

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ YÖNETİCİSİ : Prof. Dr. A. Kemal KUTLU


LARİNGS PAPİLLLOMLARI , PREKANSERÖZ VE KANSERÖZ LEZYONLARINDA
İN SİTU HİBRİDİZASYON TEKNİĞİYLE
HPV DNA POZİTİFLİĞİNİN SAPTANMASI

T 49908

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ömer YALÇIN

EDİRNE-1996



Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında gösterdiği sonsuz hoşgörü ve yönlendirmeleri için Sayın Hocam Prof. Dr. Kemal Kutlu'ya ve tüm Patoloji Anabilim Dalı çalışanlarına , verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde katkılarından dolayı Arş. Gör. Dr. Galip Ekuklu'ya teşekkürlerimi sunarım

Dr. Ömer Yalçın

İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO:
1) GİRİŞ VE AMAÇ	1
2) GENEL BİLGİLER.....	2
3) MATERYAL VE METOD.....	27
4) BULGULAR.....	33
5) TARTIŞMA.....	47
6) SONUÇLAR.....	52
7) ÖZET.....	54
8) KAYNAKLAR.....	55

GİRİŞ ve AMAÇ

Uzun süredir virüsler birçok benign ve malign tümör etyolojisinde ilgi odağı olmuştur . Bazı tümörlerde spesifik virüslerin kesin olarak etken olduğu saptanırken bazı tümörlerde viral etyoloji hala tartışmalıdır (22) .

Laringeal papillomatozis , lokal ağırsif oluşu , solunum mukozalarına yayılma eğilimi , sürekli tedaviye rağmen nüks insidansının yüksek oluşuyla (51, 86) solunum yolunu tıkayarak mortalite ve yüksek morbiditeye neden olan ciddi sağlık sorunudur (3,73) . Larinks kanserleri erkeklerde en sık kanserler arasında gösterilen (8) , direkt yayılımla , geniş metastazla ve alt solunum yolu ve akciğer enfeksiyonuyla ölüme neden olan tümörlerdir (22) .

Çoğu araştırmada Condyloma Acuminatum ve diğer papillomlarda olduğu gibi ,laringeal papillom ve papillomatozistede , epitel hücrelerinde viral etkiye bağı histopatolojik değişiklikler ve çeşitli metodlarla Human Papilloma Virüs (HPV) pozitifliği saptanmış olup (3,6,10,13,16,55,74) , etyoloji olarak HPV gösterilmektedir (3,13,22,51,68,) . Bazı yayınlarda virüsün doğum kanalından bulaşabildiği belirtilmektedir (33,58) .Teknolojik ilerlemeye paralel gelişen metodlar sayesinde 60'ın üzerinde HPV tipi saptanmış ve hangilerinin bu lezyonlara sebep olduğu tespit edilmiştir (13,68) . Larinks epidermoid karsinomlarında etyolojik açıdan hazırlayıcı etkenlere değinilmiş olup (18) ,gelişen metodlarla viral etyoloji üzerinde araştırmalar yoğunlaşmaktadır . Son yıllarda lezyon tipi , HPV pozitifliği , Langerhans hücre kantitatif değerleri arasındaki ilişki üzerinde durulmaktadır (84) . Çeşitli yayınlarda lezyon tipiyle bağımlı sayısal olarak saptanan Langerhans hücre değerleri çelişkilidir .

Bu çalışmanın amacı Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı'na mataryelleri gelmiş popülasyonundaki laringeal papillom , larinks prekanseröz lezyonları ve skuamöz hücreli karsinomlarında viral etkiyle beklenen histopatolojik değişikliklerin varlığı , In Situ Hybridization tekniğiyle HPV DNA pozitifliği ve pozitiflik oranı , Anti-S-100 immünhistokimyasal boyama tekniği kullanarak lezyondaki Langerhans hücresi kantitatif değerleriyle ilişkilerini belirlemektir .

GENEL BİLGİLER

LARİNKSİN BENİGN EPİTELYAL TÜMÖRLERİ

Papillomlar :

Papillomlar iyi sınırlı , skuamöz epitelle dōşeli benign tümörlerdir .En sık görülen benign laringeal tümörlerdir . Başlangıç yaşı ve morfolojik görünümleri dikkate alındığında 2 tipe ayrılır (21,28,34) : Juvenil ve Adult .

Juvenil Laringeal Papillom (Juvenil Papillomatozis ; Multipl Papillomlar) :

Kopenhag'da yapılmış bir çalışmada 0-14 yaşlarındaki çocuklarda insidansının 0.6/100000 , prevalansının 0.8/300000 olduğu saptanmıştır (10) . İnfantlarda , çocuklarda ve adolesanlarda daha sık olmasına rağmen , her yaşta görülebilir . Larinksin herhangi bir yerini , en sık olarak kord vokalleri tutan papiller tümörlerdir . Multipldir . Lezyonlar yayılmaya eğilim gösterir . Cerrahi tedaviden sonra tekrarlayabilir , gerileyebilir veya spontan olarak genellikle pupertede kaybolur (21,28,34,45,86,106) . Papillom tanılı dokularda viral antijen immunoperoksidaz metoduyla anti HPV antikorları kullanılarak gösterildi .Günümüzde In Situ Hybridization tekniği kullanarak HPV DNA partikülleri taranmaktadır . Papillomların etyolojisinde viral infeksiyon aktivasyonu ile birlikte bazı yazılarda hormonal sistem gibi bilinmeyen promotörlere değinilmiştir (10,87) . Bu gözlemler ,ve laringeal papillomatozisli çocukların annelerinin önemli bölümünde doğum anında genital kondylom bulunması gerçeği (73) , kuvvetli viral etyoloji bulgularıdır .

Papillomlar yumuşak , mobil , koyu pembe , ince lobule ve genellikle 2-5 mm. çapında , karnıbahar benzeri şekillidir (28,34) . Komşu veya uzak mukozaya yayılma yeteneğindedir . Lezyonlar müköz membranda derinleşir . Cerrahi tedaviden sonraki rekürrensleri kırmızımtırak , parlaktır (28) .

Histopatoloji :

Histolojik olarak lezyon , minimal keratohyalin granüllü normal büyüklükte hücreleri bulunan kalınlaşmış dikensi kenarlı hücre tabakasıyla oluşturulan multipl , küçük papiller çıkıntılardan yapıldır . Hücre nükleusları bir nükleolden daha fazlasına sahiptir . Karakteristik olarak tam keratinizasyon yoktur ve sellüler atipi içermezler

.Yüksek tekrarlama oranına rağmen mikroskopik özellikleri vakaların büyük kısmında bulunur . Malign dejenerasyon özellikle radyoterapiden sonra bazen gözlenir (34) .

Prognoz :

Çoğu vakada prognoz iyidir (10) . Tekrarlama ve yayılma eğilimi gösterir . Yaygın olduğunda solunum zorluğuna ve hatta ölüme neden olabilir (78,86) . Radyasyon , sigara içimi , infeksiyon ve nekrozun Jüvenil Laringeal Papillomatoziste kanserleşmeye neden olacağı belirtilmesine rağmen (91) nadiren Laringeal Papillomatozisle birlikte Skuamöz Hücreli Karsinom saptanır . Böyle vakalarda daha önce papillomlar nedeniyle radyoterapi öyküsü mevcuttur . Bununla beraber radyoterapi uygulanmaksızın malignite gelişen birkaç vakanın olduğu belirtilmektedir (34) . Radyoterapi uygulandıktan sonra malignite gelişmemiş vakaların varlığı da dikkati çekmektedir (10) .

Adultların Larinks Papillomları :

Larinksin en sık benign tümörü, hemen hemen tek lezyonudur ve vokal kordlarda meydana gelir. Erkeklerde daha sıktır . Sıklıkla soliterdir . Yayılma eğilimi göstermez (28,78) . Daha fazla inflamatuvar reaksiyon gösterir . Juvenil tipe göre daha az tekrarlar (78) .

Hiper veya parakeratoz nedeniyle kırmızı veya grimsi beyaz nodül görünümündedir (28) . İyi differansiye, keratinize skuamöz karsinomdan farkı daima açık değildir . Displazi oranı yüksek olduğu için eksizye edilen lezyonun dikkatli histopatolojik incelenmesi gerekir (34) . Çoğu yayında HPV pozitifliği saptanmıştır . Takiplerinde bir çoğunun benign olduğu tespit edilmesine rağmen malign değişim nadiren bazı yayınlarda bildirilmiştir (21) . Tekrarlayan larinks papillomlarının spontan karsinomlara dönüşmesi de nadirdir (106) .

Yazarlar, verrüköz karsinomla bu lezyonların benzerliğine ve karışma ihtimaline işaret etmektedir .

Papillomların tedavisinde çeşitli yayınlarda değişik yöntemler üzerinde durulmaktadır (2,47,71) . Bazı tekrarlayan papillomatozis vakalarında radyoterapi etkili şekilde kullanılırken (15) , HPV DNA saptanan (104) , tekrarlayan respiratuvar papillomatozislerde interferon gibi antiviral ajanların kullanılabileceğinden sözedilmektedir (24 ,70) . J. Élö ve Z. Máté bir çalışmada larinks papillomatozislerini ve daha sıkça tekrarlayan Jüvenil tipleri sandoviç metoduyla tedavi ederek daha düşük rekürrens oranı elde etmişlerdir . Uyguladıkları metod cerrahi tedaviden önce ve sonra immünoestimulan Isoprinosin verdikten sonra CO₂ laser ile endoskopik mikrocerrahidir

(28) . Tüm papillomlar için uzun süren remisyondan sonra dahi , sık rekürrenslerin meydana gelişi , endoskopik muayenede normal görünen alanlarda da mevcut olabilen latent HPV infeksiyonuyla açıklanmaktadır (87) .

Keratozis :

Gerçek kordları ve arytenoidler arası alanı tutar . Laringoskopik muayenede vokal kordda kalınlaşma saptanır .

Vokal kordun skuamöz epiteli orta şiddette morfolojik değişikliklere eğilim gösterir.

Keratozis, hiperkeratozis, lökoplaki ve pakidermi terimleri, laringeal epitel hiperplazisi şeklinde adlandırılmıştır. Bu durumların ağız, farenks, vulva, vajen ve uterin serviks mukozalarında benzerleri vardır. Gerçekte bu değişiklikler normalde non-keratinize, stratifiye skuamöz tip epitelli tüm muköz membranlarda yaygındır. Sıklıkla non-keratinize skuamöz hücrelerde keratin yapımını uyaran kronik irritasyon sonucudur. Şimdi tek tip reaktif değişikliğin varyantları oldukları , aralarında ayırım yapmaya çalışmanın çok az şey kazandıracığı düşünülmektedir . Bu nedenle keratozis terimi altında birleştirilmiştir . Aşırı keratin yapımı gözlenen değişikliklerin yaygın özelliğidir . Çeşitli histolojik sınıflamalar ileri sürülmüştür (34) .

Histopatoloji :

Tutulan epitelin kalınlığı bazal veya daha sık spinöz hücre tabakasının hiperplazisi sonucu genellikle artar (akantozis) . Süperfisyel hücreler keratohyalin granüller ve pullanmalar (keratinizasyon) oluşturur. İki tip keratinizasyon görülür. Birinde keratinize hücreler nüvelerini kaybetmiştir (ortokeratoz) , diğerinde nüveler küçük, yassı, piknotik, santral nokta olarak devam eder (parakeratoz) . Akatozis ve keratinizasyonun nispi oranları değişkendir. Sıklıkla bazal tabaka subepitelyal dokuya doğru aşağıya büyür, fakat bazal tabaka intakt kalır.Laringeal keratoziste olabilen veya olmayan önemli ek özellik, bozuk maturasyondur (displazi) . Bu hücre tabakalanması ve oryantasyonunda çeşitli derecelerde bozuklukla (polarite kaybı) , ve artmış nüve/sitoplazma oranı, nükleer pleomorfizm, tek hücre keratinizasyonu, artmış mitotik aktivite gibi morfolojik tek hücre anormallikleri ile gösterir. Ağır displaziye değişikliklerin tüm epitel boyunca görüldüğü karsinoma in situdan ayırmak güçtür. Her iki durumun tedavisi lokal eksizyon olduğundan pratikte bu ayırım sınırlandırılabilir. Bununla beraber ister karsinoma in situ isterse açıkça invaziv tip olsun malign değişiklik çok lokalize olabilir ve bu oldukça tanı güçlüğü artırır. İleri biyopsiler sıklıkla gereklidir. Karsinom dışlanmadan önce şüpheli görünüm

lezyonun diğer alanlarının incelenmesini gerektirir. Keratozis, laringeal karsinomun nadir öncüsüdür ve çoğu yazılar keratozisi izleyen karsinom insidansının %5'in altında olduğunu kabul eder (34).

Mikroskopik Ayırıcı Tanı :

Larinksin keratozisinde ayırıcı tanı olarak düşünülen durumlar, karsinoma in situ ve iyi diferansiye skuamöz karsinomdur. Özellikle nüve büyüklüğü, şekilde ve boyanma yoğunluğundaki belirgin değişikliklerde, lezyon boyunca hücre dizilimindeki düzensizlikte karsinoma in situ düşünülmelidir. İster in situ isterse invaziv tip olsun malign değişiklik lokalize olabilir ve bu tanı güçlüğüne epey arttırır. Pratikte iyi diferansiye skuamöz karsinomla keratozis arasında ayırım yapmak keratozisle karsinoma in situ arasında ayırım yapmaktan sıklıkla daha zordur (34).

LARINKSİN MALİGN EPİTELYAL TÜMÖRLERİ

Karsinoma İn Situ (İntraepitelyal Karsinoma) :

Bazal tabakanın altına invazyon bulgusu göstermeksizin malign tümörün tüm sitolojik ve yapısal değişikliklerine sahip epitelin proliferatif bozukluğu olarak tanımlanabilir . Yapılan incelemelerin sonuçları HPV'ün Laringeal Karsinoma İn Situ gelişiminde etyolojik ajan olacağını gösterir (48) . Lezyon genellikle invaziv karsinomun kenar alanlarında saptanır .

Bir yazıda 3 morfolojik derecede sınıflandırılır (34) :

1-Laringeal İntraepitelyal Neoplazi Grade 1 (LIN 1) : Morfolojik olarak hafif epitelyal displazidir.

2-LIN 2 : Orta derecede epitelyal displazidir.

3-LIN 3 : Hem ağır displazi hemde karsinoma in situyu içerir.

Grade 3 intraepitelyal neoplazilerin Grade 1 olanlardan daha muhtemel invaziv karsinoma ilerleyebileceği kabul edilir . Bir araştırma sonuçları epitelin displazi derecesiyle larinks kanser gelişimi arasında kuvvetli ilişki olduğunu göstermektedir (44) .

Laringeal İntraepitelyal Neoplazilerin Histolojik Görünümleri :

1-Grade 1 :Skumöz epitelin stratifikasyonu korunur.Superfisyal tabakalarda intrasellüler köprüler, keratinizasyon, sitoplazmik maturasyon bulunur. Daha alt tabakalardaki hücreler arası oryantasyon devam etmez ve nükleer birikim belirgindir.

Nüvelerde biraz pleomorfizm ve artmış nüve/sitoplazma oranı vardır. Nükleoller belirgindir, mitoz sık değildir.

2-Grade 2 :Histolojik değişiklikler grade 1'dekilere benzer. Fakat diferansiye olmamış hücreler epitel kalınlığının 2/3 'e ulaşır. Epitelin 1/3 üst bölümünde differansiyasyon ve stratifikasyon mevcuttur. Mitoz daha çoktur.

3-Grade 3 : Diferansiye olmamış hücreler epitelin 2/3 kalınlığından tüm kalınlığına kadar devam eder.Genellikle daha açık derecede pleomorfizme sahip iri nükleusları bulunur. Mitoz tüm tabakada, artmış sayıda ve anormal görünümündedir. Vakaların büyük bölümünde keratinizasyon yoktur.Fakat bazan ince keratin tabakası alttaki tüm oryantasyon kaybı gösteren hücrelerin yüzeyinde görülür.

İnsidans :

Yayınlanmış karsinoma in situ vaka yazıları insidans hakkında önemli zıtlıkların olduğunu gösterir. Zıtlıkları iki muhtemel faktör açıklayabilir. Ya vaka aslında görünmeyen alanda invazif karsinomdur fakat karsinoma in situ tanısı almış olabilir, ya da pataloglar tarafından yanlış olarak karsinoma in situ tanısı konmuş olabilir (34) .

Prognoz :

Muhtemelen tedavi edilmemiş çoğu karsinoma in situ vakaları ilerde invaziv karsinoma dönüşebilir , fakat ara çok uzun olabilir .

Skvamöz Hücreli Karsinom :

İnvazif Skvamöz Hücreli Karsinom :

Skvamöz hücreli karsinom, tüm kanserlerin % 1-2'sini ve larinkse ait tüm malign tümörlerin % 90'ını oluşturur (34) . Çoğu 1-4 cm. çaplardadır . Genellikle ülsere olan kabarık gri-pembe kitle olarak tanımlanırlar .

Risk Faktörleri :

Larinks kanserleriyle ilişkili çevresel risk faktörleri ilgi odağı olmuştur. Özellikle üzerinde durulan çevresel risk faktörleri sigara ve alkol kullanımı , radyasyon ve meslektir . Bir çalışmada yaşlanma ve sigara içiminin larinkste yassı epitel oranını belirgin şekilde arttırdığı saptanmıştır (29) . Larinks kanserlerinin % 95 yassı epitelden geliştiği hatırlanacak olursa metaplastik alanların malignite gelişmesi açısından önemli olabileceği akla gelmektedir . Epidemiyolojik çalışmalar larinks karsinomuyla sigara ve pipo içimi arasında çok kuvvetli ilişki gösterir. Laringeal epiteldeki etkisi, içilen miktarla da

yakından ilgilidir. Intraepitelyal neoplazi veya invazif karsinom, sigara içmeyenlerde % 4,2 ağır sigara içenlerde % 47,2 saptanmıştır (34) . Risk içenlerde içmeyenlere göre 6,1-15,8 kat kadar artar . Puro ve pipo içiminde 1,6-3,9 arasında değişen nispi risk oranları mevcuttur (80) . Bu bulgular Syrian hamsterlerinde deneysel çalışmayla da desteklenmiştir . Syrian hamster çalışmaları, tütün içiminin lineer doz-sonuç ilişkisini, alkol tüketiminin etkisini artırdığını ve invazif olmayan intraepitelyal neoplastik değişikliklerin invazif karsinoma ilerleyişini uyardığını gösterdi . Hem Britanya hem de Avustralya'da 2. Dünya Savaşı'ndan beri sigara ve alkol tüketimiyle paralel larengeal karsinom vakalarında artış mevcuttur . Son 30 yılda kadınlarda özellikle daha genç grupta nispeten daha fazla malignensi artışı kadınlar arasında daha fazla sigara ve alkol tüketimiyle paralellik göstermektedir (34) . Bu veriler ışığında larinks karsinomu önlenebilir bir hastalıktır . Bununla beraber radyasyonla ilişkili larinks tümörleri bildirilmiştir . Risk meslek grupları olarak nikel , mustard gazı işçileri , çiftçiler , ağaç işçileri ve makinistler belirtilmektedir (80) . Risk faktörü olarak ayrıca laringeal keratozis ve laringeal papillomlar da belirtilmektedir (97) . Asbestozisin rolü tartışmalıdır . Bazı yayınlarda asbestoza maruz kalma ile laringeal kanser arasında ilişki saptanamamıştır (20) . Larinksin yassı epitel hücreli karsinomuna sahip hastalar HLA ABC ve DR yönünden incelenmiş , normal popülasyona göre bu değerlerde önemli sapma saptanamamıştır (38) .

Yaş-Cinsiyet :

Larinks karsinomu orta yaş erkeklerin hastalığıdır. Tüm hastaların % 95'i 40-70 yaşlarındadır . 55-65 yaşlarında pik yapar.Kadınlarda sigara içiminde olan artış kadınlardaki lezyonun hafif artışını açıklar . Son yüzyıl boyunca zenciler arasında insidans artmasına rağmen ırksal eğilim yoktur. Dünya verilerine göre Brezilya'da Sao Paulo'da ve Hindistan'da Bombay'da yüksek laringeal kanser insidansı mevcuttur (80) .

Topografik Sınıflama :

Laringeal karsinomun prognozunu belirleyen faktörler arasında lezyonun histolojik özelliği yanısıra larinks içine ve dışına yayılım, tümörün kesin lokalizasyonu önemlidir. Larinks kompartmanlarının lenfatik yapısı nedeniyle larinks tümörlerinin lokalizasyonu ile boyun metastazı oranı arasında yakın ilişki vardır (47) . Pratik amaçlar için larinks tümörleri, orjine göre topografik olarak 3 ana anatomik lokalizasyonda sınıflandırılır (34,80) :

1-Supraglottik (vestibüler) tümörler :Suprahyoid glottisin posterior yüzeyinden (epiglotun tepesi, aryepiglottik bükümler ve arytenoidler) veya epiglotun infrahyoid seviyesi , vestibüler bükümler ve ventriküllerden kaynaklanır .

