SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

KARTAL DR. LÜTFİ KIRDAR EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

PATOLOJİ KLİNİĞİ

KLİNİK EĞİTİM VE İDARİ SORUMLUSU

DOÇ. DR. NAGEHAN ÖZDEMİR BARIŞIK

LARİNGEAL VE NAZOFARİNGEAL KİST VE KARSİNOMLAR ARASINDA GLUTATYON S-TRANSFERAZ KAPPA 1, VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ VE KASPAZ-3 BELİRTEÇLERİNİN İMMÜNHİSTOKİMYASAL BOYANMA FARKLILIĞININ ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. HANIM İSTEM ÖZKIZILKAYA

İSTANBUL

2017

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

KARTAL DR. LÜTFİ KIRDAR EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

PATOLOJİ KLİNİĞİ

KLİNİK EĞİTİM VE İDARİ SORUMLUSU

DOÇ. DR. NAGEHAN ÖZDEMİR BARIŞIK

LARİNGEAL VE NAZOFARİNGEAL KİST VE KARSİNOMLAR ARASINDA GLUTATYON S-TRANSFERAZ KAPPA 1, VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ VE KASPAZ-3 BELİRTEÇLERİNİN İMMÜNHİSTOKİMYASAL BOYANMA FARKLILIĞININ ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. HANIM İSTEM ÖZKIZILKAYA

Tez Danışmanı: Uzm. Dr. Kayhan Başak

İSTANBUL

2017

TEŞEKKÜR

Hastanemizin yöneticisi Prof. Dr. Recep Demirhan başta olmak üzere,

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde katkılarından dolayı klinik, eğitim ve idari sorumlumuz Doç. Dr. Nagehan Özdemir Barışık'a, çok değerli hocamız Doç. Dr. Ayşe Nimet Karadayı'ya, bilgi ve deneyimlerini her aşamada benimle paylaşan tez danışmanım Uzm. Dr. Kayhan Başak'a, yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Serpil Oğuztüzün ve Prof. Dr. Hülya Ellidokuz'a,

Asistanlığım boyunca kliniğimizde beraber çalıştığım uzmanlarımız, asistan arkadaşlarım, teknisyenlerimiz ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma,

Hayatın her alanında olduğu gibi, bu çalışmanın bütün aşamalarında gece gündüz demeden yanımda olan, desteğini, yardımlarını ve anlayışını esirgemeyen canım eşim Mert Özkızılkaya'ya ve güzel ailemin bütün güzel kalpli üyelerine her zaman yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

Dr. Hanım İstem Özkızılkaya

İstanbul, 2017

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR……i

İÇİNDEKİLER……...ii

TABLOLAR……..iii

RESİMLER……iv

KISALTMALAR……vii

ÖZET……ix

ABSTRACT……x

GİRİŞ VE AMAÇ……...1

GENEL BİLGİLER……....3

GEREÇ VE YÖNTEM……35

BULGULAR……39

TARTIŞMA……..46

SONUÇLAR……53

KAYNAKLAR……54

TABLOLAR

Tablo 1. Olgu Gruplarında GSTK1 ile Boyanma Dağılımı……..40

Tablo 2. Olgu Gruplarında VEGF ile Boyanma Dağılımı……..…….....41

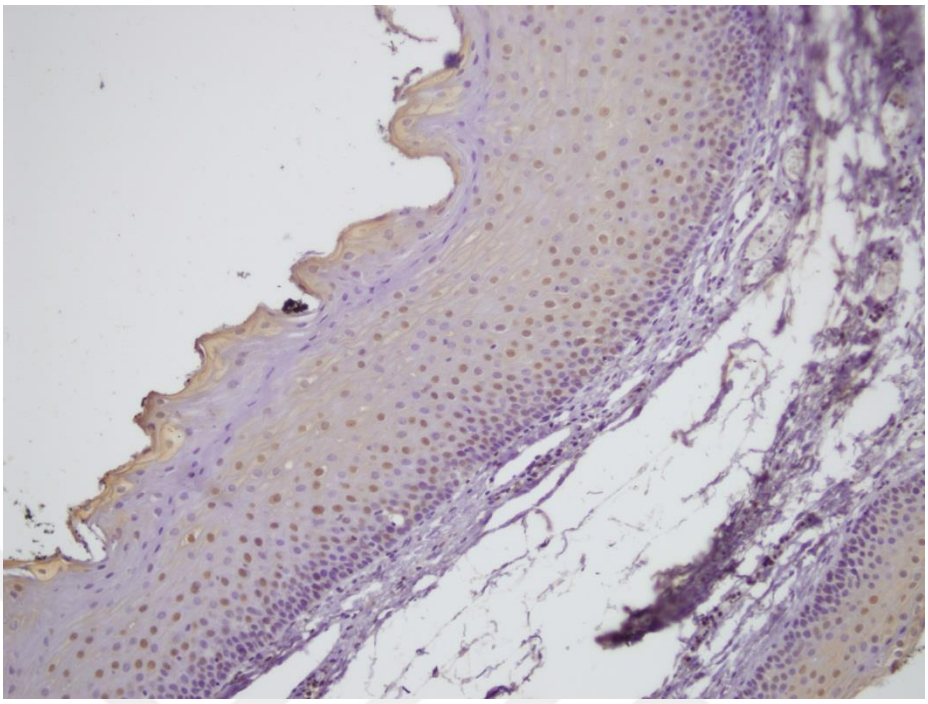
Tablo 3. Olgu Gruplarında Kaspaz-3 ile Boyanma Dağılımı……...42

Tablo 4. Olgu Gruplarında GSTK1, VEGF ve Kaspaz-3 Boyanma Skorlarının Ortalama Değerleri……43

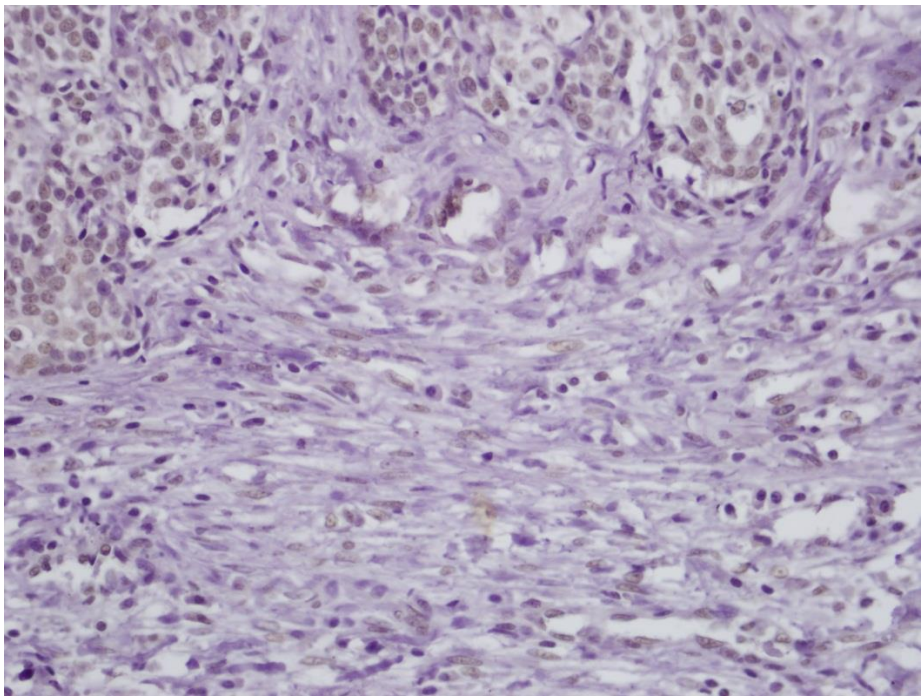
Tablo 5. Normal Grup ile Diğer Olgu Gruplarında Boyanma Skorlarının Karşılaştırılması...44

Tablo 6. Kist ve Karsinom Olgularında Boyanma Skorlarının Karşılaştırılması…….45

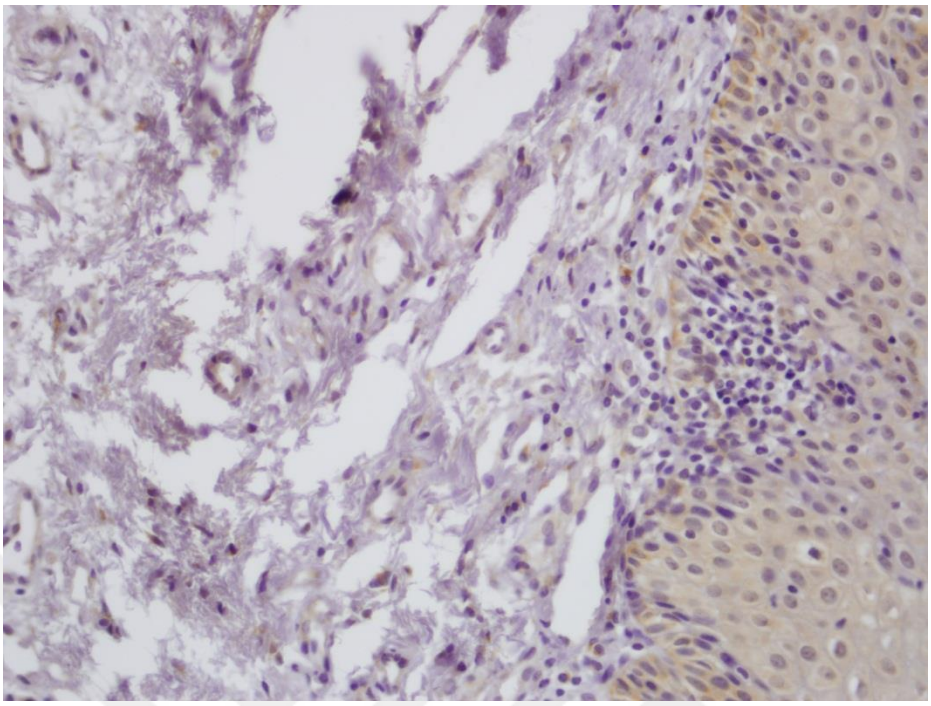
RESİMLER



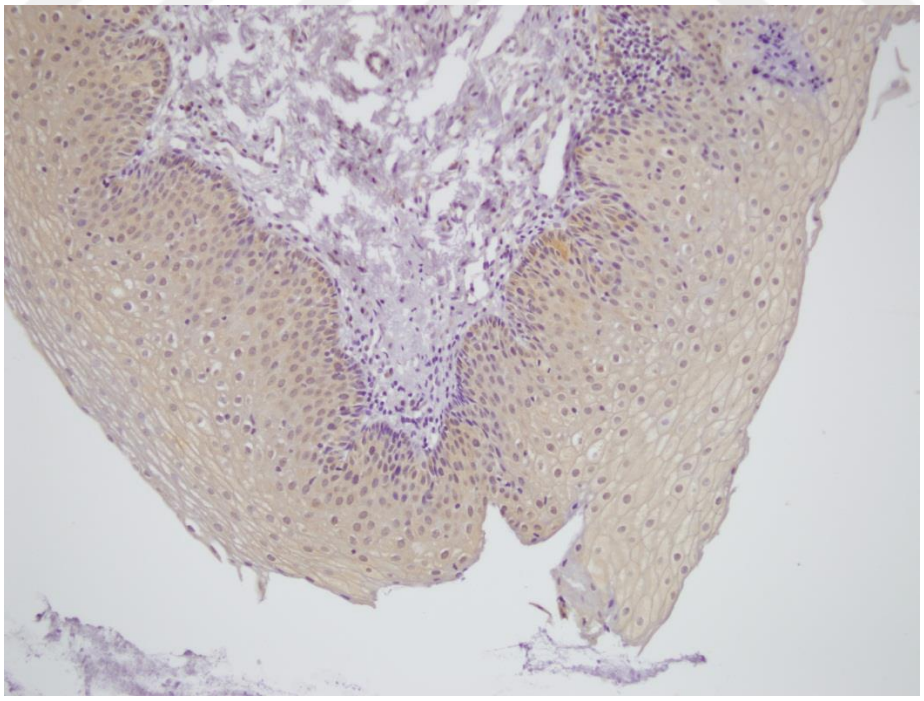
Resim 1: Kist epitelinde GSTK1 ile 1+ boyanma (x200).



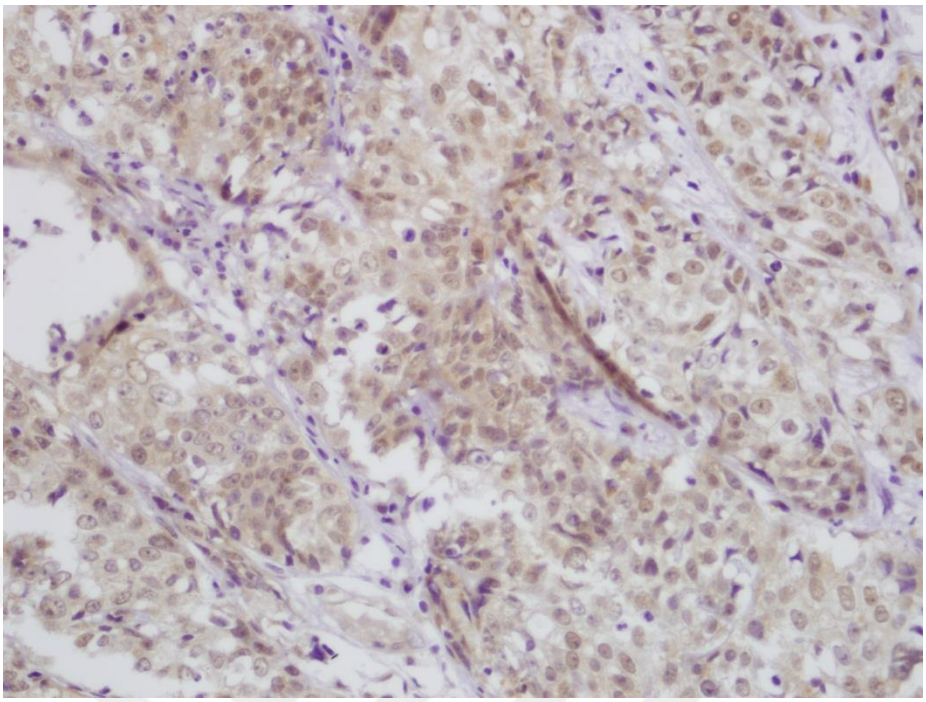
Resim 2. Laringeal skuamoz hücreli karsinom olgusunda tümör hücrelerinde ve endotelyal hücrelerde GSTK1 ile 1+ boyanma (x400).



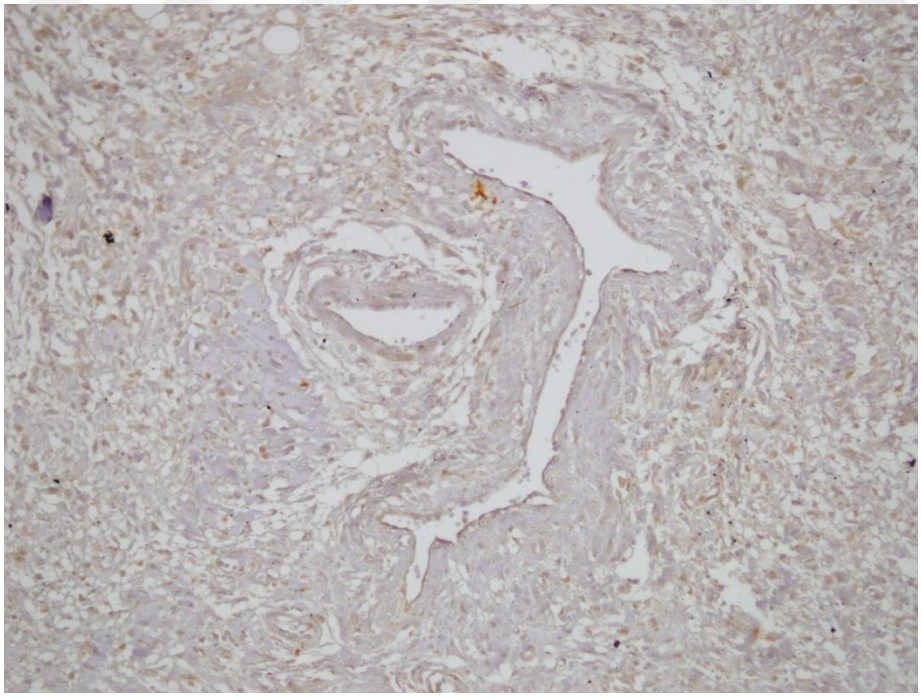
Resim 3: Kist olgusunda GSTK1 ile epitelde 2+, endotelyal hücrelerde 1+ boyanma izlenirken ve inflamatuvar hücrelerde boyanma izlenmedi (x400).



