordektomi ile tedavi edilebilir. T2 glottik kanserler de uygulanan tedavi şekli hemilaringektomidir¹⁴.

2) Supraglottik: Vakaların %30-35'ini oluştururlar. Bu tümörler yalancı kord, ventikül, epiglotun laringeal veya lingual yüzeyinde görülür. Supraglottik tümörlerin 1/3'ü ventrikülden kaynaklanır. Bu tümörler preepiglottik alana doğru belirgin yayılma eğilimi gösterirken orofarinks kalın hiyoepiglottik ligament tarafından korunur. Supraglottik tümörlerin sadece %1'i glottik bölgeyi invaze eder. Kıkırdak invazyonu da nadirdir ve kıkırdakta osseöz metaplazi varlığında izlenir. Ses değişiklikleri geç dönemde ortaya çıktığı için bu tümörler ileri evrede bulgu verirler. Tümör hipofarenks veya aritenoide ulaştığında kulağa vuran ağrı tek bulgu olabilir^{15,19}. Supraglottik larinksin lenfatikleri yaygındır bu nedenle servikal lenf nodlarına erken okkült metastazlar yapabilirler^{19,29}. Lenf nodu metastazı ortalama %40'tır. Supraglottik tümörler glottik olanlara göre daha kötü prognozlu ve histolojik olarak agresiv seyirli tümörlerdir³⁰. Klinik olarak negatif lenf nodu olan hastaların %20-35'inde mikroskopik incelemede okkült metastazlar saptanır. Tedavi radyoterapi veya larinjektomidir¹⁴. İyi sınırlı olmayan, derin invazyon gösteren supraglottik tümörler anlamlı şekilde daha fazla rekürens riskine sahiptir. Bu nedenle adjuvan kemoterapiye gerek duyulur. Az

diferansiye, kıkırdağı invaze eden, ülseratif tümörlerde elektif boyun diseksiyonu uygulanmaktadır²⁹.

3) Transglottik: Bu tümörlerin görülme sıklığı %5'in altındadır. Laringeal ventrikülü geçen kanserler için kullanılan bir terimdir. Lenf nodu tutulumu insidansı en yüksek (%52) olan bölgedir. Bu tümörlere total larinjektomi ve ek olarak elektif lenf nodu diseksiyonu uygulanmalıdır¹⁴.

4) İnfraglottik (subglottik) : Bu tümörlerin görülme sıklığı %5'in altındadır. Bu grupta 1 cm'den fazla subglottik yayılımı olan gerçek kordu tutan tümörler yanısıra subglottik alana sınırlı tümörler de yer alır. Krikoid kıkırdağa lateral yayılım kuraldır. Prelaringeal duvar ve tiroid dokusunun invazyonu ile zayıf intertirokrikoid membranın tümör ile destrükte olması sık görülür. Trakeaya sık yayılım olması nedeniyle bu yapı olabildiğince distalden rezeke edilmelidir. Servikal lenf nodu metastazı vakaların %15-20 'sinde izlenirken, vakaların %50'sinde paratrakeal lenf nodu metastazı vardır. Bu nedenle paratrakeal lenf nodlarını da içerecek şekilde radikal lenf nodu diseksiyonu yapılmalıdır¹⁴.

Priform sinüs veya postkrikoid alanlarda yerleşen tümörlerin faringeal kökenli olduğu kabul edilmektedir. Larinks tümörlerinin primer tümörün yerleşim yerine bakmaksızın en sık metastaz yaptığı yerler bölgesel lenf nodları ve akciğerlerdir¹⁴.

Tiroid dokusu ve juguler ven tutulumu doğrudan yayılıma bağlı gelişir. Juguler ven tutulumu sadece yoğun lenf nodu tutulumu varlığında görülür ve sistemik yayılım olasılığının yüksek olduğunu gösterir. Servikal lenf nodu metastazları ince iğne aspirasyon tekniği ile doğru olarak tanınabilir¹⁴.

Larinks karsinomlarında tedavi şekli tümörün evresine göre belirlenir. Evre I ve II tümörler radyoterapi ile veya radyoterapi ile birlikte supraglottik larinjektomi gibi konservatif bir cerrahi ile tedavi edilirler. Evre III ve IV tümörlerde larinjektomi ve beraberinde lenf nodu diseksiyonu uygulanır²⁴. Tedavi seçimi tümör yayılımı, komşu yapıların infiltrasyonu, lenf nodu tutulumu, uzak metastaz varlığına göre belirlenir⁵.

Tümörün anatomik yerleşiminde farklılıklara göre bazı tümörler erken dönemde bulgu verirken diğerleri geç döneme kadar asemptomatik kalabilirler. Ses kısıklığı gibi semptomların erken dönemde ortaya çıktığı glottik karsinomların prognozu en iyidir. Vakaların çoğunda boyunda görünen ve palpe edilebilen lenf nodu metastazı ilk bulgudur⁵. Tanı konulduğunda vakaların %60'ında kanser lokalize kalırken %25'inde

bölgesel yayılım %15'inde uzak metastaz izlenir². Larinks SHK'de sağkalım özellikle erken klinik evrede diğer baş ve boyun kanserleri ile karşılaştırıldığında daha iyidir. Bununla birlikte klinik evre ve tümörün anatomik yerleşim yerine göre uygulanan küratif tedaviden sonra hastaların yaklaşık %20'sinde rekürrens gelişir³¹. Tümörün ileri evrede olması, supraglottik yerleşim, sigara öyküsü, histolojik grade, cinsiyet ve yaş larinks SHK'de prognostik faktörler olarak belirtilmiştir. Birçok çalışmada genç hastalarda daha iyi prognoz olduğu gösterilmiştir. Kadınlarda prognozun daha iyi olduğunu belirten yayınlar yanısıra cinsiyetin prognoza etkisi olmadığını bildiren yayınlar da vardır¹⁸. Tanı anında klinik evre ve tümörün anatomik yerleşimi larinks SHK'de tedavi protokolünü seçmede ve prognozu belirlemede hala en önemli parametrelerdir³¹.

Hastalarda sağkalımın en anlamlı prognostik belirleyicisi metastatik servikal lenf nodu varlığı ve yokluğudur. Bununla birlikte vakaların çoğunda larinks SHK'nin heterojen biyolojik davranışı nedeniyle postoperatif sağkalımı belirlemek zordur³². Erken evredeki hasta gruplarında bile primer tedavi sonrası rekürrens gelişimi nedeniyle larinks SHK'de tümörün davranışını belirleyebilecek yeni parametreler araştırılmaktadır³¹.

2.10. LARİNKS SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMUNUN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Solid tümörlerin çoğu çok basamaklı genetik değişikliklerin sonucunda oluşur. Moleküler patoloji alanında son gelişmelere bağlı olarak tümör gelişimi ile ilişkili çok sayıda moleküler tümör belirleyicileri ortaya çıkmıştır. Tümör belirleyicileri iki kategoriye ayrılır. Tümör hücresi tarafından oluşturulup tümör çevresi ve tümör içi kan akımına salınan maddeler *erken tümör belirleyicileridir*. Sağlıklı dokunun invazyonundan ziyade tümörle ilişkili olduğundan erken tümör evrelerinde bile saptanabilirler. Tümör konak etkileşiminin sonucu olarak eksprese olan tümör belirleyicileri sadece tümörün ileri evresinde etkilidirler. Bunlar tümörün çevre normal dokuya basısı ve invazyonuna bağlı olarak normal dokuyu hasara uğratmasını gösterir⁵.

Hücre siklusunun bozulması tümörün ana özelliğidir. Baş ve boyun SHK'de proliferatif aktivitede artış izlenir ve bu grade ve hücresel dediferansiyasyon ile ilişkilidir. *PCNA* ve *MIB-1* (Ki67) gibi proliferasyon belirleyicileri SHK'de olası

prognostik belirleyiciler olarak araştırılmıştır. Bazı araştırmacılar PCNA ve MIB-1 (Ki67) skoru düşük hastalarda iyi sonuç almışlardır. Bununla birlikte intratümöral heterojenite ve tümör proliferasyonu ve tümör gradele'mesi arasındaki güçlü korelasyona bağlı olarak bu proliferasyon belirleyicilerinin gerçek prognostik değeri hala açık değildir⁵.

EGF çeşitli tipte epitelyal dokuların gelişimini uyarır ve hücre yüzey reseptörü EGFR aracılığı ile güçlü bir mitojenik aktivite gösterir. Baş ve boyun kanserlerinin oluşumunda EGF'nin rolünü destekleyen çok sayıda yayın bulunmaktadır^{5,33}. Yapılan çalışmalarda EGFR (+) tümörlerin kemoterapiye (-) tümörlerden daha iyi yanıt verdiği ileri sürülmüştür⁵. **c-myc** normal hücre proliferasyonu ve apoptoziste rol oynayan genlerin düzenlenmesinde yer alan bir transkripsiyon faktörüdür. Yapılan çalışmalarda larinks karsinomlarında c-myc'in major bir rol oynamadığı ileri sürülmüştür.

Larinks karsinomlarında **ras** proteinlerinin aşırı ekspresyonu bildirilmiştir³³.

Siklin D1 11q13 kromozomda lokalizedir. Baş ve boyun karsinomlarında sıklıkla amplifiye olduğu gösterilmiştir. Aşırı ekspresyon gösteren vakalarda hastalığın ileri evre ve daha agresif davranış gösterdiği belirtilmiştir. **Siklin E** larinks karsinomlarında özellikle supraglottik tümörlerde aşırı eksprese olur. Aşırı ekspresyon kötü histolojik diferansiyasyon, lokal olarak ilerlemiş tümörler, lenf nodu metastazı varlığı ve ileri evre ile ilişkili bulunmuştur. **Retinoblastom** 13q'nun allelik kayıpları baş ve boyun kanserlerinde sıklıkla tanımlanmıştır. **P21 waf 1/CIP 1** siklin bağımlı kinaz inhibitör aktivitesi olan bir proteindir ve wp53 ile aktive olur. Yapılan çalışmalarda larinks SHK'de P21 waf 1/CIP 1'in hem mRNA hem de protein seviyelerinde aşırı eksprese edildiği bildirilmiştir. **TGF-β** ve TGF-β reseptörleri hücre büyüme kontrolünde rol oynar. Larinks karsinomundaki rolleri tartışmalıdır. Premalign larinks lezyonlarında ekspresyon kaybının invaziv karsinoma ilerleme ile ilişkili olduğunu belirten ve bunun tersini iddia eden yayınlar vardır. Larinks SHK'de adezyon molekülleri ve ekstrasellüler matriks komponentlerinde değişiklikler bildirilmiştir. İnvaziv karsinomlarda noninvaziv lezyonlarla kıyaslandığında **Tenascin** birikiminin artmış olduğu ve bu birikimin daha yüksek seviyelerde **CD44** ve epitelyal **katepsin D** ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Matriks metalloproteinazlardan **Kollagenaz 3** ekspresyonunun lokal invazyon artışı ile ilişkili olduğu nodal metastazlar veya evre ile arasında ilişki olmadığı

belirtilmiştir³³. Matriks metalloproteinazların SHK’de eksprese edildiğini belirten çok sayıda çalışma bulunmaktadır³⁴.

2.11. p53 GENİ:

p53 geni, 53 kDa ağırlığında, 17. kromozomun kısa kolunda (17p13.1) yerleşen tümör supresör genidir³⁵. İlk tanımlandığı yıllarda sadece bir onkogen olarak görev yaptığı düşünülen p53 geninin daha sonraki çalışmalarda birçok tümörde mutasyona uğrayan bir tümör baskılayıcı gen olduğu kanıtlanmıştır³⁶. Hücrede “genin gardiyanı” olarak kabul edilir^{5,27,37}. G1 fazında hücre büyümesini frenlemek, apoptozis yoluyla hücre ölümünü sağlamak, hücre diferansiyasyonunu indüklemek gibi hücre siklusunda önemli fonksiyonları vardır^{7,38}.

p53 geni, DNA replikasyonu, hücre proliferasyonu ve hücre ölümünü kontrol eder. Normal p53 geni (wild tip) genetik hasar taşıyan hücrelerin çoğalmasını önleyen nükleer bir fosfoproteini kodlar. Fizyolojik koşullarda p53 proteininin 6–20 dakika gibi kısa bir yarı ömrü vardır ve normal hücre bölünmesi için gerekli değildir. Hücre kimyasal madde, radyasyon gibi mutajenik ajanlarla karşılaştığında DNA’da bir zedelenme olursa, p53 proteininde değişiklikler olur ve normalde çok kısa yarı ömürlü olan p53 stabilize olarak hücre nükleusunda birikir. Biriken normal p53 DNA’da spesifik bölgelere bağlanır ve hücre siklusunun G1 fazında duraklamasını sağlayarak DNA’nın onarılması için hücreye zaman tanımış olur. Eğer bu süre içinde DNA onarımı yapılamazsa p53 DNA hasarı içeren bu hücrelerin proliferasyonunu engelleyerek hücre ölümüne neden olur ve bu şekilde genetik hasarın yeni nesil hücrelere aktarılmasını engeller^{39,40}. DNA’da spesifik bölgelere bağlanan p53 transkripsiyon (kopyalama) faktörü şeklinde etki eder³⁸. p53’ün hücre siklus regülasyonu, apoptozis, gelişim, farklılaşma, gen amplifikasyonu, DNA rekombinasyonu, kromozomal ayrışma ve hücre yaşlanma gibi olaylarda rolü olduğu gösterilmiştir^{41,42}. p53 amino-terminal transaktivasyon alanı, santral DNA-bağlayıcı alan ve karboksi-terminal oligomerizasyon alanı içerir⁴³. p53’ün hücre siklusunu durdurucu fonksiyonu için transkripsiyonel aktivitesine ihtiyacı vardır. p53 transkripsiyondan bağımsız olarak apoptozisi indükleyebilir⁴³. p53 hücrede p53 bağımlı fonksiyonları olan genlerin transkripsiyonunu artırır⁴⁴.

p53 tarafından aktive olan transkripsiyon genleri Tablo 2’de gösterilmiştir⁴⁴.

Tablo 2: p53 tarafından aktive olan transkripsiyon genleri

P21 WAF1/CIP1	Çeşitli siklin-siklin bağımlı kinazları (SBK) inhibe eder. SBK’ları, siklinleri ve PCNA’yı bağlar. Hücre siklusunu durdurur.
MDM2	Bir onkogen ürünüdür. p53 aracılı transkripsiyonu inaktive eder. p53 aktivitesi için otoregülasyon oluşturur.
GADD45	DNA hasarı üzerinde etkilidir. PCNA’ya bağlanır ve hücre siklusunu durdurabilir. DNA nükleotid onarımında direkt etkilidir.
Siklin G	Fonksiyonu bilinmeyen yeni bir siklindir
Bax	Bcl-2 ailesinin bir üyesidir. Apoptozisi sağlar. Tüm hücrelerde p53 ile indüklenmez
IGF-BP3	(İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3)

GADD45, MDM2, bax/bcl-2 ve p21 WAF1/CIP1 genleri p53’ün G1 duraklaması ve apoptozisi indüklemesi ile ilişkilidir⁴⁵. Bax geni, p53’ün transkripsiyonel kontrolünde olan pro-apoptotik bir gendir⁴⁶. p53 seviyeleri ve fonksiyonu posttranskripsiyonel olarak fosforilasyon ve asetilasyon ile ve diğer proteinlere bağlanma ile düzenlenir. p53 bağlayıcı protein olan MDM2’nin transkripsiyonu p53 tarafından indüklenir⁴⁷. MDM2, p53’ün aktivasyon alanı ile kompleks oluşturarak ya da p53’ün yarı ömrünü uzatarak onu stabilize eder ve p53 inaktivasyonuna neden olur^{45,48}. p21 WAF1/CIP1 DNA onarımını artırarak ve G1 duraklamasını indükleyerek onarım sürecinde önemli rol oynar⁴⁹.

p53, p21 üzerinden hücre siklusunu durdurur veya Bax proteinini indükleyerek ve bcl-2 proteinini baskılayarak hücrelerin apoptozise giden yola girmelerini sağlar^{36,50,51}. p53 aracılı apoptotik hücre ölümü bcl-2 tarafından baskılanırken bax ekspresyonu ile artırılır. Bax apoptozisi indükleyen proapoptotik bir proteindir. Etkisi p53 proteini tarafından aktive oluken bcl-2 ile nötralize olur⁵².

p53 genindeki fonksiyon kaybı nokta mutasyonu, delesyon, viral veya hücrel onkogenler aracılığı ile olabilir. Nokta mutasyon sonucunda konformasyon değişikliği olan ve stabilitesi artan p53 proteininin yarı ömrü 3–6 saate kadar uzar. Bu nedenle normal p53'ten farklı olarak immunhistokimyasal yöntemle saptanabilir. Mutant p53 DNA'ya bağlanamaz ve DNA hasarını takiben hücre siklusunun G1 fazında duraklamaya neden olamaz^{27,38,53}. Delesyon ise p53 ekspresyonu ve protein fonksiyonunda azalmaya veya kayba neden olur⁵³.

p53 gen mutasyonları insan kanserlerinde izlenen en sık genetik değişikliktir^{5,7,27,52,54-56}. Kolon, meme, akciğer, mesane, beyin, uterus gibi pek çok organa ait tümörde p53 geninde mutasyon bildirilmektedir^{35,57-60}. p53 mutasyonu varlığında kolon, mide, meme, beyin, akciğer ve endometrium kanserlerinde hastalarda tedaviye yanıt ve sağkalım anlamlı şekilde kötü bulunmuştur⁶¹. Meme, kolorektal, gastrik, endometrial karsinomlar, lenfomalar, lösemiler gibi kanser türlerinde p53'ün aşırı ekspresyonunun prognostik önemi olduğu gösterilmiştir^{35,54,57,62}. Yapılan çalışmalarda hücre kültürlerinde normal ve mutant p53 aşırı ekspresyonunun kas, sinir ve lenfoid diferansiyasyonda bozukluklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir⁶³.

Baş ve boyun SHK'lerinde %39–80 oranında p53 mutasyonu bildirilmektedir^{5,8,15,38}. Premalign larinks lezyonlarında %40–80 oranında p53 ile boyanma izlenmiştir³⁸. p53 aşırı ekspresyonunun prekanseröz ve malign larinks lezyonlarında proliferatif aktivite ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte larinksin prekanseröz lezyonlarında rölatif olarak yüksek frekansta p53 proteini saptayan gruplarda bildirilmiştir⁶⁴. Hirai ve ark.⁶⁵ p53 ekspresyonu ile histopatolojik bulgular arasında korelasyon saptayamamıştır. Bu sonuçlar larinksin prekanseröz lezyonlarında p53'ün önemini belirtmede uyumsuzluklar olduğunu göstermektedir.