2-Glottik tümörler :Vokal kordlardan, ön ve arka kommissürlerden çıkar .

3-Subglottik tümörler :Vokal kordların altından ve 1. trakeal halkanın üstünden kaynaklanırlar .

Supraglottik/glottik sınır ventrikül apeks seviyesindedir . Histolojik olarak bu sınır vokal kord skuamöz epiteli ile ventrikül respiratuvar epiteli bileşkesidir . Glottik/subglottik sınır vokal kıvrımın serbest kenarının 1 cm. altındadır (96) .

Bu topografik sınıflama priform fossa ve postkrikoidal alanlardan çıkan tümörleri hariç tutar . Bu alanlardan çıkanlar laringofaringeal karsinom olarak sınıflandırılır .

Supraglottik karsinomlar genellikle epiglottu, vestibüler kıvrımları tutar ve larinksi destekleyen kıkırdak çatıya uzanmaz . Anterior kommissür ve ventrikül seviyesinde dururlar . Yalnız % 1'i glottik bölgeyi tutar . Bu lokalizasyon çoğu supraglottik tümörlerin glottik rezeksiyon yapılmaksızın tümörün eksize edilebilmesi demektir. Böylece fonksiyonel sesin tekrar geriye dönmesi mümkündür . Bununla birlikte büyük ülserle tümörler bazan tiroid kartilajı tutabilir . Bunlar transglottiktir ve total larinjektomiye gerektirir. Rekürrensten çok lenf nodülü metastazları bu tümörlerde tedavi yetersizliği sebebidir . Lenf bezine metastaz insidansı ortalama % 40'tır (77) . Bir çalışmada bu bölge tümörlerinde boyun metastaz oranı %30'un üzerinde bulunmuştur (47) .

Glottik karsinomlar en yaygın laringeal tümörler olup , % 60-65'ini oluşturur . Genellikle iyi differansiyedir (96) . Semptom , önce aralıklı daha sonra inatçı ses kısıklığıdır . Vokal kordlar fikse olduğunda glottik boşluk oldukça azalabilir ve solunum zorluğuna neden olur . Hastalığın ilerleyişi sıklıkla yavaştır ve kordların lenfatik drenajı sınırlı olduğu için metastaz geç olur . En sık tutulan alan vokal kordların ön yarıları ve ön kommissürdür . Posterior kommissür nadiren tutulur . Tümör orta hattı aşarak karşı kordu tutabilir . Ventrikülü , tiroid kartilajı ve preepiglottik alanların yumuşak dokularını tutabilir. Submükozal ve musküler alanların ve conus elasticus'un direkt tutulumu sıktır. Bununla beraber çoğu tümörler larinkste uzun süre lokalize kalır (34,77) . Bu nedenle vokal kordların radyoterapisi veya cerrahi tedaviyle iyi sonuç alınır ve nispeten daha iyi prognoza sahiptir . Lenf bezi metastazı vakaların % 0-13 'ünde bildirilir (34) . Vokal kord lezyonları keratotik görünümde olmaya eğilim gösterir .

Subglottik alan, anterior kommissür tendonuyla oluşturulan apeksle anterior trianguler bölüm, vokal kordların altyüzü, krikoid kıkırdağın daha alt sınırında sonlanan yan bölümden oluşur . Normal olarak respiratuvar epitelle örtülüdür . Buranın tümörleri tüm larinks karsinomlarının % 5'inden daha azını oluşturur . Genellikle tanı konduğunda krikotiroid alanı ve krikoid kıkırdağı tutmuştur (96) . Sık semptom stridordur . Daha sonra

tümör vokal kordlara uzandığında dispne ve ses kısıklığı gelişir . Klinik olarak sık tespit edilmemesine rağmen lenf bezi metastazı yaklaşık % 50 vakada saptanır (34) . Prognoz kötüdür . Krikoid kıkırdağa yayılım kuraldır . Trakeaya sık yayılım nedeniyle bu alanda mümkün olduğunca distalden rezeksiyon uygulanmalıdır (77) .

Transglottik karsinom terimi sınıflamada belirtilmemesine rağmen klinisyenlerce sık kullanılır (96) . Laringeal ventrikül kateden en azından tarif edilen larinksin 3 bölümünden 2'ini tutan tümörleri tarif etmek için Mc Gauran ve arkadaşlarınca ileri sürüldüğü belirtilmektedir . AJC veya UICC tanımlarında bulunmamasına rağmen birkaç yazar tarafından özellikle bu kavram üzerinde durulmuştur (79) . Tüm larinks karsinomlarının % 5'inden daha azını oluşturur . % 52'lik oranla en yüksek lenf bezi tutulumu gösterirler (77) .

Bağ dokusu sınırları tümörler için bariyer görevi yapar . Epiglot kıkırdağı , epiglot submukozasının ön sınırı olarak iş görür . Quadrangular membran , supraglottikleri lateral paraglottik alandan ayırır . Ventrikül ve sacculus , paraglottik alanda oluk oluşturur . Conus elasticus , glottik ve subglottik alanların inferior/lateral sınırıdır , bu alanları paraglottik alandan ayırır . Sınırları aşan tümör genellikle daha kötü prognozludur . Larinksin ligament ve kıkırdak yapılarının oluşturduğu bağ doku yapıları karsinom invazyonuna büyük direnç gösterir (79,52) . Tutulduklarında yaşam oranını çarpıcı şekilde azaltır . Thyrohyoid membran preepiglottik alanın ön kenarını oluşturur . Tutulunca , tümör membran boyunca boyun yumuşak dokularına veya dil tabanının derin kaslarına yayılabilir . Tiroid kartilaj endolarinksin yalnız küçük bölümünü sarar . Tümör paraglottik bölgeyi (yani vokal kıvrımın intrinsik kası) tuttuğunda kıkırdağı , özellikle ossifikasyon bölgesini tutabilir (79) .

Anterior kommissür tendonu özellikle önemlidir . Supraglottik ve glottik bölgeler arasında sınır meydana getirir . Ön kommissür bölgesi , lateral supraglottik lezyonlar için bariyer oluşturur . Aynı zamanda orta hat supraglottik ve büyük glottik lezyonların potansiyel yayılım yoludur (79) .

Krikoid , tümöre aşağıda ve arkada bir bariyer meydana getirir . Laringeal tümörlerin krikohyoid membrana ulaşmaksızın krikoidde ilerlemesi mümkün değildir . Krikoid boyunca posterior submukozal tümör yayılımı arytenoide ve interarytenoidal bölgelere ulaşabilir . O durumda vokal kord immobilizasyonu meydana gelebilir (79) .

Laringeal Karsinomlarda Stage :

Laringeal karsinomu stage'leme lezyonun kısa tarifini oluşturur . Bu , tedavi sonuçlarının karşılaştırılmasında ve tümör davranışının tespit edilmesinde faydalıdır.

Yaygın olarak kullanılan 2 sistem , American Joint Committe (AJC) ve International Union against Cancer (UICC) sınıflama sistemleridir . 1987'de UICC ve AJC sistemleri tekrar gözden geçirildi ve Tümör-Nodül-Metastaz sınıflama sistemi oluşturuldu . Bu sınıflama sistemine göre (79) :

T- Primer Tümör

T_x - Derecelendirilemeyen

T₀ -Tümör bulgusu olmayan

T_{is}-Karsinoma in situ

Supraglottik

T₁-Larinksin bir alanında sınırlı tümör , mobil (ventriküler bantlarda , arytenoidlerde , epiglotta)

T₂-Bir alanı aşan tümör , mobil (supraglottik veya glottik)

T₃-Larinkste fixe veya postkrikoid , medial pyriform veya preepiglottik alanı tutan

T₄-Kıkırdağa veya larinks ötesindeki dokuya invazyon

Glottik

T₁-Vokal kordlarda sınırlı tümör , mobil

T_{1a}-Bir kordda

T_{1b}-İki kordda

T₂-Supraglottik ve/veya glottik bölgeye yayılım , vokal kord hareketlerinde olası azalma

T₃-Tümör larinkste sınırlı , vokal kord fikse

T₄-Kıkırdağa veya larinks ötesine tümör yayılımı

Subglottik

T₁-Tümör subglottik bölgede sınırlı

T₂-Vokal korda yayılım , vokal kordlarda olası hareket kısıtlılığı

T₃-Tümör larinkste sınırlı , vokal kord fikse

T₄-Kıkırdağa veya larinks ötesine yayılım

N-Bölgesel Lenf Bezleri

N_x-Değerlendirilemeyen

N₀-Bölgesel lenf bezi metastazları olmayan

N₁-Bir tane metastatik , 3 cm.'den küçük ipsilateral lenf nodülü

N₂-6 cm.'den küçük metastatik lenf nodülleri

N_{2a}-3 ile 6 cm. arasında bir adet ipsilateral lenf nodülü

N_{2b}-6 cm.'den küçük ipsilateral birkaç lenf nodülü

N_{2c}-6 cm.'den küçük bilateral ve karşı taraf lenf nodülü

N₃-6 cm.'den büyük nodül veya nodüller

M-Uzak Metastaz

M_x-Değerlendirilemeyen

M₀-Uzak metastaz yok

M₁-Uzak metastaz var

Stage

0- T₁N₀M₀

1- T₁N₀M₀

II- T₂N₀M₀

III-T₃N₀M₀ /T₁₋₃N₁M₀

IV-T₄ veya N₂₋₃ veya M₁

From American Joint Committee on Cancer : Manual for staging of cancer, ed 3 , Philadelphia , 1987 , JP Lippincott; Hermarch P , Sobin H , editors : TNM classification of malign tumors , ed 4 , Berlin , 1987 , Springer Verlag

Histopatoloji :

Larinks skuamöz karsinomlarının büyük bölümü iyi veya orta derece differansiye veya tranzisyonel tip tümörlerdir (34) . Mukoepidermoid karsinomla karışabilmektedir (25) . Klinisyenin ilgi odağı tümörün muhtemel davranışı , rekürrenslerin ve metastazların meydana gelip gelmeyeceğini gösterir güvenilir bilgilerdir . Bu nedenle laringeal tümörler birkaç morfolojik özellik ele alınarak histolojik olarak derecelendirilmektedir . Yazarlara göre değerlendirmeye sokulan morfolojik kriterler değişmekle beraber bazı yazılarda 8 kriter üzerinde özellikle durulmaktadır (34,87) . Bunlardan 4'ü hücre popülasyonu ile ilgili olarak yapı , differansiyasyon , nükleer pleomorfizm , mitoz ; diğer 4'ü tümör-konakçı arasındaki ilişkiyle ilgili olarak invazyon derecesi , invazyon modu , vasküler invazyon , sellüler cevaptır . Herbir kriter 1-4 arası puanla değerlendirilmekte ve 8 kriter için toplam puan saptanmaktadır . Toplam puan ne kadar yüksekse rekürrens riski o kadar artmaktadır .

Bir yazıda bu kriterlerden bazıları şu şekilde açıklanmaktadır (34) :

1-Diferansiyasyon : Tümör hücrelerinin normal skuamöz hücrelere benzeme derecesidir . Sivri uçların (intersellüler köprüler) , keratohyalin granüllerin , tek hücre keratinizasyonunun, tümör kitlesinde veya tümör yüzeyinde tam keratinizasyon ve keratin incilerinin bulunması ışık mikroskopuyla değerlendirilen ana özelliklerdir . Çoğu glottik karsinomlar iyi-orta differansiye iken larinksin diğer bölgelerinde özellikle subglottik

alanlarda yerleşenler büyük oranda orta- kötü differansiyedir . Genel olarak tümör ne kadar küçükse görünümü o kadar iyi differansiyedir (77) .

2-*Sellüler Pleomorfizm* : Tümör hücrelerinin nüve/sitoplazma oranında , şekil ve büyüklükte değişiklik , acayip , iri veya multintükleer hücrelerin varlığıyla ve nükleusta belirgin veya çok sayıda nükleollerin bulunmasıyla ilgilidir .

3-*Yapısal Anormallik* : Gruplarda , kordonlarda veya tabakalarda hücre dizilimlerinde bozukluk , normal hücre diziliminin kaybolması veya birbirinden total ayrılmalardır .

4-*Mitotik Oran* : Tümör büyümesinin önemli göstergesidir . Anormal , tripolar , halka şekilli mitozlar genellikle kötü prognoz belirtisi olarak kabul edilir .

5-*Tümör-Konakçı Etkileşimi* : Tümörün dış kenarlarında önemli değişiklikler vardır . Tümör sınırları infiltratif veya keskin , iterek büyüyen tarzda olabilir .

6-*Konakçı Cevabı* : Tümör sınırında genellikle plazma hücreleri ve lenfositlerle olan iltihabi infiltrasyonla kendini belli eder .

Prognoz :

Genel olarak larinks kanserleri 5 yıllık % 67 'lik yaşam oranıyla iyi prognoza sahiptir (79) . Larinks karsinomunun kesin lokalizasyonu , metastazın olup olmaması ve tümörün histolojik tipi prognozu etkileyen faktörlerdir . Glottik yerleşimli karsinomlar nispeten iyi prognoza sahiptir . Subglottik yerleşimli olanlarda prognoz kötüdür . Bunlarda 5 yıllık yaşam oranı % 50'dir . Tedavinin yetersizliğini rekürrens ve uzak metastazlar belirler . Lokal rekürrenste önemli bir faktör rezeksiyon kenarında tespit edilmemiş submükozal tümör invazyonudur . Tümörün alınması sırasında malign hücrelerin implantasyonu ve stomada yeni primer tümör gelişimi gibi olasılıklar da vardır . Tümörden 0.2 cm. daha uzak alanı kapsayacak rezeksiyonda hastalar daha az rekürrens ve daha iyi 5 yıllık yaşam oranına sahiptir . Rekürrenslerin yaklaşık yarısı operasyondan sonra ilk 6 ay içinde meydana gelir . Bu tip komplikasyonda operasyon mortalitesi daha yüksektir ve radyoterapi etkisiz görünür . Akciğerler en sık uzak metastaz alanlarıdır . Bunu mediastinal lenf bezleri, kemikler ve karaciğer izler (34) .

Bildirilen serilere göre değişmekle birlikte yaklaşık olarak belirtilen 5 yıllık yaşam oranları aşağıdaki gibidir (77) :

<i>Glottik karsinomlar</i>	: % 80	I- % 90	II- % 85	III- % 60	IV- % 5>
<i>Supraglottik karsinomlar</i>	: % 65	I- % 85	II- % 75	III- % 45	IV- % 5>
<i>Transglottik karsinom</i>	: % 50				
<i>Subglottik karsinom</i>	: % 40				

Verrüköz Karsinom :

Nadir görülen tümörlerdir . Erkeklerde daha siktir . Etyolojisi tam bilinmemesine rağmen HPV'ünün rolünden bahsedilir . Sıklıkla ağız boşluğu , arkus alveolaris , yanak mukazası , aerodigestif sistem girişi ve larinkste ortaya çıkar . Ayrıca genital bölge , özefagus , burun , ayak tabanında oluşabilir . Bütün larinks tümörlerinin %1-3'ünü oluşturur (37) . Larinks respiratuvar sistemin en sık tutulan alanıdır . Çoğu glottik bölgeden çıkar , bir veya iki kordu tutar (34) .

Makroskopik olarak lezyon değişik büyüklükte ve sıklıkla yaygındır . Klinisyen tarafından genellikle malign tümör olarak yorumlanan genişçe implante kitle olarak saptanır (34) . Geniş sapla tutunmuş , mantar gibi ekzofitik büyümüş görünümündedir . Papiller yapısından ve lokal invazyonundan dolayı normal mukozadan kolaylıkla ayırt edilebilir (37) .

Histopatoloji :

Histolojik olarak tümör , biyopsi örneğinde gerçek yapısını göstermez . Bu nedenle önemli tanısal zorluğa ve hatta pataloglarla cerrahlar arasında anlaşmazlığa neden olur . Bazıları multifokaldir . Karakteristik özellikleri mitotik aktivite ve nükleer pleomorfizm gibi malignensi bulguları göstermeyen iyi differansiye , keratinize tümör hücre kordonları ve adalarıdır . Tümör keratinize kalın hücre tabakasıyla kaplıdır . Sıklıkla keratin debrileriyle dolu en alt tabakalara ulaşan büklümler arasında yarıklanmalarla katlanan papiller yapılar yapar . Tipik olarak alt sınır , ağır lenfo-plazmositer iltihabi hücre infiltrasyonu gösteren stromayı iter görünümlü , iyi sınırlı ve yuvarlaktır . Kenarlarda sık olarak granüloamatöz yabancı cisim reaksiyonu görülebilir . Sıklıkla yüzeysel olan biyopsi örneklerinde derindeki karakteristik özellikler saptanamaz . Bu durumda pataloglarla cerrahlar arasında konsültasyon gerekir . Birçok vakada lezyon tabanını içeren ikinci ve uygun biyopsi gerekebilir (34,37) . İnvazyon , kalın ve künt tümör kitlelerinin bazal membranı geçip iterek ilerlemesiyle oluşur . Büyüklüğü ne olursa olsun komşu dokulara invazyon yapar . Yumuşak dokuları tuttuğu gibi kıkırdak ve kemik dokuları da tutar , fakat metastaz yapmaz (34) . Verrüköz tip keratozisten (verrüköz hiperplaziden) ayırt edilmelidir (77) .

Radyoterapiden sonra verrüköz karsinomun %10'u anaplastik karsinoma dönüşmektedir . Anaplastik değişim ve rekürrens görülmesi nedeniyle radyoterapi uygulanmamaktadır . Kesin tedavi cerahidir (37) .

İğsi Hücreli Skuamöz Karsinom :

Psödösarkom , Karsinosarkom gibi değişik isimler de verilmektedir . Erkeklerde kadınlara göre 10 kat daha siktir . En sık 6.-7. dekadlarda arasında meydana gelir (34,75) . Bazı yazarlara göre çoğu % 72 oranla glottik bölgede yerleşim gösterir . Geriye kalanların % 14'ü hipofarenks , % 12'i supraglottik ve subglottik bölgededir (34) . Bir yazıda aksine çoğunun supraglottik yerleşimli olduğu belirtilmektedir (78) . En sıklıkla polipoid , daha nadiren ekzofitiktir . Kesit yüzü grimsi , sert , uniform görünümündedir (34,75) . Etyolojik olarak skuamöz karsinomdaki faktörler muhtemeldir (75) .

Histopatoloji :

Histolojik olarak skuamöz komponent belirgin olmayabilir . Bu durumda dikkatli olmak gerekir . Genellikle tümör , lezyonun sap kısmının tabanında yoğunlaşır ve bazı örneklerde karsinoma in situ olarak tanı alabilir . Bazal laminanın parçalandığı alanlarda altta kalan iğsi hücrelerin arasından uzanan skuamöz hücreler saptanabilir . İğsi hücre komponenti tümörün daha büyük bölümünü oluşturur . Bu komponent sıklıkla yüzeye ulaşır veya ince skuamöz hücre tabakasıyla kaplanmışdır (34) . Sellülarite vakadan vakaya değişir . Bazan multinükleer formları bulunabilir . Mitoz sıklığı değişkendir (34,75) .

Metastaz oranları lezyonun primer lokalizasyonuna göre değişmekle beraber vakaların yaklaşık % 20'inde görülür (34) . Lenf bezi metastazları ya yalnız karsinomatöz komponentten veya primer tümördeki gibi her iki komponentten ya da nadir vakalarda olduğu gibi yalnız sarkom benzeri elemanlardan oluşur (78,97) .

Ayırıcı tanısı malign mezansimal neoplazilerden ve özellikle malign fibröz histiyositomdan yapılmalıdır (75) .

Tercih edilen tedavi lokal eksizyon , gerekirse larenjektomidir . Radyoterapi uygulanırsa vakaların büyük bölümünde rekürrens görülür (34) .

Bazoloid Skuamöz Karsinom :

Küçük toplanmış hücre kitleleriyle , tipik in situ ve/veya invaziv epidermoid karsinom alanlarıyla karakterize oldukça malign laringeal tümör için son zamanlarda teklif edilen terimdir (78) .

Dilde , farenkste ve özefagusta da bulunabilen bu tümör adenoid kistik karsinom veya mukoepidermoid karsinomla karıştırılmamalıdır . Tümöral hücreler hiperkromatik

nüveli , dar sitoplazmalı olup , periferel palizat dizilim göstermekte ve küçük kistik alanlar , nekroz , belirgin hyalinizasyon içermektedir .