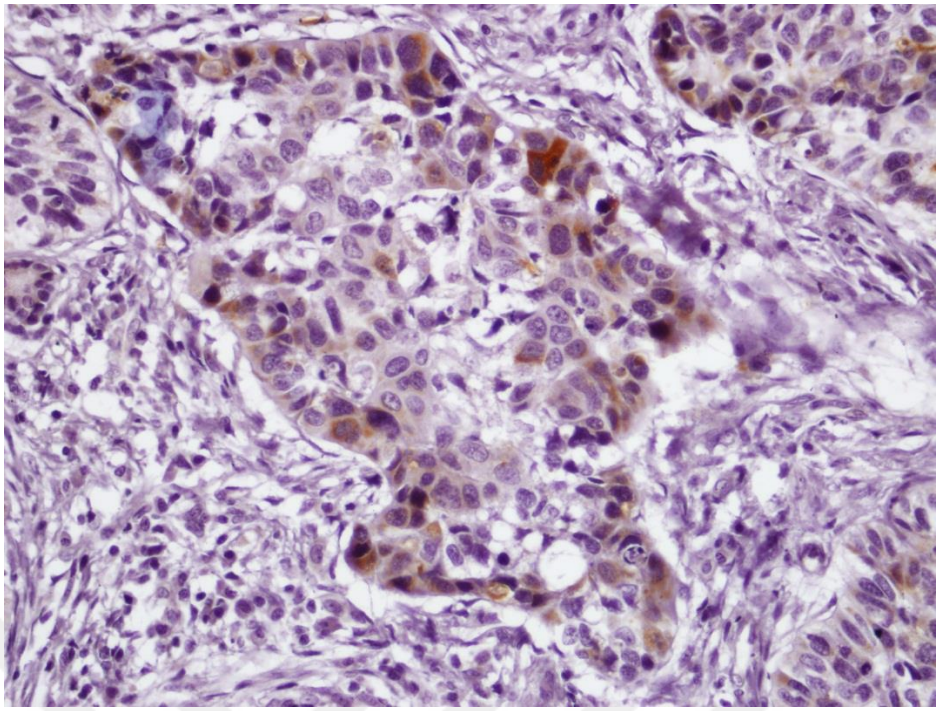
Resim 4: Kist olgusunda VEGF ile epitelde 2+ boyanma (x200).



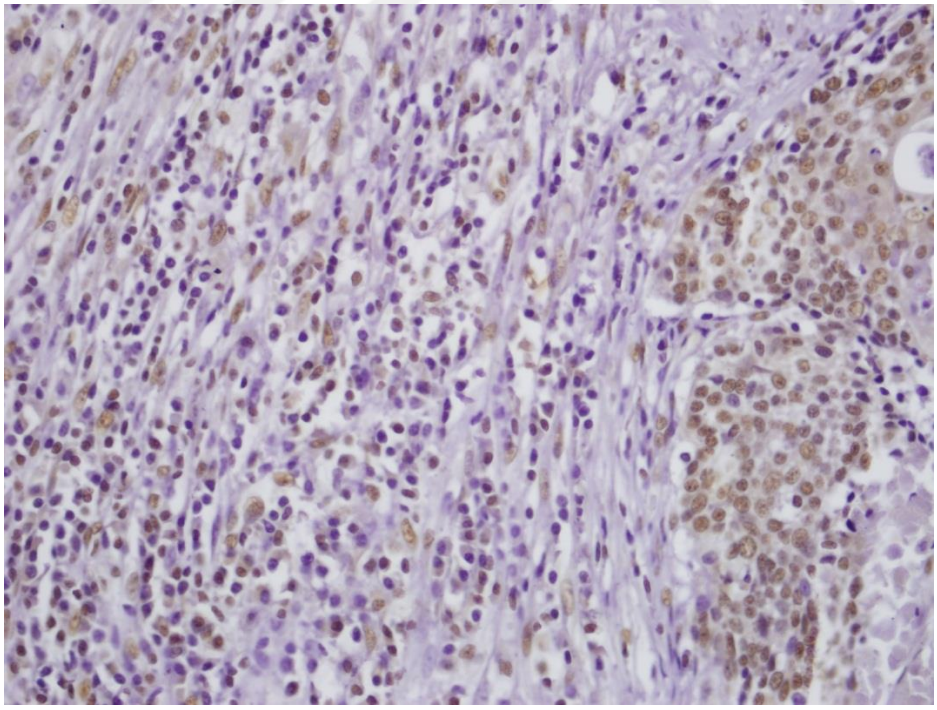
Resim 5: Nonkeratinize nazofaringeal karsinom olgusunda VEGF ile tümör hücrelerinde 2+ boyanma (x400).



Resim 6: Laringeal skuamoz hücreli karsinom olgusunda VEGF ile endotelyal hücrelerde 2+ boyanma (x200).



Resim 7: Laringeal skuamoz hücreli karsinom olgusunda Kaspaz-3 ile tümör hücrelerinde 2+ boyanma (x400).



Resim 8: Laringeal skuamoz hücreli karsinom olgusunda tümör hücrelerinde ve inflamatuvar hücrelerde Kaspaz-3 ile 1+ boyanma (x400).

KISALTMALAR

Alfabetik olarak sıralanmıştır.

BT: Bilgisayarlı Tomografi

EBV: Ebstein Barr Virus

EBNA-1: Ebstein Barr Virus Nükleer Antijen 1

EGFR: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü

GSH: İndirgenmiş Glutatyon

GSSG: Okside Glutatyon

GST: Glutatyon S-Transferaz

GSTK1: Glutatyon S-Transferaz Kappa 1

HPV: Human Papillomavirus

LMP-1: Latent Membran Protein 1

MR: Manyetik Rezonans Görüntüleme

NKNK: Nonkeratinize Nazofaringeal Karsinom

NKNC: Nonkeratinizing Nasopharyngeal Carcinoma

SCC: Squamous Cell Carcinoma

SHK: Skuamoz Hücreli Karsinom

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VEGFR: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü

ÖZET

Giriş: Laringeal ve nazofaringeal kist ve karsinomlar günlük pratikte giderek daha çok karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada larinks ve nazofarinks kistleri ile laringeal skuamoz hücreli karsinom (SHK) ve nonkeratinize nazofaringeal karsinom (NKNK) arasında Glutatyon S-Transferaz Kappa 1 (GSTK1), Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) ve Kaspaz-3 biyobelirteçlerinde immünhistokimyasal olarak boyanma farklılığı veya benzerliği araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Ondokuz adet nazofarinks ve larinks yerleşimli kist, 24 adet laringeal SHK, 10 adet NKNK olgusu belirlendi ve 9 adet normal mukoza preparatı da çalışmaya dahil edildi. Olgular kist, SHK, NKNK ve normal olmak üzere dört gruba ayrıldı. Her gruptaki vakalara ait bloklara GSTK1, VEGF ve Kaspaz-3 belirteçleri immünhistokimyasal olarak uygulandı. Epitelyal komponent, endotelyal hücreler ve inflamatuvar hücrelerde boyanma yoğunluğu değerlendirildi. Boyanma gözlenmeyen olgular skor 0 (negatif), hafif şiddette boyanma 1+ ve şiddetli boyanma 2+ olarak ışık mikroskobunda skorlandı.

Bulgular: GSTK1, VEGF ve Kaspaz-3 ile kist ve normal grup arasında epitel, endotel ve inflamatuvar hücrelerde anlamlı boyanma farkı saptanmadı ($p>0,05$). SHK ile normal grup arasında her üç belirteç ile endotelde boyanmada anlamlı farklılık saptanırken ($p<0,05$), epitelyal komponentte ise yalnızca VEGF ile boyanmada anlamlı farklılık görüldü ($p<0,05$). Kist ile SHK grubu arasında da yine her üç belirteç ile endotelde boyanmada ve epitelyal komponentte ise VEGF ile boyanmada anlamlı farklılık saptandı ($p<0,05$). Kist grubu ile normal grup arasında ve kist grubu ile NKNK grubu arasında GSTK1, VEGF ve Kaspaz-3 boyanma skorlarında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Sonuç: Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile laringeal SHK ve NKNK olgularının GSTK1, VEGF ve Kaspaz-3 belirteçleri bazında laringeal ve nazofaringeal kistler ile ilişkisi desteklenmemiştir.

ABSTRACT

Purpose: We experience laryngel and nasopharyngeal cyst and carcinomas very often in our daily practice. In this study we aim to determine any significant difference or similarity between laryngeal squamous cell carcinomas (SCC) nonkeratinizing nasopharyngeal carcinomas (NKNC) and nasopharyngeal/laryngeal cysts by scoring immunohistochemical expressions of Glutathione S Transferase Kappa 1 (GSTK1), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Caspase-3.

Matherial and Method: The specimens was composed of laryngeal and nasopharyngeal cysts (19 cases), laryngeal SCCs (24 cases), NKNCs (10 cases) and normal mucosal tissue (9 samples). Cases were categorized in four groups as cyst, SCC, NKNC and normal. Immunohistochemical analyses were performed for GSTK1, VEGF and Caspase-3. Staining was interpreted in epithelial cells (including carcinoma cells), vascular endothelial and inflammatory cells. Specimens were scored based on the intensity of expression, as 0 for negative staining, 1+ for mild and 2+ for strong staining.

Results: We found no statistically significant relationship between cyst and normal group ($p>0,05$). There were statistically significant relationship between SCC-normal and cyst-normal groups, on the basis of expression of GSTK1, VEGF and Caspase-3 in endothelial cells and VEGF in epithelial cells ($p<0,05$). No significant correlation was found between cyst-normal and NKNC-normal groups ($p>0,05$).

Conclusion: This study demonstrated that laryngeal SCCs and NKNCs are not associated with laryngeal and nasopharyngeal cysts in the basis of GSTK1, VEGF and Caspase-3 expression.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Laringeal ve nazofaringeal kist ve karsinomlar günlük pratikte giderek daha çok karşımıza çıkmaktadır. Laringeal kistler larinkste mukoza içeren her bölgesinde karşımıza çıkabilmekte olup malign olmayan laringeal lezyonların %5-10 kadarını oluşturmaktadır (1). Nazofaringeal kistler ise çoğunlukla asemptomatik olup genel popülasyonda %14'e varan oranda görülebilmektedir (2). Laringeal skuamöz hücreli karsinomlar (SHK) ve nonkeratinize nazofaringeal karsinomlar (NKNK) prognozu çok da iyi olmayan, bazen radikal cerrahi ve organ kaybı ile sonuçlanan, bunun yanı sıra radyoterapi ve/veya kemoterapi tedavisinin gerekebileceği ciddi hastalıklardır (3-7). Bu karsinomların etiyolojik faktörleri literatürde sıkça araştırılmış olmakla birlikte özellikle prognostik faktörleri belirlemek amacıyla yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur (8-11). Bunun yanı sıra laringeal SHK ve NKNK'lerde özellikle yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi, erken tanı için yeni şanslar yaratılabilmesi için yeni çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır. Bu açıdan bakıldığında bu bölgede yerleşim gösteren kist ve karsinomlar arasındaki olası direkt ilişki henüz çok da fazla değinilmemiş bir alan olup literatürde bu konuda çalışma mevcut değildir.

Glutatyon S-Transferazlar normal hücreleri toksinlere karşı koruyan faz II izoenzimlerinin bir ailesidir (12, 13). Yapılan çalışmalarda Glutatyon S-Transferaz disfonksiyonu kanser riskini arttırmakta olup hepatoselüler karsinom, meme karsinomu, prostat karsinomu ve kolorektal karsinom gibi çok çeşitli kanserlerin gelişimi ve progresyonunda rol almaktadır (12). Bu enzimlerin çok sayıda alt grubunda olduğu gibi GSTK1 alt grubunun da antikanser ilaçlara direnç mekanizmasında rolü olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (14-19).

Var olan damar yapılarından yeni damar oluşumu anjiyogenez olarak adlandırılır ve kanseröz büyümeyi desteklemek için esansiyeldir. Dahası, tümör ve metastazlarının gelişimi ve progresyonu, etkili damarsal yanıtın sonucudur. Kanser hücreleri, mikroçevre içinde, anjiyogenik süreci desteklemek için anjiyogenik büyüme faktörleri ve onların reseptörlerini serbest bırakır ve aktive eder. Damar endotelinde mitojen aktivitesi olması nedeniyle Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) en önemli pro-anjiyogenik moleküldür (20, 21). Anjiyogenezin meme karsinomu, gastrik karsinom ve over karsinomu gibi çeşitli kanserlerde prognostik önemli kanıtlanmış olmakla beraber baş boyun kanserlerinde bu sav

tartışmalıdır (22, 23). Anjiyogenez inhibitörlerinin kanser tedavisinde kullanılmasından dolayı VEGF ekspresyonu ve anjiyogenezin klinikopatolojik parametreler ve prognoz üzerindeki etkisi daha önemli hale gelmiştir (23, 24, 25).

Apoptotik mekanizmaların disregülasyonu karsinogenezde önemli rol oynamaktadır. Apoptotik süreçteki blokajlar genomik instabilite, mutasyonların birikimi ve kontrolsüz hücre çoğalmasına sebep olabilmektedir (26). Kaspaz-3 intrensek ve ekstrensek apoptoz yolağından sonra uygulayıcı fazda görev alan bir kaspazdır. Kaspaz-3'ün laringeal SHK'da prognostik faktörler ile ilişkisini destekleyen çalışmalar mevcuttur (27). Bunun yanı sıra Kaspaz-3'ü hedefleyen ilaçlar da anti-kanser tedavisinde gündemdedir (28, 29, 30).

Bu çalışmada GSTK1, VEGF ve Kaspaz-3 biyomolekülleri bazında, laringeal SHK ve NKNK'lerin, bu bölgede yerleşen kistler ile ilişkisi olup olmadığı araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

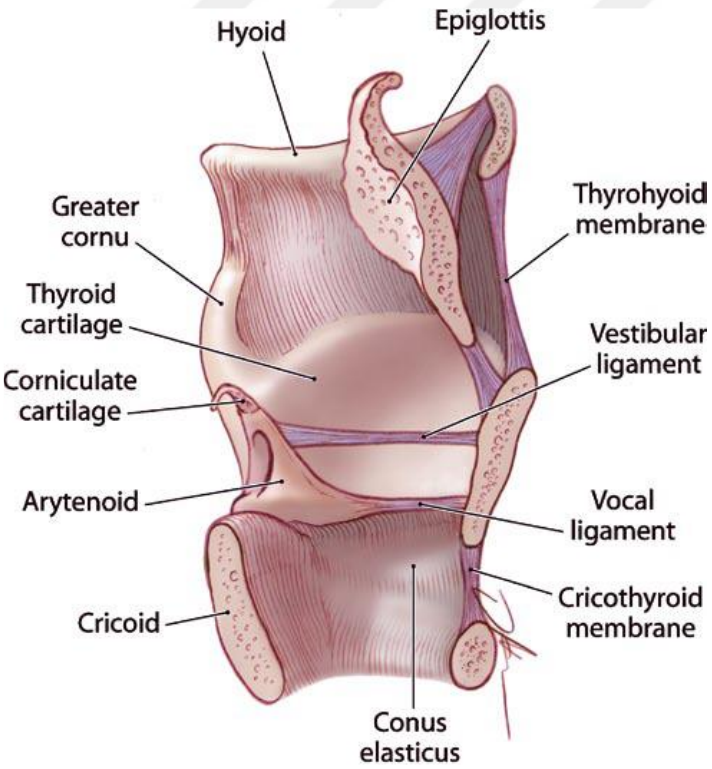
LARİNKS

Anatomi

Larinks, epiglot ile krikoid kıkırdağın alt sınırı arasında kalan bölgeye verilen isimdir (1). Lingual epiglot, tirohiyoid membran, anterior komissür, tiroid kıkırdak, krikotiroid membran ve krikoid kıkırdağın anterior arkı anteriordaki sınırları oluşturuken, posterior komissür mukozası, aritenoidler ve interaritenoid boşluk posterior sınırı meydana getirir (31).

1. Laringeal kıkırdaklar

A. Tiroid Kıkırdak: Laringeal iskelet çok çeşitli kıkırdak yapılarını barındırır (32) (Şekil 1). Bu kıkırdak yapılarının en büyüğü tiroid kıkırdaktır. Tiroid kıkırdak, iki dikdörtgen laminanın anteriorda füzyonu ile oluşur. Laminaların inkomplet füzyonu superiorda tiroid çentiği meydana getirir. Her bir laminaya posteriordan superior ve inferior cornular tutunur. Superior cornular, hiyoid kemiğin büyük boynuzları ile eklem yapar, inferior cornular ise krikoid kıkırdak ile sinovyal bir eklem yaparak krikotiroid eklemi meydana getirir.



Şekil 1: Larinksin kıkırdak ve fibroelastik yapıları (32).

Her bir superior cornunun tiroid kanat ile birleşim yerinde kıkırdaksı bir çıkıntı (superior tüberkül) vardır. Bu tüberkül, superior laringeal arter ve ve sinirin tirohiyoid membranı delmek üzere laminayı lateralden çaprazladığı yerin 1 cm aşağısına denk gelir. Sternohiyoid ve tirohiyoid kaslar tiroid laminanın anterior yüzüne oblik çizgide tutunur. İnferior faringeal konstriktör kaslar her bir tiroid laminanın posterior kenarına yapışır.

B. Krikoid Kıkırdak: Taşlı yüzük şekilli bu kıkırdak, havayolunu çepeçevre saran tek laringeal kıkırdaktır. Krikoid kıkırdak, tiroid kıkırdağın inferior cornusu ile krikotiroid eklem yüzleri aracılığıyla eklem yapar. Membranöz tutunmalar ile birinci trakeal halka ile eklem yapar. Krikoid kıkırdağın yüksekliği önde 3-4 milimetre iken arkada 20-30 milimetreye ulaşır. Bu sebeple anterior ve posterior sınırı arasında yokuşa benzeyen bir alan oluşur. Bu alan anteriorda krikotiroid membranın yerleştiği pencereyi meydana getirir.

C. Aritenoid Kıkırdak**:** Krikoid kıkırdağın posterior laminası ile eklem yapan bir çift piramidal kıkırdaktır. Her bir aritenoid kıkırdak medialde bir vokal uzantı ve lateralde bir müsküler uzantı bulundurur. Bu uzantılar vokal ligaman ve majör intrensek kasların tutunma yerleridir.