Antikanser ajanlara maruz bırakılmadan sonra tümör hücrelerinde p53 ekspresyonunun artması bu ilaçlara karşı hücrel yanıtları tetiklemede p53'ün rolü olduğunu destekler. Tümör hücrelerinde p53 fonksiyon kaybı kemoterapiye direnç ile ilişkilidir ve mutant p53 hücrelerin sitotoksik ajanlarla indüklenen apoptozise gidişini engeller⁶⁴.

2.12. p63 GENİ

p53 ailesinin yeni bir üyesi olan p63, p53 ile protein yapısı ve fonksiyon olarak benzerdir^{66,67}. Bu ailenin üyeleri yapısal olarak N-terminal transaktivasyon bölgesi, santral DNA bağlayıcı bölge ve karboksi-terminal oligomerizasyon bölgesi içerirler⁶⁸⁻⁷⁰. p63 geni 3q27-q29 kromozom bölgesinde kodlanır^{66,67,71}. p63 geninin N-terminal transaktivasyon bölgesi içeren TAp63 ve transaktivasyon bölgesi içermeyen Δ Np63 olmak üzere iki izotipi vardır. Her iki izotipin de α, β, γ olmak üzere 3 izoformu bulunur^{66,67,72}. p63 geninin kodladığı 6 protein oral mukoza, dış, tükürük bezleri ve derinin oluşumunda önemlidir. Altı farklı p63 proteinin her biri farklı özellikler ve fonksiyonlara sahiptir⁷³. TAp63, p53'e bağlanarak p53 hedef genlerini indükleyerek G1 hücre siklus durmasını veya apoptozisi indükler^{66,74}, p21 gibi p53 sorumlu genlerin transaktivasyonunu aktive eder. Δ Np63 transkripsiyonu indükleyemez⁶⁶. Δ Np63 izoformu doğrudan p53 veya TA izoformuna bağlanarak veya DNA bağlanma bölgeleri için yarışarak dominant negatif şekilde davranır. Böylece p53 ve TA izoformlarını inaktif hale getirir. Bu nedenle Δ Np63'ün anti-apoptotik rolü vardır⁷⁴. TAp63 proteini hücre diferansiyasyonunu sağlarken Δ Np63 hücre proliferasyonunu sağlar⁷¹. Deri, meme, prostat ve uterin serviks gibi organların epitelyal bazal hücrelerinde eksprese edilen baskın p63 izoformu Δ Np63'tür. Bu nedenle Δ Np63 ekspresyonu, apoptozisi indükleyen p53'ün aktivitesini bloke ederek bazal/ progenitör hücrelerin proliferasyonuna katkıda bulunabilir⁶⁷. p63 ekspresyonunu düzenleyen ve hangi izoformun baskın olacağını belirleyen faktör hala anlaşılammış olsa da, DNA hasarının TA formlarının ekspresyonunu artırdığı (up regüle), Δ N formlarını azalttığı (down regüle) düşünülmektedir. p63'ün yarı ömrü proteazomal parçalanma ve kaspaz parçalaması (cleavage) ile düzenleniyor gibi görünmektedir. Mutant p53 ile etkileşim p63'ün transkripsiyon aktivasyon fonksiyonunu inhibe ederken, wp53'ün Δ Np63 izoformuna bağlanması p63'ün parçalanmasına neden olur. p53 kararlılığında önemli düzenleyiciler olan Mdm2 ve Mdmx'in p63 aktivitesi ve yarı ömrü üzerine etkisi yoktur⁷⁴.

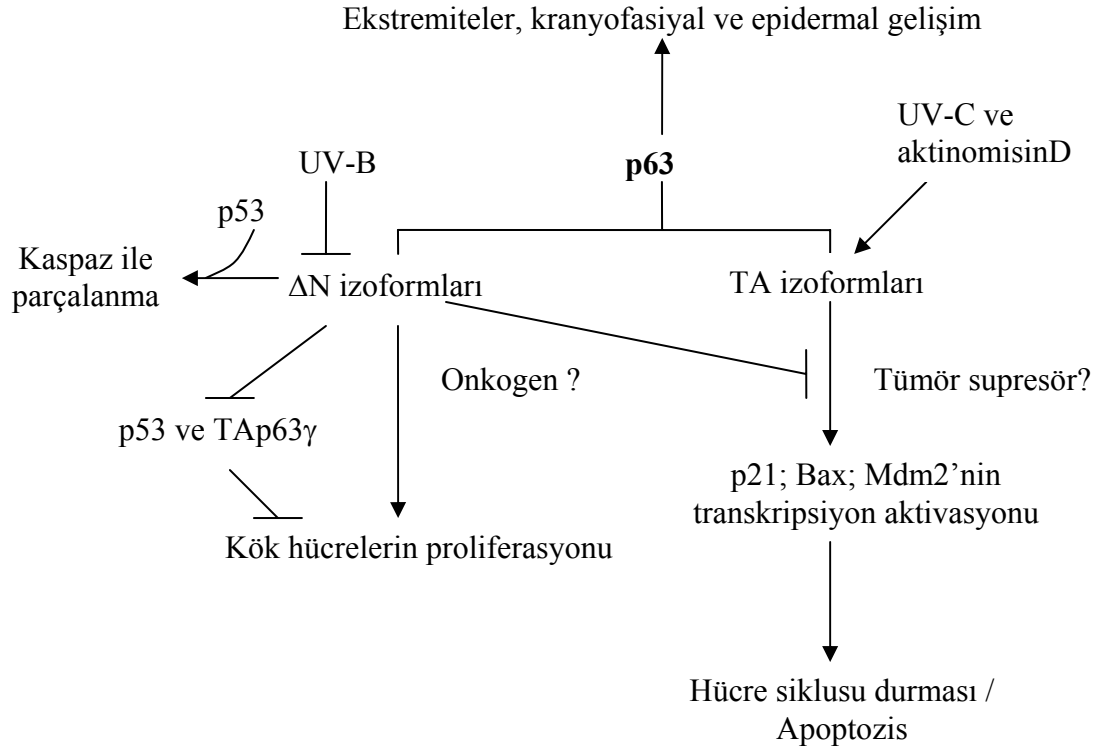
p63 normal koşullar altında epitel hücrelerinde yüksek seviyelerde eksprese edilir. Deri, larinks, meme miyoepitelyumu, oral epitel, prostat ve ürotelyumu içine alan çok sayıda epitelyal dokunun bazal rejeneratif hücrelerinin nukleusunda ve embriyonik

ektoderimde eksprese olur. p53'ün tümör baskılayıcı fonksiyonuna karşıt olarak p63'ün birçok skuamöz karsinomda aşırı eksprese edilmesi p63'ün bir onkogen gibi davranabileceğini düşündürmüştür (Resim 7'de normal çok katlı yassı epitelde bazal sıralarda p63 pozitifliği görülmektedir). p63 -/- fareler kullanılarak yapılan çalışmalar p63 proteinin skuamöz epitel gelişiminde rol oynadığını göstermektedir. Embriyonel hayatın 9–10. günlerinde epidermis gelişiminin başlangıcı ile tek tabakalı ektoderimde p63 ekspresyonunun başlaması aynı zamana rastlar. Embriyogenezin erken basamaklarında kranyofasiyal iskelet ve yumuşak doku yapılarının morfogenezi için önemli olan brankiyal yarıkların ektodermal yüzeylerinde p63 ekspresyonu tespit edilebilir⁶⁸. p63'ün gelişimdeki önemine ek olarak epidermal kök hücre popülasyonunun devamlılığında önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür^{68,75}. İmmunohistokimyasal olarak epidermis, kıl follikülleri, ter bezleri, serviks, dil, özofagus meme bezleri, prostat ve ürogenital traktustaki çeşitli epitelyal dokularda bazal/progenitör hücrelerde p63 protein ekspresyonu olduğu gösterilmiştir^{68,76,77}. Bu hücreler bazal tabakadan göç edip, diferansiye oldukça p63 ekspresyonu kaybolur⁶⁸.

p53 gen mutasyonları kanser gelişimine neden olurken, p63 mutasyonları anormal ekstremit gelişimi, ektodermal displazi ile karakterize konjenital anomalilere yol açar. Ektrodaktili-ektodermal displazi “clefting” (EEC) sendromu, Ankilobefaron ektodermal displazi ve “clefting” (AEC veya HayWells hastalığı), Akro-dermatoungual-lakrimal-tooth sendromu (ADULT), Limb-mammary sendromu gibi gelişimsel bozukluklarda p63 mutasyonları saptanmıştır^{68,77}.

p63 gen mutasyonları insan kanserlerinde nadirdir fakat deri, serviks, oral kavite mesane, nazofarinks, baş ve boyun karsinomlarında gen amplifikasyonu ve protein aşırı ekspresyonu daha sık saptanmaktadır⁷⁸⁻⁸⁰. Akciğerin SHK'sinin %93'ünde, memenin duktal karsinomlarının %10'unda, overin endometrioid karsinomlarının %25'inde p63 eksprese edilir. Meme, akciğer veya prostat adenokarsinomlarında nadiren p63 ekspresyonu saptanır. ΔNp63'ün nöroblastom, kolorektal karsinom, mesane kanseri, nazofarinks kanseri, baş ve boyun SHK'leri ve hepatosellüler karsinomlarda aşırı eksprese olduğunu bildiren yayınlar bulunmaktadır⁸¹.

p63 izoformları ve etkileri Şekil 4'de gösterilmektedir⁷⁴.



Şekil 4: p63 izoformları

3. MATERYAL VE METOD

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 1998-2005 yılları arasında incelenen larinjektomi materyallerinde SHK tanısı alan 43 hasta çalışmaya alındı. Larinjektomi materyallerinin 27'si total larinjektomi, 12'si parsiyel larenjektomi materyalidir. Hastaların dosya kayıtlarından yaş, cinsiyet, sigara alışkanlığı, indirekt ve direkt laringoskopik muayene bulguları, uygulanan cerrahi prosedürler ve takip süreleri incelendi. Servikal lenf nodu metastazı, uzak metastaz, nüks ve kanser ile ilişkili ölüm verileri kaydedildi.

Histopatolojik incelemeler %10'luk formalin ile fiksasyon sonrası rutin takip ile hazırlanmış parafin blokların 3–5µmlik Hematoksilen-Eozin boyalı arşiv preparatları değerlendirilerek yapıldı. Larinjektomi materyallerinde SHK tanısı, tümör diferansiyasyonu ve lenf nodu diseksiyon materyallerinde metastatik lenf nodu varlığı yeniden gözden geçirildi.

Tümörün histolojik tipi ve gradelemesi Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 1991 sınıflamasına¹⁶ göre yapılarak larinks kanserleri iyi diferansiye, orta derecede diferansiye, az diferansiye olarak 3 gruba ayrıldı. Histolojik grade tümör hücrelerinin pleomorfizm, hücresel diferansiyasyon ve mitotik aktivite özelliklerine göre değerlendirildi. Belirgin keratinizasyon, seyrek mitoz ve hafif derecede pleomorfizm gösteren hücrelerin oluşturduğu skuamöz adalardan oluşan tümörler iyi diferansiye, belirgin pleomorfizm, sık mitoz gösteren, keratinizasyon görülmeyen tümör hücrelerinden oluşan tümörler az diferansiye, ikisinin arasında morfoloji gösteren tümörler ise orta derecede diferansiye skuamöz hücreli karsinom olarak değerlendirildi. Evreleme 'American Joint Committee for Cancer Staging and End Results Reporting (AJCC)'¹⁷ nin önerdiği sisteme göre yapıldı.

Makroskobik incelemede tümör lokalizasyonu AJCC sistemine göre supraglottik, glottik, infraglottik olarak sınıflandı. AJCC'ye göre supraglottik bölge; suprahoid epiglot, infrahyoid epiglot, preepiglottik bölge, ariepiglottik kıvrımların laringeal yüzü, iki aritenoid ve band ventriküllerden oluşur. AJCC tarafından supraglottisin inferioru olarak laringeal ventriküllerin apeksinden geçen horizontal bir düzlem tanımlanır^{17,23}. Anatomik bölümlenmeye göre ise supraglottik bölge skuamöz epitelin respiratuar epitele dönüştüğü bölge olan arkuat çizgi ile ayrılır. Arkuat çizgi

ventriküllerin tavanı ve sakkul supraglottik bölgeye dahil iken, tabanı glottik bölgeye aittir^{17, 23}.

Glottik bölge gerçek kord vokaller, ön ve arka komissürlerden oluşur. Ön komissür vokal kordların önde birleşerek oluşturdukları müköz membrandan oluşan dar bir band şeklindedir¹⁵. Alt sınır ventriküllerin apeksinin bir santimetre aşağısından geçen horizontal düzlemlerle ayrılır^{17,23}.

İnfraglottik bölge; glottik bölgeden aşağıya doğru krikoid kıkırdağın inferior kenarına kadar uzanan kısımdır^{17,23}.

Transglottik bölge larinksi oluşturan bölgeler arasında yer almasa da, bu bölgenin kanserlerinin yüksek oranda laringeal kıkırdağa yayılım göstermesi nedeniyle ayrı olarak ele alınmıştır. Tiroid kanatları ile anterolateralden, konus elastikus ile inferomedialden, kuadranguler membranla superomedialden ve piriform sinüs mukozası ile posteriordan kuşatılır^{17,23}.

İmmünohistokimyasal Boyama İşlemleri:

1) Her olgudan tümörün genel özelliklerini en iyi yansıtan birer adet parafin blok seçildi.

2) Parafin bloklardan alınan 3–5µm kalınlığında kesitler Poly-lysine ile kaplı lamlara alındı.

3) Kesitler bir gece boyunca 37°C lik ısıda etüvde bekletildi.

4) Kesitler 6 ayrı ksilen banyosundan 5'er dakika (toplam 30 dakika) geçirilerek deparafinize edildi.

5) Absolü alkolden 4 kez 5'er dakika geçirilerek (toplam 20 dakika) dehidrate edildi ve distile suya alındı.

6) Mikrodalga fırında yüksek ısıda pH=6, 10mM sitrat buffer tampon solüsyonu bulunan şale içinde 2 kez 5 dakika bekletildi.

7) Kesitler 20 dakika oda ısısında soğutuldu.

8) Kesitler 5 dakika Phosphate Buffered Salin (PBS) solüsyonundan geçirildi.

9) Kesitler nemli ve kapaklı bir ortama yerleştirildi ve dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak amacıyla kesitler üzerine %0,3'lük Hidrojen Peroksit (H₂O₂) damlatılarak 15 dakika inkübe edildi.

10) Kesitler PBS solüsyonunda 5 dakika yıkandı

11) Nonspesifik boyanmaları engellemek amacıyla kesitler üzerine Large Volume Ultra V Blok (Lab Vision, Cat; TA-125-UB) solüsyonu damlatıldı ve 5 dakika inkübe edildi.

12) Solüsyon fazlası silindi ve primer antikorlar damlatılarak pilot immun histokimyasal işlemlerle belirlenen dilüsyon oranları ve inkübasyon süreleri ile inkübe edildi. Primer antikorların özellikleri tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3: Kullanılan antikorların özellikleri

	Üretici Firma	Klon	Ig İzotip	Dilüsyon	İnkübasyon
p53	Neomarkers	Mouse Monoklonal Klon Do-7+BP53-12	IgG2b+ IgG2a	1/100	45 dakika Oda ısısında (18-25°C)
P63	Neomarkers	Mouse Monoklonal Klon 4A4+Y4A3	IgG2a	1/100	60 dakika Oda ısısında (18-25°C)

13) Kesitler PBS banyosunda 5 dakika yıkandı

14) Sekonder antikor Biotinli Goat Anti-Polvalent (Lab. Vision, Cat TP-125-BN) damlatıldı ve 20 dakika inkübe edildi.

15) Kesitler PBS solüsyonunda 5 dakika yıkandı.

16) İşaretleyici olarak Large Volume Streptavidin Peroxidase (Lab. Vision. Cat: TS- 125-HR) damlatılarak 20 dakika inkübe edildi.

17) Kesitler PBS solüsyonunda 5 dakika yıkandı.

18)Kromojen uygulaması için 3,3’ Diaminobenzidine (DAB) çözeltisi damlatıldı ve 15 dakika inkübe edildi.

19) Kesitler şaleye alınarak distile suda yıkandı.

20) Zıt boyama yapılmak üzere 1 dakika süre ile Mayer hematoksilen uygulandı.

21) Distile su ile yıkanarak Large Volume Ultra Mount Plus ile kapatıldı.

İmmünreaktivitenin Değerlendirilmesi:

İmmunhistokimyasal çalışmalarda pozitif kontrol olarak p53 için kolon karsinomu, p63 için prostat karsinomu kesitleri kullanıldı. Her iki antikor için nükleer boyanma pozitif kabul edildi. İmmunoreaktivitenin en yoğun olduğu alanlar x10, x20 ve x40 objektifler kullanılarak belirlendi. Farklı alanlar taranarak bir büyük büyütme alanındaki immünreaktif tümör hücreleri sayıldı. 1000 tümör hücresindeki pozitif (+) hücreler saptandı. Boyanma yoğunluğu göz önüne alınmadı. Her vakada p53 ve p63 reaktivitesi 100 hücrede pozitif boyanan hücre olarak hesaplandı. Pozitif boyanan hücrelerin oranı aşağıdaki şekilde derecelendirildi.