Adenokarsinom :

Tükrük bezi tipinde olmayan adenokarsinomlar çok nadir tümörlerdir . Çoğu vakalar supraglottik veya infraglottik yerleşimlidir .

Anlatılmayacak ancak larinkste yerleşim gösteren diğer tümörler şunlardır :

Seromüköz Bezlerden Kaynaklanan Tümörler :

Hemen hemen tümü gerçek vokal kordlardan başka yerlerde lokalizedir . Bunlar :

Benign Tümörler : Adenomlar

Malign Tümörler : Adenokarsinom

Adenoid Kistik Karsinom

Mukoepidermoid Tümör

Pleomorfik Tümör

Diğer Nadir Karsinomlar :

Dev Hücreli Karsinom

Berrak Hücreli Karsinom

Nöroendokrin Tümörler :

Paraganglioma

Karsinoid Tümörler

Küçük Hücreli Anaplastik Karsinom

Sekonder Tümörler :

Papillomavirüs :

Papillomavirüsler , insanlarda ve geniş olarak hayvanlarda hiperplastik , papillomatöz ve verrüköz skuamöz epitelyal lezyonlara neden olan heterojen DNA virüs grubudur . Küçük , sirküler , çift sarmallı DNA virüsleridir . SV 40 , Polyoma , JC ve BK virüslerinin aksine daha büyük olan kapsidleri 55 nm. çapta ve kromozomları ~7900 baz çiftine sahiptir (13,18) . En önemlisi diğer virüslerin DNA dizilişindeki genetik organizasyonunun papillomavirüslerindeki organizasyonla yok denecek kadar az ortak yönü vardır (13) . Bu nedenlerle bu virüsler diğerlerinden farklı grup olarak düşünölmelidir (13,18) .

İnfekte tavşanlardan , sığırlardan ve insanlardan izole edilen Paapillomavirüs partiküllerinin görünömleri belirgin şekilde birbirine benzerdir . 72 kapsomerden (virüs iskeletinin ana yapı blokları) oluşmuş ikozahedranlardır . Papilloma virionlar birkaç proteinin basit topluluklarıdır . Zarflı virüslerdeki gibi lipid veya membran içermezler . Bu gerçek , papillomavirüs infeksiyonlarının düşük antijenitesini açıklayabilir (18) . Viral kapsidin biyokimyasal analizinde 2 farklı yapısal protein olan 54000 dalton moleküler ağırlıklı major protein ve 76000 dalton moleküler ağırlıklı minor protein saptanır . Tüm hayvan ve insan papillomavirüslerinin denatüre olmuş major kapsid proteinleri antijenik olarak çapraz reaksiyon gösterir . Hasta örneklerinde virüslerin immünhistokimyasal tespiti için bu proteinler temel oluşturur (13) .

Virionlardan elde edilen tüm papillomavirüs kromozomlarının moleküler ağırlığı yaklaşık 5200000 daltondur . Adenozin:timin / guanozin:sitozin oranı yaklaşık % 58-42 dolaylarındadır . DNA ağırlık olarak virionun yaklaşık %12'ini oluşturur (13) . Papillomavirüs genomu fonksiyonel olarak herbir viral proteinleri kodlayan bir dizi ORF (Open Reading Frame) içeren iki uzun bölgeye ve kodlama yapmayan bir bölgeye ayrılır (13,18) :

1-Erken (E) bölge : Viral genomun % 45'idir . Genom replikasyonu ve kontrolüyle ilgili proteinleri kodlayan 8 tip ORF içerir .

2-Geç (L) bölge : Viral genomun % 40'ıdır . Yapısal viral kapsid proteinleri kodlar

3-Kodlama yapmayan bölge (NCR) : Viral genomun % 15'idir . Genomun düzenleyici işlevleri için gereklidir .

Tüm papillomavirüslere temel alınarak incelenen BPV 1 (Bovine Papillomavirus tip1)'de saptanan genler ve fonksiyonları aynı kaynaklarda özetle şu şekilde belirtilmektedir :

- E1 -Viral DNA replikasyon fonksiyonları
- E2 -Transkripsiyonel regülatör fonksiyonlar
- E3 -Henüz tespit edilmedi
- E4 -Viral matürasyonda rol oynayabilen sitoplazmik protein
- E5 -Sellüler transformasyon , plazmid kopya sayısı kontrolü
- E6 -Sellüler transformasyon , plazmid kopya sayısı kontrolü
- E7 -Transkripsiyonel transaktivatör ve sellüler immortalizasyon
- E8 -Viral DNA replikasyonunda muhtemel rol
- L1 -Major kapsid protein
- L2 -Minör kapsid protein

Yüksek dereceli lezyonlarda HPV DNA'sı konakçı kromazomuna entegre olurken (13,81,83) diğer lezyonlarda ekstrakromazomal olarak kalmaktadır . Bu entegrasyon viral genetik bölgeler konusunda ilginç özellikler gösterir . Entegrasyon hemen hemen daima E1 ORF'in 3' veya E2 ORF'in 5' ucundadır ve genellikle bu bölgede virüs dizilerinin kısa bozulmalarıyla birlikte (13) .

Papillomavirüs , Tipleri ve İlgili Oldukları Lezyonlar :

Siğillerin ilk tanımına Milattan sonra 25 'te Celsus'un yazılarında rastlanır . 5. yy.'da Yunan ve Romalı hekimlerin siğiller konusunda yazmışlardır . O dönemde genital siğillerin seksüel bulaşıcılığından söz edilir . Daha sonraları değişik yıllarda genital siğiller , Sifiliz ve Gonore hastalığının belirtileri şeklinde hatalı yorumlandı . 1891'de Londra'da Payne , sıradan siğillerin infeksiyöz hastalık olduğunu ileri sürdü . 1917'e doğru infeksiyöz genital condylomata tanımlandı . 1954'te Barrett ve arkadaşları tarafından kesin epidemiyolojik bulgu sağlanana kadar bulaş şekli düşüncede kaldı . Siğillerin viral orjini ilk kez 1907'de Ciuffo tarafından ispat edildi . 1940'ta tıpa elektron mikroskobun girmesiyle dokuda viral partiküllerin direkt görülmesi ve siğillerin viral orjin teorisi ispat edildi (55) .

1960'ların sonlarına doğru genellikle sıradan , juvenil yassı ve genital siğillerin aynı tip papillomavirüs tarafından oluşturulduğu ve farklı anatomik lokalizasyonlar nedeniyle farklı klinik , morfolojik görünümde olduğuna inanılırdı . Nükleik Asit Hibridizasyon tekniklerini kullanarak Epstein Barr Virus DNA'sını Burkitt Lenfoma ve Nazofarenks Kanserinde gösteren zur Hausen 1970'in başlarında HPV ve Skuamöz Hücreli Karsinomlardaki mümkün rolünü incelemeye başladı . 1974'te yayınlanan ilk hibridizasyon verileri bir HPV tipinden daha fazlasının Condylomata Acuminata'ya neden olduğunu akla getirdi . HPV 11'in laringeal papillomda , yassı servikal codylomata'da , düşük dereceli displazilerde ve vulvanın Condylomata Acuminata'sında saptanmasıyla perinatal infeksiyonun çocuklarda laryngeal papillomun önemli sebebi olabileceği düşünüldü . Bunu diğer HPV tiplerinin saptanması izledi . 1956'da Koss ve Durfee boş ve halolu sitoplazması olan hücreleri tanımlamak için Koilositotik atipi terimini kullandı . 1980 başlarında smear ve histolojik kesitlerde koilositin HPV infeksiyonunun spesifik mikroskopik işareti olduğu kabul edildi (55) . Koilositozis , smear değerlendirme yöntemi olan Bethesda sisteminde dahi yerini almıştır (5) . Son zamanlarda yapılan bir çalışmada da özellikle atipili koilositoziste bu ilişki saptanmıştır (30) . Barbara Winkler ve arkadaşlarının özefagus papillomu ve fokal epitel epitel hiperplazi vakalarında yapmış olduğu çalışmada , koilositozisle HPV pozitifliği arasında korelasyon saptayamadı . Belki bu sonuç , onların belirtmiş olduğu vaka seçimi veya örneklerin küçük boyutu nedeniyle , belkide HPV saptarken kullandıkları teknik nedeniyle (105) . Bununla beraber

karakteristik özellik olan koilositozisin yokluğu hiçbir şekilde belirli morfolojide HPV'ünün varlığını ekarte etmez (11) . Larinksin Skuamöz Hücreli Karsinomunda HPV tipiyle ışık mikroskopik morfoloji arasında korelasyon saptanmamıştır (94) .

Papillomavirüsler , doğal konakçısına göre cottontail rabbit (Shope) papillomavirus (CRPV) , bovine papillomavirus (BPV) , deer papillomavirus (DPV) , human papillomavirus (HPV) gibi isimlendirilmektedir . Aynı türden izole edilen papillomavirüsler (PV) , nükleotid dizilimine göre alt sınıflara ayrılır (18) . HPV 'ünün doku kültürlerinde çoğaltılamayışı (87) İnsanlardaki PV ile olan çalışmaları yavaşlatmıştır . Diğerlerinin aksine sadece BPV , invitro şartlarda kemirici hayvanların hücrelerine girip replike olabilir (51,55,87) . HPV , 60 ve üzerindeki tipiyle en büyük grubu oluşturur . Muhtemelen bu sayı artacaktır (18) .

Bazı yazılarda HPV'le ilgili lezyonlarda bazal hücrelerde virüs DNA'ninin mevcut olduğu saptanmış (92) veya ileri sürülmektedir . Bu hücrelerdeki virüs DNA kopya sayılarının kullanılan propların tespit etme kapasitesinin altında kaldığı , bu nedenle bazal hücrelerde tespit edilemediği belirtilmektedir (13) . Vejetatif HPV DNA replikasyonu ve HPV yapısal proteinlerinin sentezi epidermiste yüzeye yakın tabakalarda keratinize hücrelerin bazılarında meydana gelir . Viral DNA granüler , viral kapsid proteinleri granüler ve korneum tabakalarında saptanır (51) . Bir yazıda genomlardan E1^E4'ün parabazal hücrelerde ve süperfisyal keratinositlere doğru artan miktarlarda bulunduğu , E6-E7 ve E2 spesifik exonların orta tabakadan üst tabakaya doğru artan şekilde saptandığı , kapsid proteinleri kodlayan L1-L2'lerin orta tabakadaki hücre nükleuslarında ve en differansiye keratinositlerde ise sitoplazmada saptandığı belirtilmektedir (13) . İn Situ Hibridizasyonla çalışılmış bir araştırmada ise 4 vakada ilginç olarak bazı stromal fibröblast ve makrofajlarda da HPV 16 ve 18 pozitifliği saptanmıştır (100) .

120 böbrek alıcısını içeren bir incelemede önemli sayıda HPV ile ilgili lezyon geliştiği ve immünoşüpresyon dönemi ne kadar uzunsa o derece siğillerin prevalansının büyüdüğü tespit edilmiştir (79) . Bu bulgularla özellikle böbrek alıcısı veya immünoşüpresyondaki tüm kadınların yüksek risk grubu oluşturduğundan ve kolposkopik incelemenin gerekli olduğundan bahsedilir .

Papillomavirüsler , insanlarda ve geniş olarak hayvanlarda hiperplastik , papillamatöz ve verrükköz yassı epitelyal lezyonlara neden olan virüslerdir (18) . Vulvar intraepitelyal neoplazi , bazaloid karsinom , warty karsinomda HPV DNA'ninin yüksek sıklığı tümörlerin gelişimindeki rolünü desteklemiştir (77) . Bunu uterus serviksinin karsinom metastazında yapılan incelemeler (103) gibi , larinksin karsinoma in sitularında ,

verrüköz karsinomlarında (12,48) ve diğer alanlarda HPV kapsid antijenlerinin , DNA dizilerinin tespitine dayanan çalışmalar da göstermiştir . Servikovaginal bölge lezyonlarının baş-boyun kanserli kadın hastalarda daha sık olduğu hipotezini araştırmaya yönelik çalışmada HPV infeksiyonunun sistemik olabileceği görüşü oldukça dikkat çekicidir (56) .

HPV tip 16 , 18 , 31 ve 33'ün yüksek riskli tipler , tip 6 , 11 ve 42'in düşük riskli tipler olduğu bahsedilmiş (18) veya saptanmıştır (26) . Hatta bazı yazarlar servikovaginal smearlerde yüksek riskli HPV'lerin saptanmasının yararlı prognostik bilgi sağlamış olacağından söz ederler (14) . Aksine HPV tip 6 ve 11'in de malign değişimde artan risk taşıdığına tanık olunmuştur (94) . Bazı veriler HPV 16 DNA içeren papillomların malign değişime gitme eğiliminde olduğu , eğer DNA aneuploidi veya HPV 11 DNA 'i mevcutsa bu eğilimin daha büyük olduğunu gösterir (54) .Tekrarlayan laringeal papillomların ise kromazomal olarak normal olduğu saptanmıştır (106) .

Larinks karsinomunun servikal lenf bezleri metastazlarında da PCR'la HPV pozitifliğinin saptanması oldukça ilginçtir . Her ne kadar bu çalışmanın karsinoma komşu benign lezyonlardan HPV kontaminasyonunu ekarte ettiğinden söz edilse de (43) saptanan sonuç yukarıda bahsedilen sistemik HPV infeksiyon görüşünü destekleyebilir . Bu çalışmayla HPV pozitifliğiyle karsinom differansiyasyonu arasında önemli bir ilişki saptanmamıştır (43) .

Başlıca virüs tipleri spesifik intraepitelyal ve invazif tümörlerle daha sıklıkla ilişkili olurken doğru ve kesin korelasyonlar mevcut değildir . Viral genotiplerden başka diğer faktörlerin epitelyal tümör morfolojisinin saptanmasında etkili olduğu oldukça muhtemeldir . Bulguların çoğu , intraepitelyal ve servikal invazif lezyonların hepsi olmasa da hemen hemen tamamının HPV infeksiyonuyla ilgili olduğunu gösterir . Viral nükleik asitleri içerdiği saptanamayan nispeten az sayıdaki vakalar ya kullanılan problemlardan farklı virüs tiplerine ait DNA içerebilir ya da problemlerin bağlandığı hedefler kullanılan tekniğin saptamaya yönelik konsantrasyonlarının altındadır (11) .

Benign veya potansiyel onkojenik tiplerle olan HPV infeksiyonu yalnız genital , laringeal tümörlerle ilişkili olmayıp , bronşial ve akciğer tümörleriyle de ilişkili olabilir . HPV DNA'sinin kokarsinojen olması muhtemeldir . Skuamöz metaplazi , akciğer karsinomu ve/veya displazi için önemli prekürsördür . Fakat karsinojenik fiziksel , kimyasal ajanlara ve non-neoplastik stimüluslara cevap olarak oluşur . HPV'ün skuamöz metaplazide malign değişimi başlatabilmesi mümkündür . Diğer faktörlerle birlikte malign değişimde rol oynayabilir (9) . Eğer varsa HPV'ün sınırlı non-invazif epitelyal

proliferasyonu uyardığı ve eğer meydana gelirse malignitenin diğer kofaktörlere bağlı olduğu varsayılabilir . Bu karsinojenler , genetik yatkınlık veya diğer onkojen virüs infeksiyonunun bulunması (104) , radyasyon , sigara içimi , infeksiyon ve nekroz (91) olabilir . Bunlardan bir HPV pozitif karsinomlu vakada ailesel malign tümör yatkınlığı oldukça ilginçtir (19) . 2'si jüvenil , 2'si ise adult başlangıç gösteren laringeal papillomatozisli olguların incelendiği bir araştırmada tüm hastalarda invazif skuamöz hücreli karsinomun geliştiği saptanmıştır . Burada da mevcut bulgular , kimyasal ve fiziksel karsinojenlerle (bir hasta radyoterapi almış , diğer 2'i sigara kullanma öyküsüne sahip) muhtemel sinerjik etki eden HPV'ünün karsinom etyolojisindeki rolüne destek sağlar (59) . Bununla beraber alkol ve sigara almayan ancak HPV DNA pozitif olan üst aerodigestif sistem kanserlerine sahip hastalar bildirilmiştir (46) . Bu sonuç belki etyolojide alkol , sigara kullanımı dışındaki faktörler yanısıra tek başına HPV'ünün de etkili olabileceğini düşündürür .

Radyoterapi görmüş papillomda yaklaşık 10 yılda kanser gelişir . Radyoterapi görmemiş vakalarda 30 yıl sonra kanser gelişir . bununla birlikte radyoterapi malign transformasyon için zorunlu prokürsör değildir (49) .

Prolifere olan hücrelerde mevcut viral genomlara karşı yetersiz intrasellüler kontrol nedeniyle kanserlerin geliştiği sanılmaktadır . Bu tür viral infeksiyonları izleyen kanserlerde 3 yaygın özellik mevcuttur (107) :

1-Genellikle semptomsuz virüs taşıyıcılarının yalnız küçük bir bölümünde malign tümör gelişir .

2-Primer infeksiyon-kanser çıkışı arasındaki sessizlik periyotları , kanser gelişimi için yıllar hatta dekatlar süren konakçı hücre-virüs etkileşiminin gerekli olduğunu gösterir

3-Meydana gelen tümörler tek hücreden menşei alır yani monoklonaldır .

Malign tümörlerin etyolojisinde virüslerin rolünü anlamamız açıkça bu özelliklerin yorumuna dayanır (107) .

Çeşitli HPV tipleri ve eşlik ettiği lezyonlar çeşitli kaynaklardan yararlanılarak şu şekilde özetlenebilir (1 , 3 , 12 , 13 , 16 , 18 , 21 , 22 , 26 , 31 , 33 , 35 , 43 , 50 , 51 , 53 , 55 , 64 , 65 , 68 , 74 , 78 , 82 , 83 , 85 , 86 , 90 , 96 , 98 , 100) .

Virüs Tipleri	Lezyonlar
1	Plantar ve sıradan siğiller
2	Plantar ve sıradan siğiller , Oral verrüköz karsinom
3	Düz siğiller , EV* , et işçilerinin siğilleri
4	Plantar ve sıradan siğiller

5	EV
6	Anogenital ve laringeal papillomlar , oral ve konjonktival papillomlar
7	Et işçilerinin siğilleri , oral papillomlar
8-9	EV
10	Düz siğiller , EV , Ürogenital kanser
11	Laringeal ve anogenital papillomlar , oral ve konjonktival papillomlar
12	EV
13	Oral fokal epitelial hiperplaziler
14-15	EV
16	Genital oral kanserler , kutanöz Bowen hastalığı , servikal hücre dizileri laringeal kanserler , verrüköz karsinom
17	EV , sıradan siğil
18	Anogenital kanserler , servikal hücre dizileri
19-25	EV
26	İmmün yetmezlikli hastalarda sıradan siğiller
27	Renal transplant hastasında sıradan siğiller
28-29	EV , kutanöz siğiller
30	laringeal karsinomlar
31	Servikal displaziler ve karsinomlar
32	Oral fokal epitelial hiperplazi
33	Servikal kanserler , penil intraepitelial hiperplazi
34	Bowen hastalığı
35	Servikal intraepitelial neoplazi , servikal kanserler
36	Aktinik keratoz
37	Keratoakantoma
38	Malign melanom
39	Penil Bowenoid papül , servikal kanser
40	Laringeal kanser
41	Düz siğiller
42	Vulvar papillom
43-44	Kondiloma akuminatum
45	İntraepitelial neoplazi

46-47	EV
48-50	Yayınlanmamış
51-52	İntraepitelial neoplazi
53-60	Yayınlanmamış
* Epidermodisplasia verrükiformis	

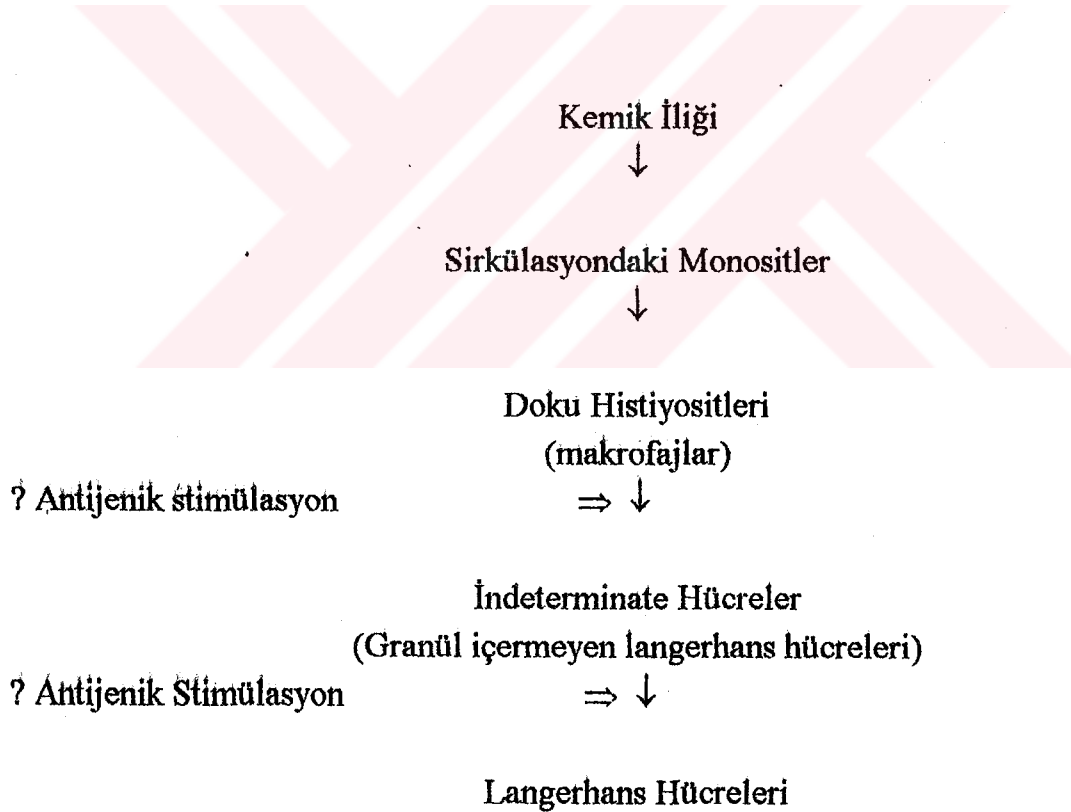
Bunların yanısıra tiplendirme yapılmaksızın HPV pozitifliği saptanan oral skuamöz papillomlardan söz edilmektedir (60,62,69) . Bazı akciğer skuamöz hücreli karsinom tanısı almış biyopsilerde HPV 18 , 16 , 11 ve 6'ya ait DNA pozitiflikleri saptanmıştır (9,72) . Yukarıda belirtilen lezyonların yanısıra paranasal sinüs ve nasal kavitedeki inverted papillomlarda HPV 6 ve 11 pozitifliği mevcuttur (92) .