D. Aksesuar Kıkırdaklar (Küneiform ve Kornikülat): Küneiform kıkırdaklar, aritenoid kıkırdakların tepesine oturan, onlarla beraber hareket eden bir çift elastik kıkırdaktır. Ariyoepiglottik katlantıların yumuşak dokuları bu kıkırdakları çevreler. Kornikülat kıkırdaklar ise aritenoid kıkırdakların lateraline oturan, tamamen ariyoepiglottik katlantıların içine gömülü duran bir çift fibroelastik kıkırdaktır.

E. Epiglot: İnferiorda, anterior komissürün hemen altında, tiroid kıkırdağın iç yüzüne tutunan, fibroelastik, dikdörtgenimsi bir kıkırdaktır. Temel görevi çiğneme sırasında aspirasyonu engellemektir. Dilin kasılması ve laringeal elevasyon ile posteriora doğru yer değiştirir. Bu, epiglotun serbest olan üst kenarının laringal girişe doğru devrilmesine, eş zamanlı olarak da larinksin glottik ve supraglottik seviyede sfinkterik olarak kapanması ve laringeal vestibülün kapanmasına neden olur.

2. Laringeal Eklemler

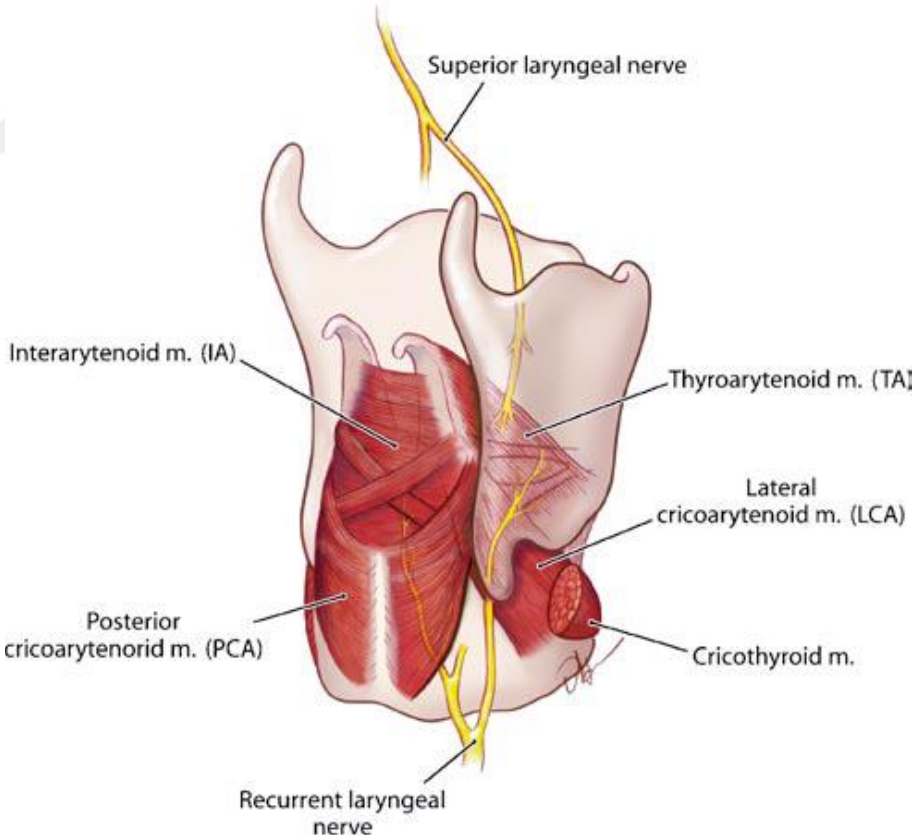
A. Krikotiroid Eklem: Tiroid kıkırdağın inferior kornusu ile krikoid laminanın fasetleri arasında meydana gelen sinovyal eklemdir (32). Tiroid kornunun krikoid kıkırdak üzerinde anteroposterior kayma ve rotasyon hareketlerini yapar. Krikotiroid kas kontraksiyonu tiroid kanadı öne çeker, tiroid kıkırdak ve krikoid kıkırdak arasındaki anteriordaki açıyı kapatır. Bu

durum anterior komissür ve vokal uzantılar arasındaki mesafeyi arttırır, böylece vokal kordlar uzar ve gerilir. Bu eklem paralitik disfoni vakalarında manipüle edilebilir.

B. Krikoaritenoid Eklem: İntrensek larinksin primer hareket eden yapısıdır. Aritenoidler krikoid kıkırdak ile multiaksiyal eklemler yapar. Bu eklemdeki hareket, iki aritenoidin vokal uzantıları arasındaki, vokal uzantılar ile anterior komissür arasındaki mesafeyi değiştirir. İntrensek kasların aritenoid kıkırdaklar üzerindeki hareketi vokal kordların şekil ve pozisyonlarını değiştirir.

3. Laringeal Kaslar

A. İntrensek Laringeal Kaslar: Larinksin intrensek kasları, aritenoidlerin müsküler ve vokal uzantılarının oryantasyonunu, vokal kordların şekil, boy, gerginlik derecelerini değiştirerek ayarlar (32) (Şekil 2). Kaslar genel olarak üç majör vokal kord addüktörü, bir abdüktör ve bir tensor kas olarak sınıflandırılır.



Şekil 2: Larinskin nöromüsküler yapısı (32).

Addüktör kaslar lateral krikoaritenoid kas, tiroaritenoid kas ve interaritenoid kas olmak üzere üç çeşittir. Lateral krikoaritenoid kaslar krikoid kıkırdağın üst sınırına lateralden, müsküler uzantısının anterioruna medialden tutunan bir çift kastır. Kontraksiyonu, müsküler uzantının anterolaterale, vokal uzantının inferior ve mediale hareketi ile sonuçlanır bu sayede vokal kordların addüksiyonu ve uzaması meydana gelir. Tiroaritenoid kas, internus ve eksternus olmak üzere iki bölümden oluşur. Tiroaritenoid externus kası, anteriorda anterior komissüre, posterolateralde aritenoidin lateral yüzüne tutunur. Bu kasın kontraksiyonu ile vokal uzantılar anteriorkomissüre yakınlaşır ve vokal kordlar kısalır (addüksiyon). Tiroaritenoid internus kası anteriorkomissürden başlayarak aritenoid kıkırdağın vokal uzantısına tutunur. Kontraksiyonu ile vokal l kısalır ve kalınlaşır. Bu kas aynı zamanda vokal kas olarak da adlandırılır. Ayrıca vokal kordların rezonans frekansını azaltır. İnteraritenoid kas, transvers ve oblik fibriller içerir. Transvers fibriller her bir arytenoidin posterior yüzüne tutunur ve horizontal olarak yerleşir. Oblik fibriller her bir arytenoidin apeksine tutunur ve oblik olarak yerleşir, bu sayede karşı tarafın posterior yüzüne tutunur. Bu kasın kontraksiyonu arytenoid addüksiyon, posterior glottisin kapanması, laringeal girişin daralması ile sonuçlanır.

Larinksin abdüktör kası posteriorkrikoaritenoid kastır. Krikoid laminanın posterior yüzünden başlayarak diagonal olarak devam eder ve aritenoidin müsküler uzantısına tutunur. Kontraksiyonu ile müsküler uzantı posterior ve kaudale, vokal uzantılar superior ve laterale doğru yer değiştirir. Sonuç vokal kordların abdüksiyonudur. Bu kas vokal kordların tek abdüktör kasıdır ve glottik havayolunun kontrolünden sorumludur. Krikoaritenoid eklemi iki ayrı kas grubu ile iki ayrı düzlemde etkiler. Medial kısmı posterior krikoid laminadan başlayıp oblik olarak devam eder ve müsküler uzantının medialine tutunur. Lateral kısım ise vertikal olarak devam edip müsküler uzantının lateraline tutunur. Her bir kas grubunun farklı pozisyon ve oryantasyanu sonucu krikoaritenoid eklem farklı oblik akslarda hareket eder.

Larinksin tensör kası ise krikotiroid kastır. Krikotiroid kas larengial kıkırdağın dış yüzünde yer alır, iki ayrı kas grubundan oluşur. Rekta kısmı daha vertikal olup, krikoid kıkırdağın süperior riminden köken alır ve tiroid kıkırdağın inferior rimine tutunur. Oblik kısım ise krikoid kıkırdağın süperior arkından oblik olarak geçer ve inferior kornuya tutunur. Kontraksiyonları ile krikotiroid boşluk anteriorda daralır, diğer yandan posterior krikoid lamina ve krikoaritenoid eklemler kaudale doğru yer değiştirir. Bu sayede vokal kordlar uzar, sıkılaşır ve incelir. Bunun sonucu olarak rezonansfrekansı artar ve vokal kordların addüksiyonu meydana gelir.

B. Ekstrensek Laringeal Kaslar: İnfrahyoid kaslar (sternotiroid, sternohiyoid ve tirohiyoid), milohiyoid, digastrik, geniohiyoid ve stilofaringeus kasları laringeal stabilizasyonu ve indirekt olarak vokal kord pozisyonlarını etkileyen kaslardır.

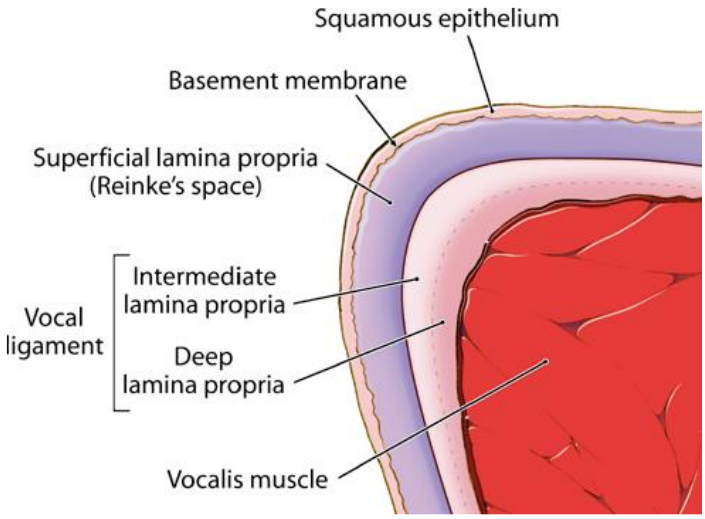
4. Larinksin Fibroelastik Dokusu

A. Kuadrangüler Membran: Supraglottik larinksin aksesuar elastik destek yapısıdır (32). Epiglotun lateral uçlarına anteriordan, aritenoidlere ise posteriordan tutunur. Kuadrangüler membranın superior serbest ucu, mukoza ile çevrili ariyoepiglottik katlantıdır. Aşağı doğru gittikçe piriform sinüsün medial duvarını oluşturur. İnferiorda vestibuler ligaman ile devamlılık gösterir.

B. Konus Elastikus: Glottis ve subglottisin fibroelastik destek yapısı olan konus elastikus, krikoid kıkırdağın superior sınırından başlayıp anterior komissür ve vokal uzantılara tutunur. Medial kısmı vokal ligamanı oluşturur. Konus elastikus anteriorda krikotiroid membran ile devam eder.

5. Vokal Kordların Mikroanatomisi

Gerçek vokal kordun kompleks mikroanatomisi sayesinde gevşek ve yumuşak yüzeyel mukozal tabakalar, daha sert olan yapısal alt katmanlar üzerinde serbestçe titreşir (32) (Şekil 3). Gerçek vokal kord 2 ana bölgeye ayrılır: Mukoza, vokal ligaman ve altta kas tabakası. Vokal kordun mukozası titreşim fonksiyonu için özelleşmiştir. En yüzeyel tabaka çok katlı yassı epitel tabakasıdır. Lamina propria 3 tabakaya ayrılır. Derine doğru gidildikçe dayanıklılık artar. Lamina proprianın yüzeyel tabakası çoğunlukla aselüler olup ekstraselüler matriks proteinleri, su, gevşek dizilmiş kollajen ve elastin fibrillerden oluşur ve jelatinözdür. Yüzeyel tabaka ile orta tabaka arasındaki potansiyel boşluk Reinke boşluğu olarak adlandırılır. Orta ve derin tabakalar çoğunlukla elastin ve kollajen fibrillerden oluşur. En yoğun olan derin tabaka çok sıkı kollajen fibrillerden meydana gelir. İntermedier ve derin tabaka vokal ligamanı oluşturur. Jelatinöz süperfisyel tabaka, çok katlı yassı epitel tabakası ile beraber vokal ligaman ve vokal kas üzerinde serbestçe hareket ederek titreşim oluşturur.



Şekil 3: Vokal kordun mikroanatomik yapısı, koronal kesit (32).

Vokal kord mukozası ve vokal ligaman vokal kası sarar ve anterior komissürden aritenoidlerin vokal uzantılarına kadar devam eder. Mukoza ve vokal ligaman, vokal uzantıyı sarmak için posteriora kadar uzanır. Dolayısıyla, endoskopik olarak görülen gerçek vokal kordun arka 1/3'ü respiratuvar (veya kıkırdaksı) kısım, ön 1/3'ü ise fonatör (membranöz) kısmıdır.

6. Kan Dolaşımı

Larinksin arteriyel desteği superior ve inferior laringeal arterden gelir, venöz dolaşım da benzer şekildedir (32). Superior laringeal arter, eksternal karotid arterden direk olarak çıkan superior tiroid arterin dalıdır. Superior laringeal arter, hyoid kemik hizasında dallandıktan sonra superior laringeal sinirin internal dalını çaprazlar ve superior tuberkülün 1 cm anterior ve superiorundan tirohiyoid membrana girer. Superior laringeal arterin dalı olan krikotiroid arter, krikotiroid kas ve eklemi beslemek için tiroid kartilajın inferior yüzünde seyreder. Bu arterin dalları krikotiroid membranı deler, tiroid kıkırdağın iç yüzünde yukarı doğru seyreder. İkinci majör arter desteğini, inferior tiorid arterin dalı olan inferior laringeal arter sağlar. İnferior konstriktör kasın fibrilleri arasından geçer ve superior laringeal arterin dalları ile anastomoz yapar.

7. Sinirler

Serebral korteksten çıkan kortikobulbar lifler internal kapsüle geçerek nukleus ambiguusta motor nöronlar ile sinaps yapar (32). Alt motor nöronlar nukleus ambiguustan

çıkar, lateralde devam eder ve medullayı olive-piramid arasından 8-10 kökçük olarak terk eder. Bu kökçükler birleşerek tek bir nöron kökü meydana getirir (vagus) ve jugular foramenden kafa tabanını terk eder. Vagus, aşağı inip karotid kılıfa girer ve üç ana dal verir: Faringeal, superior laringeal ve rekürren laringeal sinir. Superior laringeal sinir glottik ve supraglottik larinksin duyusunu ve krikotiroid kasın motor iletisini taşır. Son yapılan çalışmalar sonucu tiroaritenoid kasın superior kısmının (yalancı vokal korddaki ventriküler kas)superior laringeal sinir tarafından innerve edildiği düşünülmektedir. Rekürren laringeal sinir solda aortik arkın, sağda subklavyen arterin altından dolanır ve trakeözofageal yarıkta boyna doğru devam eder. Larinkse posteriordan, krikotiroid eklemin yanından girer. İpsilateral posterior krikoaritenoid, interaritenoid ve lateral krikoaritenoid kasları innerve eder ve tiroaritenoid kasta sonlanır. Dolayısıyla bu sinir, krikotiroid kas (ve yukarıda bahsedildiği üzere ventriküler kas) hariç larinksin tüm intrensek kaslarını innerve eder.

Histoloji-Embriyoloji

Larinksin supraglottik kısmı üçüncü ve dördüncü brankiyal arklardan, glottik ve subglottik kısımları ise beşinci ve altıncı arktan gelişir (31). Solunum traktı, emriyogenezin yirmibirinci gününde, ön barsağın sefalik kısmında bir yarık olarak karşımıza çıkar. Bu, epiglotun öncülüdür. Larinksin taslağı otuzuncu günde belirir. Daha sonra solunum yarığı kapanmaya başlar ve aritenoidlerin oluşması ile kapanma tamamlanır (33). Bu yarığın döşeyici epiteli endodermal kökenli üç sıralı polihedral embriyonik hücreler olarak, 3-5 milimetre boyutundaki embriyoda ortaya çıkar. 30 milimetre boyutundaki fetüsta, yaklaşık altmış-yetmişinci günde embriyonik skuamöz epitelin kalınlığı artar ve vokal kordlar diferansiye olmaya başlar. Kırk milimetre boyutundaki fetüste epiglot ve laringeal vestibulde silli epitel oluşur. Bu iki epitel arasındaki keskin sınır fetüs 95 metrekareye ulaştığında belirginleşir. Yenidoğanın larinksi, vokal kordlar dışında silli epitel ile döşelidir. Buna ek olarak çok katlı yassı epitel interaritenoid alan ve epiglotun lingual, bazen de laringeal ucunda da bulunur (34).

Fizyoloji

Laringeal fonksiyonların en primitif olanı havayolunun korunmasıdır (32). İnsanlarda larinks, havayolu korunmasının yanı sıra ses ve konuşma oluşumu gibi çok önemli işlevlere sahiptir. Larinks, dış etkenlere ve yabancı cisimlere karşı havayolunu korumak için çok çeşitli reflekslere sahiptir. Bu refleks mekanizmaları mukozal (duyusal afferent), miyotatik ve

rekürren laringeal sinirler boyunca iletilir. Bu reflekslerin en güçlüsü laringospazmdır. Larinks ayrıca öksürük, apne, bradikardi, hipotansiyon yapan reflekslere de sahiptir.