Hiç boyanma yok: negatif (-)

Tümör hücrelerinin %1-9'unda boyanma: 1 (+) boyanma

Tümör hücrelerinin %10-50'sinde boyanma: 2 (+) boyanma

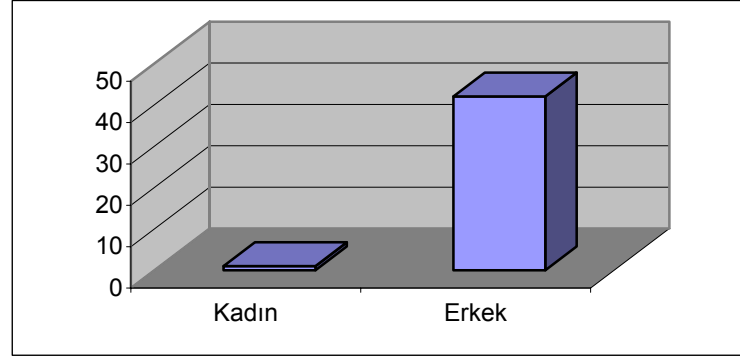
Tümör hücrelerinin %51-100'ünde boyanma 3 (+) boyanma

İstatistiksel Değerlendirmeler:

İstatistiksel analiz "SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 11.0 for Windows" programı kullanılarak yapıldı. Klinikopatolojik ve immünohistokimyasal veriler ki kare, Fisher's exact test ve Spearman nonparametrik korelasyon analizi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

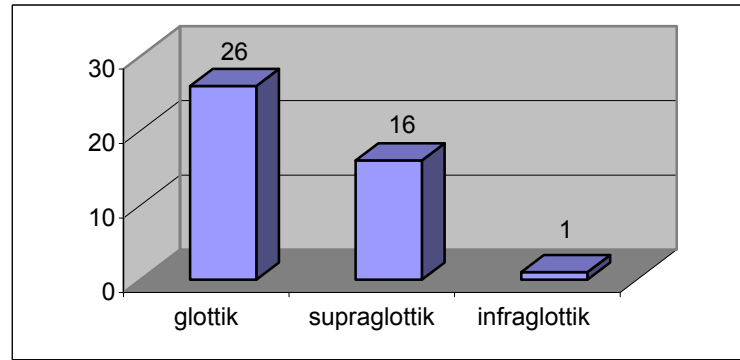
4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 43 olgunun 42'si (%97,7) erkek, 1'i (%2,3) kadındı. Hastaların yaşları 27–80 arasında olup, ortalama yaş $57,8 \pm 11,99$ olarak saptandı (Şekil 5).



Şekil 5: Olguların cinsiyete göre dağılımı

Tümörün en büyük boyutu 0,5–6,2 cm arasında olup, ortalama $3,02 \pm 1,42$ cm'di. Tümör olguların 26'sında (%60,5) glottik, 16'sında (%37,2) supraglottik, 1'inde (%2,3) infraglottik yerleşimli idi (Şekil 6).



Şekil 6: Olguların tümör yerleşim yerine göre dağılımı

Histolojik olarak olguların 18'i (%41,9) iyi diferansiye, 21'i (%48,8) orta derecede diferansiye, 4'ü (%9,3) az diferansiye SHK'di (Resim 1–3) .

AJCC TNM evreleme sistemine göre olguların 5'i (%11,6) Evre I, 5'i (%11,6) Evre II, 10'u (%23,3) Evre III, 23'ü (%53,5) Evre IV olarak değerlendirildi. İstatistiksel olarak evre ve diferansiyasyon derecelerine göre yaş grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Olguların 29'unda (%67,4) lenf nodu metastazı izlenmezken, 14'ünde

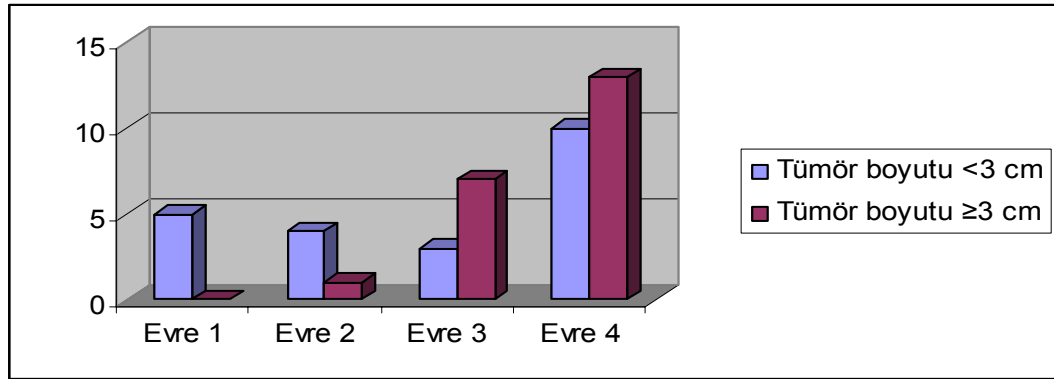
(%32,6) lenf nodu metastazı saptandı. 17 olguda (%39,5) kıkırdak invazyonu, 6 olguda (%14) larinks dışı çevre yumuşak dokuya invazyon izlendi. Uzak metastaz izlenmedi. Olguların 4'ünde (%9,3) cerrahi sınırdaki tümör varlığı, 7'sinde (%16,3) sinir invazyonu, 6'sında (%14) vasküler invazyon ve 4'ünde (%9,3) nüks izlendi. İzlenen hastaların 37'sinin (%86) hayatta olduğu tespit edildi.

Nüks ile histopatolojik ve klinik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı.

En büyük çapı 3 cm'in altında 22 olgunun 5'i (%22,7) evre I, 4'ü (%18,2) evre II, 3'ü (%13,6) evre III, 10'u (%45,5) evre IV olarak tespit edildi. Çapı 3 cm ve üzerinde olan 21 olgudan 1'i (%4,8) evre II, 7'si (%33,3) evre III, 13'ü (%61,9) evre IV'dü (Tablo 4, Şekil 7). Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0.032).

Tablo 4:Tümör boyutu 3 cm'den küçük ve 3cm'e eşit büyük tümörlerin evrelere göre dağılımı

		Evre				Toplam
		1	2	3	4	
Tümör boyutu	<3 cm	5	4	3	10	22
	≥3 cm	0	1	7	13	21
Toplam		5	5	10	23	43



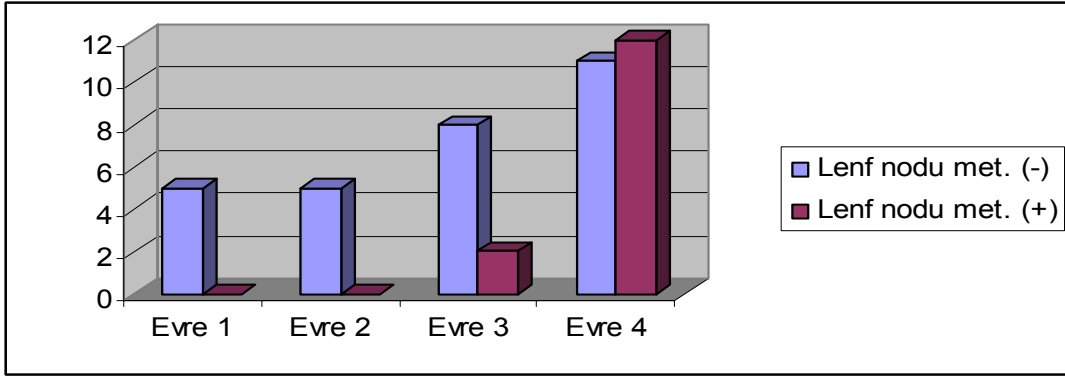
Şekil 7: Tümör boyutu 3 cm'den küçük ve 3cm'e eşit büyük tümörlerin evrelere göre dağılımı

Lenf nodu metastazı izlenen 14 olgunun 2'si (%14,7) evre III, 12'si (%85,7) evre IV'dü. Lenf nodu metastazı izlenmeyen 29 olgunun 5'i (%17,2) evre I, 5'i (%17,2)

evre II, 8'i (%27,6) evre III, 11'i (%37,9) evre IV'dür (Tablo 5, Şekil 8). Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.023$).

Tablo 5: Evre ve lenf nodu metastazı arasındaki ilişki

		Lenf nodu metastazı		Toplam
		(-)	(+)	
Evre	1	5	0	5
	2	5	0	5
	3	8	2	10
	4	11	12	23
Toplam		29	14	43

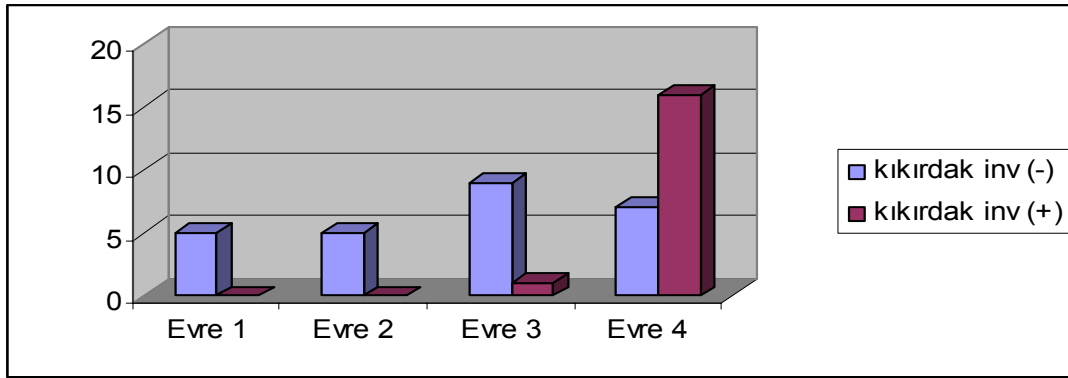


Şekil 8: Evre ve lenf nodu metastazı arasındaki ilişki

Kıkırdak invazyonu izlenen 17 olgunun 1'i (%5,9) evre III, 16'sı (%94,1) evre IV olup, kıkırdak invazyonu izlenmeyen 26 olgunun 5'i (%19,2) evre I, 5'i (%19,2) evre II, 9'u (%34,6) evre III, 7'si (%26,9) evre IV'dür (Tablo 6, şekil 9). Evre ve kıkırdak invazyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu ($p=0.00$).

Tablo 6: Kıkırdak invazyonu olan ve olmayan olguların evrelere göre dağılımı

		Kıkırdak invazyonu		Toplam
		(-)	(+)	
Evre	1	5	0	5
	2	5	0	5
	3	9	1	10
	4	7	16	23
Toplam		26	17	43



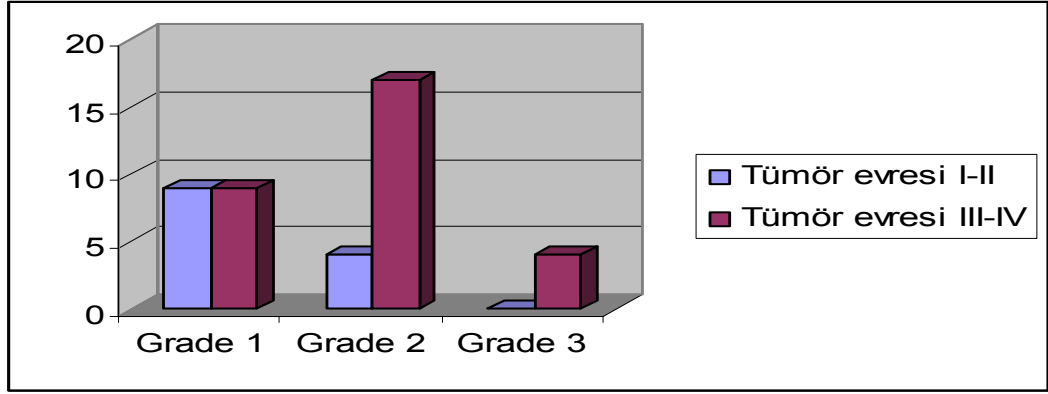
Şekil 9: Kıkırdak invazyonu olan ve olmayan olguların evrelere göre dağılımı

Evre ile larinks dışı çevre yumuşak doku yayılımı, cerrahi sınırdaki tümör varlığı, sinir invazyonu, vasküler invazyon, sigara kullanımı ve nüks arasında istatistiksel bir ilişki saptanmadı.

İyi diferansiye (grade 1) 18 olgunun 9'u (%50) evre I-II iken, 9'u (%50) evre III-IV'dür. Orta derecede diferansiye (grade 2) 21 olgunun 4'ü (%19) evre I-II iken, 17'si (%81) evre III-IV'dür. Az diferansiye (grade 3) 4 olgunun (%100) tümü ileri evrelidir (evre III-IV) (Tablo 7, şekil 10). Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.043$). İleri evre tümörlerde diferansiyasyonun azaldığı saptandı.

Tablo 7: Grade'in evrelere göre dağılımı

		Tümör evresi		Toplam
		I-II	III-IV	
Grade	1	9	9	18
	2	4	17	21
	3	0	4	4
Toplam		13	30	43

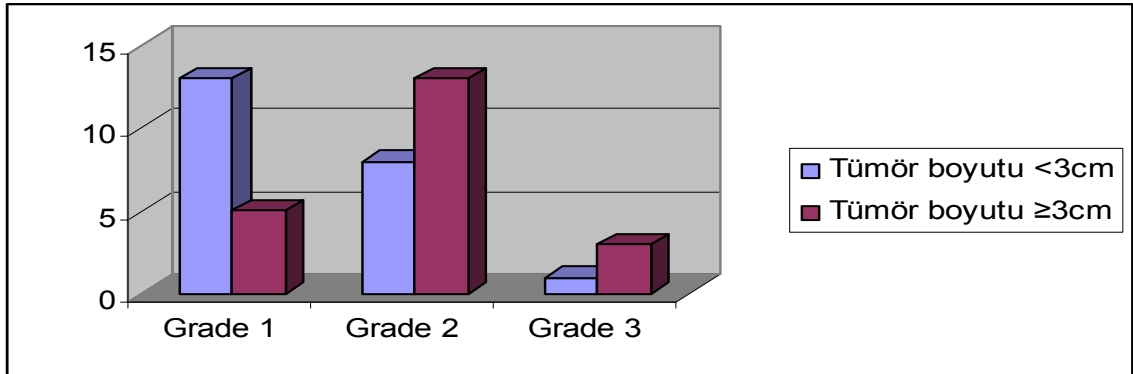


Şekil 10: Grade'in evrelere göre dağılımı

Tümörün en büyük çapı <3cm olan 22 olgunun 13'ü (%59,1) iyi diferansiye (grade 1), 8'i (%36,4) orta derecede diferansiye (grade 2), 1'i (%4,5) az diferansiyedir (grade 3). Tümörün en büyük çapı \geq 3cm olan 21 olgunun 5'i (%23,8) iyi diferansiye, 13'ü (%61,9) orta derecede diferansiye ve 3'ü (%14,3) az diferansiyedir (Tablo 8, şekil 11). İstatistiksel olarak grade ile tümör boyutu arasında korelasyon tespit edildi ($r=0.362$, $p=0.017$). Tümör boyutu arttıkça diferansiyasyonun azaldığı sonucuna varıldı.

Tablo 8: Grade ve tümör boyutu arasındaki ilişki

		Tümör boyutu		Toplam
		<3 cm	\geq 3 cm	
Grade	1	13	5	18
	2	8	13	21
	3	1	3	4
Toplam		22	21	43

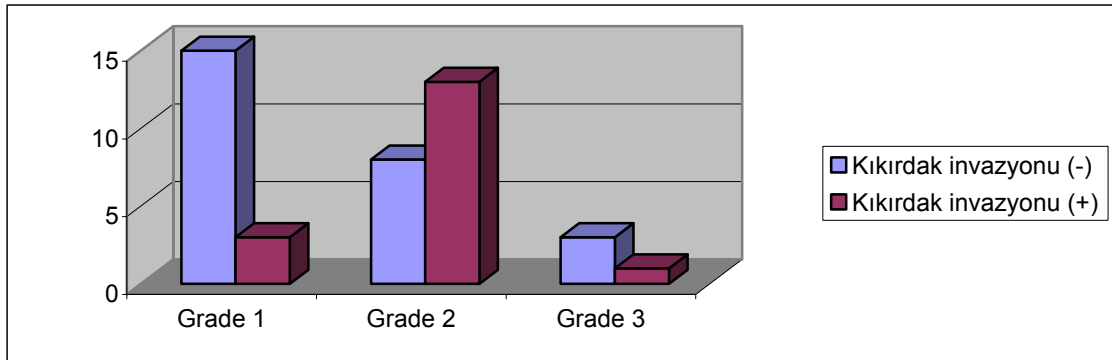


Şekil 11: Grade ve tümör boyutu arasındaki ilişki

Kıkırdak invazyonu olan 17 olgunun 3'ü (%17,6) iyi diferansiye (grade1), 13'ü (%76,5) orta derecede diferansiye (grade 2), 1'i (%5,9) az diferansiye olup (grade 3); kıkırdak invazyonu olmayan 26 olgunun 15'i (%57,7) iyi diferansiye (grade1), 8'i (30,8) orta derecede diferansiye (grade2), ve 3'ü (%11,5) az diferansiyedir (grade3) (Tablo 9, şekil 12). İstatistiksel olarak grade ile kıkırdak invazyonu arasında anlamlı ilişki bulundu ($p=0.013$). Bu sonuçlara göre kıkırdak invazyonu olan tümörlerin çoğunluğunun orta- az diferansiye tümörler olduğu saptandı.

Tablo 9: Grade ve kıkırdak invazyonu arasındaki ilişki

		Kıkırdak invazyonu		Toplam
		(-)	(+)	
Grade	1	15	3	18
	2	8	13	21
	3	3	1	4
Toplam		26	17	43



Şekil 12: Grade ve kıkırdak invazyonu arasındaki ilişki

Grade ile lenf nodu metastazı, larinks dışı yumuşak doku invazyonu, cerrahi sınırdaki tümör varlığı, sinir invazyonu, vasküler invazyon arasında anlamlı ilişki bulunmadı.

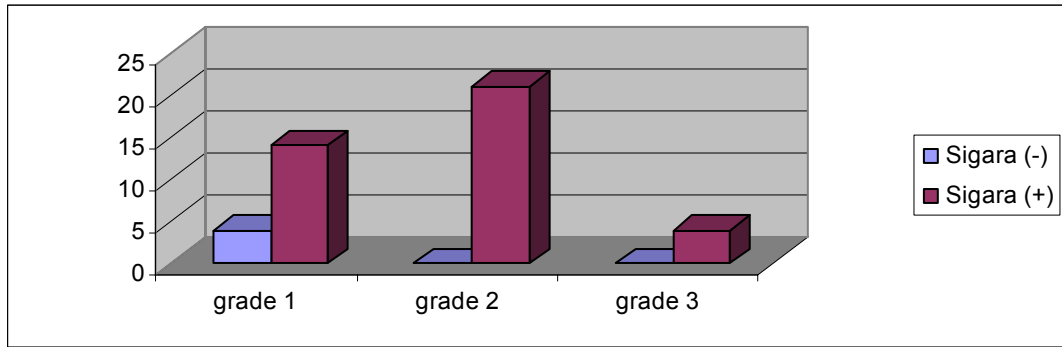
43 olgunun 39'unda (%90,7) sigara kullanma öyküsü vardır. Tümör bu olguların 23'ünde (%59) glottik, 16'sında (%41) supraglottik yerleşimlidir. Tümör lokalizasyonu ile sigara kullanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu ($p=0.03$)

Sigara kullanan 39 olgunun 14'ünde (%35,9) iyi diferansiye (grade 1), 21'inde (%53,8) orta derecede diferansiye (grade 2), 4'ünde (%10,3) az diferansiye (grade 3)

SHK saptandı. Sigara kullanmayan 4 olgunun (%100) tümünde tümörün iyi diferansiye (grade 1) olduğu tespit edildi (Tablo 10, şekil 13). Sigara kullanımı ve grade arasında da istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edildi ($p=0.047$).