Langerhans Hücreleri ve HPV Pozitif Lezyonlardaki Durumları

Paul Langerhans tarafından dentritik hücreler tanımlandıktan sonra çeşitli zamanlarda yazarlarca bu hücreler incelenmiştir . Tüm vücut boyunca dağılım gösterirler . Bir yazıda buldukları yerler şu şekilde belirtilmektedir (39) :

Stratifiye Skuamöz Epitel
 Epidermis
 Epidermal Adneksler
 Sebace bez duktusları
 Apokrin bez duktusları
 Dış taraf kıl kök kılıfı
 Gingiva
 Dil
 Yanak
 Özefagus
 Tonsil
 Nazofarenks
 Konjonktiva
 Timus
 Serviks
 Dermal Konnektif Doku
 Dermal Lenfatik Kanallar
 Lenf Bezleri

Kemik iliği orjinlidirler . Mitotik aktiviteleri mevcuttur . Bu özellikleri , radyoterapi veya steroid tedavisiyle bu hücrelerden arındırılmış epidermiste tekrar ortaya çıkışlarını kısmen açıklar . Epidermiste suprabazal yerleşim gösterirler ve dentritik yapıları epitelin yüzeyine doğru yönelir . Dentritik yapılarının sayısı değişiklik gösterir . Birçok hipersensitivif inflamatuvar deri lezyonlarında sayıları artar ve dallanmada artış gösterir . Nükleus morfolojisi hücreden hücreye değişir , sıklıkla çentiklenmiş veya oldukça büklümlüdür . Tümörlerde veya histiyositozis X vakalarında belirgin fibröz lamina gösterebilir ve büyük nükleoluslara sahip olabilirler . Sitoplazmaları çevreleyen hücrelere göre elektron luenttir ve çeşitli organellerden zengindir . Genellikle fagositik vakuolleri ve büyük lizozomları bulunmaz . Sitoplazmalarında orta sayıda mitokondri , sıklıkla belirgin Golgi aparatları , kısa granüler endoplazmik retikulum , birkaç küçük lizozom , değişen sayıda çubuk veya raket şekilli langerhans hücre granülleri saptanır . Langerhans hücrelerinin meydana gelişi tablo halinde şu şekilde özetlenmektedir (39) :



Langerhans hücrelerinin özetle immünolojik fonksiyonları şu şekildedir :

T lenfositlere antijenleri sunar

Allojenik , sinjenik mikst lokosit reaksiyonlarını stimüle eder

İnterlökin-1 sekrete eder

Sitotoksik T lenfositlerin meydana gelişinde yardımcı hücrelerdir

Kutanöz hipersensitivite reaksiyonlarının ortaya çıkışında allerjen bağlayan hücrelerdir

Hipersensitivite reaksiyonlarında oluşan immün komplekslerin hedef hücreleridir

AIDS'da sitotoksik T lenfositler için mümkün hedef hücrelerdir .

Langerhans hücreleri parafin bloklara gömülüp 4-6 µm. kalınlıkta kesilmiş ve hematóksilen eosin ile boyanmış lamlarda görülmez . Bununla beraber birçok spesifik tekniklerden birini kullanarak saptanabilir (39) . S 100 protein yanısıra NA 1/34 (human timosit antijen) kullanımıyla langerhans hücrelerinde yüzey T6 (CD1) antijen boyama , skuamöz epitelde bu hücrelerin saptanmasında en önemli yöntemlerden biridir (40) . OKT 6 ve S 100 antijenlerin immünohistokimyasal saptanmasına dayanan bir incelemede parafine gömülü kesitlerle formalin-kalsiyumda fixe edilmiş frozen kesitlerdeki S 100 pozitif langerhans hücre sayıları arasında önemli fark olmadığı istatistiksel olarak saptandı (61) . Bu sonuç , bizim vakalara ait parafin kesitler için langerhans hücre saptama metodu olarak S 100 immunohistokimyasal boyama tekniğinin daha uygun olacağını destekler .

Larinks lezyonlarının tipi , HPV DNA pozitifliği ile langerhans hücresi kantitatif değerleri arasındaki ilişki pek incelenmemiş , daha çok serviks lezyonlarında araştırma konusu olmuştur (7,17,40,63,66,95,102) . HPV pozitifliğinin eşlik ettiği servikal intraepitelyal neoplazilerde (CIN) lezyon şiddeti arttıkça langerhans hücre sayısının azaldığı (7,40,102) , bazı yayınlarda ise HPV pozitif dokularda bu azalışa ek olarak CIN şiddeti arttıkça bu sayının arttığı (63,66) , tam tersine HPV pozitifliğinin saptanmadığı CIN'lerde çevre normal epitele göre lezyonlarda lezyonların şiddetiyle bu hücrelerin arttığı , hatta bu hücrelerdeki dentritik dallanmalarının arttığı saptandı (17) . HPV pozitif CIN vakalarında langerhans hücre artışının belirlendiği yayında sebep olarak malign transformasyonla ilişkili neoantijenlere karşı yönelmiş spesifik immün cevap düşünülür (63) .

Bir çalışmada bu hücreler T6 ve S 100 yanısıra ATPase , MHC Class 2 açısından incelenmiştir . HPV infeksiyonu ve CIN'de T6 ATPase veya MHC Class 2 pozitif

langerhans hücre sayılarının normal alanlara göre % 60 oranında azaldığı , fakat S 100 pozitif hücrelerin hemen hemen tamamen azaldığı saptanmıştır . Bu bulgular servikal epitelde farklı grup langerhans hücrelerin olduğunu akla getirmiştir . Bu bilgiler ışığında özellikle selektif S 100 pozitif subgruptaki azalış olmak üzere tüm langerhans hücrelerindeki azalış HPV infeksiyonu ve CIN'ye karşı hücre sel immün cevabı , immün savunmayı bozan lokal immün yetmezliğe sebep olabileceğini düşündürmüştür . S 100 proteinin kesin fonksiyonel rolü açık olmamasına rağmen , S 100 pozitif langerhans hücrelerinin bu protein sayesinde T hücresi intrasellüler serbest kalsiyum iyon konsantrasyonunu değiştirerek T hücresinin antijene olan cevabını aktive ettiği ve düzenlediği muhtemeldir . S 100 protein yetersizliğinin servikste ki HPV'nün replikasyonuna ve neoplastik gelişime izin veren kazanılmış immün yetmezliğe sebep olabileceği de belirtilmektedir (95) .

S 100 ve T 6 pozitif langerhans hücrelerinin saptanmasına dayanan çalışmalarda bu hücrelerdeki azalışın özellikle yüksek riskli olan tip 16 , 18 olmak üzere HPV subtipleriyle (7,40) ve virüs kopya sayılarıyla ilişkili olabileceğini göstermektedir . Buradaki T 6 (+) hücre azalmasının yorumu ya gerçek bir azalış ya da HPV'nün hücrelerdeki yüzey antijenlerini değiştirmesi , bloke etmesi şeklindedir (40) . Bazı çalışmalarda ise düşük ve yüksek riskli HPV subtipleri arasında immünolojik belirleyicilerde farklılık saptanmamıştır (102) .

HPV pozitifliğinin yanısıra sigara içiminin (7) , radyoterapi ve steroid tedavisinin (39) de langerhans hücre azalışında etken olduğu belirtilmektedir .

Materyal - Metod :

Çalışmada 1994 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gelen tüm larinks insizyonel ve eksizyonel biyopsi materyallerinin lamları retrospektif olarak tekrar incelendi . Bu hastaların 1994 yılından önceki ve sonraki biyopsileri araştırıldı . Hastaları klinik bilgileri incelendi . Sigara ve alkol kullanımı , meslekleri konusundaki bilgileri eksik olan , lam ve parafin blokları çalışma için uygun olmayan vakalar çalışmadan çıkarıldı . HPV DNA taramasında kullanılacak In Situ Hibridizasyon kitlerinin sınırlı olmasından dolayı çalışma grubuna alınan vaka sayısı azaltıldı . Çalışma grubundaki vakaların biyopsi numaraları Ek'te görülmektedir . Çalışmaya alınmış olan vakaların tüm lamlarındaki lezyonlara komşu sağlam alanlar HPV infeksiyonunda beklenen koilositotik değişiklikler (55) yanısıra diskeratotik ve binükleer yassı epitel hücreler açısından tek tek incelendi . Bu histopatolojik bulgular '+ : aramakla zor bulunan , ++ : bazı alanlarda kısmen saptanan , +++ : hemen hemen tüm alanlarda saptanabilen ' olarak sınıflandırıldı . Bir yazıda belirtildiği gibi çalışılacak örneklerde karsinom veya diğer lezyonlarla tutulmamış yüzey epitelinin mevcut olmayışı HPV pozitifliğini belki olduğundan daha düşük oranda saptanmasına neden olacaktır (42) . Bu nedenle incelemek üzere vakalara ait koilositotik değişikliklerin saptandığı lamlardan bu değişikliklerin daha bol olduğu , geniş olarak lezyon ve sağlam yüzey epitel alanlarına sahip lamların parafine gömülü doku blokları seçildi . Bu dokularda HPV arandı .

Dokularda HPV saptamada kapsid proteini tespitine dayanan immünohistokimyasal metod yanısıra DNA veya RNA saptamaya dayanan In Situ Hibridizasyon (ISH) (89,99) , Southern Blot Hibridizasyon , Polimerase Chain Reaction (PCR) metodları (72,85) ve direkt virüsü saptamaya dayanan elektron mikroskopik inceleme kullanılmaktadır . İmmünohistokimyasal metodla inceleme diğerlerine göre daha ucuzdur . Ancak malign lezyonlarda virüs DNA'sı konakçı hücre DNA'sına entegre olduğundan (13,81,83) , ekstrakromazomal ne virüs ne de kapsid proteini bulunmaktadır . Bu nedenle diğer metodlara göre immünohistokimyasal metodla yanlış negatif değerler elde edilebilmektedir (31,67,100) . Bunu destekleyen çalışmalar dikkat çekicidir (59,94) . Diğer Southern Blotting , Dot Blotting , PCR gibi yöntemler ISH'a göre daha sensitif olmasına rağmen (72) bu metodlarda ISH'daki gibi morfolojik bütünlük yoktur (57) . ISH , sitolojik preparatlara olduğu gibi (36) , parafine gömülmüş doku kesitlerine , frozen kesitlere uygulanabilmektedir . DNA-DNA , DNA-RNA , RNA-RNA hibritleştirme

esasına dayanmaktadır . Bu metodla biotinle , digoxigeninle , fluoresceinle , trityumla veya 35S'le işaretlenmiş DNA problemlerinin kullanımı söz konusudur . Biotinle ve digoxigeninle işaretli problemleri radyoizotop bağlı problemlere göre araştırıcının sağlığına zararsız , ekonomik , hızlı sonuç vermesi ile daha kullanışlıdır (57) . Biotinle ve 35S'le işaretli HPV DNA problemlerinin kullandığı bir çalışmada biotinle işaretli problemler kullandığı ISH metodunun 35S'le işaretli olandan daha sensitif olduğu belirtilmektedir (93) . Hücre içinde biotin olabileceği , bu nedenle biotin bağlı problemler yanlış pozitif sonuç verebileceğinden de söz edilmektedir . Bu durumda HPV saptamada digoxigenin bağlı DNA problemlerinin kullandığı ISH metodu en uygunu olacaktır .

Kreatech Ultra Digoxigenin Kü'inde HPV DNA In Situ Hybridization Protokolü :

1- Parafine gömülü dokuların her birinden 4-6µm. kalınlıklarda 2'er kesit alınarak 56°C'a ısıtılmış distile suya kondu . Bu tür metodlarda önemli problemlerden biri , işlemler sırasında doku kesitlerinin tamamen veya kısmen lamdan düşmesidir (76) . Sonra organosilan kaplı hazır lamaların (Krea Tech Kat No SP-0010-OCGS) üzerine negatif ve pozitif kontrol olarak alındı .

2- Hazırlanmış kesitler 56°C'a ısıtılmış etüvde bir gece bekletildi (bu aşamadan sonra hazırlanmış olan lamalar istenirse 3 ay oda sıcaklığında saklanarak daha sonraki aşamalara devam edilebilir) .

3- Lamalar 3 kez 15'er dakika xylol içinde bekletildi . Ardından sırayla %96 , %85 ve %70'lik etanoller içinden geçirilerek hidrate edildi .

4- %09'lük izotonik NaCl çözeltisinde 9,076 gr. Na₂HPO₄ ve 2,48 gr. KH₂PO₄ eritilerek pH'ı 7,2 olan PBS (fosfatlı tampon solusyonu) hazırlandı . Lamalar şale içinde PBS'de 3 dakika kadar yıkandı .

5- Pan HPV Screening System'de (Krea Tech Kat No AS-4020 pHPV) bulunan digestion reagent'in (Krea Tech Kat No DK/UK/FS/HS/AS-01) tamamı 37°C'a ısıtılmış 5 ml. 0,01N HCl içinde eritildi (elde edilen solusyon kullanılmayacaksa -20°C ile -50°C arasında saklanabilir) . Bu solusyon tekrar 37°C'a ısıtılmış 0,01 N HCl ile 1/80 oranında dilüe edildi (bu oran sitolojik örneklerde 1/20.000 , frozen kesitlerde 1/40.000'dir) . Lamalar , tabanına az miktarda distile su konmuş siyah inkübasyon tepsisine (Krea Tech Kat No SP-0001-TRAY) yerleştirildi . Lamaların yüzeyini kaplayacak şekilde üzerine 37°C'a ısıtılmış bu solusyon damlatıldı . Inkübasyon tepsi 37°C'a ısıtılmış etüvde 30 dakika

tutuldu . Böylece bu aşamada , ileride kullanılacak olan DNA Probu'nun nükleusa girmesini sağlayacak olan nükleus membranı parçalanması sağlanmış oldu .

6- Sırayla % 70 , % 85 ve % 96'lık etanollerden geçirilerek dehidrate edildi . Havada kurutuldu .

7-Pre-Hibridizasyon aşamasında herbir lamel üzerine 10 µl. 'Hybridisation mixture (Krea Tech Kat No DK/UK/FS/HS/AS-02) damlatıldı . Kesitlerin bulunduğu lamalar lameller üzerine kapatıldı . İnkübasyon tepsisinde 37 °C'ta 30 dakika inkübe edildi

8-Lamlar PBS solusyonuna batırılıp çıkarılarak lamellerin düşmesi sağlandı . PBS içinde 2 kez 3'er dakika yıkandı . Sırayla % 70 , % 85 , % 96'lık etanollerden geçirilerek dehidrate edildi ve havada kurutuldu .

9-Paralel çalışılan numuneler için herbir lamel üzerine 10 µl. pozitif (Krea Tech Kat No AP 4010 pHPV) ve negatif (Krea Tech Kat No PLB 043) DNA prob'ları damlatıldı . Lamin beyaza boyanmış kenarına yakın alana pozitif , diğer kenara negatif olan gelecek şekilde lameller üzerine lam kapatıldı .

Denatürasyon aşamasında önceden 90-95 °C'a (90-100°C'ta olabilir) ısıtılmış olan hot plate (Krea Tech Kat No KI-0007-HOTP) üzerinde 2 dakika bekletildi . Bu aşamada problemlerin örneklerdeki karşıtı olan uygun DNA'lara bağlanması başlatılmış olur .

Hibridizasyon aşamasında lamalar inkübasyon tepsisine alınarak nemli ortamda 37 °C'ta 16 saat inkübe edildi .

10-Yıkama aşamasında lamalar şale içindeki PBS solusyonuna batırılıp çıkarılarak lamellerin ayrılması sağlandı .

5 ml. konsantre Washing Buffer (Krea Tech Kat No DK/UK/FS/HS/AS-05) , 795 ml. distile su ve 200 ml. formamid (Krea Tech Kat No SP 0031) karışımından oluşan yıkama solusyonu hazırlandı . (Smear ve frozen kesitler için bu solusyonun 400 ml. formamid , 595 ml. distile su ve 5 ml. konsantre washing buffer karışımından yapılması önerilmektedir . Hazırlanan tüm bu yıkama solusyonları oda sıcaklığında 1 hafta süresince kullanılmak üzere saklanabilir .) Lamlar şale içinde hazırlanmış olan 37°C sıcaklığındaki yıkama solusyonunda 3 kez 10'ar dakika bekletilerek yıkandı . Böylece hatalı HPV DNA prob bağlanmaları önlenmiş oldu . Daha sonra lamalar 2 kez 2'er dakika şale içinde PBS solusyonunda yıkandı .

11-Blocking aşamasında herbir kesit üzerine 100 µl. blocking solution (Krea Tech Kat No DK/UK-06) konup 10 dakika bekletildi .

12-Anti Dig-AP bağlama aşamasında 1/500 oranında blocking solution ile dilüe edilmiş Fab anti Dig-Alk. Ph-ase (Krea Tech Kat No DS-dOAP-05/UK-08) ilave edilerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi . Şale içinde PBS'le 3 kez 3'er dakika yıkandı .

13-Presoaking aşamasında kesitler üzerine 100 µl. staining buffer (Krea Tech Kat No DS-OAP/SAP-02) ilave edilerek oda sıcaklığında 3 dakika beklendi .

14-Boyama aşamasında ışık almayan küçük şişe içinde Dye solution taze olarak hazırlandı . Bunun için NBT(Nitro Blue Tetrazolium) solusyonu (Krea Tech Kat No DS-OAP/SAP-3a) 1/100 oranında ve yine BCIP(5-Bromo 4-Chloro Indolyphosphate) solusyonu (Krea Tech Kat No DS-OAP/SAP-3b) 1/100 oranında aynı staining buffer içerisinde dilüe edildi . Siyah renkli inkübasyon tepsisine alınan kesitler üzerine bu solusyon ilave edilerek karanlıkta 37°C'de etüvde inkübe edildi . 15 dakika sonra 5'er dakika aralıklarla ışık mikroskopuyla renklenme kontrol edildi ve renklenme oluştuğunda inkübasyona son verildi . Bu aşamada inkübasyon 2 saati aşmamalıdır . Bu süreyi aştığında zemin boyanması olmaktadır .

15-Boyamanın durdurulması aşamasında şalede 1/500 oranında distile su ile dilüe edilmiş stop buffer (Krea Tech Kat No DS-OAP-04) içinde 5 dakika bekletildi . Sonra distile suyla yıkandı .

16-Zemin boyama aşamasında counterstain Fast Red (Krea Tech Kat No DK/UK-13) kesitlere ilave edildi . 2 dakika beklendikten sonra distile su ile yıkandı ve havada kurutuldu .