Laringeal fonksiyonların en karmaşık ve özel olanı ses oluşumudur ve çok çeşitli faktörlerin eş zamanlı var olmasını gerektirir. Yeterli subglottik basıncın oluşması için uygun nefes desteği; glottik kapanma, vokal kordların uygun uzunluk ve gerginliği için laringeal kasların kontrolü ve elbette vokal kordların titreşim ve esneklik kapasitesi gereklidir. Tiroaritenoid, lateral krikoaritenoid, interaritenoid ve krikotiroid kaslar ses oluşumunda görev alır.

Ses oluşumu, beyin sapı refleksleri, kas aktiviteleri ve yüksek oranda kortikal kontrol gerektirir. Akciğer kapasitesi, göğüs duvarı kompliyansı, faringeal, nazal, oral anatomi ve mental durum gibi ek faktörler de ses oluşumunda etkilidir. Süreç inhalasyon ve glottisin kapanışı ile başlar. Subglottik basınç, kapalı glottik kapanma kuvvetinin üzerine çıkana kadar artmaya devam eder ve böylelikle hava vokal kordların arasına geçer. Body-cover teorisine göre vokal kordların gevşek mukozası, daha sert olan vokal ligaman ve vokal kas üzerinde dalga şeklinde hareket eder. Bu hareket mukozal dalga olarak adlandırılır. Dalga infraglottik olarak başlar, vokal kordların serbest ucuna yukarı doğru gider, daha sonra superior yüzün lateraline yayılır. Son olarak inferior sınırlar, hem açık glottiste basıncın düşmesine hem de dokuların elastik recoillerinden ötürü tekrar bir araya gelirler. Kapanış fazında bu basamaklar ters sırayla gerçekleşir. Subglottik basınç tekrar yükseldiğinde siklus yeniden başlar.

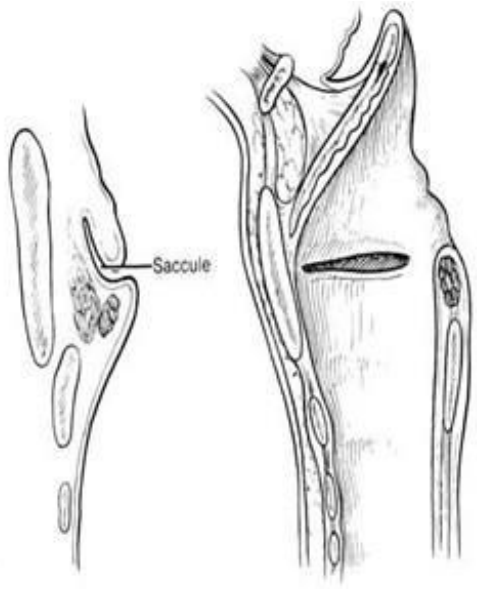
LARİNGEAL KİSTLER

Terminoloji

Büyük sakküller, bazı laringeal kistler ve laringosel; laringeal ventrikülün sakküler uzantısında meydana gelen konjenital veya edinilmiş hastalıkların spektrumunu temsil eder.

Sakkül (cul-de-sac), tiroid kıkırdağın iç yüzü ile yalancı vokal kord arasında yukarı doğru uzanan kör sonlanan bir kesedir (Şekil 4). Laringeal ventrikülün appendiksi olarak da bilinir ve solunum tipi epitel ile döşelidir. İnfantlarda görece daha büyük olan sakkül, papiller müköz membran ile döşeli olup subepitelyal lenfoid agregatlar içerir (35). Erişkinlerde ise mukoza daha az karmaşık ve lenfoid komponentten yoksundur. Çok sayıda müköz gland sekresyonlarını sakküle boşaltır. Sakkül, vokal kordlar için kayganlaştırıcı görevi görür. Ventriküldeki sakküler orifis 0,5-1.0 milimetre boyutundadır. Bu sebeple atrezi, tümör,

enfeksiyon, fibrozis ve travma gibi sebeplerden kolaylıkla etkilenebilir. Sakkülün derinliği değişkendir, erkeklerde kadınlardan daha geniş olma eğilimindedir. Broyles, çalışmalar sonucu sakkülün %75 olguda 6-8 milimetre, %25 olguda 10 milimetre ve üstü, %7 olguda 15 milimetre ve üstü derinlikte olduğunu saptamıştır (36). Tiroid kıkırdağın üst sınırı, vokal kordların süperiorundan 16 milimetre yukarıdadır. Dolayısıyla az sayıda erişkinde sakkül, tiroid kartilaj seviyesinden daha yukarı uzanır (37). Fetüs ve yenidoğanda bu 'uzamış' sakküller %25 oranında bulunur. Bazı 'normal' larinkslerde de sakkül bulunmayabilir (38).



Şekil 4: Laringeal sakkül.

Sakkül obstrükte olup sekresyon birikimi olursa sakküler kist oluşur. Eğer sakkül hava ile dolar ve laringeal lümen ile açık ilişkide olursa laringosel terimi kullanılır.

Laringeal kistler konjenital/edinilmiş, duktal/sakküler, tonsiller/epitelyal/onkositik olmak üzere çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir (38, 39, 40). DeSanto, Devine ve Weiland, kistik laringeal lezyonları sakküler, duktal ve tiroid kıkırdak foraminal kistler olmak üzere 3 grupta sınıflandırmışlardır (39). Son dönemlerde Forte ve arkadaşları, kistin büyüklüğü ve içerdiği dokulara göre 2 alt gruba ayırmayı önermiştir. Radyolojik ve klinik olarak larinkse sınırlı olup endoskopik olarak tamamen ve kolayca çıkarılabilen kistler tip I olarak, ekstralaringeal yayılımı olanlar tip II olarak adlandırılmıştır. Sadece endodermal hücreler mevcut ise tip IIa, hem endodermal hem mezodermal elemanlar mevcut ise tip IIb olarak sınıflandırılır (42).

Laringeal kistlerin çoğu edinilmiş olup duktal-epitelyal tiptedir. Tek veya çok sayıda olabilirler. Çoğunlukla 50 yaş üzeri bireylerde görülmekle birlikte her yaş grubunda karşımıza çıkabilirler (37, 39, 43). Ses kısıklığı, disfaji, öksürük, beslenme problemleri, boyunda yabancı cisim hissi, boyunda kitle, ağrı gibi şikayetler ile prezente olabilir. Çoğu olguda kistler asemptomatik olup insidental olarak farkedilirler.

Kistler primer olarak supraglottik larinks, daha az sıklıkla glottis, nadiren de subglottik bölgede yerleşir. Muköz bezlerin duktuslarındaki veya laringeal sakkülün orifisindeki obstrüksiyon sonucu oluşur.

İnfant ve çocuklardaki laringeal kistlerin %20-30 unun, diğer konjenital veya gelişimsel anomaliler ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir. Down Sendromu, kistik fibrozis, serebral palsi, kardiyak anomaliler, prematürite, hidrosefali, mikrosefali bu anomalilerden birkaçıdır (37, 44, 45).

DeSanto ve arkadaşları larinks kistlerini duktal (kistlerin %75'i) ve sakküler (kistlerin %25'i) olmak üzere 2 ana kategoriye ayırmışlardır (39).

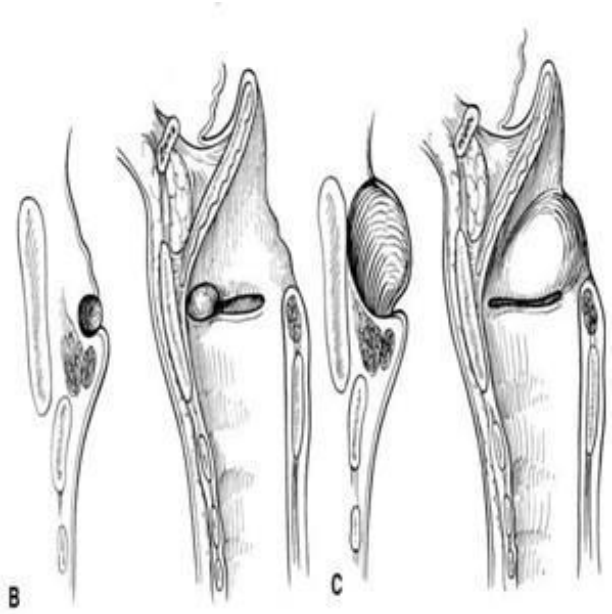
Duktal Kist

Müköz bezlerin duktusları oklüde olduğunda duktal kist oluşur ve bezlerin bulunduğu her yerde oluşabilir. Çoğunlukla 1 cm den küçük, yüzeyel, mukoza içinde görülebilen lezyonlardır. %40'ı gerçek vokal kord civarında, %37'si epiglot, diğerleri ise yalancı vokal kord, ventrikül, ariyoepiglottik katlantı, aritenoid, piriform sinüs ve subglottiste izlenir (39).

Sakküler Kist

Laringeal sakkülün obstrüksiyonu ile oluşan mukus dolu kistlerdir. Hemen her zaman supraglottik kökenli, submukozal, normal müköz membran ile çevrili, 1-7,5 cm arasında değişen boyutlarda olabilen kistlerdir. %58 oranında ventrikül, %14 ariyoepiglottik katlantı, %12 lateral larinkste yerleşir (39).

Sakküler kistler anterior ve lateral olmak üzere ikiye ayrılır (Şekil 5). Yüzde 60 kadarı anteriordur ve ventikül orifisi ve anterior glottis etrafında yerleşir (37, 39). Lateral sakküler kistler ise ariyoepiglottik katlantılar, yalancı vokal kord, epiglot yerleşimlidir. Nadir vakalarda kist tirohiyoid membrandan dışarı doğru uzanıp boyunda kitle olarak karşımıza çıkabilir. Bir kistin anterior veya lateral olduğuna sakkülün uzunluğu ve obstrüksiyon seviyesine göre karar verilir.



Şekil 5: Anterior sakküler kist ve lateral sakküler kist.

Histolojik olarak duktal ve sakküler kistler solunum tipi veya skuamöz epitel ile döşelidir. Bu sebeple belirgin ayırıcı özellikleri yoktur. Bazılarında fokal veya tümüyle onkositik epitel görülebilir. DeSanto'nun duktal-sakküler sınıflaması yerleşim, derinlik, çap gibi kriterlere dayalı olup bazı kistler parçalı halde eksize edildiğinde yüzey mukozası ile ilişkisini kaybettiğinden patologlar açısından kullanışlılığı sorgulanmıştır. Bu sebeple daha kullanışlı ve klinik olarak da karşılık bulabilecek bir sınıflama arayışı başlamıştır. Newman ve arkadaşları yaptıkları çalışmalar sonucu laringeal kistleri epitelyal kist, tonsiller kist ve onkositik kist olmak üzere 3 gruba ayırmayı önermişlerdir (40). Ramesar ve arkadaşlarının 72 laringeal kist olgusunda yaptıkları çalışmada ise vakaların %66'sı epitelyal kist, %15'i onkositik kist, %19'u tonsiller kist olarak tespit edilmiştir (41).

Tonsiller Kist

Keratin ile genişlemiş palatin tonsiller kripti andıran bir histolojik yapısı vardır. Hemen hemen her zaman epiglot, vallekula veya piriform sinüs yerleşimlidir. Tek veya multipl olabilir. Genellikle küçük, skuamöz epitel ile döşeli, keratin ile dolu, germinal merkez içeren lenfoid doku ile çevrili kistlerdir (46).

Epitelyal Kist

Supraglottik larinks, piriform sinüs veya vallekula yerleşimlidir. Solunum tipi ve/veya skuamöz epitel ile döşeli papiller içe katlantılar görülebilir. Dolayısıyla keratin veya müsin içerebilirler. Bazıları küçük lenfoid agregatlar ile ilişkili olabilir. Ek klinik bilgiler varlığında epitelyal kistler duktal ve sakküler kist olarak sınıflandırılabilir (46).

Onkositik Kist

Çoğunlukla yalancı kordlar ve ventrikül çevresinde, 50 yaş üzeri bireylerde görülür. Uniloküler olabileceği gibi papiller içe katlantılar da gösterebilir. Papiller içe katlantılar gösteren onkositik kistler onkositik papiller kistadenom olarak da adlandırılır. Bu kistler onkositik epitel ile döşeli olup, multifokaliteye ve lokal rekürrense yatkındır (46).

Tedavi

Laringeal stenozdan kaçınmak için infant ve çocuklarda koruyucu yaklaşım yapılmalıdır. Bazı araştırmacılar öncelikle iğne aspirasyon önermektedir. Rekürrens olduğunda tekrar iğne aspirasyonu, bazı olgularda kistin çatısını çıkarmak, kistin kup forseps ile eksizyonu veya lazer ile marsupiyalizasyonu gerekebilir (47).

LARİNKS TÜMÖRLERİ

Larinks supraglottis, glottis ve subglottis olmak üzere üç bölüme ayrılmıştır. Supraglottis; epiglot, ariyoepiglottik katlantılar, yalancı vokal kordlar, ventikül ve sakkülden oluşur. Epiglotun ucu ve ariyoepiglottik katlantılar supraglottisin superior ve lateral sınırlarını oluşturur. Ventrikülün lateral sınırı ile gerçek vokal kordun superior yüzeyinin birleşim yerinden geçen horizontal düzlem inferior sınırı meydana getirir. Ventrikül, gerçek ve yalancı vokal kordlar arasında bulunan bir ceptir. Ventrikülün lateral superior uzanımı (cul-de-sac) sakkül olarak adlandırılır. Epiglot hiyoid kemik seviyesinden geçen bir düzlem ile suprahiyoid ve infrahiyoid olmak üzere iki kompartmana ayrılır (31).

Glottis, ventrikülün lateral sınırı ile gerçek vokal kord superiorunun birleşim yerinden geçen horizontal düzlemden başlar, ventrikülün lateral sınırının 10 milimetre inferiorundan çizilen hayali horizontal düzleme kadar devam eder (31). Gerçek vokal kordlar, anterior ve posterior komissürleri içerir. Subglottis gerçek vokal kordların 10 milimetre inferiorundan başlar, krikoid kıkırdağın inferior sınırında sonlanır. Klinik olarak subglottik olan çoğu tümör

aslında gerçek vokal kordların alt yüzeyinden köken alır ve glottik kategoride değerlendirilir. Transglottik terimi, ventrikülü vertikal olarak kat eden, hem supraglottisi hem glottisi, nadiren subglottisi tutan tümörler için kullanılır (48). Laringeal tümörlerin büyüme ve yayılmasına tümörün köken aldığı yer ve farklı laringeal kompartmanlarda bulunan anatomik bariyerler yön verir (49). Bu anatomik bariyerlerden en önemlileri; anterior komissür tendon (Broyles ligamanı), paraglottik boşluk ve preepiglottik boşluktur.

Anterior komissür tendon, vokal ligamanlardan başlayıp tiroid kıkırdağın üst iç yüzünde orta hatta uzanan, 1 mm genişliğinde, 10 milimetre uzunluğunda, fibröz dokudan oluşan bir banttır. Lenfatik damarları ve kan damarlarını barındırır. Bunun yanı sıra, tiroid kıkırdağa tutunduğu yerde perikondrium olmadığı için, komşu yumuşak dokulara veya prelaringeal (Delphian) lenf noduna yayılımda önem arz etmektedir (31).

Paraglottik boşluk ventrikül ve sakküle doğru uzanan, yağ doku ve gevşek bağ doku ile dolu potansiyel bir boşluktur. İnferiorda konus elastikus, lateralde tiroid kartilaj, medialde kuadrangüler membran, posteriorda ise piriform sinüs ile sınırlandırılmıştır. Preepiglottik boşluk da yağ ve gevşek bağ doku ile dolu üçgen şekilli bir alandır. Anteriorda tiroid kıkırdak ve tirohiyoid membran, posteriorda epiglot ve tiroepiglottik membran, posteriorda epiglot ve tiroepiglottik ligaman, superiorda da üçgenin tabanını meydana getiren hiyoepiglottik ligaman ile sınırlıdır. Paraglottik ve preepiglottik boşluklar lenfatikler ve kan damarlarından zengin olup lenf nodu içermezler. Suprahiyoid epiglottik tümörler preepiglottik boşluğun superiorunda yerleşip dil tabanına doğru yayılım gösterebilirler. Preepiglottik ve paraglottik boşluğu invaze eden tümörler gevşek bağ dokudan kolayca geçerek ekstralaringeal dokulara yayılım gösterebilir (31).

Supraglottik larinks lenfatiklerden zengin olup bu lenfatikler üst, orta ve alt juguler lenf nodlarına drene olur (seviye II, III, IV). Glottisin ise lenfatik desteği sınırlıdır ve supraglottik larinks ile aynı lenf nodlarına drene olur. Eğer glottik bir tümör (karsinom), inferiora doğru 1 cm den daha fazla büyürse paratrakeal lenf nodlarında metastaz riski meydana gelir. Subglottisin lenfatik drenajı esas olarak paratrakeal lenf nodlarına, az oranda orta ve alt juguler lenf nodlarına (seviye III, IV) olur (31).