Tablo 10: Grade ve sigara kullanımı arasındaki ilişki

		Sigara		Toplam
		(-)	(+)	
Grade	1	4	14	18
	2	0	21	21
	3	0	4	4
Toplam		4	39	43



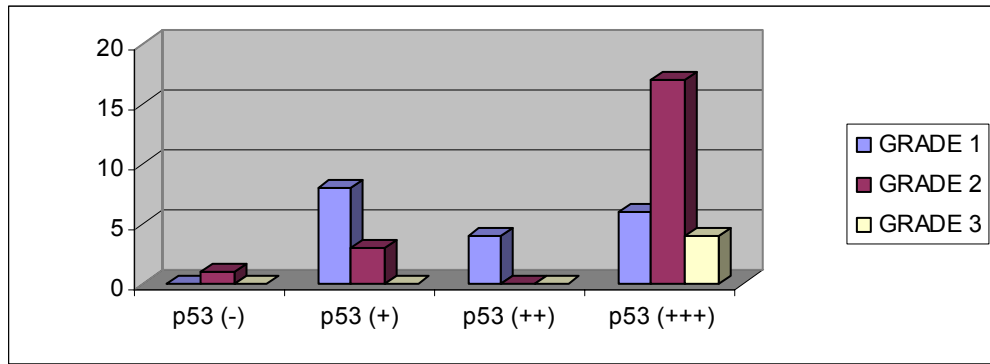
Şekil 13: Grade ve sigara kullanımı arasındaki ilişki

Sigara kullanımı ile evre, lenf nodu metastazı, kıkırdak invazyonu, vasküler invazyon, cerrahi sınırdaki tümör varlığı ve nüks arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı.

p53 boyanması: 43 larinks karsinomu olgusundan 42'sinde (%97,7) p53 ile immunoreaktivite tespit edildi. Bu olguların 11'inde (%25,6) 1+ boyanma, 4'ünde (%9,3) 2 + boyanma, 27'sinde (%62,8) 3+ boyanma izlendi. Tümör diferansiyasyonuna göre iyi diferansiye (grade 1) 8 olguda (%44,4) 1+ boyanma, 4 olguda (%22,2) 2 + boyanma, 6 olguda (%33,3) 3+ boyanma izlendi. Orta derecede diferansiye (grade 2) 3 olguda (%14,3) 1+ boyanma, 17 olguda (%81) 3+ boyanma, az diferansiye (grade 3) 4 olguda (%100) 3+ boyanma tespit edildi (Tablo 11, şekil 14, resim 4–6). Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.016$). Tümör diferansiyasyonu azaldıkça p53 ekspresyonunun arttığı saptandı.

Tablo 11: p53 pozitifliği ve grade ilişkisi

		grade			Toplam
		1	2	3	
p53 pozitifliği	0	0	1	0	1
	1	8	3	0	11
	2	4	0	0	4
	3	6	17	4	27
Toplam		18	21	4	43

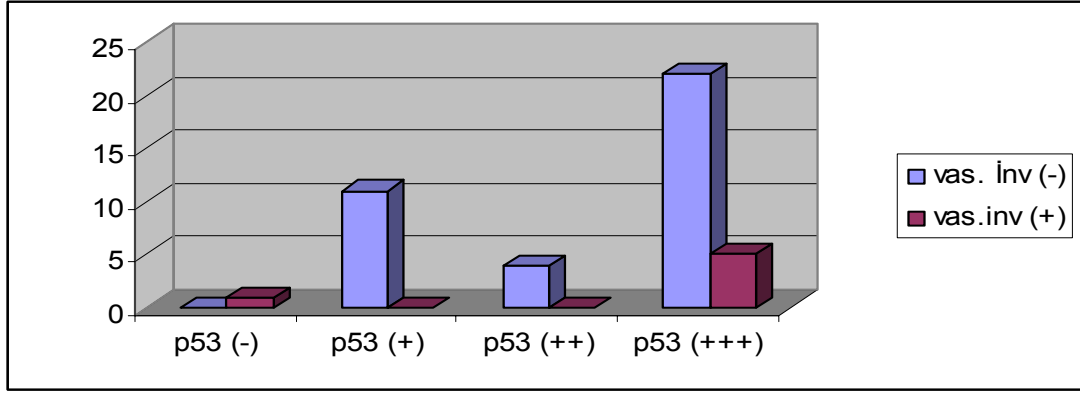


Şekil 14: p53 pozitifliği ve grade ilişkisi

43 olgudan 6'sında (%14) vasküler invazyon tespit edildi. Bu olguların 5'inde (%83,3) p53 ile 3+ boyanma izlenirken, 1'inde (%16,7) boyanma izlenmedi. Vasküler invazyon olmayan 37 olgudan 11'inde (%29,7) p53 ile 1+ boyanma izlenirken, 4'ünde (%10,8) 2+ boyanma, 22'sinde (%59,5) 3+ boyanma izlendi (Tablo 12, şekil 15). p53 pozitifliği ile vasküler invazyon arasında anlamlı ilişki saptandı ($p=0.028$).

Tablo 12: p53 pozitifliği ve vasküler invazyon ilişkisi

		vasküler invazyon		Toplam
		(-)	(+)	
p53 pozitifliği	0	0	1	1
	1	11	0	11
	2	4	0	4
	3	22	5	27
Toplam		37	6	43

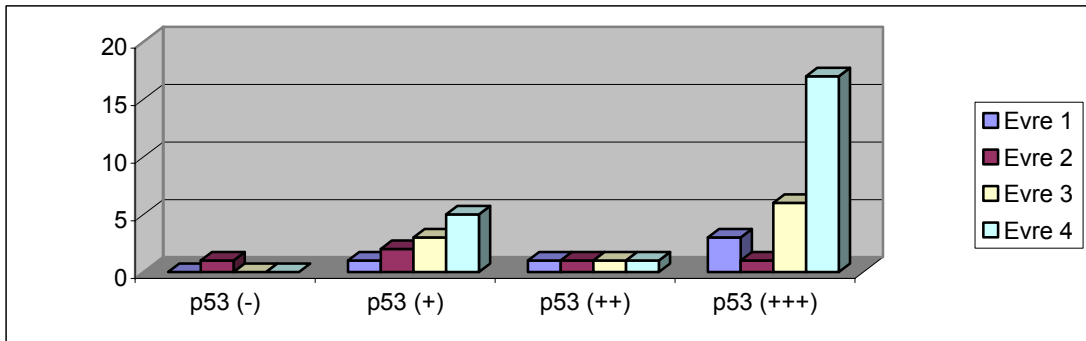


Şekil 15: p53 pozitifliği ve vasküler invazyon ilişkisi

Evre I olan 5 olgudan 1'inde (%20) p53 ile 1+ boyanma, 1'inde (%20) 2+ boyanma, 3'ünde (%60) 3+ boyanma saptandı. Evre II olan 5 olgudan 2'sinde (%40) 1+ boyanma, 1'inde (%20) 2+ boyanma, 1'inde (%20) 3+ boyanma izlendi. Evre III olan 10 olgudan 3'ünde (%30) 1+ boyanma, 1'inde (%10) 2+ boyanma, 6'sında (%60) 3+ boyanma saptandı. Evre IV 23 olgudan 5'inde (%21,7) 1+ boyanma, 1'inde (%4,3) 2+ boyanma, 17'sinde (%73,9) 3+ boyanma saptandı (Tablo 13, şekil 16). İstatistiksel olarak p53 immunoreaktivitesi ile evre arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

Tablo 13: p53 pozitifliği ve evre ilişkisi

		Evre				Toplam
		1	2	3	4	
p53 pozitifliği	0	0	1	0	0	1
	1	1	2	3	5	11
	2	1	1	1	1	4
	3	3	1	6	17	27
Toplam		5	5	10	23	43



Şekil 16: p53 pozitifliği ve evre ilişkisi

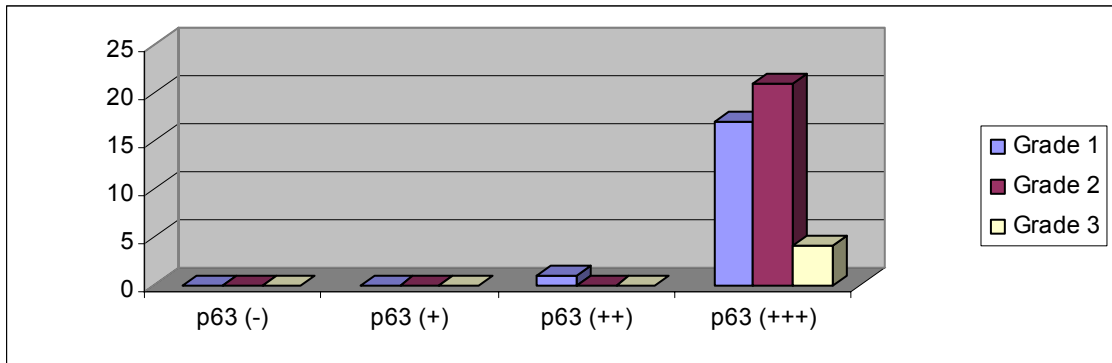
p53 immünoaktivitesi ile lenf nodu metastazı, kıkırdak invazyonu, sinir invazyonu, cerrahi sınırdaki tümör varlığı, sigara kullanımı ve nüks arasında da istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı.

p63 boyanması: p63 ile larinks karsinomlu 43 olgunun tümünde immünoaktivite tespit edildi. 42 olguda (%97,7) 3 + boyanma, 1 olguda (%2,3) 2 + boyanma izlendi.

p63 ile 2+ boyanma izlenen 1 olgu (%100) iyi diferansiyedir (grade1). 3+ boyanma izlenen 42 olgudan 17'si (%40,5) iyi diferansiye (grade1), 21'i (%50) orta derecede diferansiye (grade 2), 4'ü (%9,5) az diferansiyedir (grade3) (Tablo14, şekil 17, resim 7–10). Bu sonuçlara göre p63 immünoaktivitesi ve tümör diferansiyasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı.

Tablo 14: p63 pozitifliği ve grade ilişkisi

		grade			Toplam
		1	2	3	
p63 pozitifliği	1	0	0	0	0
	2	1	0	0	1
	3	17	21	4	42
Toplam		18	21	4	43



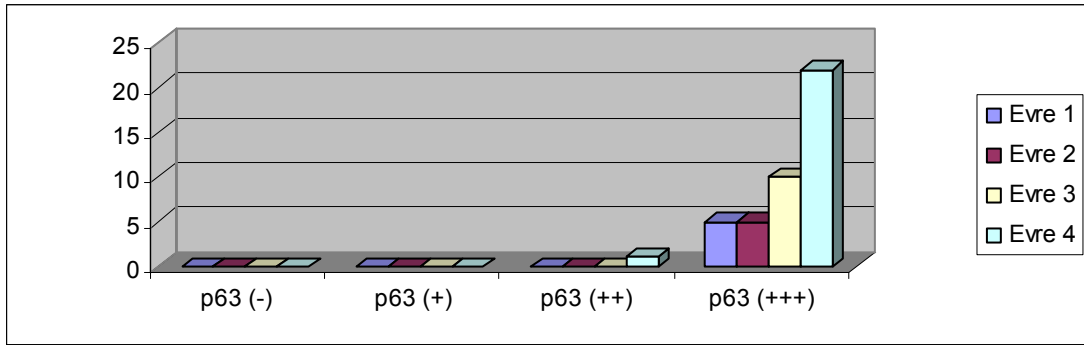
Şekil 17: p63 pozitifliği ve grade ilişkisi

p63 ile 2+ boyanma izlenen 1 olgu (%100) evre IV'dür. 3+ boyanma izlenen 42 olgudan 5'i (%11,9) evre I, 5'i (%11,9) evre II, 10'u (%23,8) evre III ve 22'si (%52,4)

evre IV'dür (Tablo 15, şekil 18). Bu sonuçlara göre p63 immünoaktivitesi ve tümör evresi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı.

Tablo 15: p63 pozitifliği ve evre ilişkisi

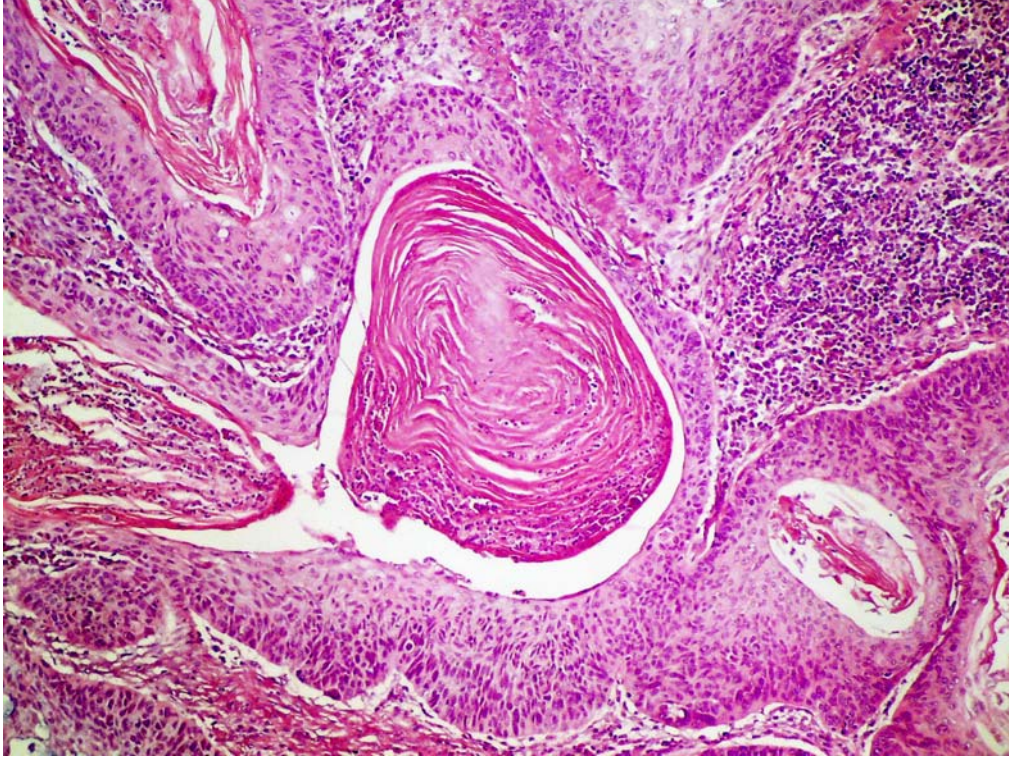
		Evre				Toplam
		1	2	3	4	
p63 pozitifliği	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	1	1
	3	5	5	10	22	42
Toplam		5	5	10	23	43



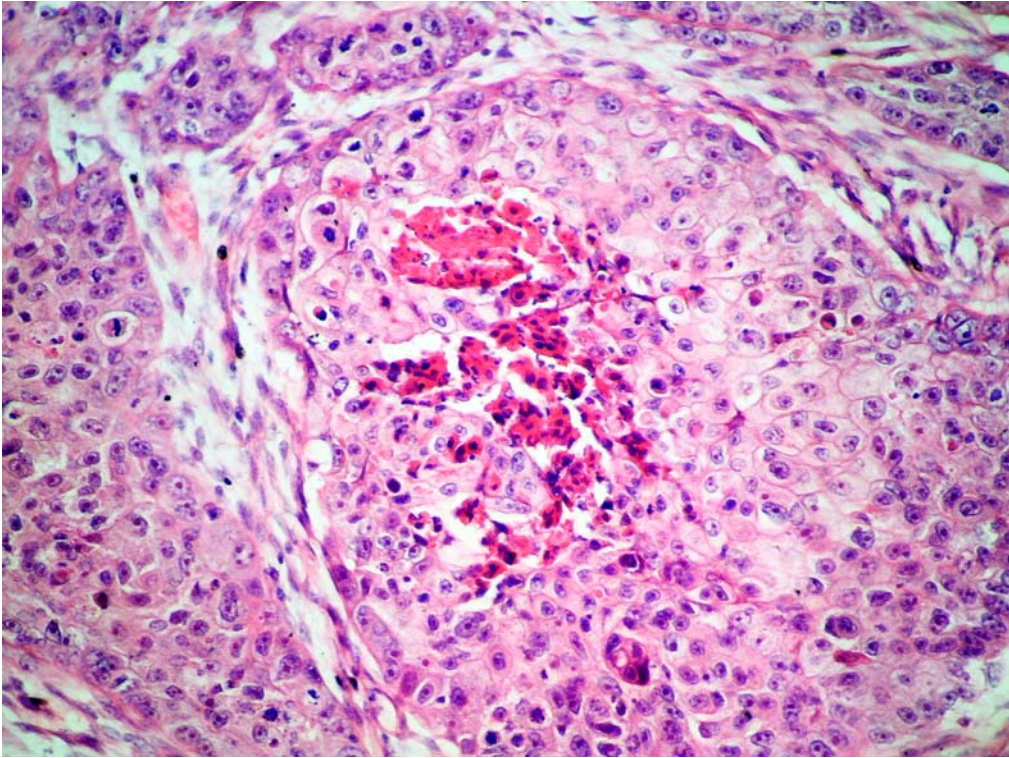
Şekil 18: p63 pozitifliği ve evre ilişkisi

p63 immünoaktivitesi ile lenf nodu metastazı, kıkırdak invazyonu, sinir invazyonu, vasküler invazyon, sigara kullanımı ve nüks arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı.