17-Çam reçinesi damlatılarak lamelle kapatıldı . Işık mikroskopunda değerlendirildi .

Bu yöntemde değerlendirme aşamasında bir hücre nükleusunda dahi boyanmanın saptanması pozitif boyanma olarak değerlendirilmektedir (99) . Bu yöntemle özellikle lökositler olmak üzere apoptotik hücrelerde yanlış pozitif boyanma olabilmektedir . Bazı yazılarda fibroblastlarda ve makrofajlarda da HPV DNA saptanmasına (100) rağmen bizim çalışmada sadece bir vakaya ait kesitte böyle şüpheli boyanma saptandı . Ancak sadece epitelyal alanlarda saptanan boyanmalar pozitif boyanma kabul edildi . Hatalı zemin boyanması kullanılan PBS ph'nun asidik veya daha bazik olması , hazırlanan boyama solusyonunun ışık alması veya boyama aşamasında sürenin 2 saati aşması nedeniyle meydana gelmektedir .

3 vakaya ait ISH boyanmış preparatlarda lamel kapatılırken yapılan teknik hata nedeniyle istenmeyen flu görünüm mevcuttu . Bu lamel önerildiği gibi şalede ph'ı 7,2

olan PBS'a konup 30 dakika beklendi . Daha sonra yukarıda anlatılmış olduğu gibi hazırlanan % 20'lik yıkama solusyonuna kondu . Tekrar PBS'te yıkanarak havada kurutuldu ve çam reçinesi damlatılarak lamelle kapatıldı .

ISH ile boyanan preparatlarda sağlam ve lezyonların bulunduğu epitelyal alanlar tamamen tarandı . Normal , atipik , malign görünümdeki epitel hücrelerinin nükleuslarında saptanan ince granüler mavi boyanmalar pozitif olarak kabul edilip , sağlam ve lezyona ait epitelyal alanlar olarak pozitif hücreler sayıldı .

Seçilmiş olan bu parafin bloklardan tekrar 4 µm. kalınlıkta kesitler lamalar üzerine negatif ve pozitif kontrol olarak alınıp , Langerhans hücresi taramak üzere S 100 immünohistokimyasal boyama kitiyle boyandı . Bunun için DAKO S 100 immünohistokimya boyama protokolü uygulandı .

DAKO S 100 İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü :

1-Poly-L Lysine (Sigma Kat No P 8920) ile kaplanmış lamalar üzerine alınmış kesitler 45°C'ye ısıtılmış etüvde 1 saat tutularak deparafinize edilmeye başlandı .

2-Deparafinizasyon işleminde kesitler iki kez 5'er dakika ksilene kondu . Daha sonra sırasıyla 2 kez 3'er dakika saf alkollerde , 2kez 3'er dakika % 95'lik alkollerde ,30 saniye distile suda tutularak rehidrate edildi .

3-Proteolitik Predigestion aşamasında şalede 80 mg. Tripsin (Merck Kat No 8214) yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan 80 ml. PBS içinde eritildi . Lamalar oda sıcaklığında bu şale içinde 6 dakika tutuldu .

4-Lamalar şale içinde distile suya kondu . Boyama işlemi başlatıldı .

5-Fazla süyu alınan ve etrafı dikkatlice silinen kesitler metanolle hazırlanan % 3'lük H₂O₂ solusyonuna alındı , 5 dakika inkübe edildi . PBS'da yıkandı .

6-Blocking Reagent aşamasında lamalardaki fazla PBS alınıp kesitlerin etrafı dikkatlice silindi . Kesitlerin etrafı DAKO pen (DAKO Code No S 2002) ile çerçeveslendi . Kesitlere mavi renkli blocking reagent (DAKO Code No K 0681) yeteri kadar damlatıldı . 5 dakika inkübe edildi .

7-Primer antikor ve negatif kontrol maddesi damlatılması aşamasında lamalar yıkanmaksızın fazla blocking reagent dökülüp kesitlerin etrafı dikkatlice silindi . Aynı kesitler üzerine primer antikor ve negatif kontrol şişelerinden (DAKO Code No N 1573) birer damla damlatıldı . 10 dakika inkübe edildi . PBS ile şalede yıkandı .

8-Link damlatılması aşamasında fazla PBS akıtıldıktan sonra kesitlerin etrafı dikkatlice silindi . Kesitlerin üzerine sarı renkli link solusyonundan (DAKO Code No K 0681) damlatıldı . 10 dakika inkübe edildi . PBS ile şale içinde yıkandı .

9-Streptavidin peroksidaz aşamasında fazla PBS akıtıldıktan sonra kesitlerin etrafı dikkatlice silindi . 4 ml. Streptavidin Buffer Diluent (DAKO Code No K 0681) içine 1 damla Streptavidin Concentrate (DAKO Code No K 0681) eklenerek taze hazırlanan kırmızı renkli solusyondan kesitler üzerine damlatıldı . 10 dakika inkübe edildi . PBS ile şale içinde yıkandı .

10-Substrat kromojen solusyonu damlatılması aşamasında fazla PBS akıtılıp kesitlerin etrafı silindi . 5 ml. PBS 'te 1/2 DAB(Diaminobenzidine) tableti (DAKO Code No S 3000) eritilerek ve üzerine distile suyla hazırlanmış % 3'lük 40 µl. H₂O₂ damlatılarak hazırlanmış solusyondan ilave edildi . 5 dakikka beklendi . Şale içinde distile suyla yıkandı .

11-Zıt boyama aşamasında lamalar şalede hematoksilen boyası içine 3-4 kez daldırıldı . Daha sonra şalede 200 µl. 15 M NH₄OH ile 80 ml. distile sudan hazırlanan amonyum suyuna 10 kez daldırıldı . Şale içinde distile suda 2 dakika bekletildi .

12-Alkollerden geçirilerek dehidrate edildi . Ksilenlerden geçirildikten sonra Kanada balzamu damlatılarak lamelle kapatıldı .

Bu boyamada bazı lamalar flu olması nedeniyle ksilende tekrar açıldıktan sonra geriye doğru alkollerden geçirildikten sonra tekrar alkollerde dehidrate edilip , ksilenden geçirilerek Kanada balzamuyla kapatıldı .

Boyanan tüm lamalarda sağlam ve lezyona ait epitelyal alanlardaki S 100 pozitif dentritik langerhans hücreleri büyük büyütmeyle (x40 objektif ile) sayıldı . Alanların genişliğine göre 3-10 alan değerlendirilerek ortalama bir büyük büyütme alanına düşen langerhans hücreleri sayısal olarak değerlendirildi . Sağlam ve lezyon bölgerindeki hesaplanmış olan bu değerler tanı ve HPV DNA pozitiflikleri de göz önüne alınarak birbiriyle karşılaştırıldı

BULGULAR :

1994 yılında Anabilim Dalımızda tanı konulan laringeal lezyonlarla ilişkili vaka sayımız 67'dir . Bu hastaların 3'ü (% 4,5) kadın , 64'ü (% 95,5) erkektir . 1 hastanın yaşı klinik olarak bildirilmemiş olmasına rağmen diğer hastaların yaşları 19 ile 75 arasında değişmektedir . Bilinenlere ait yaş ortalaması $51,3 \pm 12,3$ saptanmıştır . Bu hastaların 22'i (% 32,84) iyi differansiye epidermoid karsinom , 6'ı (% 8,96) orta derece differansiye epidermoid karsinom , 2'i (% 2,99) az differansiye epidermoid karsinom , 3'ü (% 4,48) differansiyasyonu saptanamayan epidermoid karsinom , 6'ı (% 8,96) papillom , 5'i (% 7,46) polip , 15'i (% 22,38) laringeal nodül , 3'ü (% 4,48) keratozis ve bulguları , 2'i (% 2,99) displazi , 1'i (% 1,49) displazi ve papillom , 1'i (% 1,49) orta derece differansiye epidermoid karsinom ve laringeal nodül , 1'i (% 1,49) leiomyosarkomdur .

Çalışma grubuna materyel-metodta belirtilen şartlar nedeniyle 23 olgu alınabildi . Bunların hepsi erkekti . % 13,04'ü papillom (Resim 1) , % 13,04'ü laringeal nodül (Resim 2) , % 4,34'ü polip , % 4,34'ü laringeal nodül ve orta derece differansiye epidermoid karsinom , % 8,68'i keratozis bulguları (Resim 3) , % 4,34'ü displazi (Resim 4) , % 4,34'ü az differansiye epidermoid karsinom , % 17,39'ü orta derece differansiye epidermoid karsinom , % 30,43'i iyi differansiye epidermoid karsinomdu (Resim 5) (Tablo 1) .

Tablo 1. Çalışmaya alınan olguların dağılımı

Lezyonlar	Olgu Sayısı	%
Polip	1	4,35
laringeal nodül	3	13,04
Keratozis bulguları	2	8,7
Papillom	3	13,04
Displazi	1	4,35
Laringeal nodül ve orta der. diff. epid. karsinom	1	4,35
Az differansiye epidermoid karsinom	1	4,35
Orta derece differansiye epidermoid karsinom	4	17,39
İyi differansiye epidermoid karsinom	7	30,43
Toplam	23	100

Çalışmaya alınan olguların tanılara göre yaş dağılımları uç değerler olarak aşağıdaki gibi değişim göstermekteydi .

Tablo 2 . Olguların tanılara göre yaş dağılımları .

Tanı	Yaş
Polip	55 (n:1)
Laringeal nodül	36-46 (n:3)
Keratozis bulguları	51-60 (n:2)
Papillom	23-73 (n:3)
Displazi	44 (n:1)
Az differansiye epidermoid karsinom	65 (n:1)
Orta derece differansiye epidermoid karsinom	50-62 (n:4)
İyi differansiye epidermoid karsinom	39-75 (n:7)
Lar. nod. , orta der. diff. epidermoid. karsinom	54 (n:1)
Toplam	(23)

Olguların alışkanlıkları incelendiğinde 2 papillom ve 1 laringeal nodül tanılı olguların sigara içmedikleri diğer tüm olguların 1-3 paket/gün sigara içtiği saptandı (Tablo 3) . Sigara kullanımıyla tanılar arasında Fisher kesin κ^2 testinde anlamlı ilişki saptanamadı .

Tablo 3. Olguların tanılara göre sigara içme alışkanlıkları .

Tanı	Sigara kullanan	Sigara kullanmayan	Günlük sigara miktarı (paket) uç değerleri	Sigara içim süresi (yıl) uç değerleri
Polip	1	0	1	40
Laringeal nodül	2	1	1-1,5	20
Keratozis bulguları	2	0	1-2,5	20-40
Papillom	1	2	2	30
Displazi	1	0	1	20
Lar. nod., or. dif. epi. kars.	1	0	1	35
Az diff. epid. kars.	1	0	1	40
Orta der. diff. epid. kars.	4	0	2-3	30-40
İyi diff. epid. kars.	7	0	1-1,5	20-50

Olguların alkol kullanma alışkanlıkları incelendiğinde polip , papillom , laringeal nodül , orta derece differansiye epidermoid karsinom ve laringeal karsinom , epidermoid karsinom tanısı almış olanların hiçbirinin alkol kullanmadığı dikkati çekti . Bunun

yanısıra displazi ve keratozis bulgularına sahip olanların hepsi alkol kullanmaktaydı . İyi differansiye ve az differansiye epidermoid karsinom tanılılar değişik derecelerde alkol kullanmış veya kullanmaktaydı (Tablo 4) . Fisher kesin χ^2 testinde alkol kullanımıyla tanılar arasında anlamlı ilişki saptanamadı .

Tablo 4. Olguların alkol kullanma alışkanlıkları .

Tanı	Kullanan	Arasına kullanan	Daha önce kullanan	Kullanmamış
Polip				1
Laringeal nodül				3
Keratozis bulguları	2			
Papillom				3
Displazi	1			
Lar. nod. , ort.der.diff.epider. kars.				1
Az diff. epider. kars.		1		
Orta derece diff. epider. kars.			1	3
İyi diff. epider. kars.	2	2	1	2
Toplam	5	3	2	13

Tanılara meslek gruplarının dağılımı incelendiğinde karsinomlarda değişik meslek grupları saptanmasına rağmen çiftçi meslek grubu biraz daha fazladır (Tablo 5) .

Tablo 5. Tanıların meslek gruplarına dağılımı .

Tanı	Çiftçi	Öğretmen	Memur	İşçi	Emekli	İşsiz	Bilinmeyen
Polip	1						
Papillom	1			1		1	
Lar. nod.	1	2					
Keratozis	1		1				
Displazi	1						
Lar. nod. ,epid. kars.					1		
Az diff. epid. kars.	1						
Orta diff. epid. kars.	2		1		1		
İyi diff. epid. kars.	4			1	1		1

Tanılara göre lezyonların yerleşim alanları incelendiğinde laringeal nodüllerin glottik bölgede yerleştiği saptandı . Çalışmaya alınmamış vakalar da gözönüne alındığında papillom lokalizasyonlarının farklı laringeal bölgelerde olmakla beraber glottik bölgede yoğunlaştığı dikkat çekmekteydi (Tablo 6) .

Tablo 6. Vakaların tanılara göre topografik dağılımı .

Tanı	Lar.far.	Supr.glott.	Glott.	Subglott.	Tr.glott.
Laringeal nodül			3		
Papillom			3		
Polip			1		
Keratozis			2		
Displazi			1		
İyi diff. epid. kars.		2	1	1	3
Orta diff. epid. kars.			1	1	2
Az diff. epid. kars.					1
Lar. nod.,or.de.dif. ep. kars.	1				

Tanılarla birlikte sağlam epitelyal alanlardaki koilositozis , tek hücre diskeratozisi ve binükleozis (Resim 6,7,8) tarzındaki hücrel değişiklikler incelendiğinde laringeal nodül tanılılarda bu değişiklikler hiç saptanmadı veya şüpheli pozitiflikler saptandı . Papillomlarda ise tüm vakalarda belirgin koilositotik hücreler saptanırken diğer değişiklikler daha silikti . Keratozis olgularından birinde koilositozis çok belirgindi . Epidermoid karsinom vakalarında bu değişiklikler kantitatif olarak daha geniş dağılım göstermekteydi . Tüm vakalarda In Situ Hibridizasyon tekniği ile HPV DNA pozitif epitelyal hücre nükleusları (Resim 9,10,11,12) saptanmaya çalışıldı .

Şüpheli değerler olarak kabul edilen + koilositozis bulguları negatif koilositozis grubuna dahil edildikten sonra yapılan kıkare (κ^2) testinde HPV DNA pozitif değerlerle koilositozis arasında anlamlı beraberlik tespit edildi ($p=0,02$) . Oysa diskeratozis ($p=0,32$) ve binükleasyon ($p=0,28$) değerleriyle yapılan Fisher kesin κ^2 testinde HPV DNA pozitifliğiyle olan ilişki anlamlı değildi .

Tablo 7. Tanılara göre saptanan histolojik değişiklikler ve HPV DNA pozitiflikleri

Tanı	+	+	+	*	*	*	0	0	0	Sağlam epidermiste HPV DNA pozitifliği	Lezyondaki epitelyal hücrelerde HPV DNA pozitifliği
Polip	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Laringeal nodül	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Keratozis bulguları	1	0	1	2	0	0	1	0	0	0	1
Papillom	0	3	0	1	1	0	1	0	0	0	2
Displazi	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Lar. nod.,ort.der.dif.ep. kars.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Az diff. epid. karsinom	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Ort. diff. epid. karsinom	2	1	1	1	1	0	3	0	0	1	2
İyi diff. epid. karsinom	2	4	1	3	2	0	1	0	0	3	7

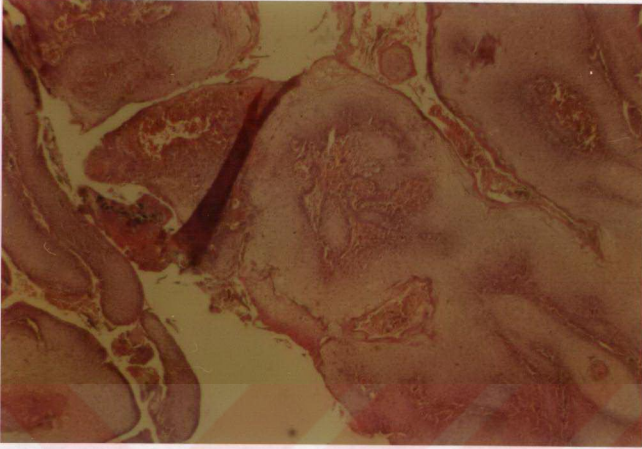
+:Koilositik değişiklik , *:Tek hücre diskeratozisi, 0:Multinükleasyon
(+:aramakla zor saptanan , ++:bazı alanlarda saptanan,+++geniş alanda saptanan)

Tanılar eşliğinde sağlam yassı epitel -lezyona ait epitel hücreleri arasındaki S-100 pozitif langerhans hücrelerin (Resim 13,14,15) kantitatif değerlerindeki değişiklikler ayrı ayrı saptandı . HPV DNA pozitiflikleriyle karşılaştırıldı . HPV DNA pozitifliğiyle birlikte sağlam yassı epitelden lezyona doğru S-100 pozitif dentritik langerhans hücrelerin azalma eğiliminde olduğu ilginçtir . Ancak bazı karsinomlarda bu azalış tersine dönmüştür . Tabloda görüldüğü gibi HPV DNA negatif lezyonlarda kantitatif hücresel değişiklik artış yönündedir (Tablo 8) . Bununla beraber istatistiksel değerlendirmede anlamlılık

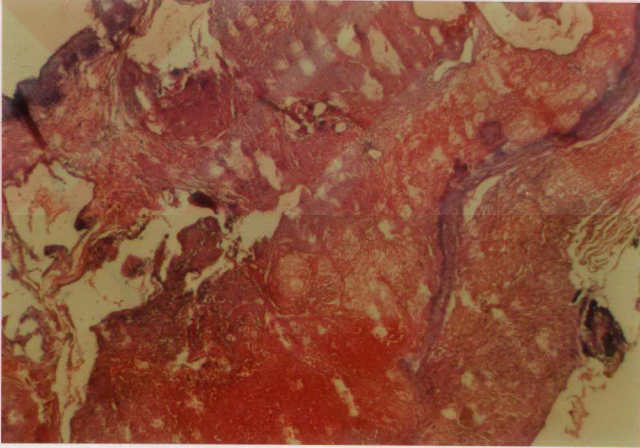
saptanamamıştır . Ancak HPV DNA pozitifliğiyle iyi differansiye epidermoid karsinomların arasında anlamlı ilişki mevcuttur ($p=0,04$).

Tablo 8. Tanılar eşliğinde HPV DNA pozitifliği ve S-100 (+) langerhans hücre sayıları.

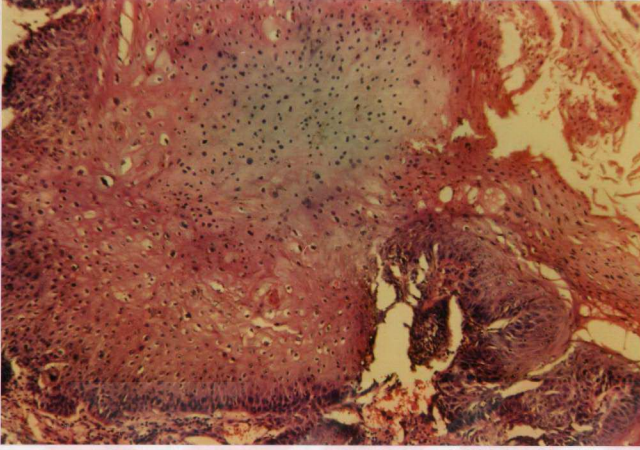
Tanı	HPV DNA pozitifliği	Sağl.epitelde lang.hüc.sayısı (ort.hüc.say./x40b.)	Lezy. ait epit. alan. lang. hüç. sayısı (ort.hüc.say./x40b.)
Polip (1019)	0	0	2,6
Laring. nod. (1234)	0	0,8	3,7
Laring. nod. (1650)	0	0	1,7
Laring. nod. (1959)	0	2	2,6
Keratozis (1400)	0	3	9
Keratozis (3895)	+	4	0,83
Papillom (198)	+	saptanamadı	0
Papillom (2537)	0 (koilositoz ++)	2	0
Papillom (3063)	+	2,6	0,8
Displazi (500)	0	0	0
Az d.ep.kar. (209)	0	0,1	1,87
Or. d.ep.kar. (941)	+	0,1	0,25
Or. d.ep.kar. (1231)	+	11,9	11,4
Or. d.ep.kar. (2649)	0	3,2	4,5
Or.d.ep.kar. (3338)	0	1,9	5,7
İy. d.ep.kar. (1003)	+	3,2	0,5
İy. d.ep.kar. (767)	+	1,4	10,12
İy. d.ep.kar. (1676)	+	4,3	2,3
İy. d.ep.kar. (1468)	+	0,1	0
İy. d.ep.kar. (2021)	+	3,9	3,5
İy. d.ep.kar. (4526)	+	0,83	6,8
İy. d.ep.kar. (4208)	+	17	2,1
Ep.kar., lar.nd.(3896)	0	1,3	9,2



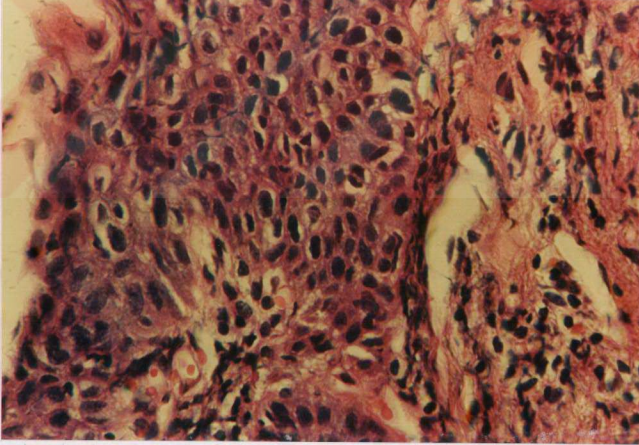
Resim 1 . Papillom . İnce fibrovasküler stromayı döşeyen papillomatöz yapılar oluşturmuş atipi içermeyen çok katlı yassı epitel izlenmekte (H+E , x10).