Yaşamın ilk dönemlerinde larinks tamamen solunum tipi epitel ile döşelidir. Zamanla bu epitel keratinize olmayan çok katlı skuamöz epitel ile yer değiştirmeye başlar. Erişkin larinksi, solunum tipi epitel ile döşeli olan ventrikül ve subglottis dışında tamamen skuamöz epitel ile döşelidir. Nadiren tipik bir erişkin supraglottisinde yamasal olarak persistan silli

solunum tipi epitel görülebilir.Gerçek vokal kordların keratinize olmayan skuamöz epiteli normalde 5-10 hücre kalınlığındadır. Supraglottis ve subglottiste bolca görülen seromüköz bezler ise gerçek vokal kordlarda bulunmaz (31).

Epidemiyoloji

Laringeal skuamöz hücreli karsinom (SHK) genellikle altıncı ve yedinci dekadda, nadiren çocuklarda görülür (50, 51). Erkeklerde kadınlara oranla daha sık karşımıza çıkmakla birlikte bazı ülkelerde son iki dekaddır kadınlarda sigara kullanımının artmasıyla birlikte erkek kadın oranı düşmüştür (52, 53).

İnsidans

SHK, laringeal malignitelerin %95'ini oluşturur. Çoğunluğu supraglottik ve glottik bölgeden köken alır. Erkeklerde insidansın yüksek olduğu yerler (yılda 10/100,000 veya fazla) Orta ve Güney Avrupa, Güney Brezilya, Uruguay, Arjantin; düşük olduğu yerler (yılda <1/100,000) Güneydoğu Asya ve Afrika'dır. Kadınlarda çoğu ülkede insidans 1/100,000' den düşüktür. Kırsal kesimlerde şehir merkezlerine göre daha az sıklıkta görülür (52, 53).

Laringeal SHK'lerin topografik yerleşimine göre coğrafik farklılıklar da söz konusudur. Fransa, İspanya, İtalya, Finlandiya ve Hollanda'da supraglottik SHK baskın iken, ABD, Kanada, İngiltere ve İsveç'te glottik SHK daha fazla oranda görülür. Japonya'da supraglottik ve glottik SHK'ler yaklaşık olarak eşit oranda görülür.

Laringeal SHK insidansı, sigara ve alkol tüketimindeki artış sebebiyle, erkek ve kadınlarda tüm dünyada artmaktadır (52). Primer korunma, sigara ve alkol tüketiminin durmasıyla mümkün olacaktır.

Etiyoloji

1.Sigara ve Alkol

Batı ülkelerinde laringeal kanser olgularının çoğu sigara ve alkol kullanımı ile ilişkilidir. İkisine kombine maruziyet, ayrı ayrı maruz kalma etkisinin toplamından daha fazla etkilidir (54, 55). İtalya ve İsviçre'de yapılan kontrollü vaka çalışmalarında ağır alkol tüketenlerde laringeal SHK için rölatif risk 2,46, alkol kullanmayan ama sigara kullananlarda ise rölatif risk 9.38 bulunmuştur (56).

2. Asbest ve Mesleki Maruziyet

Mesleki asbest maruziyeti ile laringeal SHK gelişme riski arasındaki ilişki tartışmalıdır. Son yapılan çalışmalarda asbest maruziyetinin nedensel rolü desteklenmemiştir (57). Polisiklik aromatik hidrokarbon, metal tozu, cement tozu, cila, vernik vb. gibi mesleki maruziyetler ile laringeal SHK gelişme riski arasındaki lişkiyi destekleyen kanıtlar mevcuttur (58). İyonize radyasyon, dizel egsoz, sülfürik asit ve hardal gazı (iperit) ile laringeal SHK gelişimi arasında önemli ilişki mevcuttur (58, 59).

3. Human Papillomavirus (HPV)

Laringeal SHK olgularının %3-85 kadarında HPV16 nın rolü hakkında çelişkili kanıtlar mevcuttur. HPV nin karsinogenezdeki rolünün, eğer varsa, minör olduğu düşünülmektedir (60, 61). Klinik ve histolojik olarak normal olan larinkslerin %12-25'inde HPV DNA tespit edilmiştir (62). Bu sebeple laringeal SHK'de HPV pozitifliğinin insidental olduğu düşünülmektedir.

4. Diyet ve Beslenme

Yüksek oranda sebze ve meyve alımı ile koruyucu etkinin sağlanabileceği düşünülmektedir (55, 63).

5. Gastroözofageal Reflü

Artmış laringeal SHK riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Sigara ve alkol varlığında, laringeal SHK gelişiminde hızlandırıcı faktör olarak rol alabilir (64).

6. Genetik Özellikler

Laringeal karsinogenezde güçlü genetik faktörlerin varlığını destekleyen bulgu yoktur. Alkol ve sigaranın detoksifikasyonunda rol alan enzimlerdeki polimorfizmlerin rölatif riski 1.5-2 dir. Bloom Sendromu, laringeal ve hipofaringeal SHK yatkınlığına yol açan genetik bir durumdur (65, 66).

Klinik Özellikler ve Tanısal Prosedür

Larinksteki tümörün tuttuğu anatomik bölge semptomlara, tanı anındaki evreye, tedavi ve prognoza direk etkilidir. Supraglottis ve glottisteki malignensilerin çoğunluğu SHK dir. SHK nin laringeal kompartmanlar arası dağılımı ise coğrafik değişiklik göstermektedir. Non-

skuamoz tümörler ise laringeal malignensilerin çok küçük bir kısmını oluşturur ve glottisten ziyade supraglottis ve infraglottiste yerleşir.

Glottik tümörler ses kısıklığı ile prezente olur ve tanı anında küçüktür. Bunun aksine, supraglottis klinik olarak daha sessiz bir alan olduğundan tanı anında daha büyük tümörler karşımıza çıkar. Epiglottik tümörler ses özelliğinde değişiklik, havayolu obstrüksiyonu, disfaji ve/veya servikal metastaz ile karşımıza çıkar. Epiglotun tabanındaki tümörler indirekt laringoskopide gözden kaçabilir. Primer ventriküler tümörler laringeal muayenede kenarda kalıp yalancı vokal kordun altından bir çıkıntı oluşturabilir. Piriform sinüs tümörleri tespit edildiklerinde büyük olup odinofaji veya otalji ile prezente olurlar. Tümör piriform sinüsün medial duvarını veya apeksini tutarsa vokal kord disfonksiyonu oluşabilir.

Detaylı anamnez ve fizik muayene ile tümörün yeri ve yayılımı belirlenebilir. Klinisyenin en doğru tedaviye karar vermesine yardımcı olan 4 ana basamak mevcuttur: patolojik tanı, tümörün lokal yayılımı, bölgesel lenf nodlarının durumu ve uzak metastazın olup olmayışı.

Direk endoskopi hem biyopsi elde etmek, hem tümörün yayılımını değerlendirmek ve ek ikinci primer tümörü dışlamak için gereklidir.

Prognoz ve Prediktif Faktörler

Küçük glottik ve supraglottik SHK lazer eksizyon, sınırlı rezeksiyon veya primer radyoterapi ile konservatif olarak tedavi edilebilir. Bu yaklaşımın küratif potansiyeli vardır ve sağkalımı iyidir (67). Vokal kordları fikse eden glottik ve supraglottik karsinomlar primer rezeksiyon, beraberinde olası radyoterapi veya organ koruyucu protokoller (neoadjuvan kemoterapi ve küratif radyoterapi) ile tedavi edilebilir. Tümör sebat eder veya tekrarlar ise geciken total larenjektomiden ötürü genel sağ kalımda azalma olmaz.

TNM tümör sınıflaması hastalıksız ve genel sağ kalım ile tutarlı bir şekilde koreledir. TNM Evre IV hastalar arasında ekstensiv kıkırdak invazyonu ve/veya büyük tümör volümü varlığı kemoradyoterapiye kötü cevabın göstergesi olup bu hastaların primer rezeksiyon ve olası adjuvan radyoterapi ile tedavi edilmesi gerekmektedir (68). Konjestif kalp hastalığı, kardiyak aritmi, periferal vasküler hastalık, pulmoner hastalık, renal hastalık, kanser varlığı gibi komorbiditeler sağkalımda önemli belirleyicilerdendir.

Genel olarak histolojik derecelendirme sağ kalımda sınırlı etkiye sahiptir. Bunun yanında tümörün invazyon paterni tek başına veya diğer histolojik değişkenler ile kombine

olarak laringeal karsinom için prediktif değere sahiptir (69). T1/T2 laringeal SHK olgularında invazyon paterninin biyopsi ile değerlendirilmesi sonucu hangi olguların primer radyoterapiye cevap vereceği, hangi olgular için primer rezeksiyonun daha iyi bir seçenek olduğu öngörülmektedir. Yapılan çalışmalar ve çok değişkenli analizler sonucu p53 aşırı ekspresyonunun genel sağkalım için prediktif olduğu bulunmuştur (70). p53 aşırı ekspresyonu ve artmış PCNA (proliferating cell nuclear antigen) indeksi organ korumasında önemli bağımsız faktörlerdir.

Larinksin Yüzey Epitel Tümörleri (Dünya Sağlık Örgütü 2017 Sınıflandırması)

- Konvansiyonel skuamoz hücreli karsinom
- Verrüköz skuamoz hücreli karsinom
- Bazaloid skuamoz hücreli karsinom
- Papiller skuamoz hücreli karsinom
- İğsi hücreli skuamoz hücreli karsinom
- Adenoskuamöz skuamoz hücreli karsinom
- Lenfoepitelyal karsinom

Laringeal SHK

Larinks, farinks ve trakeanın en sık görülen kanseridir. Sıklıkla erişkin erkeklerde, sigara ve alkol kullanımı ile ilişkili olarak karşımıza çıkar. Skuamöz diferansiyasyon ile karakterizedir.

1. Lokalizasyon

Laringeal SHK'nin en sık görüldüğü bölgeler coğrafyaya göre farklılık göstermekle beraber en sık supraglottik ve glottik bölgede karşımıza çıkar (31).

2. Klinik Özellikler ve Semptomlar

Klinik özellikler SHK'nin lokalizasyonuna göre değişkenlik gösterir. Glottik karsinomda en sık görülen erken bulgu ses kısıklığıdır. Supraglottik tümörler disfaji, ses kalitesinde değişme, boğazda yabancı cisim hissi, hemoptizi, odinofaji ve boyunda kitle ile karşımıza çıkar. Disfoni ve stridor da subglottik tümörlerde görülen semptomlardır (71).

3. Histopatoloji

Skuamöz diferansiyasyon (inci "pearl" formasyonları içeren keratinizasyon) ve invaziv büyüme paterni, SHK nin en belirgin özelliklerindendir. İnvazyon, bazal membranın

bütünlüğünün bozularak, sıklıkla stromal reaksiyon içererek alttaki dokuya uzanması ile karakterizedir. Anjiyolenfatik ve perinöral invazyon malignitenin ek bulgularıdır (31).

Laringeal SHK iyi, orta ve az diferansiye olmak üzere üç ana gruba ayrılır. İyi diferansiye SHK normal skuamöz epitele benzer. Orta derecede diferansiye SHK'de ise belirgin pleomorfizm ve atipik mitozlar da içerebilen mitotik aktivite ve daha az keratiniasyon gösterir. Az diferansiye SHK olgularında immatür hücreler baskın olup çok miktarda tipik ve atipik mitoz içerir ve keratinizasyon nadirdir. Keratinizasyon iyi ve orta derecede diferansiye SHK olgularında daha fazla karşımıza çıksa da, SHK derecelendirmesinde çok önemli bir kriter olarak algılanmamalıdır. Çoğu SHK olgusu orta derecede diferansiyedir. İnvazyon paterni ile karşılaştırıldığında diferansiyasyon derecesi çok düşük prognostik değere sahiptir (31).

NAZOFARİNKS

Anatomi

Nazofarinks, nazal kavitenin arkasında yer alan dar tubuler bir pasajdır. Çatısı ve posteritor duvarı bazi-sfenoid, bazi-oksiput ve birinci servikal vertebra tarafından oluşturulur. Anteriorda koanalar aracılığıyla nazal kavite ile ilişkidedir. Östaki tüplerinin ağızları lateral duvarda yer almakta olup her biri superior ve posteriordan torus tubarius denen kabarıklıklar ile korunmaktadır. Torus tubarius un hemen üstünde arkada, bir faringeal fossa olan Rosenmüller boşluğu bulunmaktadır. Nazofarinks, inferiora doğru daralır ve yumuşak damak seviyesinden itibaren orofarinks olarak devam eder (31).

Nazofarinks, Waldeyer halkasına dahil olan bir oluşumdur. Histolojik olarak mukoza solunum tipi epitel ile döşelidir, ama değişken oranda skuamoz epitel izlenebilir. Mukozal invaginasyonlar alttaki stromada kript oluşumu izlenir. Stroma lenfoid dokudan zengin olup reaktif lenfoid folliküller içerebilir. Çok sayıda küçük lenfosit yüzey ve kript epitelini infiltre edip ağsı bir patern oluşturur. Stromada az sayıda seromüsinöz gland olmakla birlikte nazal mukozadaki kadar yoğun değildir (31).

NAZOFARİNGEAL KİSTLER

Brankiyal Yarık Kistleri

Brankiyal yarık kistleri (lenfoepitelyal kistler veya brankiyojenik kistler) genellikle geç çocukluk veya erken erişkinlik döneminde karşımıza çıkar. Çoğu ikinci brankiyal yarıktan köken alır ve klasik olarak boyunda yerleşir. Nazofarinksin konjenital brankiyal yarık kistleri

nadir olup genellikle lateral nazofarinksten köken alıp inferior ve mediale doğru yayılım gösterirler. Sıklıkla mukus sekrete eder, tek ve unilateral olarak karşımıza çıkarlar (72).

Thornwaldt Kistleri

Notokord ve nazofaringeal endoderm arasındaki ilişkiden kaynaklanan ve faringeal bursa olarak adlandırılan bölgede karşımıza çıkan nadir, benign konjenital kistlerdir. Faringeal bursada oluşan mekanik obstürksiyon, inflamasyon veya abseler sonucu meydana gelir. Superior konstriktor kasın yüzeyinde olup nazofaringeal mukoz membran ile kaplıdır. Çoğu asemptomatiktir, nadiren nazal obstrüksiyon, yabancı cisim hissi, işitme kaybı, periyodik ağız kokusu gibi şikayetler olabilir. Genellikle MR görüntülemelerinde tesadüfen tanı konur (73). Histopatolojik olarak kistler submukozal olup silli solunum tipi epitel ile döşelidir. Bazen skuamoz metaplazi görülebilir (74). Asemptomatik kistler tedavi gerektirmezken semptomatik olgularda endonazal veya transoral müdahale ile marsupiyalizasyon yapılabilir (73).

NAZOFARİNKS KARSİNOMLARI

Nazofarinksin malign epitelyal tümörleri nazofaringeal karsinom, nazofaringeal papiller adenokarsinom ve tükürük bezi tipi karsinom olmak üzere üç ana başlıkta toplanmaktadır (31).

Nazofaringeal Karsinom

Nazofaringeal karsinom nazofarinksin en sık görülen tümörüdür. Lenfoepitelyom, lenfoepitelyom benzeri karsinom, lenfoepitelyal karsinom, Regaud veya Schmincke lenfoepitelyomu, embriyonel karsinom, tranzisyonel karsinom, “intermediate” hücreli karsinom, anaplastik karsinom, lenfoid stromalı andiferansiye karsinom terimleri de eş anlamlı olarak kullanılmıştır (31).

Nazofarinksin glandüler olmayan karsinomları başta 1978 Dünya Sağlık Örgütü’ne göre NKNK (DSÖ tip 1), non-keratinize karsinom (DSÖ tip 2) ve andiferansiye karsinom (DSÖ tip 3) olarak sınıflandırılmıştır (75). 1991 DSÖ sınıflamasında ise non-keratinize karsinom ve andiferansiye karsinom terimleri non-keratinize karsinom başlığına alınmış olup diferansiye ve andiferansiye olarak gruplandırılmıştır (76). Bu sınıflamada lenfoepitelyal benzeri karsinom andiferansiye karsinomun morfolojik varyantı olarak ele alınmaktadır. Günümüzde sınıflandırmaya bazaloid skuamoz hücreli karsinom eklenmiştir.

Nazofarinks Karsinomları (Dünya Sağlık Örgütü 2017 Sınıflandırması)

1. Nazofaringeal karsinom
- Nonkeratinize skuamoz hücreli karsinom
- Keratinize skuamoz hücreli karsinom
- Bazaloid skuamoz hücreli karsinom
2. Nazofaringeal papiller adenokarsinom olarak sınıflandırılmaktadır.

Epidemiyoloji

Nazofaringeal karsinom, ırksal ve coğrafik dağılım gösterir ve multifaktöryel bir etiyolojisi vardır. Dünyanın çoğu ülkesinde çok nadir görülürken Çin, Asya'nın güneyi (Tayland, Filipinler, Vietnam), Kuzey Afrika (Fas, Cezayir), Kanada ve Alaska'da belirgin olarak daha sık görülür. En yüksek insidans, 75 yaşından önce her 40 erkekte 1 ortaya çıkması sebebiyle Hong Kong'dadır. Irka bağlı yatkınlık göç edenlerde değişmemektedir. Aynı ailede birden çok bireyde saptanabilir. İnsidans 100 binde 30-50 dir. Çocuklar dahil olmak üzere geniş bir yaş grubunda görülebilir. İkinci ve altıncı dekadda pik yapar (31).