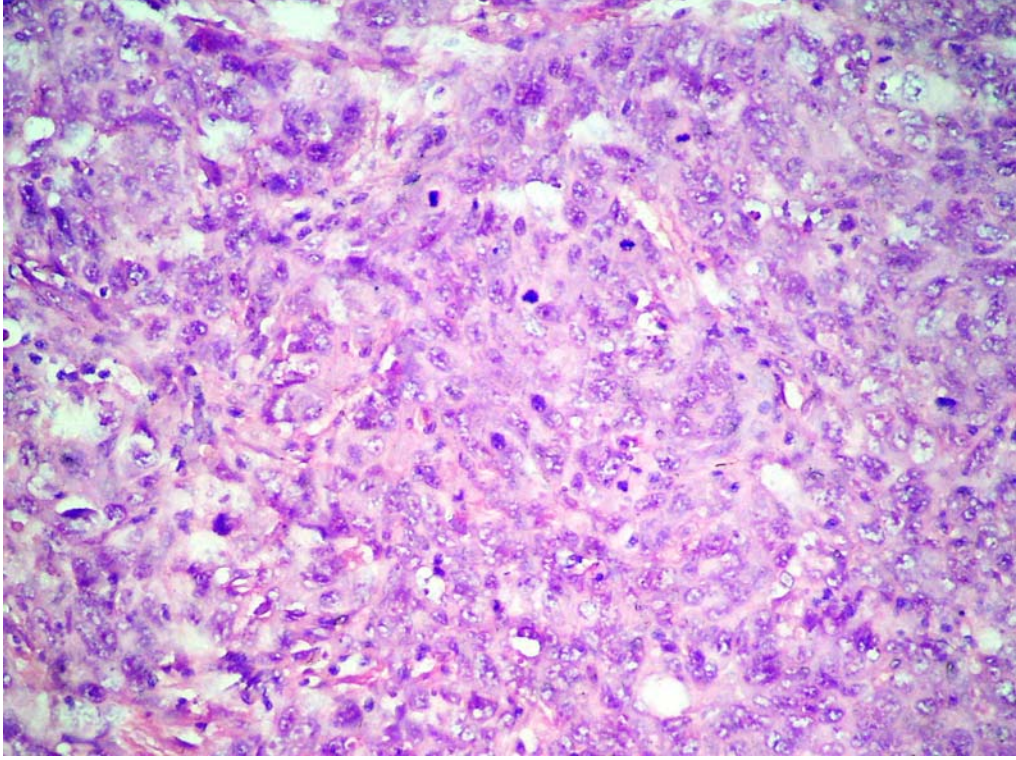
p53 ve p63 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı.



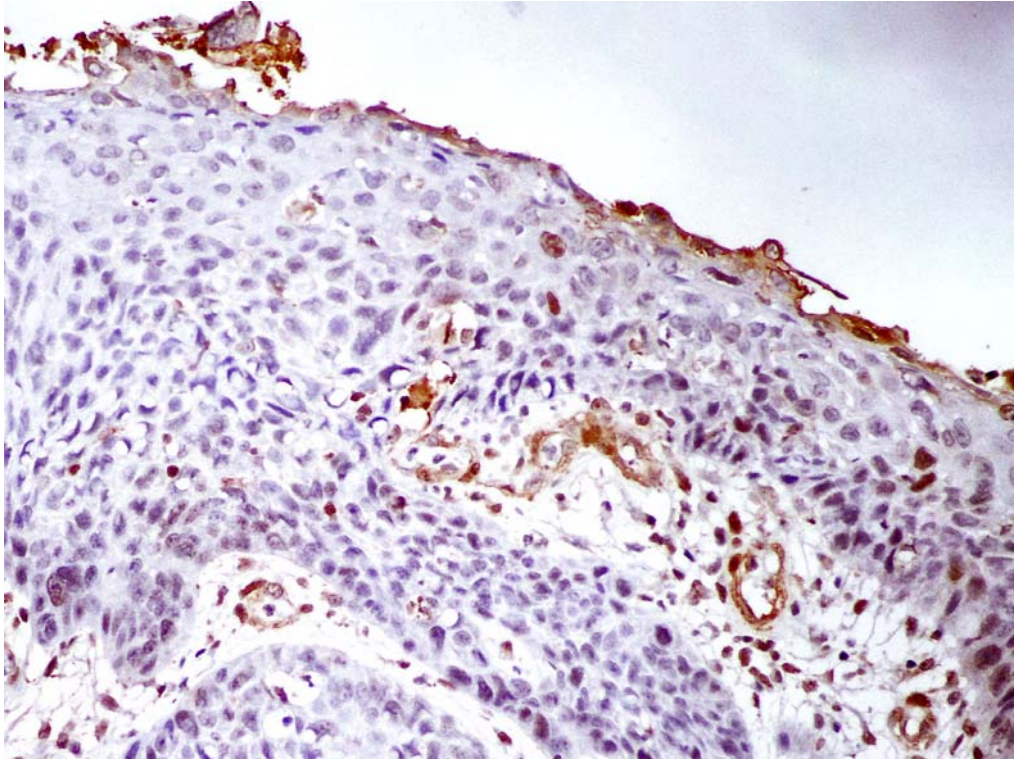
Resim 1: İyi diferansiye SHK'de keratin incileri (HE, 10X)



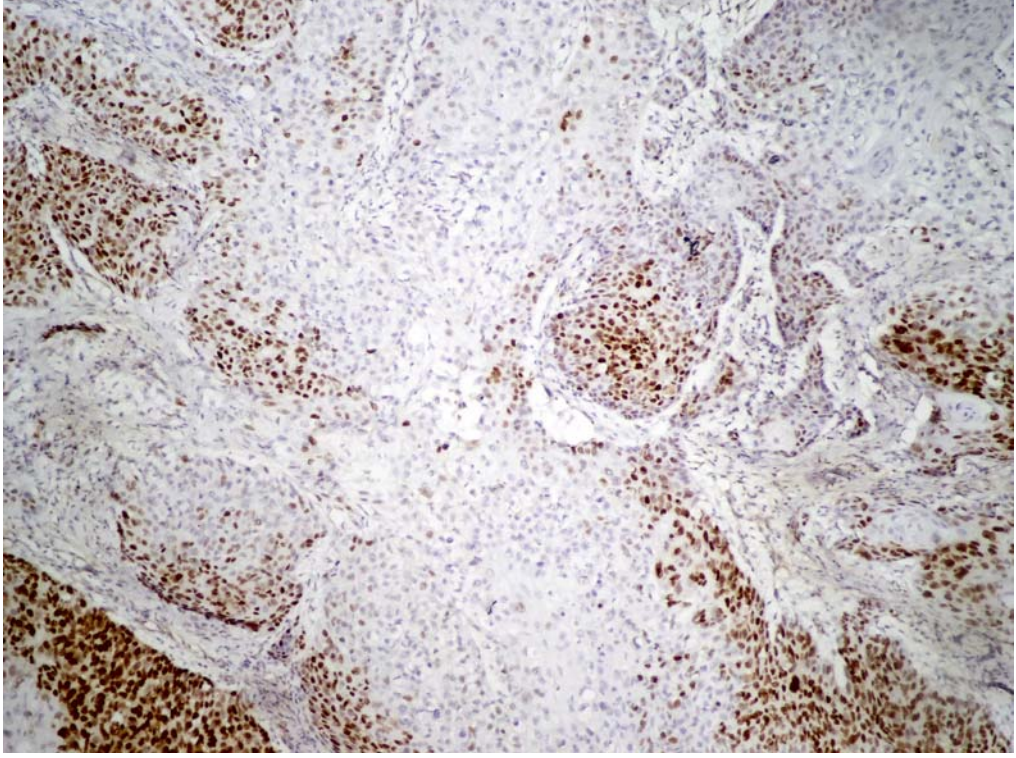
Resim 2: Orta derecede diferansiye SHK. (HE, 40X)



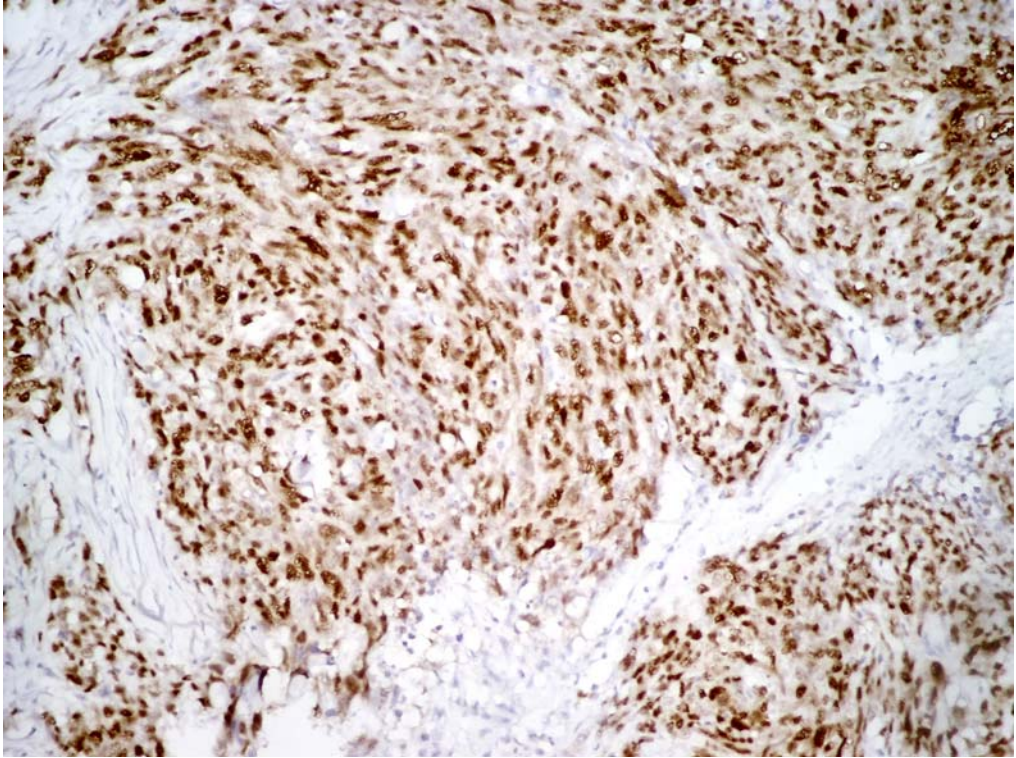
Resim 3: Az diferansiye SHK'de belirgin atipi ve mitoz (HE, 40X)



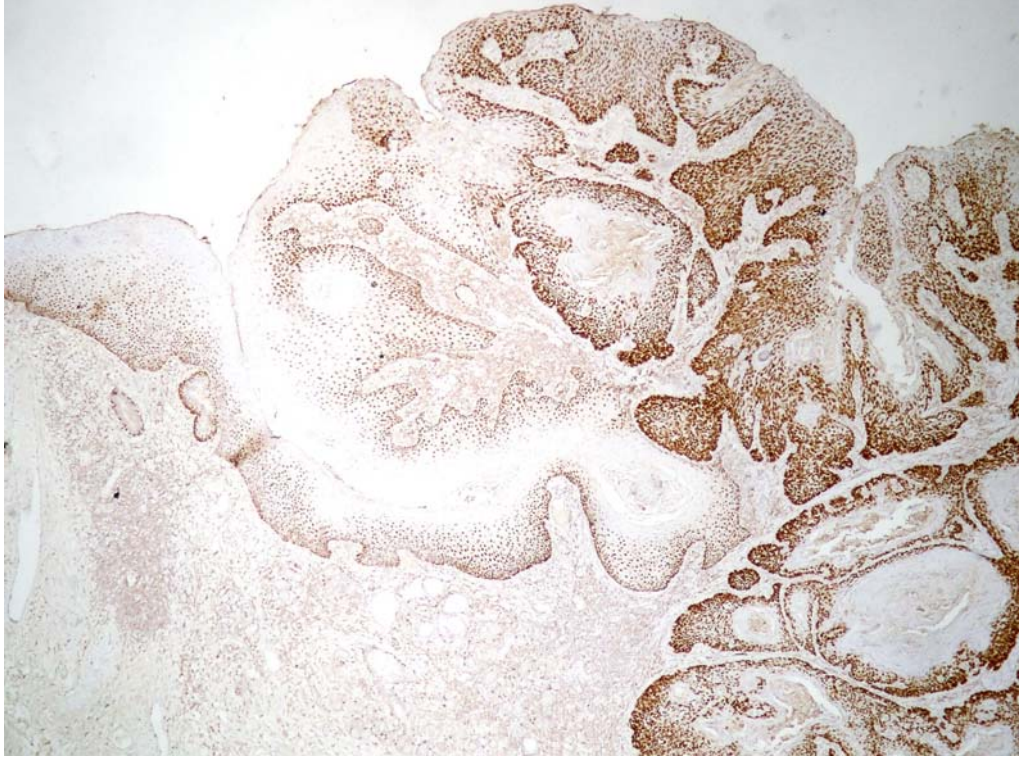
Resim 4: İyi diferansiye SHK'de nadir nükleer p53 pozitifliği (p53, 20X)



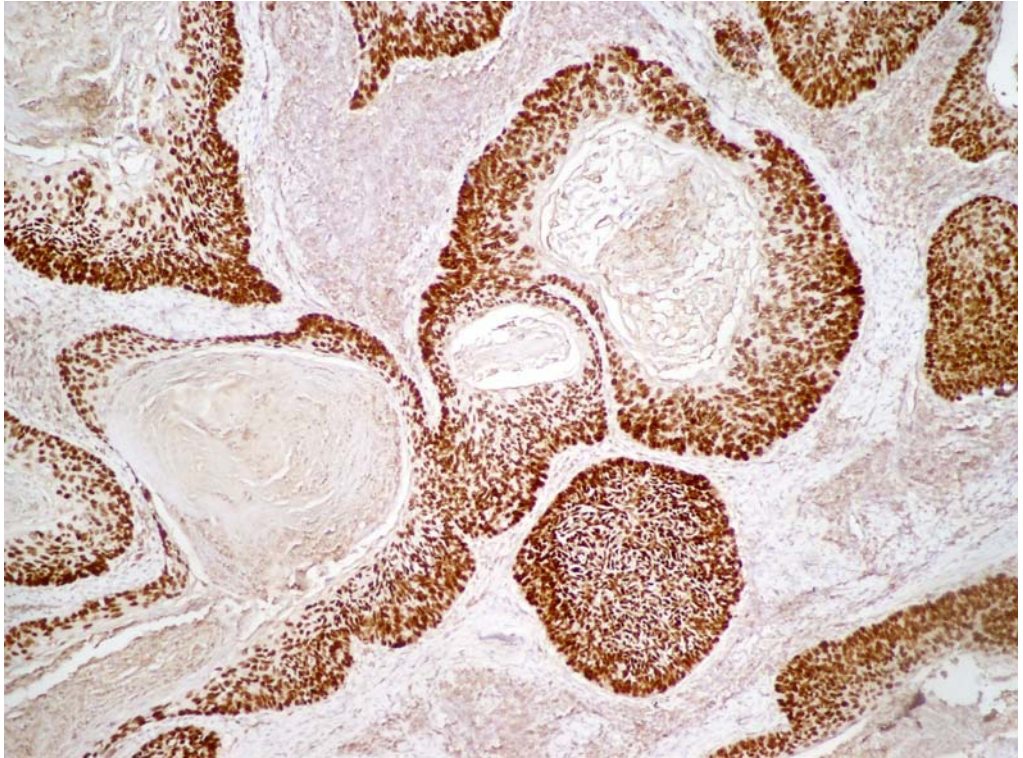
Resim 5: Orta derecede diferansiye SHK'de nükleer p53 pozitifliği (p53, 10X)



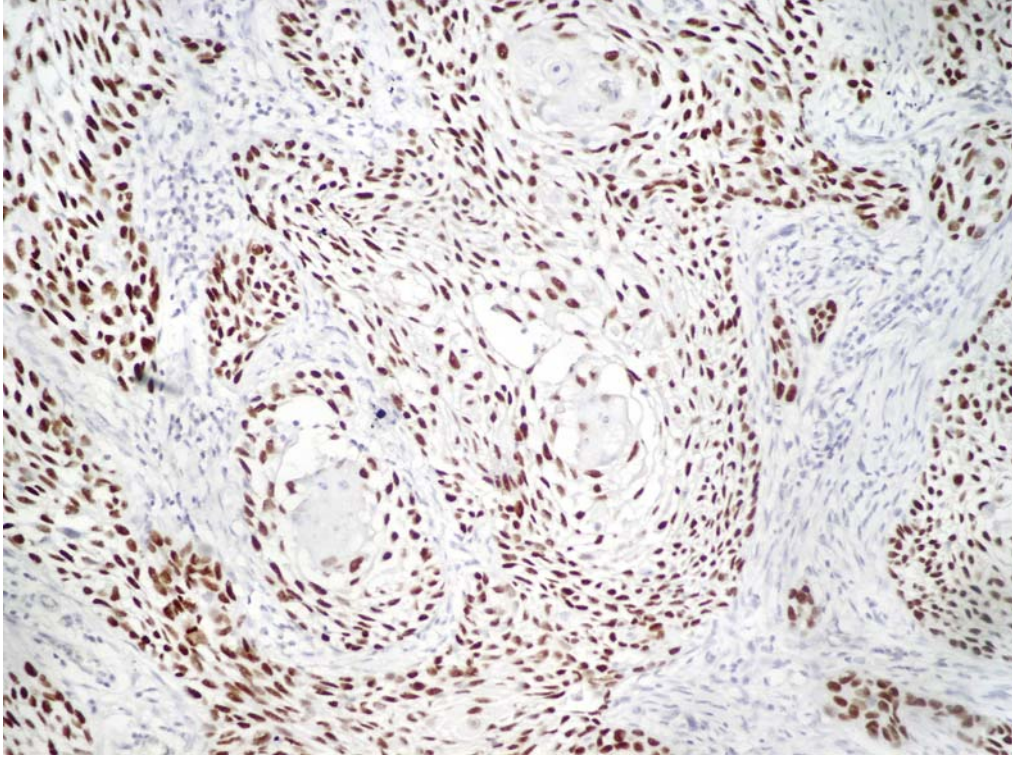
Resim 6: Az diferansiye SHK'de diffüz nükleer p53 pozitifliği (p53, 20X)



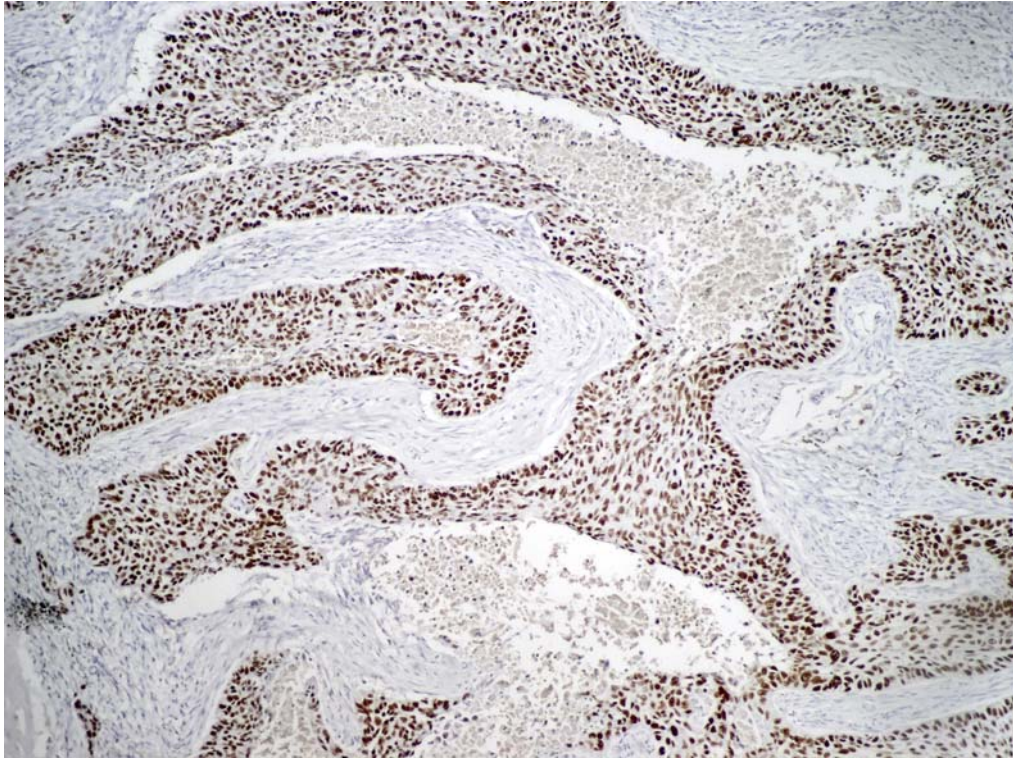
Resim 7: İyi diferansiye SHK normal epitel geçişi. Normal çok katlı yassı epitelde bazal sıralarda ve tümörde p63 pozitifliği. (p63, 4X)



Resim 8: İyi diferansiye SHK, p63 pozitifliği. Keratin incilerinde p63 ile boyanma yoktur (p63, 10X)



Resim 9: Orta derecede diferansiye SHK'de nükleer p63 pozitifliği (p63 10X)



Resim 10: Az diferansiye SHK'de nükleer p63 pozitifliği. Nekroz alanlarında p63 ile boyanma yoktur (p63, 10X)

5. TARTIŞMA

Larinks kanserleri baş ve boyun bölgesinde en sık görülen kanserlerdir. Batı ülkelerinde görülen kanserlerin %2 'sini oluşturur². Erkekler arasında tüm ölümlerin %7'sinden sorumludur⁴. Larinks kanserlerinin %80'den fazlası 50–70 yaş arasında görülmektedir^{4,82}. Çalışmamıza alınan vakaların ortalama yaşı 57,8± 11,99 olarak tespit edilmiştir.