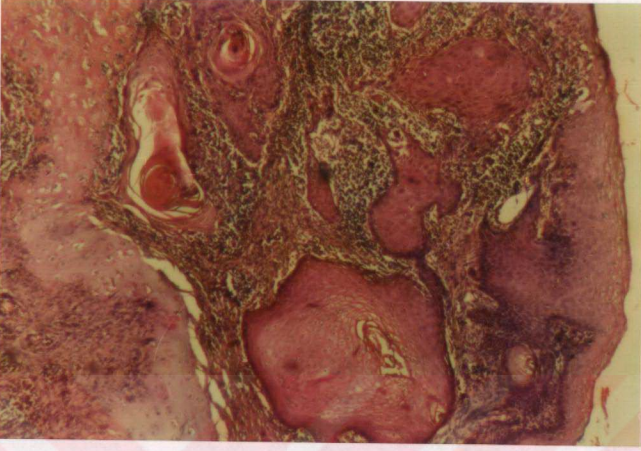
Resim 2 . Laringeal nodül . Yüzeyi incelmış çok katlı yassı epitelle örtülü . Bazı alanlarda hyalinizasyon , kanamalı alanlar , dilate kan damarları izlenmekte (H+E , x10) .



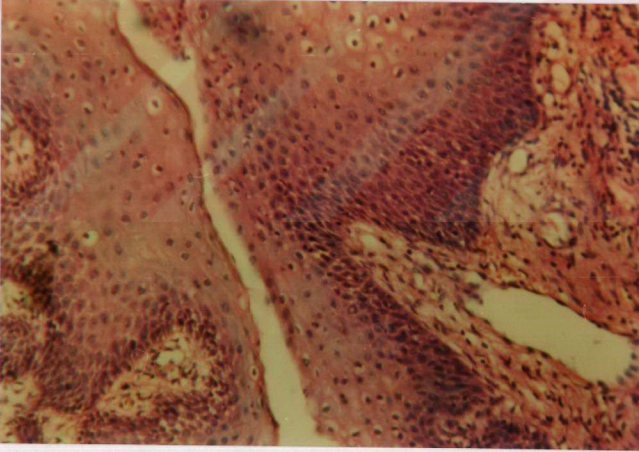
Resim 3 . Keratozis . Hiperplazi , akantozis ve parakeratozis gösteren epitelde spinöz ve yüzey epitel hücre tabakalarına doğru hücrelerde belirgin koilositotik değişiklikler , birkaç tek hücre diskeratinizasyonu izlenmektedir (H+E , x20)



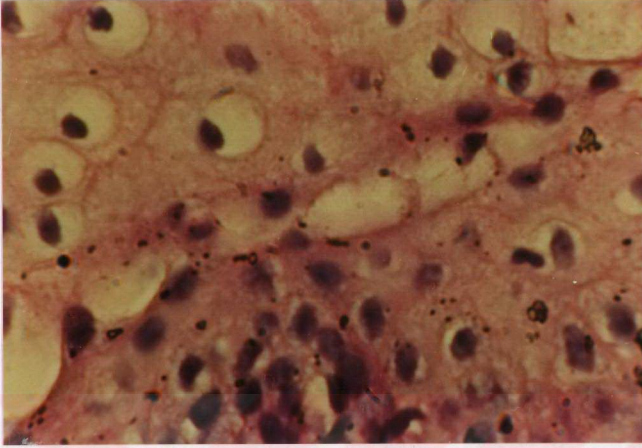
Resim 4 . Displazi . Çok katlı yassı epitel hücre nükleuslarında hiperkromazi ve sıralanmada bozulma (H+E , x110)



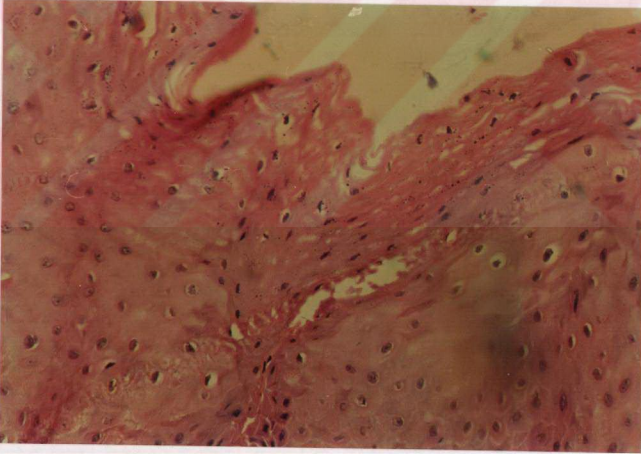
Resim 5 . İyi differansiye epidermoid karsinom (H+E , x15)



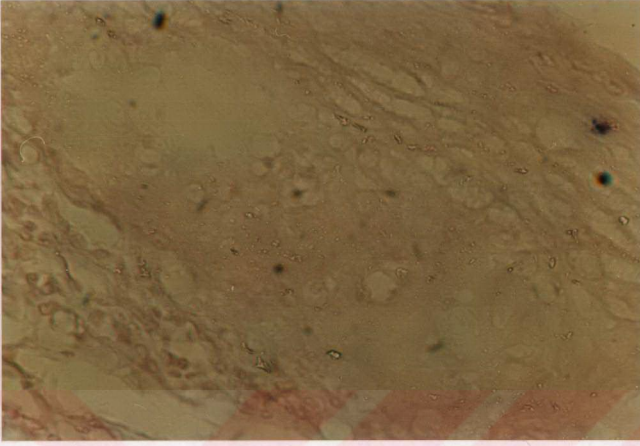
Resim 6 . Koilositozis . Spinöz ve granüler tabakalarda berrak perinükleer halolu epitel hücreleri (H+E , x40)



Resim 7 . Koilositotik epitel hücreleri (H+E , x200)



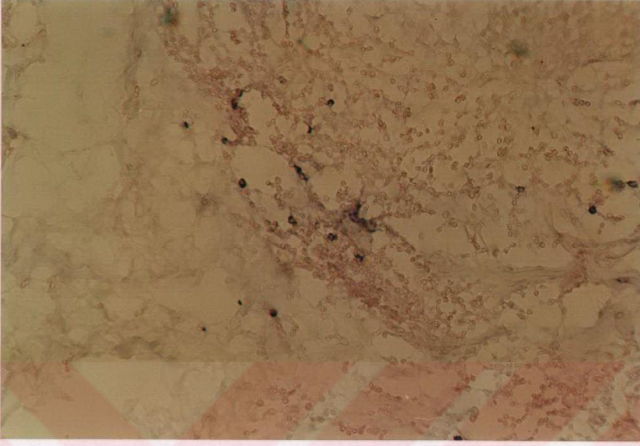
Resim 8 . Koilositozis , tek hücre keratinizasyonu , bintikleasyon gösteren epitel hücreleri (H+E , x50)



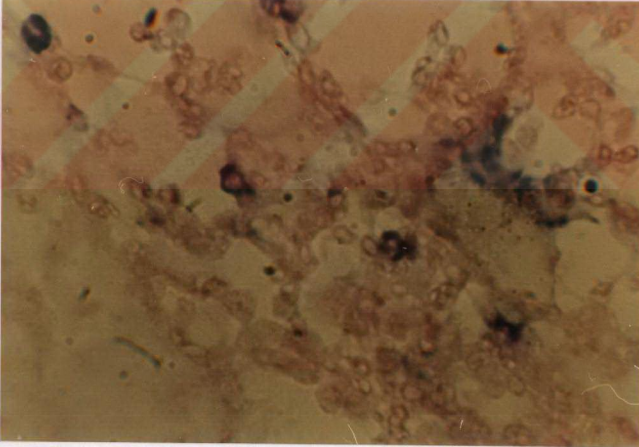
Resim 9 . Çok katlı yassı epitelde yüzeye yakın tabakada HPV DNA (+) hücre nükleusu (DNA In Situ Hibridizasyon Metodu . Counterstain olarak Fast Red kullanıldı . x100)



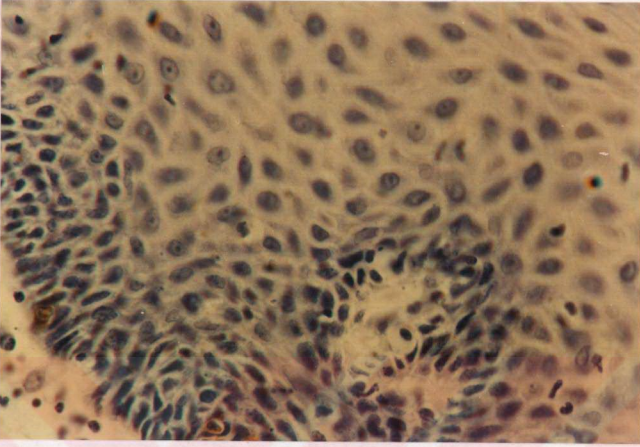
Resim 10 . Keratozis vakasında HPV DNA (+) epitelyal hücre nükleusu (DISH , Counterstain Fast Red , x200)



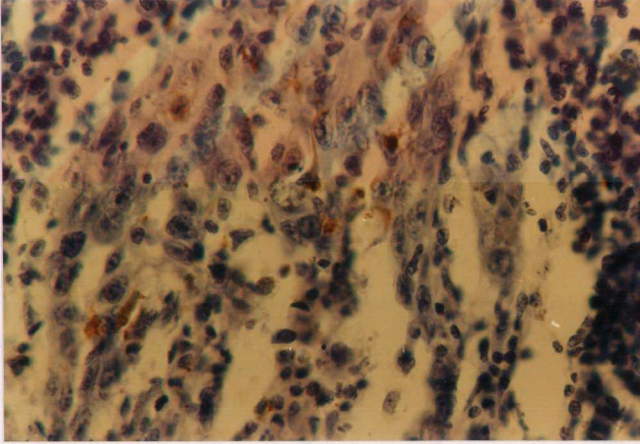
Resim 11 . Epidermoid karsinomda invazyon alanlarında birçok HPV DNA (+) malign epitelyal hücre nükleusları (DISH , Counterstain Fast Red , x50) .



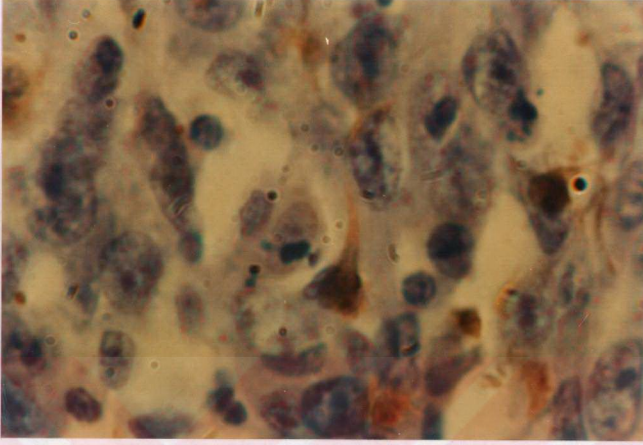
Resim 12 . Epidermoid karsinom invazyon alanlarında birçok HPV DNA (+) epitelyal hücre nükleusları (DISH , Counterstain Fast Red , x200) .



Resim 13 . Çok katlı yassı epitelde bazal , suprabazal yerleşimli S-100 (+) dentritik langerhans hücreleri (S-100 immünhistokimya , x 100)



Resim 14 . Epidermoid karsinomda malign epitel hücreleri arasında birçok S-100 (+) dentritik langerhans hücreleri (S-100 immünhistokimya , x100) .



Resim 15 . Malign epitelyal hücrelerin arasında birçok S-100 (+) dentritik langerhans hücreleri (S-100 immünhistokimya , x250) .

TARTIŞMA :

Papillomlar en sık benign laringeal tümörlerdir . Başlangıç yaşı ve morfolojik görünümüne göre juvenil ve adult olmak üzere iki tipe ayrılır (21,28,34) . Etyolojik olarak HPV pozitifliği saptanmış (21) veya saptanmaktadır . Ancak bazı çalışmalarda tekrarlayan papillomatozis vakalarında interferonla tedavinin başarı sağlamaması dolaylı olarak etyolojide HPV'ün rolünü şüpheli hale sokmaktadır (41,101) . Bizim çalışma grubuna alınmış olan vakalardan 3'ü papillomdu . Yaşları 23 ile 73 arasında değişmekteydi . Her 3'ü de vokal kord lokalizasyonlu olup , literatürlerde belirtilen lokalizasyonla (23,28,45,73,78) uyumluluk göstermekteydi . Biri hariç diğer 2 olgu biyopsilerin aralıklarla birkaç kez alınması nedeniyle nüks eden juvenil papillomlara benzerlik gösterse de (21,28,34,45,86,106) , her 3 olgu yaş , multiple olmayışı ve morfolojinin uyması nedeniyle adult papillom olarak kabul edilmelidir . Ayrıca nüks sadece juvenil papillomun özelliği değildir . HPV'le ilgili genital patolojilerde de özellikle eksizyon kenarlarında HPV'ün halen mevcut olduğu durumlarla da karşılaşılmaktadır (32)

Papillomun etyolojik olarak sigara kullanımıyla ilişkisi literatürlerde belirtilmemiş olmasına rağmen bizim olgulardan birinde sigara kullanım öyküsü mevcuttur . Hiçbirisi alkol kullanmamış veya kullanmamaktadır .

1980'in başlarında koilositozisin HPV infeksiyonunun spesifik işareti olduğu kabul edilmesiyle (55) bu konuda birçok çalışma yapılmış , koilositozisle HPV antijen birlikteliği (27) , yeni bir çalışmada özellikle atipili koilositozisle HPV DNA pozitifliğinin birlikteliği saptanmıştır (30) . Ancak koilositozisin olmayışı dokuda HPV varlığını ekarte ettirmez . Bununla beraber viral etkiye bağlı histolojik değişiklikler oranında tek hücre diskeratinizasyonundan ve binükleasyondan söz edilir (3) .

Çalışma grubumuzdaki papillom olgularında çok göze çarpıcı olmasa da özellikle epitelin spinöz ve yüzey tabakalarında belirgin koilositozis saptanmıştır . Diğer histolojik değişiklikler ise belirgin değildir .

Southern Blot tekniğinin bir varyantı olan DNA In Situ Hibridizasyon tekniğini kullanarak papillom olgularından 2'sinin parafin kesitlerinde HPV DNA (+) epitel hücre nükleuslarının mevcut olduğu saptandı . Ancak HPV DNA saptanamayan olgunun hematoksilen-eosin boyalı lamalarında koilositozis mevcuttu . Kullanmış olduğumuz DISH tekniği 50-100 kopya üzerindeki DNA dizilerini saptayabilmektedir . Bu bir olguda belki de saptayamayacağımız kadar az sayıda HPV DNA kopyası mevcuttu . Bu teknik yerine tek bir DNA dizisini saptayabilen Polymerase Chain Reaction tekniği kullanmış olsaydık belki de bu olguda da HPV DNA'ini saptayabilecektik . Bununla birlikte bu olgudaki koilositozis ve daha sonra bahsedilecek olan S-100 (+) langerhans hücre sayısındaki azalma HPV varlığını dolaylı olarak desteklemektedir . Bu sonuç papillomlarda etyoloji olarak HPV'ün düşünülebileceğini göstermesine rağmen çalışma grubumuzdaki papillom vaka sayısı az olduğundan istatistiksel anlamlılık elde edilememiştir .

Laringeal nodül , non-neoplastik ve sesin kötü kullanımıyla ilgili bir lezyon olmasına rağmen gerek negatif kontrol olarak gerekse daha objektif olarak değerlendirme yapmak için çalışma grubumuza alındı . 3 laringeal nodül olgusundan 2'si meslek grubu olarak öğretmendi . Olgularımızın 3'ünde de hem viral etkide beklenen hücresel değişikliklerin silik oluşu hem de HPV DNA tespit edilememesiyle çalışmamızın güvenilirliği desteklenmiş oldu .

Keratozis , non-keratinize skuamöz hücrelerde keratin yapımını uyaran kronik irritasyon sonucu oluşan vokal kordları ve arytenoidler arası alanı tutan , epitelde hiperplazi , parakeratozis , hiperkeratozisle karakterli lezyonlardır (34) . Etiyolojisinde sigara içiminden , sesin kötü kullanımından söz edilmektedir (78) . Çalışma grubumuzdaki böyle iki olguda lezyonda belirtilen lokalizasyonla uyumlu olarak glottik bölgede yerleşim saptanmıştı . Her ikisi de sigara kullanmaktaydı . Ancak olgu sayısı az olduğundan sigarayla ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi . Yalnız birinde viral etkide beklenen hücresel değişikliklerden koilositozis çok belirgin olup , diğer değişiklikler belirsizdi . Bu tek vakada HPV DNA (+) epitel hücre nükleusu saptandı . Bununla birlikte olgu sayısının kısıtlı oluşu nedeniyle HPV ile beraberliği istatistiksel olarak anlamlı değildir .

Displazi 3 derecede olabilen , bazal tabakanın altına invazyon bulgusu göstermeyen , hücre sıralanmasının bozulması , hiperkromazi , mitozla karakterli lezyon

olup (34) , gelişiminden HPV'ün sorumlu olacağını gösteren çalışmalar da mevcuttur (48)

Çalışma grubumuzda tek displazi olgusu mevcuttu . Derecelendirilmesi yapıldığında , hücre sıralanmasındaki bozukluğunu ve hiperkromazinin yüzey tabakalarına kadar saptanmasıyla ağır displaziye uymaktaydı . Viral etkide beklenen hücresel değişiklikler belirgin değildi . Epitel hücre nükleuslarında HPV DNA pozitifliği saptanmadı . Olgunun tek olması nedeniyle bu bulguların istatistiksel anlamı yoktur .

Larinksin skuamöz hücreli karsinomları tüm kanserlerin % 1-2'ini oluşturan , larinksin tüm malign tümörlerinin % 90'ını oluşturan tümörlerdir . İlişkili çevresel risk faktörleri ilgi odağı olmuştur . Özellikle üzerinde durulan sigara , alkol kullanımı , meslek ve radyasyondur (34,80) . Diğer faktörler olarak ayrıca laringeal keratozis ve laringeal papillomlar da belirtilmektedir (97) . HPV'ün etyolojik ajan olabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (3,12,59) . Erkeklerde ve 50-70 yaşları arasında daha sıktır (78,80) . Çalışma grubumuzdaki tüm karsinom tanılı hastalar erkekti . Yaşları 39-75 arasında değişmekteydi . Tümü sigara kullanmaktaydı . Alkol kullanımlarıyla karsinom arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı . Meslek grubu olarak vakaların yarısından fazlası çiftçiydi . Bu sonuç , karsinomlarda belirtilen riskli meslek gruplarından (80) biriyle birliktelik göstermesine rağmen istatistiksel olarak bu desteklenemedi .

Skuamöz hücreli karsinom , en sık glottik yerleşimli olup , onu sırayla supraglottik ve subglottik bölgeler izler (34,78,80) . Hastalarımıza ait piyeslerde ise daha çok transglottik olarak belirtilen iki veya daha fazla bölgede lokalizasyon dikkati çekmekteydi . Bu belki de tümörün daha ileri dönemlerinde hastaların hastaneye başvurmalarından kaynaklanmaktadır . Ancak bir vakada laringofaringeal bölge olan priform sinüste yerleşim göstermekteydi .