Etiyoloji

Genetik yatkınlık, etnik köken, Epstein Barr Virüs (EBV) enfeksiyonu ve çevresel faktörler yer almaktadır. EBV nin tümörün onkojenik gelişiminde rolü vardır (77, 78). Hastaların çoğunda EBV'ye karşı gelişen antikor (özellikle IgA) düzeyinde yükselme, tümör hücrelerinde EBV DNA veya RNA'sının belirlenmesi ve prekürsör lezyonlarda EBV varlığı bunu destekleyen bulgulardandır. EBV nükleer antijen-1 (EBNA-1) ve latent membran protein-1 (LMP-1) ekspresyonu saptanır. LMP-1 transforme edici özelliklere sahiptir ve epidermal hiperplaziyi başlatabilir, skuamöz diferansiyasyonu inhibe edebilir, adhezyon molekülü ICAM-1 ve CD40'ı upregüle edebilir ve epidermal büyüme faktör ekspresyonunu indükleyebilir.

Nitrozamin içeren gıdalar, erken yaşlarda tuzlanmış balık ve fermente yiyecek tüketimi risk faktörlerindendir. Isınmak ve yemek pişirmek için odun yakılan, kalabalık, havasız ortamlarda yaşamak, sigara, kimyasal gazlar ve tozlar, formaldehit maruziyeti, radyasyon maruziyeti de risk faktörleri arasındadır (79-82).

Klinik Bulgular

En sık nazofarinks lateral duvarı ve özellikle Rosenmüller çukurda karşımıza çıkar ve buna bağlı olarak seröz otit, işitme kaybı gibi belirtiler görülür. Burun akıntısı, kanama ve tıkanıklık, kulak ağrısı, çınlama, akıntı, işitme kaybı, çift görme, görme kaybı, baş ağrısı, kraniyal sinir tutulumuna bağlı semptomlar görülebilir. %10 hasta asemptomatik olmakla birlikte olguların yarısından fazlasında ilk semptom olarak metastaza bağlı ağrısız servikal lenfadenopati saptanır. Başlangıçta en sık kitle jugulodigastrik lenf nodunda saptanır. Posterior servikal zincir metastazı, diğer baş boyun tümörleri tarafından tercih edilmediğinden nazofarinks karsinomu için tipiktir. Fizik muayenede nazofarinks tamamen normal olabilir, hafif bir dolgunluk veya yüzeyde düzensizlik görülebilir. BT ve MR görüntüleme yöntemleri tümörü saptamada yardımcıdır. BT ile özellikle kortikal kemik doku erozyonu, MR ile yumuşak doku infiltrasyonu ve intrakraniyal yayılım saptanabilir. EBV'ye karşı pozitif seroloji nazofarinks karsinom olgularının hemen tamamında saptanır. EBV nükleer antijenleri (EBNA), membran antijen, timidin kinaz, DNA polimeraz, ribonükleotid redüktaz gibi rekombinant EBV antijenlerine dayanan testlerin kombine kullanımının yararlı olduğu düşünülmektedir. Endoskopik biyopsinin histopatolojik incelemesi tanıda en değerli yöntemdir. Nazofarinks muayenede normal görünse bile olguların ¾'ünde tümörün saptanmasını sağlayabilir (31).

Nazofarinks karsinomlu olguların %3-8'inde intraepitelyal komponent saptanabilmektedir. Ancak nazofarinks karsinomunun yüzey epitelindeki komponentten geliştiği konusu net değildir. Çünkü pür in situ karsinom çok nadir saptanmıştır. Bu sebeple nazofarinks karsinomlarının çoğunun in situ komponentten köken almadığı kabul edilmektedir. İn situ nazofarinks karsinomlarının EBV pozitif olduğu bilinmektedir (83).

Evreleme

TNM sistemi kullanılmaktadır. TNM evreleme sistemi, nazofarinksin yalnızca epitelyal tümörlerinde kullanılabilir.

Histopatolojik Özellikler

NKNK histopatolojik olarak solid tabakalar, düzensiz adalar ve trabekül yapıları içeren karsinom komponenti ile lenfosit ve plazma hücrelerini içerir. Tümörü andiferansiye veya diferansiye şeklinde sınıflandırmak, klinik veya prognostik bir fark oluşturmadığından ve tümörün farklı alanları farklı morfolojide olabileceğinden gerekli değildir.

Daha sık görülen andiferansiye alt tip, sinsityal görünümlü, hücre sınırları belirsiz, yuvarlak veya oval veziküler çekirdekli, büyük santral çekirdekçik içeren geniş hücrelerden oluşur. Sitoplazma amfofilik veya eozinofiliktir. Diferansiye alt tip, hücresel sıralanması, bazen pleksiform paterni ile andiferansiye alt tipten farklılık gösterir ve mesanenin tranzisyonel hücreli karsinomunu andırır.

NKNK'de desmoplastik stroma nadirdir, nekroz alanları görülebilir (31).

Keratinize skuamoz hücreli karsinom ise hücrelerarası köprüler ve/veya keratinizasyon şeklinde belirgin skuamoz farklılaşma gösterir. Farklılaşma derecesi, iyi diferansiye, orta derecede diferansiye ve az diferansiye olarak derecelendirilir. Tümör, düzensiz adalara eşlik eden abondan desmoplastik stroma ve lenfosit, plazma hücresi, nötrofil ve eozinofilleri içerir. Keratin incileri görülebilir (31).

Keratinize skuamoz hürcreli karsinom de novo oluşabileceği gibi, NKNK için radyoterapi alınmasından yıllar sonra radyasyon ilişkili olarak karşımıza çıkabilir (84, 85, 86). NKNK ile karşılaştırıldığında daha yüksek oranda lokal ileri tümör büyümesi ve daha düşük oranda lenf nodu metastaz eğilimi mevcuttur (87, 88).

Tedavi ve Prognoz

Nazofarinks karsinomunda tedavi amacıyla radyoterapi uygulanır. Bununla birlikte birçok çalışmada radyoterapi ile kombine kemoterapi ilerlemiş veya metastatik hastalıkta daha avantajlıdır. En önemli prognostik parametre hastalık ortaya çıktığında saptanan evredir. Tümör volümü hastalığın lokal kontrolünü öngörmede önemlidir. Genel olarak kadınlarda, 40 yaşından gençlerde ve lenfoepitelyoma morfolojisine sahip olanlarda prognoz daha iyidir. Semptomların bir yıldan uzun süredir var olması, boynun alt kısmında pozitif lenf nodu bulunması, kraniyal sinir tutulumu ve uzak metastaz kötü prognostik faktörlerdir. Prognozu belirlemede EBV antikorlarının değeri sınırlıdır. Tümörün anöploid olması, proliferasyon hızının yüksek olması kötü prognoz ile ilişkilidir (83).

Nazofarinks karsinomu lokal yaygın invazyon, erken lenfatik yayılım ve yüksek hematojen disseminasyon insidansı ile oldukça malign davranış gösterir. Tümör invazyonu ilerledikçe kafa tabanı ve paranazal sinüs erozyonu, intrakraniyal tutulum, kraniyal sinir tutulumu ve daha uzak yapılara yayılım karşımıza çıkar. Nazofarinks çok zengin bir lenfatik ağa sahip olduğu için erken evrelerde lenfatik yayılım gerçekleşir. Hematojen yayılım ise en sık kemik, akciğer ve karaciğerde görülür (83).

GSTK1, VEGF VE KASPAZ-3

GSTK1

1.Glutatyon

Glutatyon; glutamik asid, glisin ve sisteinden oluşan, intraselüler yerleşimli bir tripeptittir. İndirgeyici bir ajan ve antioksidanolan glutatyon, hücrelerin oksidasyon-redüksiyon dengesini sürdürmekle görevlidir. Proteinlerdeki SH gruplarının korunması, bazı reaksiyonlarda koenzim olarak görev alma, aminoasitlerin transportu, protein ve DNA sentezinde de önemli rol oynar. Glutatyon dokularda indirgenmiş glutatyon (GSH) ve okside glutatyon (GSSG) olmak üzere, birbiriyle dengede bulunan iki şekilde bulunur. İntrasellüler GSH, selenyum içeren glutatyon peroksidaz enzimi ile GSSG'ye dönüştürülür (89).

2.Glutatyon S-Transferazlar

İnsanda birçok dokuda bulunan Glutatyon S-Transferazlar (GST), çok işlevli ve geniş spektrumlu substrat özgüllüğü olan enzim ailesidir. Bu enzim ailesi, detoksifikasyon görevini, indirgenmiş glutatyonun tiyol (-SH) grupları ile elektrofilik fonksiyonel gruba sahip olan ksenobiyotiklerin (oksidatif stres, çevresel kirleticiler ve karsinojenler vb.) büyük bir bölümünün elektrofilik bölgelerini nötralize ederek gerçekleştirir. Bunun sonucunda merkaptürik asittir (N-asetilsistein) oluşur ve vücuttan idrarla atılır. GST'ler hem sitoplazmada, hem de endoplazmik retikulumda yerleşmiştir. Enzimin en fazla aktivite gösterdiği organlar, testis, karaciğer, böbrek, bağırsak ve adrenal bezlerdir (90).

3.Ksenobiyotik Metabolizması ve Glutatyon S-Transferazlar

Karsinojenik maddelerin oluşturduğu etkilerden hücrenin korunmasında detoksifikasyon mekanizmalarınının önemi büyüktür. Toksik maddeler, metabolitler, epoksitler v.b. oluşturduğu ksenobiyotiklerin, zararlı etkilerinin moleküller ya da enzim yardımı ile etkisiz hale getirilerek vücuttan dışarı atılmalarını sağlayan mekanizmalar, detoksifikasyon (biyotransformasyon) mekanizmalarıdır (91). Hücre içine giren ksenobiyotikler, ya reaktif olmayan metabolitlere katalize edilip vücuttan dışarı atılırlar ya da aktive olarak reaktif metabolitlere dönüştürülürler. Reaktif metabolitlerin hücre ve/veya dokularda birikmesi ile DNA hasarı, doku hasarı, nekroz, mutasyonlar ve bunların sonucunda da kanser gibi hastalıklar oluşur. Metabolizmanın bu safhasında aktive olan reaktif

metabolitler detoksifiye edilerek reaktif olmayan metabolitlere dönüştürülüp vücuttan dışarı atılırlar.

Ksenobiyotiklerin metabolizması I. Faz (yükseltgenme, indirgenme ve hidroliz reaksiyonları) II. Faz reaksiyonları (konjugasyon, metilasyon, asetilasyon reaksiyonları) olmak üzere iki ana bölüme ayrılır.

I. Faz reaksiyonları ile lipitler ile çözünebilen ksenobiyotik maddeler daha polar molekül haline gelirken, II. Faz reaksiyonlarında endojen maddelerle birleşen bu polar metabolitler inaktif hale gelir ve eliminasyona uğrarlar. II. Faz reaksiyonları glukuronik asit, sülfat ve GSH ile konjugasyon reaksiyonları, asetilasyon ve metilasyon olmak üzere başlıca 3 reaksiyondan oluşur.

GSH molekülündeki (–SH) sülfidril grubuna işaret eder ve molekülün alışveriş yapan kısmıdır. Sülfidril grubu güçlü bir nükleofilik grup gibi hareket eder, epoksid veya bazı toksik bileşiklerin veya metabolitlerin elektrofilik merkezlerine bağlanarak onları nötralize yani detoksifiye eder. Eğer toksik potansiyeli olan ksenobiyotikler GSH ile konjugasyona uğramasalardı; DNA, RNA veya hücre proteini ile kovalent olarak birleşmekte serbest olacaklar ve sonuçta ciddi hücre hasarlarına yol açabileceklerdi. Bundan dolayı GSH, bazı ilaçlar ve karsinojenler gibi çeşitli toksik bileşiklere karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır (62).

Glutatyon konjugatları vücuttan atılmadan önce daha ileri metabolizasyona uğrarlar. Glutatyona ait glutamil ve glisin grupları spesifik enzimler tarafından uzaklaştırılırlar ve geri kalan sisteinil kısmının amino grubuna bir asetil grubu (asetil KoA'dan sağlanan) eklenir. Sonuçta meydana gelen bileşik idrarla atılıma uğrayan L-asetil sisteinin konjugesi olan merkapturik asittir (92, 93).

GST'ler substratları olan, kolesterol-5,6-oksit, 4-hidroksil-2-nonenal, dopaminokrom, adenin propenal, aminokrom, 9-hidroperoksilinoleik asit gibi endojen moleküllerin; aflatoksin B1-8,9-epoksit, hekzaklorobütadien, bütadien, stiren oksit, akrolein, trikloroetilen, metilen klorid, nitrokinolin oksit, etilenoksit gibi çevresel karsinojenlerin; DDT, atrazin, lindan gibi pestisitlerin ksenobiyotik metabolizmasında detoksifikasyonunu sağlarken, başta cis-platin gibi, platin bazlı kanser ilaçları olmak üzere, siklosofamid, klorambusil, fosfomisin, tiyotepe, nitrogliserin, etakrinik asit, asetaminofen, adriamisin gibi ilaçlarında aktivitelerini inhibe ederek hücre içinde bu ilaçlara karşı direncin oluşmasına sebep olurlar (94).

Enzimatik özelliklerine, primer yapılarına, antikorlarla ilgili reaksiyonlarına, kimyasal affinitelerine, aminoasit dizilerine, yapısal karakteristiklerine ve enzimlerin kimyasal davranışlarına göre GST'ler sitozolik, mikrozomal ve mitokondriyal olmak üzere üç ailede sınıflandırılmıştır. Buna göre sitoplazmik GST'ler, GST Mü, GST Alfa, GST Pi, GST Teta, GST Sigma, GST Zeta ve GST Omega olarak 7 sınıf, mikrozomal GST'ler MGST1, MGST2 ve MGST3 olarak 3 sınıf ve mitokondriyal GST sınıfını oluşturan GST Kappa olmak üzere, toplam 11 sınıfta incelenmektedir (94).

4.Glutatyon S-Transferaz ve İlaç Direnci

Kanser hücrelerinin sitotoksik ajanlara karşı direnç geliştirmesinde çeşitli mekanizmalar söz konusudur. Bunlar içerisinde hücre siklusu, proliferasyon,detoksifikasyon, ilaç transportu gibi biyokimyasal mekanizmalar ve DNA replikasyonu ve tamiri gibi mekanizmalar rol oynamaktadır. Anti kanser ilaçlara direnç gelişiminde olası mekanizmaları sıralamak mümkündür;

-Azalmış hücre içi ilaç düzeyi;

a. Hücre yüzeyinde reseptör ve ya taşıyıcı kaybı: İlacın hücre içine girişinde azalma,

b. İlacın hücre dışına atılmasını sağlayan taşıyıcıların aşırı ekspresyonu: İlacın hücre içinde tutulmasında azalma.

-Apopitotik ve anti apopitotik genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişim.

-Hücresel hedeflerdeki değişiklikler, örneğin; Topoizomeraz II inhibitörlerine (doksoru bisin, etoposid, daunorubisin) duyarlılığın azalması,

-İlacın biyoaktivasyonunda azalma,

-İlaçla oluşan hasarın iyileşmesin detoleransın gelişmesi, örneğin; alkilleyici ajanlar ile indüklenen DNA hasarı tamirinde artış,

-Hücresel ilaç detoksifikasyonunda artış, örneğin; hücre içi GSH ve GST düzeylerinde artış.

GST'nin ilaç direnci üzerindeki rolünü iki şekilde açıklamak mümkündür:

1. Enzimin ve ilaç direnci proteinlerinin ekspresyonlarındaki ortak artış,

2. Enzimin sinyal iletimindeki rolü.

Tümör hücresine anti-kanser ajanın girmesiyle birlikte hücre içinde GSH düzeyinde ve GST enziminin ifadesinde artış olmaktadır.Hücre içinde GSH en fazla bulunan protein yapısında olmayan ve tiyol grubu içeren bir tripeptiddir. Bu bileşik GST enziminin fizyolojik substratı olarak görev yapmaktadır. Enzim, GSH yardımıyla ksenobiyotiklerin (örneğin; anti-kanser ilaçlar) protein yapısındaki çeşitli pompalar yardımıyla dışarı atılmasına neden olmaktadır. Artan GST aktivitesi ile birlikte ilacın hücre içinde uzun süre kalması bu nedenle zorlaşmaktadır. Kaldı ki, enzime paralel olarak bu dışarı pompalama proteinlerinin [MultiDrug Resistance Proteins (MRPs)] ifadesinde de artış gözlenmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, tümör hücrelerin de GSH'ın yüksek düzeylere ulaşmasının ve GST'nin aşırı ekspresyonunun MDR gelişimini ile paralel geliştiği yönündedir (95).

Çoklu ilaç direnci proteini ailesi olan ve ksenobiyotiklerin taşınmasında görevli ATP-bağımlı taşıyıcı protein, ABC proteinleri (ATP Binding Casette Super family Transporters), P-glikoprotein (Pgp), çoklu ilaç direnci ilişkili protein 1 (MRP1 ve ya ABCC1), meme kanser direnci proteini (BCRP veya ABCG2) gibi proteinlerdir ve büyük bir kısmının MDR fenotipine sahip oldukları saptanmıştır. MRP'ler GSH ve GSH konjugatlarının transportuyla onkolitik ajanların hücreden atılımlarına aracılık etmektedir. Literatürde MRP'ler ve GST'ler arasındaki sinerjizmi gösteren birçok örnek mevcuttur. Bu sinerjizm, yani ekspresyonlarındaki paralel artış sonucu tümör hücrelerinin etakrinik asit, etoposid, vinkristin, klorambusil gibi ajanlara karşı direnç geliştirdikleri bildirilmiştir.