Larinks kanseri tüm dünyada erkeklerde kadınlardan 15–20 kat daha fazla görülür¹⁸. Kadın hastaların çoğu genç hastadır. Birçok araştırmacı larinks karsinomu olan kadınlarda prognozun erkeklere göre daha iyi olduğu belirtilmektedir¹⁹. Bizim çalışmamızda 43 olgunun sadece 1'i (%2,3) kadın hastadır. Bu nedenle prognoz hakkında yorum yapılamamıştır.

Literatürde larinks kanserlerinin %60'ının glottik, yaklaşık %40'nin supraglottik sadece %1'i ya da daha azının subglottik yerleşimli olduğu belirtilmektedir⁶. Bazı çalışmalar glottik yerleşimli kanserlerin daha genç hastalarda görüldüğünü ve daha yaygın olduğunu ileri sürmektedir⁸³. Bizim çalışmamızda literatürle uyumlu olarak tümör olguların, 26'sında (%60,5) glottik, 16'sında (%37,2) supraglottik, 1'inde (%2,3) infraglottik yerleşimlidir. Yaş ve tümör lokalizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanamamıştır.

Larinks karsinomunda tümörün diferansiyasyon derecesi önem taşımaktadır. Az diferansiye tümörler iyi diferansiye olanlara göre daha sık metastaz yapar²⁹. Mc Gavran ve ark.⁸⁴ larinks kanserinde tümör büyüklüğü ve diferansiyasyon arasında ilişki olmadığını, servikal lenf nodu metastazı ve diferansiyasyon arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ileri sürmektedir. Aynı çalışmada tümörün çevre dokuya invazyonunun tümör diferansiyasyonu ile ilişkili olduğu, az diferansiye tümörlerin infiltratif gelişim gösterdiği ve sıklıkla lenf nodu metastazının eşlik ettiği belirtilmiştir. Soo ve ark⁸⁵ ise tümör diferansiyasyonunun larinks kanserinde sağkalımı etkilemediğini belirtmektedir. Bizim çalışmamızda tümör diferansiyasyonu ile boyutu arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Tümör boyutu 3 cm'in altında olan olguların %40,9'u orta- az diferansiye iken, boyutu 3 cm ve üzerinde olan olguların %76,2'si orta-az diferansiyedir. Tümör diferansiyasyonu ile servikal lenf nodu metastazı ve çevre yumuşak doku invazyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edilmemiştir.

Kıkırdak invazyonu glottik ve supraglottik tümörlerin rekürens hızı üzerine anlamlı bir etkiye sahip değildir. Bazı yazarlar tiroid ve krikoid kıkırdak tutulumunun sağkalımı olumsuz etkilediğini, epiglot kıkırdak tutulumunun ise sağkalıma etkisi olmadığını bu nedenle kıkırdak invazyonunun değerlendirilmesinde epiglot kıkırdak tutulumunun dahil edilmemesi gerektiğini ileri sürmektedir²⁹. Bizim çalışmamızda kıkırdak invazyonu ile tümör diferansiyasyonu arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Kıkırdak invazyonu olan tümörlerin büyük kısmı orta- az diferansiye (%82,4) tümörlerdir.

Nüks izlenen 4 (%9,3) olgudan 1'inde cerrahi sınırdaki tümör bulunmaktadır. Üçünde larinks dışı yayılım ve lenf nodu metastazı, ikisinde kıkırdak invazyonu saptanmıştır. Olguların tümünde tümör glottik yerleşimlidir ve ileri evredir. Nüks izlenen olguların sayısı az olmakla birlikte kötü prognostik parametreler ile ilişkili oldukları düşünülmüştür. Bununla birlikte nüks ile histopatolojik ve klinik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Larinks karsinomunda prognostik faktörler arasında servikal lenf nodu tutulumu da önemlidir. Üç cm veya daha küçük çapta lenf nodu tutulumunun prognoz üzerine etkisi az iken daha büyük olanlar prognoz üzerine anlamlı şekilde olumsuz etki gösterirler. Bilateral veya kontrateral lenf nodu tutulumu genellikle kötü prognoz gösterir⁵. Baş ve boyun kanserlerinde aynı tarafta tek bir metastatik lenf nodu varlığı bile sağkalımı %50 oranında azaltmaktadır⁸⁶. Larinks SHK'li hastalarda metastatik lenf nodu varlığı ve yokluğu prognozu belirlemede en önemli faktör olarak kabul edilmektedir³². Literatürde larinks kanserlerinde ortalama %25–50 oranında servikal lenf nodu metastazı tespit edilmiştir⁸⁷. Tümör çapı ve servikal lenf nodu metastazı arasında anlamlı ilişki olduğu belirtilmektedir²⁹. Bizim çalışmamızda olguların 14'ünde (%32,6) servikal lenf nodu metastazı saptanmıştır. Tümör çapı ve servikal lenf nodu metastazı arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

Bununla birlikte çalışmamızda tümör evresi ile diferansiyasyonu ve tümör boyutu arasında da istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. İleri evre tümörlerde diferansiyasyon azalmaktadır ve çoğu 3 cm ve üzerindedir.

Sigara kullanımı baş ve boyun kanserlerinin çoğunda olduğu gibi larinks kanseri için de önemli risk faktörüdür. Vakaların %95'inden fazlasında sigara içme öyküsü vardır. Sigara ve alkol kullanmayan larinks kanserli hastalarda yapılan bir

epidemiyolojik çalışmada, içmeyenlerin içenlere oranla ortalama 10 yaş daha yaşlı olduğu, erkek baskınlığı olmadığı ve tümörlerin genellikle glottik yerleştiğini bildirilmiştir²¹. Koch ve ark.⁸⁸ sigara kullanmayan larinks kanserli hastaların kadın baskınlığı gösterdiğini ve bu hastaların 80 yaş üstü ve 40 yaş altı olduğunu belirtmiştir. Bizim çalışmamızda olguların %90,7'sinde sigara kullanma öyküsü vardır. Tümör bu olgularda çoğunlukla (%59) glottik yerleşimlidir. Olgularımızdan sadece biri kadındır ve sigara kullanmamaktadır. Orta ve az diferansiye tümörlü olguların tümü sigara kullanmakla birlikte, sigara kullanmayan 4 olguda tümör iyi diferansiyedir. Sigara kullanma ve tümör diferansiyasyonu arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur.

Günümüzde aynı anatomik bölgeden köken alan, benzer histolojik diferansiyasyon gösteren larinks tümörlü olgularda hastalığın farklı seyri nedeniyle tümör davranışını daha net belirleyebilmek için daha farklı parametreler araştırılmaktadır. Moleküler patoloji alanındaki gelişmelere bağlı olarak tümör oluşumu ile ilişkili çok sayıda moleküler “tümör belirleyicileri” ile çalışmalar yapılmaktadır^{5,6}.

p53 gen mutasyonları insan kanserlerinde izlenen en sık genetik değişikliktir^{5,7,27,52,54-56}. Kolon, meme, akciğer, mesane, beyin, uterus gibi pek çok organa ait tümörde p53 geninde mutasyon bildirilmektedir^{35,57-60}. Meme, kolorektal, gastrik, endometrial karsinomlar, lenfomalar, lösemiler gibi kanser türlerinde p53'ün aşırı ekspresyonunun prognostik önemi olduğu gösterilmiştir^{35,54,57,62}.

p53 geni baş ve boyun kanserlerinde de en sık mutasyona uğrayan genidir⁸⁹. Baş ve boyun SHK'lerinde %39–80 oranında p53 mutasyonu bildirilmektedir^{5,8,38}. Apoptotik hücre ölümünü indükleyerek kanser gelişimine karşı koruyucu rolü olan p53'ün aşırı ekspresyonu veya mutasyonunu larinks SHK'de sağkalım göstergesi olarak anlamlı bulan çalışmalar yanında⁵ p53 ile sağkalım arasında ilişki olmadığını belirten çalışmalar da vardır^{31,33}. Hasta gruplarındaki heterojeniteye bağlı olarak sonuçlar değişkenlik gösterse de p53 olası bir prognostik faktör olarak baş ve boyun kanserlerinde dikkat çekmektedir⁸⁹. İleri evre larinks karsinomunda p53 mutasyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğunu belirten yayınlar yanı sıra^{52,89-91} daha iyi prognozu gösterdiğini belirten yayınlar da vardır⁸. Bunlara ek olarak p53 aşırı ekspresyonunu larinks SHK'de en erken fazında belirleyici olarak kabul eden ve p53 ile ileri evre tümör arasında anlamlı bir ilişki olmadığını belirten yayınlar da bulunmaktadır³⁷. Bizim çalışmamızda olguların 42'sinde (%97,7) p53 ekspresyonu saptanmıştır. Bu olguların

11'inde (%25,6) zayıf boyanma, 4'ünde (%9,3) orta şiddette boyanma, 27'sinde (%62,8) kuvvetli boyanma izlenmiştir. p53 ekspresyonu ile tümör evresi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır

Yapılan çalışmalarda premalign lezyonlar, displaziler ve hatta normal ve komşu inflame mukozada p53 gen değişiklikleri saptanmıştır. Buna bağlı olarak p53 gen değişikliklerinin larinks SHK gelişiminin erken döneminde rol oynadığı ileri sürülmüştür. Tüm bu bulgular bir arada değerlendirildiğinde p53'deki değişikliklerin bu tümörlerde neoplastik transformasyonun erken basamaklarında ortaya çıktığı neoplastik progresyon için ek bir avantaj sağlamadığı ortaya atılmıştır. Premalign larinks lezyonlarında p53 ekspresyonu %40-80'dir³⁸. Nakashima ve ark. nın³⁸ çalışmasında laringeal hiperkeratozda %42 oranında p53 ekspresyonu tespit edilmiştir. Bu bulgulara göre laringeal karsinogenezde erken dönemde mutasyon varlığı ileri sürülmüştür. Aynı çalışmada larinks kanserli hastalarda p53 aşırı ekspresyonu ve prognoz arasında korelasyon saptanmamıştır. Bu bulgulara göre p53'ün karsinogenezde rol alırken, tümör agresifliğine katkıda bulunmadığı belirtilmiştir.

Teppo ve ark.³¹ larinks karsinomunda hücre proliferasyonu, p53 ekspresyonu ve anjiogenezin prognozu anlamlı şekilde etkilemediğini ileri sürmüşlerdir.

Khademi ve ark.²⁰. Morawski ve ark'nın⁹² yaptıkları farklı çalışmalarda larinks kanserinde p53 ekspresyonu ile grade arasında korelasyon tespit edilememiştir. Benzer şekilde Wood ve ark⁹³ baş ve boyun bölgesinde skuamöz hücreli karsinomu olan 38 hastada yaptıkları çalışmada p53 mutasyonu ile tümör diferansiyasyonu arasında anlamlı bir ilişki tespit edememişlerdir. Kazkayasi ve ark'nın⁶¹ çalışmasında p53 ekspresyonu ile hasta yaşı, tümör yeri, klinik evre, tümörün histopatolojik gradelemesi, alkol kullanımı ve klinik gidiş arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulunamazken, p53 aşırı ekspresyonu lenf nodu metastazı varlığı ile anlamlı şekilde ilişkili bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda tümör diferansiyasyon derecesi azaldıkça p53 ekspresyonunun arttığı görülmüş ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Vasküler invazyon izlenen olguların %83,3'ünde şiddetli p53 ekspresyonu saptanmıştır. p53 ekspresyonu ile vasküler invazyon arasındaki ilişki de anlamlı bulunmuştur. p53 immünoreaktivitesi ile lenf nodu invazyonu, kıkırdak invazyonu, sinir invazyonu, cerrahi sınırdaki tümör varlığı, sigara kullanımı ve nüks arasında

istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır. Bu sonuçlara göre p53 ekspresyonu larinks SHK'de tümör agresifliğine eşlik eden kötü prognostik faktör olarak yorumlanmıştır.

Son yıllarda p53 gen ailesinin yeni bir üyesi olan p63 ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Normal dokularda p63 ekspresyonu deri, ektoserviks, özofagus, bronş ve ürotelyumda çok katlı yassı epitelin bazal hücrelerinde; prostat ve meme gibi glandüler dokuların bazal ve miyoepitelyal hücrelerinde tespit edilir⁶⁹. p53 ultraviyole ışınlar veya genotoksik ilaçlara bağlı hasara uğrayan epitelial hücrelerde eksprese olurken p63 normal koşullar altında epitelial dokuların progenitör veya kök hücrelerinde aşırı eksprese olur⁷⁷.

p63'ün neoplastik transformasyon ve tümör gelişiminde rolünü araştıran çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Farklı organlardan gelişen SHK'lerinde $\Delta Np63$ yüksek seviyelerde eksprese olmaktadır. p63'ün TA ve ΔN izoformlarının birbirine zıt fonksiyonları vardır. TA izoformu tümör baskılayıcı aktiviteye sahipken, ΔN formu onkojenik aktiviteye sahip gibi görünmektedir. p63 mutasyonu nadir iken, p63 gen amplifikasyonu ve ΔN izoformlarının artmış ekspresyonu bu izoformların onkojenik rolü olduğunu desteklemektedir⁷⁴.

Tsujita-Kyutoku ve ark.⁹⁴ normal deri, deri ekleri ve tümörlerinde p63 ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. Normal deride epidermisin bazal ve suprabazal hücrelerinde, dış kök kılıfında, kıl folikülünün kıl matriks hücrelerinde, duktusların dış tabaka hücrelerinde ve ter bezlerinin sekretuar kısmının miyoepitelyal hücrelerinde p63 ekspresyonu saptamışlardır. İyi diferansiye SHK'de periferde lokalize bazaloid hücrelerde p63 ekspresyonu izlenirken, matür hücrelerde ekspresyon saptanmamıştır. Diferansiyasyon azaldıkça immünoreaktivite artmıştır. Bazal hücreli karsinomlarda tümör hücrelerinde diffüz p63 ekspresyonu izlenmiştir. Piloseböz tümörlerde bazaloid hücrelerde immünoreaktivite saptanırken, yüzeyel hücreler, horn kistler ve gölge hücrelerde immünoreaktivite saptanmamıştır. Ter bezi tümörlerinde bazaloid hücreler ve miyoepitelyal hücrelerde p63 eksprese olurken, luminal hücrelerde ekspresyon görülmemiştir. Bu sonuçlara göre p63'ün deri ve deri eki tümörlerinin bazal/progenitör hücrelerinin bir belirleyicisi olabileceği ve bu tümörlerin tanısında kullanılabileceği ileri sürülmüştür.

Reis- Filho ve ark.⁹⁵ benzer şekilde deri tümörlerinin onkogenezinde ve diferansiyasyon paterninde p63'ün rol oynayabileceğini belirtmiştir.

Normal ve neoplastik meme dokusunda p63 ve p53 ekspresyonları arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada intraduktal karsinom, tubuler karsinom, lobüler karsinom, medüller karsinom ve grade I ve grade II invaziv duktal karsinomlarda tümör hücrelerinde p63 ekspresyonu izlenmezken, grade III invaziv duktal karsinomlarda p63 ekspresyonu izlenmiştir. Bu bulgularla p63'ün meme karsinomunda kötü diferansiye hücrelerin bir göstergesi olduğu ileri sürülmüştür. p63 normal memede duktal ve alveolar epitel çevreleyen miyoepitelyal tabakada ekspresyon göstermiştir. Meme karsinomlarının %21.17'sinde p53 ekspresyonu, %11.76'sında p63 ekspresyonu saptanmıştır. p63 ekspresyonu tümör evresi, boyutu, histolojik diferansiyasyonu, lenf nodu metastazı ve östrojen reseptör negatifliği gibi kötü prognostik parametrelerle ilişkili bulunmuştur. Bu verilere göre p63'ün meme karsinomunun agresif davranışının belirleyicisi olabileceği ileri sürülmüştür³⁵.