Skuamöz hücreli karsinomda differansiyasyon keratinizasyonun derecesiyle saptanmaktadır (88) . Hastalara ait biyopsiler değerlendirildiğinde çoğunun çok belirgin keratinizasyona , keratin incilerine sahip , spinöz-bazal hücre sıralanmasını çok iyi taklit eden iyi differansiye karsinom olduğu saptandı . Bu 7 iyi differansiye karsinom hastası içinde 3'ünün transglottik oluşu , hastaların ileri evrelerde hastaneye başvurduğunu gösteren dolaylı bulgudur . Ancak çalışma grubundaki olgu sayısı az olduğundan istatistiksel olarak bu desteklenemedi .

Larinks kanserlerinde çeşitli metodlarla yapılan HPV taramalarında , metodların hassasiyeti farklılıklar gösterdiği gösterdiği için farklı sonuçlar edilmiştir . Mehmet U. Akyol'un HPV kapsid proteinini saptayan immünhistokimyasal tekniği kullanarak yapmış olduğu tez çalışmasında epidermoid karsinomda % 12,5 , verüköz karsinomda % 20 pozitiflik saptanırken (3) , Janet L. Brandsma ve arkadaşları DNA hibridizasyon tekniği kullanarak larinks verrüköz karsinomlu 6 vakanın hepsinde HPV DNA pozitifliği elde etmiş ancak bunların hiçbirinde immünhistokimyasal olarak HPV antijeni saptamamıştır (12) . Bu , sonuçlar bakımından iki metod arasındaki farklılığı açıkça göstermektedir. HPV antijeninin saptanamaması , olgularda HPV bulunmadığı anlamına gelmemektedir . Bununla beraber DNA kopya sayısının 10'dan daha az olduğu zamanlarda DNA ISH tekniği HPV DNA'ini saptayamamaktadır . Bu gibi durumlarda DNA kopya sayısını saptanabilir seviyeye ulaştıracak PCR gen amplifikasyon tekniği geliştirilmiştir . Bu metod tek DNA dizisinin dahi saptanmasını sağlamaktadır . Milton T. Kiyabu ve arkadaşları PCR metodunu kullanarak larinks dahil çeşitli bölgelere ait karsinomları çalışmışlar , 10 larinks skuamöz hücreli karsinom olgusunun 4'ünde (% 40) HPV DNA pozitifliği saptamışlardır (53) . Ancak bu metodun dezavantajı morfolojik bütünlüğün olmamasıdır . Ancak son yıllarda aranan gen parçasının lokalizasyonunu saptayan DNA ISH ile tek bir geni amplifikiye edip gösterebilen PCR yöntemlerini birlikte kullanan yeni ve çok sensitif metodlar geliştirilmektedir .

Skuamöz hücreli karsinom tanılı vakaların seçilmiş doku kesitlerinde DNA ISH tekniği ile 13 vakadan 9'unda (% 69) özellikle malign epitelyal hücrelerde olmak üzere HPV DNA (+) hücre nükleusları saptandı . Sağlam yassı epitel alanlarındaki HPV DNA (+) nükleusların spinöz ve granüler hücre tabakalarında lokalize oluşu , literatürlerde bildirilen lokalizasyonlarla uyumluydu (13,51,91) . Çalışmamızda HPV DNA pozitifliği oldukça yüksek oranda saptanmasına rağmen istatistiksel değerlendirme bu etyolojik ilişkiyi desteklemez .

Bir çalışmada karsinom differansiyasyonu HPV DNA (+)'liği arasında anlamlı beraberlik saptanmazken (43) çalışmamızda iyi differansiye karsinomlarla HPV DNA (+)'liği arasında istatistiksel olarak anlamlı beraberlik ($p=0,04$) saptanmıştır . Yine aynı çalışmada HPV DNA (+) karsinomların (-) olanlara göre daha genç yaşlarda olduğu saptanmıştır (43) . Çalışmamızda böyle bir ilişki mevcut değildir .

Çalışmamızda benign ve malign tüm vakalarda hücresel değişikliklerdeki şüpheli pozitiflikler negatif gruplara dahil edildiğinde HPV DNA pozitifliğiyle koilositozis arasında istatistiksel olarak anlamlı beraberlik ($p=0,02$) saptandı . Fakat diğer hücresel değişikliklerle bu beraberlik ispatlanamadı .

Larinks lezyonlarında HPV DNA pozitifliğiyle langerhans hücresi kantitatif değerler arasındaki ilişki pek incelenmemiş , daha çok servikal lezyonlarda böyle ilişki üzerinde durulmuştur . HPV pozitifliğinin eşlik ettiği servikal intraepitelyal neoplazilerde langerhans hücre sayısının azaldığı (7,40,102) , HPV negatif CIN'lerde çevre normal epitelye göre lezyonlarda lezyonun şiddetiyle orantılı bu hücrelerin arttığı , dentritik dallanmalarının arttığı (17) belirtilmektedir . Bir yazıda HPV (+) CIN'de langerhans hücre artışının sebebi olarak malign transformasyonla ilişkili neoantijenlere yönelmiş spesifik immün cevap gösterilmiştir (63) .

Selektif S-100 (+) başta olmak üzere tüm langerhans hücrelerindeki azalışın HPV enfeksiyonuna ve CIN'ye karşı hücresel immün savunmayı bozan lokal immün yetmezliğe neden olabileceği belirtilmiştir . S-100 proteinin , muhtemelen T hücresinde intrasellüler serbest kalsiyum iyon konsantrasyonunu değiştirerek T hücresinin antijene olan cevabı aktive ettiği , düzenlediği düşünülmüş , S-100 proteindeki yetersizliğin HPV replikasyonuna ve neoplastik gelişime izin veren kazanılmış immün yetmezliğe sebep olabileceği bahsedilmiştir (95) . Ayrıca langerhans hücre azalışına sebep olarak HPV yanısıra sigara içimi (7) , radyoterapi ve steroid tedavisi (39) belirtilmiştir .

Çalışmamızda HPV (+) vakalar ve karsinomlar hariç tutulduğunda polip , 2 laringeal nodül , displazi , 1 keratozis tanılı hastalarda sigara kulanmalarına karşın S-100 (+) langerhans hücrelere ait kantitatif değerlerin sağlam alanlardan lezyona doğru azalacağına arttığı saptandı . Hasta sayısı sınırlı olduğundan bu değerlerin istatistiksel anlamlılığı yoktu . Hastaların biyopsileri alınmadan önceki dönemlere ait steroid tedavisi , radyoterapi konusunda sağlıklı bilgi elde edilemedi .

S-100 (+) langerhans hücrelerindeki kantitatif değerler HPV DNA pozitifliğiyle karşılaştırıldığında 12 HPV DNA (+) olgudan 8'inde (%66,7) S-100 (+) langerhans hücrelerinin sağlam epitelyal alandan lezyona ait epitelyal alana doğru azaldığı saptandı . Ancak bunun istatistiksel olarak desteklenebilmesi için daha fazla sayıda olgu çalışma grubuna alınmalıdır . HPV DNA saptanan olgularda HPV tiplerine yönelik kitler elimizde olmadığından tiplleme yapılamadı .

SONUÇ :

1. Çalışmamıza alınan 23 olguya ait larinks biyopsi ve larinjektomi materyallerine ait H.E. boyalı lamaları tekrar incelenmiştir . Bunlardan 3'ü laringeal nodül , 2'i keratozis , 3'ü papillom , 1'i displazi , 1'i polip , 1'i laringeal nodül ve orta derece differansiye epidermoid karsinom , 1'i az differansiye epidermoid karsinom , 4'ü orta derece differansiye epidermoid karsinom , 7'i iyi differansiye epidermoid karsinom olarak saptanmıştır .

2. Tüm olguların sigara ve alkol alışkanlıkları , meslekleri araştırılmıştır . Hemen hemen tüm olguların sigara içtiği , tanılarla alkol alışkanlığı arasında belirgin beraberliğin olmadığı saptanmıştır . Vakalarımızın hemen hemen yarısı çiftçidir . Laringeal nodül tanılılardan 2'i öğretmen meslek grubundadır . Epidermoid karsinom tanılıların hemen hemen yarısı çiftçidir . Olgularımızın hepsi erkektir .

3. Laringeal nodül , papillom , polip , keratozis , displazi tanılılarda lezyon glottik yerleşimlidir . Karsinomluların yarıya yakınında transglottik tutulum mevcuttur . Bu sonuç dolaylı olarak olgularımızın geç evrelerde hastanemize başvurduğunu akla getirmektedir .

4. Karsinomluların 7'i (% 53) iyi differansiyedir .

5. Tüm vakalar viral etkide beklenen hücresel değişiklikler açısından H.E. boyalı tüm lamalar incelendiğinde 11 vakada (% 47,8) belirgin koilositozis , 4'ünde (% 13,7) belirgin tek hücre diskeratozisi saptandı . Diğer tüm şüpheli olan (+)'likler negatif kabul edildi . 3 papillom olgusunun hepsinde , 7 iyi differansiye epidermoid karsinom olgularının 5'inde , orta derece differansiye epidermoid karsinomluların 2'inde koilositozis saptanmış oldu .

6. Olguların uygun kesitlerine HPV DNA probuyla yapılan In Situ Hibridizasyon metodunda tüm vakaların 12'inde (% 52,2) mavi boyanmış HPV DNA (+) epitelyal hücre nükleusları saptandı . Pozitif hücreler spinöz - granüler hücre tabakaları arasında ve karsinom alanlarında lokalizeydi . Tek hücre pozitifliğinde , olgu HPV DNA pozitif olarak kabul edildi . Papillomların 2'si , keratozislerin 1'i , orta derece differansiye epidermoid karsinomların 2'si ve iyi differansiye epidermoid karsinomların 7'si HPV DNA içermektedir . Tüm karsinomlarda HPV DNA pozitifliği % 69'dur . İstatistiksel olarak daha anlamlı sonuçlar elde etmek için olgu sayısı artırılmalı , kullanılan metod PCR amplifikasyon yöntemi ile modifiye edilmelidir .

7. HPV DNA pozitifliğiyle hücresel değişikliklerden koilositozis beraberliği κ^2 testiyle ($p=0,02$) anlamlıdır . Diğer hücresel değişikliklerle anlamlı beraberliği saptanmadı .

8. HPV DNA pozitifliğiyle iyi differansiye epidemoid karsinom arasında κ^2 testiyle istatistiksel anlamlı beraberlik ($p=0,04$) mevcuttur .

9. Tüm olguların uygun kesitleri S-100 immünhistokimya boyama ile incelendi . S-100 (+) langerhans hücre sayısal değişimleri hesaplandı . Sigara içimiyle S-100 (+) langerhans hücrelerinin sayısal değişimi arasında istatistiksel anlamlı beraberlik saptanamadı . Bunun için olgu sayısı daha geniş tutulmalıdır .

10. HPV DNA (+) olguların 8'inde (% 66,7) S-100 (+) langerhans hücre sayısı sağlam epitelden lezyona doğru azalmıştır . Ancak bunların 5'i karsinom tanılıdır . Diğer 3'ünde bu sayısal değer artış yönündedir . Bunların 3'ü de karsinom tanılıdır . Papillom vakalarından 1'inde ise sağlam epitel alanı kesitlerde bitmiş olduğundan sağlam epitel alanına ait langerhans hücresinin sayısal değerlendirilmesi yapılamadı . Bu sonuçlarla değerlendirildiğinde HPV pozitifliği langerhans hücrelerinin sayısal olarak azalmasına neden olurken karsinomların ortaya çıktığı durumlarda bu azalışın artış yönünde değiştiği dikkat çekiciydi . Ancak bu ilişki olguların az oluşu nedeniyle istatistiksel olarak saptanamadı .

11. Tüm bu sonuçlarla birlikte değerlendirildiğinde karsinomların etyolojisinde HPV , çevresel faktörler ve langerhans hücresindeki değişiklikler dikkat çekicidir . Ancak HPV saptama tekniklerinin maddi güçlüğü nedeniyle olgular sınırlı sayıda tutulmuştur . Bu nedenle bazı verilerde istatistiksel anlamlılık saptanamamıştır . Bu veriler arasında ilişkilerin tam aydınlatılabilmesi için kullanılan metodun PCR amplifikasyon tekniğiyle modifikasyonu , HPV tiplerinin saptanması ve olgu sayısının daha geniş tutulması gereklidir .

ÖZET :

Larinks karsinomlarında risk faktörleri olarak sigara ve alkol kullanımı , radyasyon yanısıra meslek belirtilmektedir . Bazı yazarlar tarafından etyolojik olarak HPV üzerinde çalışılmış veya çalışılmaktadır . HPV'ün kesin olarak etyolojide saptanmasıyla karsinomların tedavisi yeni boyut kazanacaktır . Belki de HPV (+) benign lezyonlu hastaların izlenmesi gerektiği biraz daha irdelenmiş olacaktır . Bu çalışmada larinks lezyonlarında HPV pozitifliğini araştırmak hedeflenmiş , langerhans hücrelerindeki sayısal değişikliklerle ilişkisi saptanmaya çalışılmıştır .

Çalışmamıza 1994 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanı konan ve aranan klinik bilgileri tam olan olgular alınmıştır .

Olguların H.E. boyalı tüm kesitleri viral etkide beklenen hücresel değişiklikler açısından incelenmiş , daha sonra uygun kesitlerinde HPV DNA In Situ Hibridizasyon metoduyla HPV DNA (+) epitelyal hücre nükleusu aranmıştır . Daha sonra uygun kesitlerine S-100 immünohistokimya boyama yöntemi uygulayarak sağlam ve lezyon alanlarında langerhans hücre sayılarındaki değişiklikler saptanmıştır . Tüm veriler birbiriyle karşılaştırılmıştır .

Sonuç olarak HPV DNA pozitifliğiyle koilositozis ve iyi differansiye epidermoid karsinom arasında anlamlı beraberlikler saptanmıştır . Ancak diğer veriler arasındaki ilişkileri saptamak için olguların daha geniş tutulması , kullanılan tekniğin PCR amplifikasyon tekniğiyle modifiye edilmesi , HPV tiplerinin de saptanması kanısındayız .

KAYNAKLAR

- 1-Abramson A.L. , Brandsma J. , Steinberg B. , Winkler B. : Verrucous Carcinoma of the Larynx *Possible Human Papillomavirus Etiology* , Arch. Otolaryngol. 111 : 709-715 , 1985 .
- 2-Abramson A.L. , Waner M. , Brandsma J. : The Clinical Treatment of Laryngeal Papillomas with Hematoporphyrin Therapy , Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 114 : 795-800 , 1988 .
- 3-Akyol M. U. : Human Papilloma Virüs Enfeksiyonunun Laringeal Papillomatozis , Larinks Verrüköz Kanseri ve Larinks Epidermoid Kanseri ile İlişkinin İmmünohistokimyasal Yöntemle Araştırılması , Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi , 1990 .
- 4-Alberts D.S. , Coulthard S.W. , Meyskens F.L. : Regression of Aggressive Laryngeal Papillomatosis with 13-cis-Retinoic Acid (Accutane) , J. Biol. Response Modifiers 5 : 124-128 , 1986 .
- 5-Arkan P. , Mocan G. : Servikovaginal sitolojide Bethesda Sistemi , Ankara Patoloji Bülteni 11 (2) : 52-55 , 1994 .
- 6-Ataman M. , Sungur A. , Tuncer M. A. : Juvenil Laringeal Papillomatoziste Human Papilloma Virüs Enfeksiyonu , Ankara Patoloji Bülteni 11 (1) : 19-21 , 1994 .
- 7-Barton S.E. , Hollingworth A. , Maddox P.H. , Edwards R. , Cuzick J. , Mc Cance D.J. , et al. : Possible Cofactors in the Etiology of Cervical Intraepithelial Neoplasia *An Immunopathologic Study* , J. Reproductive Med. 34 : 613-616 , 1989 .
- 8-Başak K. , Aksoy F. : Ankara Numune Hastanesi'nde 1984-1992 yılları arasındaki kanser dağılımının değerlendirilmesi , Ankara Patoloji Bülteni 10 (2) : 62-71 , 1993 .
- 9-Béjui-Thivolet F. , Liagre N. , Chignol M.C. , Chardonnet Y. , Patricot L.M. : Detection of Human Papillomavirus DNA in Squamous Bronchial Metaplasia and Squamous Cell Carcinomas of the Lung by In Situ Hybridization Using Biotinylated Probes in Paraffin-Embedded Specimens , Human Pathol. 21 : 111-116 , 1990 .
- 10-Bomholt A. : Juvenile Laryngeal Papillomatosis *An Epidemiological Study from Copenhagen Region* , Acta Otolaryngol. (Stockh) 105 : 367-371 , 1988 .

- 11-Bonfiglio T.A. , Stoler M.H. : Human Papillomavirus and Cancer of the Uterine Cervix , *Human Pathol.* 19 (6) : 621-622 , 1988 .
- 12-Brandsma J.L. , Steinberg B.M. , Abramson A.L. , Winkler B. : Presence of Human Papillomavirus Type 16 Related Sequences in Verrucous Carcinoma of the Larynx , *Cancer Research* 46 : 2185-2188 , 1986 .
- 13-Broker T.R. : Structure and Genetic Expression of Papillomaviruses , *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 14 : 329-348 , 1987 .
- 14-Burk R.D. , Kadish A.S. , Calderin S., Romney S.L. : Human Papillomaviruses infection of the cervix detected by cervicovaginal lavage and molecular hybridization : Correlation with biopsy results and Papanicolau smear , *Am. J. Obstet. Gynecol.* 154 : 982-989 , 1986 .
- 15-Byhardt R.W. , Almagro U. : The Role of Radiation Therapy in the Treatment of Recurrent Adult Laryngeal Papillomatosis , *Am. J. Clin. Oncol.* 11 (2) : 131-137 , 1988 .
- 16-Byrne J.C. , Tsao M. S. , Fraser R.S. et al. : HPV 11 DNA in a Patient with Chronic Laryngotracheobronchial Papillomatosis and Metastatic Squamous-Cell Carcinoma of the Lung , *N. E. J. M.* 317 (14) : 873-878 , 1987 .
- 17-Caorsi I. , Figueroa C.D. : Langerhans' Cell Density in the Normal Exocervical Epithelium and in the Cervical Intraepithelial Neoplasia , *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 93 : 993-998 , 1986 .
- 18-Chang F. : Role of Papillomaviruses , *J. Clin. Pathol.* 42 : 269-276 , 1990 .
- 19-Chaput M. , Ninane J. , Gosseye S. , Moulin D. , Hamoir M. , Claus D. , et al. : Juvenile Laryngeal Papillomatosis and Epidermoid Carcinoma , *The Journal of Pediatrics* 114 : 269-272 , 1989 .
- 20-Charles K.C. , J. Bernard L.G. : Asbestos Exposure and Laryngeal Cancer : An Analysis of the Epidemiologic Evidence , *Occup. Med.* 30(1) : 23-27 , 1988 .
- 21-Corbitt G. , Zorad A.P. , Arrand J.R. , Longson M. , Farrington W.T. : Human Papillomavirus (HPV) Genotypes Associated with Laryngeal Papilloma , *J. Clin. Pathol.* 41 : 284-288 , 1988 .
- 22-Cotran R.S. , Kumar V. , Robbins S.L. : Robbins Pathological Basis of Disease , 4th Edition , 1989 , W.B. Saunders Co. Philadelphia , Chpt. 6 , 275-282 . Chpt. 17 , 816-817 .