İlaç metabolizmasında GSH bağımlı enzimlerin MRP'ler ile ilişkili olduğunu ve glutatyon bağımlı detoksifikasyonun kompleks bir yapı olduğunu ayrıca ilaç detoksifikasyonunda bu üyelerden birinin görev alıp almadığı ise muhtemeldir. MRP-1 ayrıca modifiye olmamış ksenobiyotiklerin taşınmasında da görev almakta ve sıklıkla bu işlem için glutatyona ihtiyaç göstermektedir (96).

Kanser tedavisinde ilaca direnç gelişimi tedaviyi etkileyen önemli bir unsurdur. Tedavide kullanılan ilaçlardan önemli bir grubu oluşturan alkilleyici bileşikler söz konusu olduğunda, ilaç direnci, hücrede GSH ve GST seviyelerinin artması ile ilişkilendirilmiştir. Bu mekanizma ile gelişen direncin ortadan kaldırılmasında ilk başlardaki yaklaşım GST'ler ile detoksifiye edilen geleneksel antikanser ilaçlarla kullanımda faydalı olabilecek toksik olmayan GST inhibitörlerinin kullanılmasıydı. Alternatif yeni bir tedavi yaklaşımı ise, tümör

hücrelerinde yükselmiş seviyelerde salgılandığı bildirilen GST enziminden (özellikle GST Pi (GSTP)) terapötik amaçla yararlanmaktır (97).

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Büyüme faktörlerinin majör rolü hücre büyümesi ve bölünmesi için gereken genlerin aktivitesini stimule etmektir. Büyüme faktörlerinin aktivitesi ise spesifik reseptörlere bağlanarak olur ve gen ekspresyonu gerçekleşir: Bu gen ekspresyonları sayesinde hücrelerin hücre siklusuna girmeleri, replikasyonun devamı, apoptozun önlenmesi, hücre bölündükten sonraki her iki hücreye gereken yapısal komponentlerin (nükleik asit, protein, lipid, karbonhidratlar) sentezi gibi bir dizi reaksiyon gerçekleşir. Büyüme faktörleri hücre proliferasyonunu veya hayatta kalmayı sağlayan proteinler oldukları gibi aynı zamanda hücre göçü, diferansiyasyon gibi büyüme dışı bir dizi olayda da rol almaktadırlar. Hücrenin kararlı hallerinde ve hücre hasarı olduğunda görev alırlar. Büyüme faktörlerinin disregülasyonu veya sinyal yolaklarının aktivasyonu durumunda kontrolsüz hücre çoğalması meydana gelir. Bu sebeple aslında büyüme faktör yolaklarındaki genlerin çoğu protoonkogendir. Bu genlerdeki gain-of-function mutasyonları onkogene dönüşüm ile sonlanır ve durdurulamayan hücre çoğalması ve tümör gelişimi meydana gelir (98).

VEGF ailesi VEGF-A, -B, -C, -D, -E ve plasental büyüme faktörü (PIGF) ‘nü içeren homodimerik bir protein ailesidir. VEGF-A, kısaca VEGF, hasar sonrası ve tümörlerde majör anjiyogenik faktördür. VEGF-B ve PIGF embriyolojik damar gelişiminde, VEGF-C ve D anjiyogenez ve lenfanjiyogenez stimulasyonunda rol alır. VEGF, pencereli epitele komşu epitelde yüksek oranda eksprese olur ve normal erişkin endotelinin idamesinde rol alır (böbrekteki podositler, retinadaki pigment, beyindeki koroid pleksus gibi). VEGF, endotelyal hücre göçü, çoğalması ve vasküler lümen oluşumunu destekleyerek anjiyogenezi stimule eder, vasküler dilatasyon ve artmış vasküler geçirgenliği indükler. VEGF üretimi için en güçlü uyaran hipoksi olup intraselüler hipoksi-inducible factor (HIF-1) ün yer aldığı yolaklar ile gerçekleşir. İnflamasyon ve yara iyileşmesi alanlarında ortaya çıkan PDGF ve TGF-alfa VEGF için diğer uyaranlardır (98).

VEGF bir tirozin kinaz reseptör ailesi olan VEGFR-1, 2 ve 3’e bağlanır. VEGFR-2 endotelde yüksek oranda eksprese olur ve anjiyogenez için en önemli olandır. VEGF’ye karşı geliştirilen antikorlar renal kanserler, kolon kanserleri gibi yayılım ve büyüme için anjiyogeneze ihtiyaç duyan birçok tümörün tedavisinde kullanılmaktadır. Anti-VEGF antikorları yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, prematürelerin retinopatisi ve diabetik maküler

ödem gibi oftalmolojik hastalıklarda da kullanılır. Gebelerde VEGFR-1'in çözünebilen türlerinin (s-FLT-1) artması, normal endotel için gereken serbest VEGF'yi emerek preeklampsiye neden olabilir (98).

Solid malignensilerde vasküler profile yaklaşımda iki seçenek mevcuttur: yeni damar oluşumunu inhibe etmek (anti-anjiyogenik tedavi) veya neoplastik damarlara selektif olarak hasar vermek (vasküler hedef tedavi). İleri evre laringeal SHK'lerde bu her iki yaklaşım da umut verici olmakla beraber daha ileri preklinik ve klinik araştırmalara ihtiyaç vardır. Şu anda Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR), VEGF, Anjiyogenin, Hypoxia-inducible Factor-1 gibi biyolojik belirteçler arasında baş boyun kanserleri için FDA onayı bulunan tek tedavi anti-EGFR tedavidir (99).

Laringeal SHK baş boyun bölgesinde en sık görülen SHK olup larinksin en sık tümörüdür (70,71). Prognoz ve sağkalımın klinik evre ile ilişkili olduğu bilinmektedir (72). Laringeal SHK'lerin yüksek insidansı ve düşük sağkalım oranı yeni tanısal yaklaşımların geliştirilmesini gerektirmektedir (100). Tümör büyümesi ve metastazın anjiyogenez ile ilişkili olduğu bilinmektedir (100). Anjiyogenez belirteci olan VEGF'nin ekspresyonunun tümör agresifliği ve lenf nodu metastazı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (101). Literatürde VEGF nin laringeal SHK'lerdeki prognostik önemini sorgulayan çeşitli araştırmalar mevcuttur. Bu araştırmaların bir kısmında VEGF'nin aşırı ekspresyonunun kötü prognostik faktör olduğu, klinik evre, histodiferansiyasyon ve metastaz ile ilişkili olabileceği, VEGF izoformlarına ait gen ekspresyonunun lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğuna ulaşılmıştır (103-107). Bunun yanı sıra, VEGF ekspresyonu ile tümör boyutu, servikal lenf nodu yayılımı, tümör evresi ve tümör diferansiyasyonu ile ilişkili olmadığını destekleyen yayınlar da mevcuttur (100, 107, 108).

VEGF ekspresyonu nazofaringeal karsinomlarda da araştırılmıştır. Yapılan çaışmalarda tümör dokusunda VEGF ekspresyonunun metastatik potansiyel ve prognoz ile ilgili olduğu, bu sebeple anjiyogenez inhibitörlerinin metastazın önüne geçebilmek için kullanılabileceği düşünülmektedir (109-111).

Kaspaz-3

Kaspaz-3 biyomolekülünün işlevini anlamak için önce apoptoz mekanizmalarını gözden geçirmek gereklidir.

Hücrenin nükleer DNA'sının, nükleer ve sitoplazmik proteinlerinin degrade olmasını sağlayan enzimlerin aktive olduğu, hücre ölüm yolağıdır. Apoptotik hücre fragmanları parçalanarak ayrılır. Apoptotik hücrenin hücre membranı intakt olup hücre ve fragmanlar fagositlerin hedefi olabilmek için bazı değişikliklere uğrar. Ölü hücre ve fragmanları hücresel komponentler dışarı sızmadan ortamdan temizlenir, dolayısıyla apoptotik hücre ölümü inflamatuar yanıt oluşmaz. Bu açıdan, membran bütünlüğünün kaybolduğu, hücrenin enzimatik olarak sindirildiği, hücresel komponentlerin dışarı sızdığı ve inflamatuar yanıtın tetiklendiği nekrozdan farklılık gösterir (112).

Apoptoz birçok normal durumda olabileceği gibi patolojik nedenlerden ötürü de meydana gelebilir.

Fizyolojik durumlarda apoptoz vücut için görevini tamamlamış ve artık gerekli olmayan hücrelerden kurtulmak ve dokulardaki hücre sayısını sabit tutmak için gerekli bir fenomendir (112):

- Embriyogenez
- Hormon bağımlı dokularda hormon etkisi azalması (menstrüel siklusta endometrial yıkım)
- Çoğalan hücre popülasyonlarında hücre sayısını sabit tutma (barsak kript epiteli)
- Faydalı amaçlarını tamamlamış hücrelerin eliminasyonu (akut inflamatuar cevapta immün yanıt sona erdikten sonra nötrofil ve lenfositlerin ortadan kaldırılması)
- Potansiyel zararlı self-reaktif lenfositlerin ortadan kaldırılması (vücudun kendi dokularına reaksiyon vermesini engellemek adına)
- Sitotoksik T lenfositlerce indüklenen hücre ölümü (virüs ve tümörlere karşı savunma mekanizması)

Patolojik durumlarda apoptoz genetik olarak değişmiş veya hasarlanmış hücrelerin eliminasyonunda, immün yanıtı tetikleyip doku hasarını minimumda tutan apoptoz mekanizmaları rol alır (112):

- DNA hasarı
- Yanlış katlanmış proteinlerin birikimi
- Enfeksiyonlar sonucu hücre hasarı
- Duktus obstrüksiyonu sonrası parankimal organlarda patolojik atrofi

1.Apoptoz Mekanizmaları

Apoptoz, Kaspaz olarak adlandırılan bir dizi enzimin aktivasyonu ile gerçekleşir. Diğer birçok proteaz gibi kaspazlar da hücrede inaktif proenzim olarak bulunurlar. Bu proenzim enzimatik bölünmeye uğrayıp aktif enzim haline gelir. Apoptoz başlangıç ve uygulama fazı olmak üzere ikiye ayrılabilir. Başlangıç fazında kaspazlar enzimatik olarak aktif hale gelir, uygulama fazında ise diğer kaspazlar hücresel komponentlerin degredasyonunu tetikler (113).

Kaspaz aktivasyonunda intrensek ve ekstrensek olmak üzere iki yolak görev alır. Bu iki yolak birbiriyle kesişmekle birlikte farklı durumlarda indüklenir, farklı moleküller içerir ve vücutta farklı rollere sahiptir.

2. İntrensek (Mitokondrial) Yolak

Bütün memeli hücrelerinde majör apoptotik yolak intrensek yolaktır. Mitokondrial dış zarın geçirgenliğinin artması sonucu intermembranöz aralıkta yer alan pro-apoptotik moleküllerin (sitokrom c vb.) sitoplazmaya salınması ile başlar. Mitokondrial pro-apoptotik proteinlerin salınımı BCL2 protein ailesi tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir.

Antiapoptotik Moleküller: BCL2, BCL-XL, MCL-1 bu grupta olup mitokondri dış membranı, endoplazmik retikulum zarı ve sitozolde bulunur. Mitokondrial dış membranın geçirmezliğini sağlayarak sitokrom c ve benzeri pro-apoptotik moleküllerin sitozole geçmesini engeller.

Proapoptotik Moleküller: BAX ve BAK prototipik örneklerdir. Aktive olduklarında mitokondrial dış membranında bir kanal oluşumunu sağlayarak sitokrom c nin sitozole geçmesini sağlar.

Sensörler: BAD, BIM, BID, Puma, Noxa molekülleri hücresel stres ve hasarda sensör olarak görev alır ve iki grup arasındaki dengeyi düzenler.

Sitokrom c sitozole salındığında APAF-1 adında bir proteine bağlanır ve apoptozom denen hekzamer oluşur. Apoptozom, mitokondrial yolağın başlatıcısı olan kaspaz-9

molekülüne bağlanır, meydana gelen otoamplifikasyon ile kaspaz aktivasyon kaskadı tetiklenir. Diğer mitokondrial proteinler sitoplazmaya girer ve apoptozun fizyolojik inhibitörü olarak görev yapan sitoplazmik proteinleri (IAP) nötralize eder. IAP lerin görevi kaspaz-3 gibi kaspazların aktivasyonunu bloke etmek ve hücreyi canlı tutmaktır (113).

3. Ekstrensek (Ölüm Reseptörleri Aracılı) Yolak

Ölüm reseptörleri TNF reseptör ailesinin üyesi olan ve sitoplazmik uçlarında apoptotik sinyal iletiminde görevli "death domain" bulunduran moleküllerdir. En iyi bilinenleri TNF reseptör tip 1 (TNFR1) ve Fas (CD95) tır. Fas için olan ligand Fas ligand olarak adlandırılır. FasL, self antijenleri tanıyan T hücrelerinin ve virüsle enfekte hücreleri ve tümör hücrelerini bazı sitotoksik T lenfositlerin yüzeyinde bulunur. FasL Fas molekülüne bağlandığı zaman ortaya çıkan bir dizi reaksiyon sonrası kaspaz 8 aktivasyonu meydana gelir ve mitokondri yolağında olduğu gibi kaspaz aktivasyon kaskadı tetiklenir (113).

4. Uygulama Fazı

Mitokondrial yolakta kaspaz-9 aktivasyonu, ölüm reseptör yolağında da kaspaz 8 ve 10 aktivasyonu sonrası uygulayıcı kaspazlar (kaspaz-3 ve 6) ortaya çıkar ve DNAaz enzimini aktive eder, nükleer matriksin yapısal komponentlerini degrade eder (113).

5. Ölü Hücrenin Ortadan Kaldırılması

Apoptotik cisimlerin oluşumu sonucu fragmanlar fagositler tarafından yenebilir hale gelmiş olur. Sağlıklı hücrelerde hücre zarının iç kısmında yer alan fosfatidilserin molekülü apoptotik hücrelerde yer değiştirerek zarın dış membranında eksprese edilir ve makrofaj reseptörleri tarafından tanınır olur. Apoptoza uğrayan hücreler fagositleri ortama çağıracak solubl maddeler sekrete eder. Apoptotik cisimler trombospondin, doğal antikorlar ve kompleman proteinleri (özellikle C1q) ile kaplanıp fagositlerce tanınırlar. Böylece fagositler üzerindeki birçok reseptör ve apoptotik hücredeki ligandlar "beni ye" sinyaline katkı sağlayarak hücrelerin yutulmasını sağlar. Ölü hücreler dakikalar içinde iz bırakmadan ve inflamasyon oluşturmadan yok olur (113).

Apoptoz, görevini tamamlamış hücrelerin eliminasyonu ve normal dokunun homeostazının devamı için ana mekanizmadır. Bu sebeple apoptotik sistemde herhangi bir disfonksiyon kanser gibi çeşitli hastalıklara yol açmaktadır (114, 115). Apoptoz, prekanseröz lezyonlarda tümorigenezi engellemek için DNA hasarı olan hücrelerin ortadan kaldırılmasında tetiklenebilir (115). Bozulan apoptotik mekanizmalar sonucu kanser

hücrelerinin hayatta kalmasına ve kanser metastazında çok önemli olan anjiyogenez ve invaziv özelliğin kazanılmasına yol açmaktadır (116). Tümör hücreleri tedaviye direnç geliştirmek ve bu sayede tedavinin başarısız olması için de apoptotik mekanizmalardan kaçmaktadır (117, 118). Anti-apoptotik proteinleri inhibe ederek apoptozu indükleyen hedefe yönelik tedaviler bazı kanser türlerinde gelecek vaadetmektedir (119).

Kolon karsinomlarında yapılan bir çalışmada, karsinom olgularında neoplastik olmayan kolon dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı oranda azalmış Kaspaz-3 immünhistokimyasal ekspresyonu izlenmiştir (120). Bir başka çalışmada Kaspaz-3 ün tümörde ekspresyonunun azalması 5-Florourasil tedavisi alan kolon kanser olgularında hastalıksız sağkalımda azalma ve rekürrens oranında artma ile korele bulunmuştur (121).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 2011 ile Mayıs 2016 tarihleri arasında Sağlık Bilimleri Üniversitesi Kartal Dr. Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Kliniği'ne gönderilen laringeal kist, nazofaringeal kist, laringeal karsinom ve nazofaringeal karsinom nedeniyle biyopsi yapılmış veya opere edilmiş olgular taranarak kist ve karsinom tanısı alan 54 olgu belirlendi ve çalışma kapsamına alındı. Bu olguların 19 tanesi kist (15'i laringeal kist, 4'ü nazofaringeal kist), 25 tanesi laringeal skuamöz hücreli karsinom ve 10 tanesi NKNK idi. Bu olgulara ait Hematoksilen & Eozin boyalı tüm arşiv preparatları tekrar değerlendirilerek immünhistokimyasal inceleme için en uygun bloklar seçildi. Bunun yanı sıra taranan preparatlar arasından tümör dokusuna komşu olmayan normal mukoza alanlarını içeren toplam 9 adet blok seçilerek normal gruba dahil edildi. Olgular normal (9 olgu), kist (19 olgu), laringeal SHK (25 olgu) ve NKNK (10 olgu) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Bu gruplardaki olgulara ait belirlenen bloklar 4 mikron kesit alınarak boyama için aşağıdaki basamaklar izlendi.