Yapılan çalışmalarda p63'ün bazal ve immatür servikal skuamöz epitelde ekspresyonu olduğu belirtilmektedir⁹⁶. Wang ve ark.⁹⁶ serviks SHK'de %97 oranında p63 ekspresyonu saptarken, adenokarsinomlarda ekspresyon saptamamıştır. Servikal transformasyon zonunda p63 ve skuamöz diferansiyasyon arasında anlamlı ilişki tespit etmişlerdir. Normal matür endoservikal epitelde p63 tespit edilememiştir⁹⁶. p63'ün ektoerviks epitelinin bazal hücreleri, rezerv hücrelerinin nukleusunda belirlenmesi bu antikorun servikal kök hücre saptanmasında belirleyici olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir⁹⁷.

Pelosi G⁷⁸ çalışmasında akciğer SHK'de, skuamöz metaplazi ve displazi gibi prekürsör lezyonlarında ve yüksek gradeli nöroendokrin tümörlerde p63 immunreaktifliğinin yüksek olduğunu belirtmiştir. Akciğer tümörlerinde p63 ekspresyonunu değerlendiren diğer bir çalışmada SHK'in %96,9'unda, adenokarsinomların %30'unda, büyük hücreli karsinomların %37'sinde p63 ekspresyonu tespit edilmiştir. Nöroendokrin tümörlerde grade arttıkça p63 ekspresyonu da artmış, klasik karsinoidlerde %1,9, atipik karsinoidlerde %30,8, büyük hücreli nöroendokrin karsinomlarda %50, küçük hücreli karsinomlarda %76,9 oranında immünoreaktivite saptanmıştır. Akciğer SHK'de bronş epitelinde bazal ve suprabazal hücrelerde p63 ekspresyonu izlenirken daha yüzeysel, diferansiye olmuş hücre

tabakalarında ekspresyon kaybı olduğu gösterilmiştir. Bronşiyal epitelyal displazinin şiddeti arttıkça p63 ekspresyonu da artmaktadır. SHK’de en yüksek seviyede p63 ekspresyonu bildirilmiştir⁶⁹. Yine aynı çalışmada p53 ve p63 ekspresyonları arasındaki ilişki anlamlı bulunmamıştır⁶⁹. p63 ekspresyonunu araştıran diğer bir çalışmada 51 normal doku, 350 karsinom, 25 malign melanom ve 25 glioblastom değerlendirilmiştir. Mezenşimal, nöral, endotelyal, düz kas ve adipöz hücrelerde p63 ekspresyonu izlenmezken, skuamöz ve bazal epitelyal hücrelerde saptanmıştır. Akciğerin SHK’inde %93, meme duktal karsinomunda %10 ve overin endometrioid karsinomunda %25 oranında p63 ekspresyonu bildirilmiştir⁹⁸.

Hu ve ark.⁶⁶ çalışmalarında p63’ün özofagusta skuamöz epitel displazisi ve kanser gelişimi ile anlamlı şekilde ilişkili olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada p63’ün SHK, skuamöz displazi ve komşu histolojik olarak normal epitelinde eksprese olduğu bulunmuştur. Mesane, tonsil, ektoserviks, özofagus ve deride stratifiye epitelde ve bronş, meme ve prostattaki glandüler yapılardaki bazal hücrelerde p63 ekspresyonu saptanmıştır⁹⁹. Larinks, özofagus, serviks, akciğerin SHK’inde derinin bazal hücreli karsinomunda ve mesane değişici epitel hücreli karsinomunda güçlü nükleer boyanma tespit edilmiştir. Bununla birlikte timomalar ve bazı lenfomalarda p63 aşırı ekspresyonu bildirilmiştir^{69,99}.

Lo Muzio ve ark.¹⁰⁰ oral SHK’de p63 ekspresyonu ile tümör diferansiyasyonu arasında korelasyon tespit etmişlerdir. Diffüz p63 ekspresyonu gösteren olgular daha agresif ve kötü diferansiyedir. p63 aşırı ekspresyonu oral SHK’de kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur. Chen ve ark.¹⁰¹ çalışmalarında p63 ekspresyonunu oral epitelyal displazinin derecesi ile ilişkili bulmuştur. Bu bulgular ışığında p63’ün ekspresyon artışının oral karsinogenezde erken dönemde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür.

Urist ve ark.¹⁰² mesane değişici epitel hücreli karsinomunda (DEHK) iyi diferansiye papiller yüzeysel tümörlerde %93, orta derecede ve az diferansiye yüzeysel tümörlerde %68 oranında p63 ekspresyonu saptamıştır. İnvaziv tümörlerde p63 ekspresyonu azalmıştır (%16). Buna bağlı olarak mesane DEHK’de evre ve grade ile ilişkili ürotelyal diferansiyasyon kaybına p63 ekspresyon kaybının eşlik ettiği ileri sürülmüştür. DEHK’de p63 ekspresyonunun azalmasının büyümeyi inhibe eden ve diferansiyasyon ile ilişkili p63 izoformlarının kaybını gösterebileceği belirtilmiştir.

p63'ün mesane epitelinin oluşumu için gerekli olmadığı fakat epitelin diferansiyasyonu için gerekli olduğu ileri sürülmüştür.

Pruneri'nin¹⁰³ çalışmasında TAp63 ekspresyon kaybı laringeal karsinomlarda tümör progresyonu ile ilişkili bulunmuştur. Normal laringeal mukozada epitelin bazal ve suprabazal tabakalarında, serömüsinöz glandların miyoepitelyal hücrelerinde p63 ile nükleer immünoreaktivite tespit edilmiştir. Laringeal intraepitelyal neoplazide p63 immünoreaktivitesi bazal tabakaya sınırlı değildir. Epitelin tüm tabakalarında p63 ekspresyonu saptanmıştır. Çalışmaya alınan tüm larinks SHK'de tümör hücrelerinde %10-%98 arasında değişen oranlarda p63 ekspresyonu bildirilmiştir. Çalışmada tümör lokalizasyonu, lenf nodu metastazı, klinik evre ve sigara kullanımı tümör rekürrensi ile ilişkili bulunmuştur. Laringeal intraepitelyal neoplazide p63 ekspresyonu tespit edildiği için p63'ün larinks kanser gelişiminin erken basamaklarında rol oynayabileceği ileri sürülmüştür.

Sniezek ve ark.⁷⁰ baş ve boyun SHK'de p63 ve p53 ekspresyonunu inceleyerek, 36 olgunun 26'sında (%72) p53 ekspresyonu, olguların tümünde (%100) p63 ekspresyonu tespit etmişlerdir. p53 ekspresyonu izlenmeyen 10 olgunun tümünde güçlü p63 ekspresyonu saptanmıştır. p53 ve p63 ekspresyonları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Buna bağlı olarak p63'ün baş ve boyun SHK'de p53 yolağını antagonize ederek onkojenik bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Yine aynı çalışmada Western blot analizinde $\Delta Np63\alpha$ 'nın baş ve boyun SHK'de saptanan baskın izoform olduğu ve komşu normal doku ile karşılaştırıldığında tümörde aşırı eksprese edildiği bildirilmiştir. Baş ve boyun SHK'de $\Delta Np63\alpha$ izoformunun mukozal epitelde anti-diferansiyasyon ve anti-apoptotik rol oynadığı ve olasılıkla tümör oluşumuna yol açabileceği ileri sürülmüştür.

Bizim çalışmamızda olguların %97,7'sinde p53 ekspresyonu, olguların tümünde p63 ekspresyonu saptanmıştır. p53 ve p63 ekspresyonları arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildir. p63 ile keratin incilerde boyanma izlenmezken, tümöre komşu normal mukozada epitelin bazal tabakasında, tümörde bazal ve suprabazal tabakalarda daha yoğun olmak üzere diffüz boyanma izlenmiştir. Bu boyanma paterni p63'ün larinkste skuamöz epitel hücrelerinin matürasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Protein immatür, diferansiyasyon göstermeyen hücrelerde eksprese olmaktadır. p63 immünoreaktivitesi ile tümör evresi, diferansiyasyonu, lenf nodu

metastazı, kıkırdak invazyonu, sinir invazyonu, vasküler invazyon, sigara kullanımı ve nüks arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bu bulgular ışığında p63'ün larinks skuamöz hücreli karsinomunda prognostik bir marker olmadığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda larinks SHK'lerinde p53 ekspresyonu yüksek grade ve vasküler invazyon gibi olumsuz prognostik parametrelerle korale bulunmuştur. p63 ekspresyonu ise hücre matürasyonu ile ilişkili bulunmuştur. Bu bulgular p53 ekspresyonunun larinks SHK'lerinde olumsuz prognostik göstergelerden biri olabileceğini, p63 ekspresyonunun ise tümör davranışından ziyade karsinogenezi ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

6. SONUÇLAR VE YORUM

Bu çalışmada larinjektomi materyallerinde SHK tanısı alan 43 hastada p53 ve p63 gen ekspresyonlarının klinik ve histopatolojik parametrelerle ilişkisi değerlendirilmiş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- Çalışmaya alınan 43 olgunun 42'si (%97,7) erkek, 1'i (%2,3) kadındır. Hastaların yaşları 27–80 arasında olup, ortalama yaş $57,8 \pm 11,99$ olarak saptanmıştır.
- Tümörün en büyük boyutu 0,5–6,2 cm arasında olup, ortalama 3.02 ± 1.42 cm'dir.
- Tümör olguların, 26'sında (%60,5) glottik, 16'sında (%37,2) supraglottik, 1'inde (%2,3) infraglottik yerleşimlidir.
- Histolojik olarak olguların 18'i (%41,9) iyi diferansiye, 21'i (%48,8) orta derecede diferansiye, 4'ü (%9,3) az diferansiye SHK'dir.
- AJCC TNM evreleme sistemine göre olguların 5'i (%11,6) Evre I, 5'i (%11,6) Evre II, 10'u (%23,3) Evre III, 23'ü (%53,5) Evre IV olarak değerlendirilmiştir.
- Olguların 14'ünde (%32,6) lenf nodu metastazı, 17'sinde (%39,5) kıkırdak invazyonu, 6'sında (%14) larinks dışı çevre yumuşak dokuya invazyon izlenmiştir. Uzak metastaz izlenmemiştir.
- Olguların 4'ünde (%9,3) cerrahi sınırdaki tümör varlığı, 7'sinde (%16,3) sinir invazyonu, 6'sında (%14) vasküler invazyon ve 4'ünde (%9,3) nüks izlenmiştir. İzlenen hastaların 37'sinin (%86) hayatta olduğu tespit edilmiştir.
- Nüks ile histopatolojik ve klinik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır.
- Olguların %90,7'sinde sigara kullanma öyküsü vardır. Tümör bu olgularda çoğunlukla (%59) glottik yerleşimlidir. Olgularımızdan sadece biri kadındır ve sigara kullanmamaktadır. Orta ve az diferansiye tümörlü olguların tümü sigara kullanmakla birlikte, sigara kullanmayan 4 olguda tümör iyi diferansiyedir. Sigara kullanma ve tümör diferansiyasyonu arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur.
- Tümör evresi ve diferansiyasyonu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.043$). İleri evre tümörlerde diferansiyasyonun azaldığı saptanmıştır.

- Tümör evresi ile larinks dışı çevre yumuşak doku yayılımı, cerrahi sınırdaki tümör varlığı, sinir invazyonu, vasküler invazyon, sigara kullanımı ve nüks arasında istatistiksel bir ilişki saptanmamıştır.
- Tümör diferansiyasyonu ile tümör boyutu ve kıkırdak invazyonu arasındaki ilişki anlamlıdır (sırayla $r=0.362$, $p=0.017$, $p=0.013$). Tümör boyutu arttıkça diferansiyasyonun azaldığı ve kıkırdak invazyonu olan tümörlerin çoğunluğunun orta- az diferansiye tümörler olduğu saptanmıştır.
- Grade ile lenf nodu metastazı, larinks dışı yumuşak doku invazyonu, cerrahi sınırdaki tümör varlığı, sinir invazyonu, vasküler invazyon arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.
- Olguların 42'sinde (%97,7) p53 ile immünoaktivite tespit edilmiştir.
- Tümörün p53 immünoaktivitesi ile diferansiyasyonu ve vasküler invazyon varlığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırayla $p=0.016$, $p=0.028$). Tümör diferansiyasyonu azaldıkça p53 ekspresyonunun arttığı ve vasküler invazyon saptanan olgularda p53 ile şiddetli boyanma olduğu tespit edilmiştir.
- p53 immünoaktivitesi ile evre, lenf nodu metastazı, kıkırdak invazyonu, sinir invazyonu, cerrahi sınırdaki tümör varlığı, sigara kullanımı ve nüks arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır.
- Olguların tümünde (%100) p63 ile immünoaktivite tespit edilmiştir. p63 immünoaktivitesi ve tümör diferansiyasyonu, evre, lenf nodu metastazı, kıkırdak invazyonu, sinir invazyonu, vasküler invazyon, sigara kullanımı ve nüks arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır.
- p53 ve p63 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.
- Bu bulgular p53 ekspresyonunun larinks SHK'lerinde olumsuz prognostik göstergelerden biri olabileceğini, p63 ekspresyonunun ise tümör davranışından ziyade karsinogenezi ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

ÖZET

Larinks Skuamöz Hücreli Karsinomunda p53 ve p63 Gen Ekspresyonunun Klinik Ve Histopatolojik Parametreler İle İlişkisi

Larinks SHK'si baş ve boyun bölgesinde en sık izlenen malignitedir. Larinks SHK'li hastalarda sağ kalımın en anlamlı prognostik belirleyicisi metastatik servikal lenf nodu varlığı veya yokluğudur. Histolojik grade, klinik evre, tümör boyutu ve lokalizasyonu, invazyon derinliği gibi olası prognostik belirleyiciler değerlendirilmiştir fakat hiçbirinin klinik olarak değeri kanıtlanmamıştır. Bu nedenle tümörün biyolojik davranışını tanımakta yardımcı olabilecek yeni parametrelerin belirlenmesi önemlidir.

Bu çalışmanın amacı larinks SHK'de klinikopatolojik parametreler ile p53 ve p63 gen ekspresyonları arasında korelasyon olup olmadığını araştırmaktır. Çalışmamız 1998–2005 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesinde tanı alan ve tedavi gören 43 larinks karsinomlu hastada gerçekleştirildi. Olguların %97,7'sinde p53 ekspresyonu tespit edildi. p53 aşırı ekspresyonu ile histolojik grade ve vasküler invazyon arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanırken, klinik evre, tümör boyutu ve lokalizasyonu, lenf nodu metastazı ve kıkırdak invazyonu arasında anlamlı ilişki saptanmadı. Olguların %100'ünde p63 ekspresyonu tespit edildi. p63 ekspresyonu ile tümör boyutu ve lokalizasyonu, klinik evre, histolojik grade, sigara kullanımı, vasküler invazyon, metastatik lenf nodu varlığı ve kıkırdak invazyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı. p53 ve p63 ekspresyonları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı

Bu bulgularla p53'ün ekspresyonunun larinks SHK'inde kötü prognoz hakkında fikir verebileceği sonucuna varılmıştır. p63 ekspresyonunun ise prognostik parametrelerle ilişkili olmadığı ancak bu tip lezyonların karsinogenezi hakkında fikir verebileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Larinks skuamöz hücreli karsinomu, p53, p63, immünohistokimya

SUMMARY

The Relation of p53 and p63 Gene Expression With Clinical and Histopathological Parameters in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas

Laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) is the most common head and neck malignancy. The most significant prognostic indicator of survival in patients with LSCC is the presence or absence of metastatic cervical nodes. In squamous cell carcinoma of the larynx, many factors have been evaluated as possible prognostic indicators, such as histologic grade, clinical stage, size and location of tumor, depth of invasion, but none have proven to have any real clinical value. Therefore, it is important to define new prognostic indicators which may help to recognize the biological behaviour of the tumor.

The aim of this study is to investigate whether there is a correlation between p53 and p63 gen expression and the clinicopathological features in laryngeal squamous cell carcinoma. Our study was performed on 43 patients with laryngeal squamous cell carcinoma diagnosed and treated in Suleyman Demirel University Medical Faculty between 1998 and 2005. p53 expression was detected in %97,7 of cases. Over-expression of p53 was significantly associated with the histologic grade and vascular invasion but there was no statistically significant correlation with clinical stage, size and location of tumor, lymph node metastasis and cartilage involvement. p63 expression was detected in %100 of cases. There was no statistically significant correlation between expression of the p63 protein and the tumor size and location, clinical stage, histologic grade, cigarette consumption, vascular invasion, presence of metastatic lymph node and cartilage involvement. Also there was no statistically significant correlation between expression of the p63 protein and p53 protein.

With these findings we have concluded that p53 expression in LSCC can predict poor prognosis. Also it is considered that p63 expression is not related with prognosis, but it can give an idea about carcinogenesis of these lesions.

Key words: Laryngeal squamous cell carcinoma, p53, p63, immunohistochemistry

KAYNAKLAR:

1. Lazaris AC, Lendari I, Kavantzias N, Kandiloros D, Adamopoulos G, Davaris P. Correlation of tumor markers p53, bcl-2 and cathepsin-D with clinicopathologic features and disease-free survival in laryngeal squamous cell carcinoma. *Pathology International* 50: 717-724, 2000.
2. Mendenhall WM, Million RR, Stringer SP, Cassisi NJ. Squamous cell carcinoma of the glottic larynx:a review emphasizing the university of Florida Philosophy. *Southern Medical Journal* 92: 385-393, 1999.
3. Narayana A, Vaughan ATM, Fisher SG, Reddy SP. Second primary tumors in laryngeal cancer: results of long-term follow-up. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 42: 557-562, 1998.
4. Elci OC, Akpınar M, Blair A, Dosemeci M. Risk of laryngeal cancer by occupational chemical exposure in Turkey. *J Occup Environ Med* 45(10): 1100-1106, 2003.
5. Tannapfel A, Weber A. Tumor markers in squamous cell carcinoma of the head and neck:clinical effectiveness and prognostic value. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 258: 83-88, 2001.
6. Vielba R, Bilbao J, Ispizua A, Zabalza I, Alfaro J, Rezola R, Moreno E, Elorriaga J, Alonso I, Baroja A, Hoz C. p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 113: 167-172, 2003.
7. Mostafapour SM, Hockenbery DM, Rubel EW. Life and death in otolaryngology. Mechanisms of apoptosis and its role in the pathology and treatment of disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 125: 729-737, 1999.
8. Chomchai JS, Du W, Sarkar FH, Li YW, Jacobs JR, Ensley JF, Sakr W, Yoo GH. Prognostic significance of p53 gene mutations in laryngeal cancer. *The American Laryngological Rhinological Otological Society* 109(3): 455-459, 1999.
9. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. İnsan Embriyolojisi Klinik yönleri ile, Nobel Tıp Kitabevi, 2002.
10. Sternberg SS. Larynx and pharynx, In: *Histology for Pathologists*. 2nd ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 391-398,1997.
11. Bocca E, Pignataro O, Mosciaro O. Supraglottic surgery of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 77: 1005-1026, 1968.
12. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*, 3. baskı. İstanbul, Güneş Kitabevi, Cilt 1; 290-297, 2001.
13. Moore KL. *Clinically Oriented Anatomy* Baltimore USA, Williams & Wilkins, 1992.