- 23-Cristensen P.H. , Jørgensen K. , Grøntved A. : Juvenile Papillomatosis of the Larynx , *Acta Otolaryngol (Stockh)* 412 : 37-39 , 1984 .
- 24-Crockett D.M. , McCabe B.F. , Lusk R.P. , Mixon J.H. : Side Effects and Toxicity of Interferon in the Treatment of Recurrent Respiratory Papillomatosis , *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 96 : 601-607 , 1987 .
- 25-Cumberworth V.L. , Narula A. , MacLennan K.A. , Bradley P.J. . Mucoepidermoid Carcinoma of the Larynx , *J. Laryngol. Otol.* 103 : 420-423 , 1989 .
- 26-De Villiers E.-M. , Weidauer H. , Otto H. , Zur Hausen H. : Papillomavirus DNA in Human Tongue Carcinomas , *Int. J. Cancer* 36 : 575-578 , 1985 .
- 27-Demirhan B. , Gököz A. , Ayhan A. : Bowenoid Papullosis - Human Papilloma Virüs Enfeksiyonu , Vulvajen - Serviks Tutulumu Olan Bir Vaka , *Ankara Patoloji Bülteni* 8 :37-39 , 1991 .
- 28-Élő J. , Máté Z. : Combined Therapy with Isoprinosine and CO2 Laser Mikrosurgery for the Treatment of Laryngeal Papillomatosis , *Arch. Otorhinolaryngol.* 244 : 342-345 , 1988 .
- 29-Erdoğan M. , Özkaptan Y. , Önder T. , Aydın R. , Dündar A. , Kanımtürk E. : Larinks Mukoza Yapısı Üzerinde Postmortem Bir Araştırma , *Türk Otorinolarenoloji XXI. Ulusal Kongresi Manavgat/Antalya 1991* : 1074-1079 .
- 30-Erensoy S. , Erhan Y. , Zeytinoğlu A. , Özacar T. , Özdemir N. , Bilgiç A. : DNA In Situ Hybridization in the Diagnosis of Human Papillomavirus Infection , 20-22 Haziran 1995 , *FEMS Symposium on Recent Advances in the Diagnosis of Viral Disease* , PP 10 .
- 31-Eversole L.R. , Laipids P.J. : Oral Squamous Papillomas : Detection of HPV DNA by In Situ Hybridization : *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 65 : 545-550 , 1988 .
- 32-Ferenczy A. , Mitao M. , Nagai N. : Latent Papillomavirus Infections and Recurring Genital Warts , *N.E.J.M.* 313 : 784-788 , 1985 .
- 33-Ferenczy A. : HPV-Associated Lesions in Pregnancy and Their Clinical Implications , *Clin. Obst. Gynecol.* 32 (1) : 191-199 , 1989 .
- 34-Friedmann I. : *Sistemic Pathology* , Third Edition , 1986 , Churchill Livingston , Volume 1 , Chpt. 11 , 210-249 .

- 35-Griffin N.R. , Dockey D. , Lewis F.A. , Wells M. : Demonstration of Low Frequency of Human Papilloma Virus DNA in Cervical Adenocarcinoma and Adenocarcinoma In Situ by the Polymerase Chain Reaction and In Situ Hybridization , *Int. J. Gynecol. Pathol.* 10 : 36-43 , 1991 .
- 36-Gupta J.W. , Gupta P.K. , Rosenthein N. , Shah K.V. : Detection of Human Papillomavirus in Cervical Smear . A Comparison of In Situ Hybridization , Immunochemistry and Cytopathology , *Acta Cytol.* , 31 : 387-396 , 1987 .
- 37-Gürsan Ö. , Terzi R. , Ince Ü. : Larinksin Verrüköz Karsinomu ve Tedavisi , *Türk Otorinolarenoloji XXI. Ulusal Kongresi Manavgat/Antalya-1991* : 598-601 .
- 38-Haliloğlu T. , Oğuz A. , Cevanşir B. , Güldiken B. , Tınaz M. : Larinks Yassı Epitel Hücreli Kanserde HLA Antijenleri , *Tür Otorinolarenoloji XXI. Ulusal Kongresi Manavgat /Antalya-1991* ; 299-301.
- 39-Hammer S. : Langerhans Cells , *Pathol. Annual* 23 : 293-328 , 1988 .
- 40-Hawthorn R.J.S. , Murdoch J.B. , Mac Lean A.B. , Mac Kie R.M. : Langerhans' Cells and Subtypes of Human Papillomavirus in Cervical Intraepithelial Neoplasia , *British Medical Journal* 297 : 643-646 , 1988 .
- 41-Heally G.B. , Gelber R.D. , Trowbridge A.L. , et al. : Treatment of Recurrent Respiratory Papillomatosis with Human Leukocyte Interferon , *N.E.J.M.* 319 (7) : 401-407 , 1988 .
- 42-Hille J.J. , Markowitz S. , Margolius K.A. , Isaacson C. : Human Papillomavirus and Carcinoma of the Esophagus , *N.E.J.M.* 312 (26) : 1707 (lttr) , 1987 .
- 43-Hoshikawa T. , Nakajima T. , Uhara H. , Gotoh M. , Shimosato Y. , Tsutsumi K. , et al. : Detection of Human Papillomavirus DNA in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas by Polymerase Chain Reaction , *Laryngoscope* 100 : 647-650 , 1990 .
- 44-Højslet P.-E. , Nielsen V.M. , Palvio D. : Premalignant Lesions of the Larynx , *Acta Otolaryngol (Stockh)* 107 : 150-155 , 1989 .
- 45-Irwin B.C. , Hendrickse W.A. , Pincott J.R. , Bailey C.M. , Evans J.N.G. : Juvenile Laryngeal Papillomatosis , *The Journal of Laryngology and Otology* 100 : 435-445 , 1986 .
- 46-Ishibashi T. , Matsushima S. , Tsunokawa Y. , Asai M. , Nomura Y. , Sugimura T. , et al. : Human Papillomavirus DNA in Squamous Cell Carcinoma of the Upper Aerodigestive Tract , *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 116 : 294-298 , 1990 .

47-İnal E. , Kemalöđlu Y.K. , Ataođlu Ö. , Dursun A. , Yeđin H. , Uslu S. , Özerdem Ö. : Larenks Tümörlerinde Klinik ve Histopatolojik Parametrelerin Servikal Lenf Nodu Metastazi Yönünden Değerlendirilmesi : Türk Otorinolarenoloji XXI. Ulusal Kongresi Manavgat/Antalya-1991 ; 999-1003 .

48-Kashima H. , Mounts P. , Kuhajda F. , Loury M. : Demonstration of Human Papillomavirus Capsid Antigen in Carcinoma In Situ of the Larynx , Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 95 : 603-607 , 1986 .

49-Kashima H. , Wu T.C. , Mounts P. , Heffner D. , Cachay A. , Hyams V. : Carcinoma Ex-Papilloma : Histologic and Virologic Studies in Whole-Organ Sections of the Larynx , Laryngoscope 98 : 619-624 , 1988 .

50-Khan T. , Schwarz E. , Zur Hausen H. : Molecular Cloning and Characterization of the DNA of a New Human Papillomavirus (HPV 30) from a Laryngeal Carcinoma , Int. J. Cancer 37 : 61-65 , 1986 .

51-Kirchner H. : Immunobiology of Human Papillomavirus Infection , Prod. Med. Virol. 33 : 1-41 , 1986 .

52-Kirchner J.A. , Carter D. : Intralaryngeal Barriers to the Spread of Cancer , Acta Otolaryngol (Stockh) 103 : 503-513 , 1987 .

53-Kiyabu M.T. et al. : Detection of HPV in Formalin Fixed Invazive Squamous Carcinomas Using the Polymerase Chain Reaction , Am. J. Surg. Pathol. 13 (3) : 221-224 , 1989 .

54-Klemi P.J. , Joensuu H. , Siivonen L. , Virolainen E. , Syrjänen S. , Syrjänen K. : Association of DNA Aneuploidy with Human Papillomavirus-Induced Malignant Transformation of Sinonasal Transitional Papillomas , Otolaryngol. Head Neck Surg. 100 (6) : 563-567 , 1987 .

55-Krebbs H. B. : Milestones in HPV Research , Clin. Obst. Gynecol. 32 : 107-111 , 1989

56-Lee N.K. , Ritter D.B. , Gross A.E. , Myssiorek D. J. , Kadish A.S. , Burk R.D. : Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Associated with Human Papillomaviruses and an Increased Incidence of Cervical Pathology , Otolaryngol. Head Neck Surg. 99 : 296-300 , 1988 .

- 57-Liang X. M. , Wieczorek R.L. , Koss L.G. : In Situ Hybridization with Human Papillomavirus Using Biotinylated DNA Probes on Archival Cervical Smear , *J. Histochem. Cytochem.* 39 : 771-775 , 1991 .
- 58-Lindeberg H. , Elbrond O. : Laryngeal Papillomas : Clinical aspects in a series of 231 patients , *Clin. Otolaryngol.* 14 : 335-342 , 1989 .
- 59-Lindeberg H. , Syrjänen S. , Kärjä J. , Syrjänen K. : Human Papillomavirus Type 11 DNA in Squamous Cell Carcinomas and Pre-existing Multiple Laryngeal Papillomas , *Acta Otolaryngol.* 107 : 141-149 , 1989 .
- 60-Löning T. , Ikenberg H. , Becker J. , Gissmann L. , Hoepfer I. , Zur Hausen H. : Analysis of Oral Papillomas , Leukoplakias , and Invasive Carcinomas for Human Papillomavirus Type Related DNA , *J. Invest. Dermatol.* 84 : 417-420 , 1985 .
- 61-Maddox P.H. , Tay S.K. , Jenkins D. : A New Fixed Cryosection Technique for the Simultaneous Immunocytochemical Demonstration of T6 and S100 Antigens , *Histochem. J.* 19 :35-38 : 1987 :
- 62-Madinier I. , Monteil R.A. : Human Papillomaviruses in Oral Epithelial Lesions . Comparative Study Between Histopathology and Immunohistochemistry in Routine Diagnosis , *J. Biol. Buccale* 15 : 105-110 , 1987 .
- 63-McArdle J.P. , Muller H.K. : Quantitative Assessment of Langerhans' Cells in Human Cervical Intraepithelial Neoplasia and Wart Virus Infection , *Am. J. Obstet. Gynecol.* 154 : 509-515 , 1986 .
- 64-McClatchey K.D. , Zarbo R.J. : The Jaws and Oral Cavity . In: *Diagnostic Surgical Pathology* . Ed. Sternberg S.S. , New York , Raven Press , Ltd. , 2nd edit. 1994 , Chpt 19 : 763-764 .
- 65-McDonnell P.J. , McDonnell J.M. , Kessis T. , Green W.R. , Shah K.V. : Detection of Human Papillomavirus Type 6/11 DNA in Conjunctival Papillomas by In Situ Hybridization with Radioactive Probes , *Human Pathology* 18 : 1115-1119 , 1987 .
- 66-Morelli A.E. , Sananes C. , Di Paola G. , Paredes A. , Fainboim L. : Relationship Between Types of Human Papillomavirus and Langerhans' Cells in Cervical Condyloma and Intraepithelial Neoplasia , *Am. J. Clin. Pathol.* 99 : 200-206 , 1993 .
- 67-Nagai N. , Nuovo G. , Friedman D. , Crum C.P. : Detection of Papillomavirus Nucleic Acids in Genital Precancers with the In Situ Hybridization Technique , *Int. J. Gynecol. Pathol.* 6 : 366-379 , 1987 .

- 68-Ostrow R.S. , Faras A. J. : The Molecular Biology of HPVs and the Pathogenesis of Genital Papillomas and Neoplasms , *Cancer and Metastasis Rev.* 6 : 383-395 , 1987 .
- 69-Padayachee A. , Van Wyk C.W. : Human Papillomavirus (HPV) in Oral Squamous Cell Papillomas , *J. Oral Pathol.* 16 : 353-355 , 1987 .
- 70-Papay F. , Wood B. , Coulson M. : Squamous Cell Papilloma at the Tracheoesophageal Puncture Stoma , *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 114 : 564-566 , 1988 .
- 71-Patel P. , Gemmell R. , Carruth J.A.S. : Inosine Pranobex in Recurrent Laryngeal Papillomatosis , *The Journal of Laryngology and Otology* 101 : 1306-1307 , 1987 .
- 72-Popper H.H. , El- Shabrawi Y. , Wöckel W. , Höfler G. , Kenner L. , Jüttner-Smolle F.M. , Pongratz M.G. : Prognostic Importance of Human PapillomaVirus Typing in Squamous Cell Papilloma of the Bronchus : Comparison of In Situ Hybridization and the Polymerase Chain Reaction , *Hum. Path.* 25(11) : 1191-1197 , 1994 .
- 73-Quiney R.E. , Hall D. , Craft C.B. : Laryngeal Papillomatosis : Analysis of 113 Patients , *Clin. Otolaryngol.* 14 : 217-225 , 1989 .
- 74-Quiney R.E. , Wells M. , Lewis F.A. et al. : Laryngeal Papillomatosis : Correlation Between Severity of Disease and Presence of HPV 6 and 11 Detected by In Situ DNA Hybridization , *J. Clin. Pathol.* 42 : 694-698 , 1989 .
- 75-Recher G. : Spindle Cell Squamous Carcinoma of the Larynx . Clinico-Pathological Study of Seven Cases , *J. Laryngol. Otol.* 93 : 871-879 , 1985 .
- 76-Rentrop M. , Knapp B. , Winter H. , Schweizer J. : Aminoalkylsilane treated glass slides as support for in situ hybridization of keratin cDNAs to frozen tissue sections under varying fixation and pretreatment conditions , *Histochem. J.* 18 : 271-276 , 1986 .
- 77-Robert J. Kurman , Toshihiko Toki , Mark H. Schiffman : Basaloid and Warty Carcinoma of the Vulva .Distinctive Types of Squamous Cell Carcinoma Frequently Associated with Human Papillomaviruses , *American Journal of Surgical Pathology* 17 (2) : 133-145 ,1993 .
- 78-Rosai J. : *Ackerman's Surgical Pathology* , 7th Edition , 1989 , The C.V. Mosby Co. , Volume 1 , Chpt. 7 , 248-258 .

- 79-Rüdlinger R. , Smith I.W. , Bunney M.H. , et al. : Human Papillomavirus infections in a group of renal transplant recipients , *Br.J.Dermatol.* 115 : 681-692 , 1986 .
- 80-Sasaki C.T. , Carlson R.D. , Larynx Tumours . In: *Otolaryngology Head and Neck Surgery* . Eds. Cummings C.W. , Fredrickson J.M. , Harker L.A. , Krause C. J. , Schuller D.E. St.Louis , Missouri , Mosby Year Book Inc. 2nd edit.1993 , 1925-1954 .
- 81-Scheurlen W. , Stremlau A. , Gissmann L. , Höhn D. , Zenner H.P. , Zur Hausen H. : Rearranged HPV 16 Molecules in an Anal and in a Laryngeal Carcinoma , *Int. J. Cancer* , 38 : 671-676 , 1986 .
- 82-Schneider A. , Meinhardt G. , Kirchmayr R. , Schneider V. : Prevalence of Human Papillomavirus Genomes in Tissues from the Lower Genital Tract as Detection by Molecular In Situ Hybridization , *Int. J. Gynecol. Pathol.* 10 : 1-14 , 1991 .
- 83-Schwarz E. , Freese U.K. , Gissmann L. , Mayer W. , Roggenbuck B. , Stremlau A. , et al. : Structure and Transcription of Human Papillomavirus Sequences in Cervical Carcinoma Cells , *Nature* 314 : 111-114 , 1985 .
- 84-Seçkin S. , Aksoy F. , Tezcan S. , Dündar İ. , Ortaç F. , Yavuz H. : Servikal İntraepitelyal Neoplazi (CIN) ve Human Papilloma Virüs Enfeksiyonunda Langerhans Hücreleri (HC) , *Ankara Patoloji Bülteni* 11 (1) : 22-24 , 1994 .
- 85-Shibata D.K. , Arnheim N. , Martin J. : Detection of Human Papilloma Virus in Paraffin-Embedded Tissue Using the Polymerase Chain Reaction , *J. Exper. Med.* , 167 : 225-230 , 1988 .
- 86-Sperry K. : Lethal Asphyxiating Juvenile Laryngeal Papillomatosis : A Case Report with Human Papillomavirus İn Situ Hybridization Analysis , *Am. J. For. Med. Path.* 15(2) : 146-150 , 1994 .
- 87-Steinberg B.M. , Topp W.C. , Schneider P.S. , Abramson A.L. : Laryngeal Papillomavirus Infection During Clinical Remission , *N.E.J.M.* 308 : 1261-1264 , 1983 .
- 88-Stell P.M. : Prognostic Factors in Laryngeal Carcinoma , *Clin. Otolaryngol.* 13 : 399-409 , 1988 .
- 89-Stoler M.H. , Broker T.R. :In Situ Hybridization Detection of Human Papillomavirus DNAs and Messenger RNAs in Genital Condylomas and a Cervical Carcinoma , *Hum. Pathol.* 17 : 1250-1258 , 1986 .

- 90-Sungur A.A. : HPV Enfeksiyonunun Servikal İntraepitelyal Neoplaziler ve Serviks Kanseri ile İlişkinin İmmünohistokimyasal Yöntem ile Araştırılması , Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi , 1990 .
- 91-Swoboda H. , Braun P. , Schratter M. : Zum Problem der Pulmonalen Kanzerisierung der Juvenilen Larynxpapillomatose , Laryng. Rhinol. Otol. 66 : 557-561 , 1987 .
- 92-Syrjänen S. , Happonen R.-P. , Virolainen E. , Siivonen L. , Syrjänen K. : Detection of Human Papillomavirus (HPV) Structural Antigens and DNA Types in Inverted Papillomas and Squamous Cell Carcinomas of the Nasal Cavities and Paranasal Sinuses , Acta Otolaryngol. 104 : 334-341 , 1987 .
- 93-Syrjänen S. , Partanen P. : Sensitivity of in situ hybridization technique using biotin an S-35 labelled human papillomavirus (HPV) DNA probes , J. of Virol. Meth. , 19 : 225-238 , 1988 .
- 94-Syrjänen S. , Syrjänen K. , Mäntyjärvi R. , Collan Y. , Kärjä J. : Human Papillomavirus DNA in Squamous Cell Carcinomas of the Larynx Demonstrated by In Situ DNA Hybridization , ORL 49 : 175-186 , 1987 .
- 95-Tay S.K. , Jenkins D. , Maddox P. , Champion M. , Singer A. : Subpopulations of Langerhans' Cells in Cervical Neoplasia , Br. J. Obstet. Gynaecol. 94 : 10-15 , 1987 .
- 96-Terry R.M. , Lewis F.A. , Griffiths S. , Wells M. , Bird C.C. : Demonstration of Human Papillomavirus Types 6 and 11 in Juvenile Laryngeal Papillomatosis by In Situ DNA Hybridization , J. Pathol. 153 : 245-248 , 1987 .
- 97-Thawley S.K. : Cysts and Tumors of the Larynx . In : Otolaryngology . Ed. Zorab R. , W.B. Saunders Company 3rd edit. 1991 , 2307-2369 .
- 98-Tsutsumi K. , Nakajima T. , Gotoh M. , et al. : In Situ Hybridization and Immunohistochemical Study of Human Papillomavirus Infection in Adult Laryngeal Papillomas , Laryngoscope 99 : 80-85 , 1989 .
- 99-Unger E.R. , Budgeon LR. , Myerson D. , Brigati D.J. : Viral Diagnosis by In Situ Hybridization *Description of a Rapid Simplified Colorimetric Method* , Am. J. Surg. Pathol. 10 (1) : 1-8 , 1986 .
- 100-Vallejos H. , Del Minstro A. , Kleinhaus S. , Braunstein J.D. , Halwer M. , Koss L.G. : Characterization of Human Papilloma Virus Types in Cndylomata Acuminata in Children by In Situ Hybridization , Lab. Invest. 56 : 611-615 , 1987 .

- 101-Vesikari T. , Nuutila A. , Cantell K. : Neurologic Sequelae Following Interferon Therapy of Juvenile Laryngeal Papilloma , Acta Paediatr. Scand. 77 : 619-622 , 1988 .
- 102-Viac J. , Guérin-Reverchon I. , Chardonnet Y. , Brémond A. : Largerhans Cells and Epithelial Cell Modifications in Cervical Intraepithelial Neoplasia : Correlation with Human Papillomavirus Infection : Immunobiol. 180 : 328-338 , 1990 .
- 103-Walboomers J.M.M. , Fokke H.E. , Polak M. , Volkers H. , Houthoff H.J. , Barents J. , et al . : In Situ Localization of Human Papillomavirus Type 16 DNA in a Metastasis of an Endocervical Adenocarcinoma , Intervirology 27 : 81-85 , 1987 .
- 104-Weber R.S. , Shillitoe E.J. , Robbins T. , Luna M. , Batsakis J.G. , Donovan D.T. , et al . : Prevalence of Human Papillomavirus in Inverted Nasal Papillomas , Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 114 : 23-26 , 1988 .
- 105-Winkler B. , Capo V. , Reumann W. , Ma A. , La Porta R. , Reilly S. , et al . : Human Papillomavirus Infection of the Esophagus *A Clinicopathologic Study with Demonstration of Papillomavirus Antigen by the Immunoperoxidase Technique* , Cancer 55 : 149-155 , 1985 .
- 106-Zaslav A-L. , Steinberg B.M. , Stamberg J. , Lin Y.J. , Abramson A.L. : Chromosomal Analysis of Recurrent Laryngeal Papillomas , Arch. Otolaryng. Head Neck Surg. 114 : 1170-1174 , 1988 .
- 107-Zur Hausen H. : Intracellular Surveillance of Persisting Viral Infections , The Lancet : 489-491 , 1986 .