14. Rosai J. Larynx and trachea, In: Ackerman's Surgical Pathology. 8th ed. New York, Mosby, 314-337,1996.
15. Sternberg SS. Pathology of the larynx, In: Diagnostic Surgical Pathology. third edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 925-947, 1999.
16. Shanmugaratnam K: Histological typing of tumours of the upper respiratory tract and ear. World Health Organization. International histological classification of tumours. 2nd ed. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1991.
17. American Joint Committee on Cancer : Manual for Staging of Cancer. Philadelphia, JB Lippincott 1992.
18. Korczynska B, Korzeniowski S, Skolyszewski J. Cancer of the larynx in females. *Cancer Radiotherapie* 7: 380-385, 2003.
19. Sasaki CT, Jassin B. Cancer of the pharynx and larynx. *Am J Med* 111: 118-123, 2001.
20. Khademi B, Shirazi FM, Vasei M, Doroudchi M, Gandomi B, Modjtahedi H, Pezeshki AM, Ghaderi A. The expression of p53, c-erbB-1 and c-erbB-2 molecules and their correlation with prognostic markers in patients with head and neck tumors. *Cancer Letters* 184: 223-230, 2002.
21. Leon X, Rinaldo A, Saffiotti U, Ferlito A. Laryngeal cancer in non-smoking and non-drinking patients. *Acta Otolaryngol* 124: 1-6, 2004.
22. Kaufman JA, Burke AJ. The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am* 30: 1-19, 1997.
23. Sinard RJ, Netterville JL, Garrett CG, Ossoff RH, D.M.D. Cancer of the larynx. *Cancer of the head and neck. Third Edition. Philadelphia, Pennsylvania*, 381-421, 1996.
24. Taxy JB. Upper respiratory tract. *Anderson's pathology. Tenth edition.* 1460-1469, 1996.
25. Blackwell KE, Fu YS, Calcaterra TC. Laryngeal dysplasia: a clinicopathologic study. *Cancer* 15: 457-463, 1995.
26. Krecicki T, Jelen M, Krecicka MZ, Szkudlarek T, Szajowski K. Immunohistochemically stained markers (p53, PCNA, bcl-2) in dysplastic lesions of the larynx. *Cancer Letters* 143: 23-28, 1999.
27. Shin DM, Lee JS, Lippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G, Heyne K, Shin HJC, Ro JY, Goepfert H, Hong WK, Hittelman WN. p53 expression: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 88: 519-529, 1996.

28. Hellquist H, Cardesa A, Gale N, Kambic V, Michaels L. Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. A study by members of the Working Group on Epithelial Hyperplastic Laryngeal Lesions of the European Society of Pathology. *Histopathology* 34: 226-233, 1999.
29. Yılmaz T, Hoşal AŞ, Gedikoğlu G, Kaya S. Prognostic significance of histopathological parameters in cancer of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 256: 139-144, 1999.
30. Hirvikoski P, Virtaniemi J, Kumpulainen E, Johansson R, Kosma VM. Supraglottic and glottic carcinomas: clinically and biologically distinct entities? *European Journal of Cancer* 38: 1717-1723, 2002.
31. Teppo H, Soini Y, Melkko J, Koivunen P, Alho O. Prognostic factors in laryngeal carcinoma: the role of apoptosis, p53, proliferation (Ki-67) and angiogenesis. *APMIS* 111: 451-457, 2003.
32. Acikalın MF, Öner Ü, Tel N, Pasaoğlu Ö, Çaklı H, Çolak E. Prognostic significance of Ki-67 expression for patients with laryngeal squamous cell carcinoma primarily treated by total laryngectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 26: 376-380, 2004.
33. Nadal A, Cardesa A. Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 442: 1-7, 2003.
34. Culhaci N, Metin K, Copcu E, Dikicioglu E. Elevated expression of MMP-13 and TIMP-I in head and neck squamous cell carcinomas may reflect increased tumor invasiveness. *BMC Cancer* 4: 42-47, 2004.
35. Ribeiro-Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, Zucoloto S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. *Arch Pathol Lab Med* 127: 336-340, 2003.
36. Sheikh MS, Fornace AJ. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* 182: 171-181, 2000.
37. Augusto L, Dennis AC. Cancer progression and p53. *Lancet* 346: 1009-1112, 1995.
38. Nakashima T, Wang XF, Masuda M, Inokuchi A, Komiyama S. Overexpression of p53 nuclear protein in premalignant and malignant laryngeal lesions. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 256: 56-59, 1999.
39. Merritt AJ, Potten CS, Kemp CJ, Hickman JA, Balmain A, Lane DP. The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Res* 54(3): 614-617, 1994.
40. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 55(22): 5187-5190, 1995.

41. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 25(4): 177-181, 2004.
42. Saint F, Le Frere Belda MA, Quintela R, Hoznek A, Patard JJ, Bellot J, Popov Z, Zafrani ES, Abbou CC, Chopin DK. Pretreatment p53 nuclear overexpression as a prognostic marker in superficial bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Eur Urol* 45(4): 475-482, 2004.
43. Sheikh MS, Fornace AJ. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* 182(2): 171-181, 2000.
44. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88(3): 323-331, 1997.
45. Hashimoto H, Sue Y, Saga Y, Tokumitsu M, Yachiku S. Roles of p53 and MDM2 in tumor proliferation and determination of the prognosis of transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. *Int J Urol* 7: 457-463, 2000.
46. Pagliaro LC, Keyhani A, Liu B, Perrotte P, Wilson D, Dinney CP. Adenoviral p53 gene transfer in human bladder cancer cell lines: cytotoxicity and synergy with cisplatin. *Urol Oncol* 21: 456-462, 2003.
47. Shiina H, Igawa M, Shigeno K, Yamasaki Y, Urakami S, Yoneda T, Wada Y, Honda S, Nagasaki M. Clinical significance of MDM2 and p53 expression in bladder cancer. A comparison with cell proliferation and apoptosis *Oncology* 56: 239-247, 1999.
48. Hall PA, Lane DP. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? *J Pathol* 172(1): 1-4, 1994.
49. Osen I, Fossa SD, Majak B, Rotterud R, Berner A. Prognostic factors in muscle-invasive bladder cancer treated with radiotherapy: an immunohistochemical study. *Br J Urol* 81(6): 862-869, 1998.
50. Dietz S, Rother K, Bamberger C, Schmale H, Mössner J, Engeland K. Differential regulation of transcription and induction of programmed cell death by human p53-family members p63 and p73. *FEBS Letters* 525: 93-99, 2002.
51. Melino G, Lu X, Gasco M, Crook T, Knight RA. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *TRENDS in Biochemical Sciences* 28(12): 663-671, 2003.
52. Bandoh N, Hayashi T, Kishibe K, Takahara M, Imada M, Nonaka S, Harabuchi Y. Prognostic value of p53 mutations, bax and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Cancer* 94: 1968-1980, 2002.

53. Dowell SP, Hall PA. The p53 tumour suppressor gene and tumour prognosis: is there a relationship. *Journal of pathology* 177: 221-224, 1995.
54. Sung CJ, Zheng Y, Quddus MR, Kang X, Zhangs ZF, Lauchlan SC, Zheng W. p53 as a significant prognostic marker in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 10: 119-127, 2000.
55. Izawa H, Yonemitsu N, Shin T, Sugihara H. Histopathological analysis of apoptosis, and expression of p53, bcl-2, bax, and Ki-67 in laryngeal squamous cell carcinomas and dysplasia. *Auris Nasus Larynx* 26: 317-330, 1999.
56. Saunders ME, Mackenzie R, Shipman R, Fransen E, Gilbert R, Jordan RCK. Patterns of p53 gene mutations in head and neck cancer: full-length gene sequencing and results of primary radiotherapy. *Clinical Cancer Research* 5: 2455-2463, 1999.
57. Martinazzi M, Crivelli F, Zampatti C, Martinazzi S. Relationship between p53 expression and other prognostic factors in human breast carcinoma. An Immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 100: 213-217, 1993.
58. Porter PL, Gown AM, Kramp SG, Coltrera MD. Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. An immunohistochemical study using methacarn-fixed, embedded tissue. *Am J Pathol* 140: 145-153, 1992.
59. Chang K, Ding I, Kern FG, Willingham MC. Immunohistochemical analysis of p53 and HER-2/neu proteins in human tumors. *J Histochem Cytochem* 39: 1281-1287, 1991.
60. Hensel CH, Xiang RH, Sakaguchi AY, Naylor SL. Use of the single strand conformation polymorphism technique and PCR to detect p53 gene mutations in small cell lung cancer. *Science* 249: 912-915, 1990.
61. Kazkayasi M, Hücümenoğlu S, Siriner Gİ, Hücümenoğlu M. Over-expression of p53 and c-erbB-2 oncoproteins in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 258: 329-335, 2001.
62. Rogriguez MA, Ford RJ, Goodacre A, Selvanayagam P, Cabanillas F, Deisseroth AB, Chromosome 17p and p53 changes in lymphoma. *British Journal of Haematology* 79: 575-582, 1991.
63. Hall PA, Campbell SJ, O'Neill M, Royston DJ, Nylander K, Carey FA, Kernohan NM. Expression of the p53 homologue p63 α and Δ Np63 α in normal and neoplastic cells. *Carcinogenesis* 21(2): 153-160, 2000.
64. Cabelguenne A, Blons H, Waziers I, Carnot F, Houllier A, Soussi T, Brasnu D, Beaune P, Laccourreye O, Puig PL. p53 alterations predict tumor response o neoadjuvant

- chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series. *J Clin Oncol* 18: 1465-1473, 2000.
65. Hirai T, Hayashi K, Takumida M, Ueda T, Hirakawa K, Yajin K. Reduced expression of p27 is correlated with progression in precancerous lesions of the larynx. *Auris Nasus Larynx* 30: 163-168, 2003.
66. Hu H, Xia S, Li A, Xu X, Cai Y, Han Y, Wei F, Chen B, Huang X, Han Y, Zhang J, Zhang X, Wu M, Wang M. Elevated expression of p63 protein in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 102: 580-583: 2002.
67. Kyutoku MT, Kiuchi K, Danbara N, Yuri T, Senzaki H, Tsubura A. p63 expression in normal human epidermis and epidermal appendages and their tumors. *J Cutan Pathol* 30: 11-17, 2003.
68. Westfall MD, Pietenpol JA. p63: molecular complexity in development and cancer. *Carcinogenesis* 25(6): 857-864, 2004.
69. Au NHC, Gown AM, Cheang M, Huntsman D, Yorlida E, Elliott WM, Flint J, English J, Gilks CB, Grimes HL. p63 expression in lung carcinoma. A tissue microarray study of 408 case. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 12(3): 240-247, 2004.
70. Sniezek JC, Matheny KE, Westfall MD, Pietenpol JA. Dominant negative p63 isoform expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 114: 2063-2072, 2004.
71. Foschini MP, Gaiba A, Cocchi R, Pennesi MG, Gatto MR, Frezza GP, Pession A. Pattern of p63 expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Virchows Arch* 444: 332-339, 2004.
72. Filho JS, Torio B, Albergaria A, Schmitt FC. p63 expression in normal skin and usual cutaneous carcinomas. *J Cutan Pathol* 29: 517-523, 2002.
73. Thurfjell N, Coates PJ, Boldrup L, Lindgren B, Backlund B, Uusitalo T, Mahani D, Dabelsteen E, Dahlqvist A, Sjostrom B, Roos G, Vojtesek B, Nenutil R, Nylander K. Function and importance of p63 in normal oral mucosa and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Adv Otorhinolaryngol* 62: 49-57, 2005.
74. Little NA, Jochemsen AG. Molecules in focus p63. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34: 6-9, 2002.
75. Yang A, Kaghad M, Caput D, McKeon F. On the shoulders of giants:p63, p73 and the rise of p53. *TRENDS in Genetics* 18(2): 90-96, 2002.

76. Ince TA, Cviko AP, Quade BJ, Yang A, McKeon FD, Mutter GL, Crum CP. p63 coordinates anogenital modeling and epithelial cell differentiation in the developing female urogenital tract. *Am J Pathol* 161: 1111-1117, 2002.
77. Bokhoven H, McKeon F. Mutations in the p53 homolog p63: allele-specific developmental syndromes in humans. *TRENDS in Molecular Medicine* 8(3): 133-139, 2002.
78. Pelosi G, Pasini F, Stenholm CO, Pastorino U, Maisonneuve P, Sonzogni A, Maffini F, Pruneri G, Fraggetta F, Cavallon A, Roz E, Iannucci A, Bresaola E, Viale G. p63 immunoreactivity in lung cancer: yet another player in the development of squamous cell carcinomas. *J Pathol* 198: 100-109, 2002.
79. Koster MI, Roop DR. The role of p63 in development and differentiation of the epidermis. *Journal of Dermatological Science* 34: 3-9, 2004.
80. Chen YK, Huse SS, Lin LM. Differential expression of p53, p63 and p73 proteins in human buccal squamous-cell carcinomas. *Clin Otolaryngol* 28: 451-455, 2003.
81. Strano S, Fontemaggi G, Costanzo A, Rizzo MG; Monti O, Baccarini A, Sal GD, Levrero M, Sacchi A, Oren M, Blandino G. Physical interaction with human tumor-derived p53 mutants inhibits p63 activities. *The Journal of Biological Chemistry* 277(21): 18817-18826, 2002.
82. Kaufman JA, Burke AJ. Current concepts in laryngeal cancer. *The Otolaryngol Clin of North America* 517: 1-19, 1997.
83. Stell PM. Prognosis in laryngeal carcinoma: host factors. *Clin Otolaryngol* 15: 111-119, 1990.
84. McGavran MH, Bauer WC, Ogura JH. The incidence of cervical lymph node metastases from epidermoid carcinoma of the larynx and their relationship to certain characteristics of the primary tumor. A study based on the clinical and pathological findings for 96 patients treated by primary en bloc laryngectomy and radical neck dissection. *Cancer* 14: 55-66, 1961.
85. Soo KC, Shah JP, Gopinath KS, Gerold FP, Jaques DP, Strong EW. Analysis of prognostic variables and results after supraglottic partial laryngectomy. *Am j Surg* 156: 301-305, 1988.
86. Takes RP, Baatenburg RJ, Schuurin E, Hermans J, Litvinov SV. Markers for assessment of nodal metastasis in laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 123: 412-419, 1997.

87. Resnick MJM, Uhlman D, Niehans GA, Gapany M, Adams G, Knapp D, Jaszcz W. Cervical lymph node status and survival in laryngeal carcinoma: Prognostic factors. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104: 685-694, 1995.
88. Koch WM, Lango M, Sewell D, Zahurak M, Sidransky D. Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. *Laryngoscope* 109: 1544-1551, 1999.
89. Narayana A, Vaughan ATM, Kathuria S, Fisher SG, Walter SA, Reddy SP. p53 overexpression is associated with bulky tumor and poor local control in T1 glottic cancer. *Int J Oncology Biol Phys* 46(1): 21-26, 2000.
90. Alsner J, Sorensen SB, Overgaard J. TP53 mutation is related to poor prognosis after radiotherapy, but not surgery, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiotherapy and Oncology* 59: 179-185, 2001.
91. Pietruszewska W, Kobos J, Gryczynski M. Prognostic significance of chosen tumour indicators (angiogenesis, cell proliferation and apoptosis) in laryngeal cancer. *International Congress Series* 1240: 1119-1123, 2003.
92. Morawski K, Gabriel A, Namyslowski G, Ziolkowski A, Pietrawska V, Steplewska K. Clinical application of proliferating cell nuclear antigen, oncoprotein p53 and tumor front grading analysis in patients operated on for laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 256: 378-383, 1999.
93. Wood NB, Kotelnikov V, Caldarelli DD, Hutchinson J, Panje WR, Hedge P. Mutation of p53 in squamous cell cancer of the head and neck; Relationship to tumor cell proliferation. *The Laryngoscope* 107: 827-833, 1997.
94. Tsujita-Kyutoku M, Kiuchi K, Danbara N, Yuri T, Senzaki H, Tsubura A. p63 expression in normal human epidermis and epidermal appendages and their tumors. *J Cutan Pathol* 30 :11-17, 2003.
95. Reis-Filho JS, Torio B, Albergaria A, Schmitt FC. p63 expression in normal skin and usual cutaneous carcinomas. *J Cutan Pathol* 29: 517-523, 2002.
96. Wang T, Chen B, Yang Y, Chen H, Wang Y, Cviko A, Quade BJ, Sun D, Yang A, Mckeon FD, Crum CP. Histologic and immunophenotypic classification of cervical carcinomas by expression of the p53 homologue p63: a study of 250 cases. *Human Pathology* 32: 479-486, 2001.
97. Martens JE, Arends J, Van der Linden PJ, De Boer BA, Helmerhorst TJ. Cytokeratin 17 and p63 are markers of the HPV target cell, the cervical stem cell. *Anticancer Res* 24: 771-775, 2004.

98. Reis-Filho JS, Simpson PT, Martins A, Preto A, Gartner F, Schmitt FC. Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and cytokeratin 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray. *Virchows Arch* 443: 122-132, 2003.
99. Como CJ, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Feldstein JT, Pohar K, Hoos A, Cardo CC. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clinical Cancer Research* 8: 494-501, 2002.
100. Lo Muzio L, Santarelli A, Caltabiano R, Rubini C, Pieramici T, Trevisiol L, Carinci F, Leonardi R, De Lillo A, Lanzafame S, Bufo P, Piatelli A. p63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 36(2): 187-194, 2005.
101. Chen YK, Hsue SS, Lin LM. Expression of p63 protein and mRNA in oral epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med* 34(4): 232-239, 2005.
102. Urist MJ, Di Como CJ, Lu M, Charytonowicz E, Verbel D, Crum CP, Ince TA, McKeon FD, Cordon-Cardo C. Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Am J Pathol* 161: 1199-1206, 2002.
103. Pruneri G, Pignataro L, Manzotti M, Carboni N, Ronchetti D, Neri A, Cesana BM, Viale G. p63 in laryngeal squamous cell carcinoma: evidence for a role of TA-p63 down-regulation in tumorigenesis and lack of prognostic implications of p63 immunoreactivity. *Lab Invest* 82: 1327-1334, 2002.