İMMÜNHİSTOKİMYA

Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Primer Antikor (GSTK1, VEGF, Kaspaz-3)
- Sekonder Antikor (Biotinylated secondary antikor), (Santa Cruz)
- TBS buffer (Santa Cruz)
- %30' luk H_2O_2 Solusyonu (Sigma)
- Ksilol (Merck)
- Etanol (Merck)
- Metanol (Merck)
- Sodyum Sitrat (Sigma)
- Sitrik Asit (Sigma)
- Protein Blokajı (Normal Swine Serum, Normal Goat Serum) (Santa Cruz)
- ABC HRP (Avidin Biotin Complex Horse Radish Peroxsidase) (Santa Cruz)
- Hematoksilen (Shandon)
- DAB (Diamino benzidin) (Santa Cruz)

Solusyonların Hazırlanışı

I. H_2O_2 Blokajı Solusyonu Hazırlanışı: 30 ml %30' luk H_2O_2 üzerine 470 ml metanol ilave edilerek hazırlandı.

II. Antijen Retrival Solusyonunun Hazırlanışı (0,01 M, pH: 6.0): 2,101 gr sitrik asit (A) 100 ml distile suda; 0,1 M 14,7 gr sodyum sitrat (B) 500 ml distile suda çözüldü. 27 ml A solusyonundan, 123 ml B solusyonundan alınarak 1500 ml'ye distile su ile tamamlandı.

III. 0,005 M Tris Tamponunun Hazırlanışı: 60,55 gr tris base, 85,20 gr NaCl 500 ml distile suda çözülür. 370 ml 1 M HCl eklenerek pH: 7,6'ya getirilip 1 lt'ye tamamlanır. (1 ml TBS 100 ml distile suyla dilüe edilerek kullanılır.)

Kullanılan Cihazlar

- Etüv
- -20'lik derin dondurucu ve buzdolabı
- pH-metre
- Vortex
- Düdüklü tencere
- Isıtıcı
- Hassas terazi
- Olympus marka BX-51 model ışık mikroskobu
- Olympus marka DP-72 model fotoğraf makinesi

1.Dokuların Deparafinizasyonu

1) Etüvde 70C'de 1 saat bekletildi.
2) Isınmış ksilolde yarım saat bekletildi.
3) Etüvden çıkarıldıktan sonra soğuma işlemi için oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
4) - %90'lık alkolde 1dakika
   - %70'lik alkolde 1dakika
   - %50'lik alkolde 1dakika
   - Distile suda 1-2 dakika bekletildi.

2.Basamak

1) H_2O_2blokajı ile endojen peroksidaz aktivasyonunun inhibisyonu için solusyonda 10 dakika bekletildi.
2) Çeşme suyunda 5 dakika bekletildi.
3) Antijen Retrival Solusyonu içinde düdüklü tencerede 3 dakika kaynatıldı.
4) Nonspesifik boyanma inhibisyonu için "Protein Block Solution" 10 dakika uygulandı.
5) Primer antikor uygulandı (60 dakika)
6) PBS ile 3 defa yıkama yapıldı ve her yıkama 5 dakika bekletildi.
7) Sekonder antikor uygulandı (15 dakika)
8) PBS ile yıkandı (3x5 dakika)
9) Streptavidin-peroksidaz kompleksi uygulandı (20 dakika)
10) PBS ile yıkandı (3x5 dakika)
11) 10 dakika DAB uygulandı.
12) 1 dakika distile suda bekletildi.

3.Basamak: Hematoksilen Boyaması

1) Hematoksilende 1 dakika
2) Distile suda 1dakika
3) %50'lik alkolde 1 dakika
4) %70'lik alkolde 1 dakika
5) %90'lık alkolde 1 dakika
6) Absolü alkol-ksilolde 1dakika
7) Ksilolde 10 dakika

Poly-L-lysin kaplı lamlara alınan doku kesitleri deparafinizasyon işleminden sonra immunohistokimya yöntemi ile GSTK1 (Glutatyon-S-transferaz Kappa1) 1:100 (Anti GSTK1 bs-13399R Biossusa), VEGF 1:100 (Anti VEGF-A nb-100-698 Novus), ve Kaspaz-3, 1:50 Anti-Caspase-3 (PA1302-1) (Boster Biological Technology Co. Ltd., USA) dilüsyonlarında yukarıda ayrıntılı olarak açıklanan prosedüre göre boyandı.

İMMÜNHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

VEGF, GSTK1 ve Kaspaz-3 belirteçleri için epitelyal komponent (kist epiteli, normal mukoza epiteli ve tümör), endotelyal hücreler (tümör stromasında ve nonneoplastik olgularda) ve inflamatuvar hücrelerde boyanma durumu Olympus CX31 model ışık mikroskobunda değerlendirildi. Değerlendirme boyanma şiddetine göre yapıldı. Preparatlar, hiç boyanma olmadığında 0, hafif şiddette intrasitoplazmik boyanma varlığında 1+, şiddetli intrasitoplazmik boyanma durumunda 2+ olarak skorlandı.

Hastalar dört gruba ayrılarak istatistiksel analiz yapıldı (laringeal SHK, NKNK, kist olguları ve normal doku). İstatistiksel analiz için "SPPS 15.0 for Windows" (SPSS Inc., Chicago, Illinois) istatistik paket programı kullanıldı. Çalısma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (ortalama, standart sapma) yanı sıra gruplar arasındaki ilişkileri belirlemek amacıyla Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde degerlendirildi.

3. BULGULAR

Çalışmamızdaki olguların 46'sı (%85,2) erkek, 8'i (%14,8) kadındı. Hastalar 19-71 yaş aralığında olup ortalama yaş kadınlarda 49,1 erkeklerde 53,5 tüm olgularda 52,8 idi.

GSTK1 ile tüm olgularda epitelyal komponentte 2 (%3,1) olguda hiç boyanma saptanmazken, 6 (%9,4) olguda 1+ boyanma, 56 (%87,5) olguda 2+ boyanma gözlendi. GSTK1 ile tüm olgularda endotelyal hücrelerde 7 (%11,1) olguda hiç boyanma gözlenmezken, 26 (%41,3) olguda 1+, 30 (%47,6) olguda 2+ boyanma mevcuttu. GSTK1 ile tüm olgularda inflamatuvar hücrelerde 16 (%25,4) olguda hiç boyanma olmazken 29 (%46,0) olguda 1+, 18 (%28,6) olguda 2+ boyanma gözlendi. Olgu gruplarında GSTK1 ile boyanma dağılımı Tablo 1'de yer almaktadır.

VEGF ile tüm olgularda epitelyal komponentte 1 (%1,6) olguda hiç boyanma saptanmazken, 15 (%23,4) olguda 1+, 48 (%75,0) olguda 2+ boyanma izlendi. VEGF ile tüm olgularda endotelyal hücrelerde 6 (%9,8) olguda hiç boyanma gözlenmezken, 32 (%52,5) olguda 1+, 23(%37,7) olguda 2+ boyanma mevcuttu. VEGF ile tüm olgularda inflamatuvar hücrelerde 18 (%29,5) olguda hiç boyanma izlenmezken, 28 (%45,9) olguda 1+, 15 (%24,6) olguda 2+ boyanma saptandı. Olgu gruplarında VEGF ile boyanma dağılımı Tablo 2'de yer almaktadır.

Kaspaz-3 ile tüm olgularda epitelyal komponentte 6 (%9,7) olguda hiç boyanma saptanmazken, 26 (%41,9) olguda 1+, 30 (%48,4) olguda 2+ boyanma izlendi. Kaspaz-3 ile tüm olgularda endotelyal hücrelerde 20 (%32,3) olguda hiç boyanma izlenmezken, 35 (%56,5) olguda 1+, 7 (%11,3) olguda 2+ boyanma gözlendi. Kaspaz-3 ile tüm olgularda inflamatuvar hücrelerde 34 (%54,8) olguda hiç boyanma saptanmazken, 24 (%38,7) olguda 1+, 4 (%6,5) olguda 2+ boyanma izlendi. Olgu gruplarında Kaspaz-3 ile boyanma dağılımı Tablo 3'te yer almaktadır.

Tablo 1. Olgu Gruplarında GSTK1 ile Boyanma Dağılımı

	Boyanma Skoru		Olgu Grupları				
			Kist	SHK	NKNK	Normal	Toplam
Epitelyal GSTK1 Boyanması	0	n	0	0	1	1	2
		%	0,0%	0,0%	9,1%	11,1%	3,1%
	1	n	2	2	2	0	6
		%	10,5%	8,0%	18,2%	0,0%	9,4%
	2	n	17	23	8	8	56
		%	89,5%	92,0%	72,7%	88,9%	87,5%
	Toplam	n	19	25	11	9	64
Endotelyal GSTK1 Boyanması	0	n	2	1	3	1	7
		%	11,1%	4,0%	27,3%	11,1%	11,1%
	1	n	7	6	6	7	26
		%	38,9%	24,0%	54,5%	77,8%	41,3%
	2	n	9	18	2	1	30
		%	50,0%	72,0%	18,2%	11,1%	47,6%
	Toplam	n	18	25	11	9	63
İnflamatuvar Hücrelerde GSTK1 Boyanması	0	n	8	5	2	1	16
		%	44,4%	20,0%	18,2%	11,1%	25,4%
	1	n	8	7	7	7	29
		%	44,4%	28,0%	63,6%	77,8%	46,0%
	2	n	2	13	2	1	18
		%	11,1%	52,0%	18,2%	11,1%	28,6%
	Toplam	n	18	25	11	9	63

Tablo 2. Olgu Gruplarında VEGF ile Boyanma Dağılımı

	Boyanma Skoru		Olgu Grupları				
			Kist	SHK	NKNK	Normal	Toplam
Epitelyal VEGF Boyanması	0	n	0	1	0	0	1
		%	0,0%	4,0%	0,0%	0,0%	1,6%
	1	n	7	1	2	5	15
		%	36,8%	4,0%	18,2%	55,6%	23,4%
	2	n	12	23	9	4	48
		%	63,2%	92,0%	81,8%	44,4%	75,0%
	Toplam	n	19	25	11	9	64
Endotelyal VEGF Boyanması	0	n	2	1	1	2	6
		%	11,1%	4,2%	10, 0%	22,2%	9,8%
	1	n	13	6	7	6	32
		%	72,2%	25,0%	70,0%	66,7%	52,5%
	2	n	3	17	2	1	23
		%	16,7%	70,8%	20,0%	11,1%	37,7%
	Toplam	n	18	24	10	9	61
İnflamatuvar Hücrelerde VEGF Boyanması	0	n	8	5	4	1	18
		%	44,4%	20,8%	40,0%	11,1%	29,5%
	1	n	7	11	4	6	28
		%	38,9%	45,8%	40,0%	66,7%	45,9%
	2	n	3	8	2	2	15
		%	16,7%	33,3%	20,0%	22,2%	24,6%
	Toplam	n	18	24	10	9	61

Tablo 3. Olgu Gruplarında Kaspaz-3 ile Boyanma Dağılımı

	Boyanma Skoru		Olgu Grupları				
			Kist	SHK	NKNK	Normal	Toplam
Epitelyal Kaspaz-3 Boyanması	0	n	1	2	2	1	6
		%	5,3%	8,0%	20,0%	12,5%	9,7%
	1	n	11	6	5	4	26
		%	57,9%	24,0%	50,0%	50,0%	41,9%
	2	n	7	17	3	3	30
		%	36,8%	68,0%	30,0%	37,5%	48,4%
	Toplam	n	19	25	10	8	62
Endotelyal Kaspaz-3 Boyanması	0	n	7	4	5	4	20
		%	36,8%	16,7%	45,5%	50,0%	32,3%
	1	n	11	14	6	4	35
		%	57,9%	58,3%	54,5%	50,0%	56,5%
	2	n	1	6	0	0	7
		%	5,3%	25,0%	0,0%	0,0%	11,3%
	Toplam	n	19	24	11	8	62
İnflamatuvar Hücrelerde Kaspaz-3 Boyanması	0	n	13	9	8	4	34
		%	68,4%	37,5%	72,7%	50,0%	54,8%
	1	n	5	12	3	4	24
		%	26,3%	50,0%	27,3%	50,0%	38,7%
	2	n	1	3	0	0	4
		%	5,3%	12,5%	0,0%	0,0%	6,5%
	Toplam	n	19	24	11	8	62

Tüm olgularda GSTK1 ile epitelde boyanma skoru ortalaması 1,84, endotelde boyanma skoru ortalaması 1,37, inflamatuvar hücrelerde boyanma skoru ortalaması 1,03 idi. Olguların tamamında VEGF ile epitelde ortalama boyanma skoru 1,73, endotelde ortalama boyanma skoru 1,28 ve inflamatuvar hücrelerde ortalama boyanma skoru 0,95 olarak saptandı. Kaspaz-3 ile tüm olgularda ortalama boyanma skoru epitelde 1,39, endotelde 0,79, inflamatuvar hücrelerde 0,52 idi. Olgu gruplarında belirteçlerin boyanma skorlarının ortalama değerlerine Tablo 4'te yer verilmiştir.

Tablo 4. Olgu Gruplarında GSTK1, VEGF ve Kaspaz-3 Boyanma Skorlarının Ortalama Değerleri

	Boyanma Yeri	Olgu Grupları			
		Kist	SHK	NKNK	Normal
GSTK1	Epitel	1,89	1,92	1,64	1,78
	Endotelyal hücre	1,39	1,68	0,91	1,00
	İnflamatuvar hücre	0,67	1,32	1,00	1,00
VEGF	Epitel	1,63	1,88	1,82	1,44
	Endotelyal hücre	1,06	1,67	1,10	0,89
	İnflamatuvar hücre	0,72	1,13	0,80	1,11
Kaspaz-3	Epitel	1,32	1,60	1,10	1,25
	Endotel	0,68	1,08	0,55	0,50
	İnflamatuvar hücre	0,37	0,75	0,27	0,50

GSTK1 ile epitel, endotelyal hücre ve inflamatuvar hücrelerde boyanma skorları karşılaştırıldığında kist grubu ile normal grup arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). SHK grubu normal grup ile karşılaştırıldığında endotelyal hücrelerde GSTK1 ile anlamlı boyanma farklılığı görüldü ($p<0,05$). Epitel ve inflamatuvar hücrelerde GSTK1 ile anlamlı boyanma farklılığı saptanmadı ($p>0,05$). GSTK1 ile epitel, endotelyal hücreler ve inflamatuvar hücrelerde boyanma skorları karşılaştırıldığında NKNK grubu ile normal grup arasında anlamlı fark izlenmedi ($p>0,05$). Normal grup ile olgu gruplarının GSTK1 ile boyanma skorlarının karşılaştırmalarına ait p değerleri Tablo 5'te yer almaktadır.

VEGF ile epitel, endotelyal hücreler ve inflamatuvar hücrelerde boyanma skorları karşılaştırıldığında kist grubu ile normal grup arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). SHK grubu normal grup ile karşılaştırıldığında epitel ve endotelyal hücrelerde VEGF ile anlamlı boyanma farklılığı izlendi ($p<0,05$), inflamatuvar hücrelerde VEGF ile anlamlı boyanma farklılığı gözlenmedi ($p>0,05$). VEGF ile epitel, endotelyal hücrelerde ve inflamatuvar hücrelerde boyanma skorları karşılaştırıldığında NKNK grubu ile normal grup arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 4). Normal grup ile olgu gruplarında VEGF ile boyanma skorlarının karşılaştırmalarına ait p değerleri Tablo 5'te yer almaktadır.

Kaspaz-3 ile epitel, endotelyal hücreler ve inflamatuvar hücrelerde boyanma skorları karşılaştırıldığında kist grubu ile normal grup arasında anlamlı fark izlenmedi ($p>0,05$). SHK grubu normal grup ile karşılaştırıldığında endotelyal hücrelerde Kaspaz-3 ile anlamlı boyanma farklılığı saptandı ($p<0,05$). Epitel ve inflamatuvar hücrelerde Kaspaz-3 ile anlamlı boyanma farklılığı görülmedi ($p>0,05$). Kaspaz-3 ile epitel, endotelyal ve inflamatuvar hücrelerde boyanma skorları karşılaştırıldığında NKNK grubu ile normal grup arasında anlamlı fark izlenmedi ($p>0,05$) (Tablo 4). Normal grup ile olgu gruplarında Kaspaz-3 ile boyanma skorlarının karşılaştırmalarına ait p değerleri Tablo 5'te yer almaktadır.

Tablo 5. Normal Grup ile Diğer Olgu Gruplarında Boyanma Skorlarının Karşılaştırılması

	Boyanma Yeri	Karşılaştırılan Olgu Grupları (p değerleri)		
		Kist-Normal	SHK-Normal	NKNK-Normal
GSTK1	Epitel	0,891	0,721	0,446
	Endotel	0,109	**0,002**	0,719
	İnflamatuvar hücre	0,165	0,177	1,000
VEGF	Epitel	0,359	**0,005**	0,089
	Endotel	0,462	**0,002**	0,426
	İnflamatuvar hücre	0,162	0,912	0,324
Kaspaz-3	Epitel	0,857	0,152	0,662
	Endotel	0,465	**0,032**	0,849
	İnflamatuvar hücre	0,451	0,383	0,324

Mann-Whitney U Testi, $p<0,05$.

SHK grubu, kist grubu ile karşılaştırıldığında endotelde GSTK1 ile anlamlı boyanma farklılığı saptandı ($p<0,05$). Epitel ve inflamatuvar hücrelerde GSTK1 ile anlamlı boyanma farklılığı izlenmedi ($p>0,05$). GSTK1 ile epitel, endotel ve inflamatuvar hücrelerde boyanma skorları karşılaştırıldığında NKNK grubu ile kist grubu arasında anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$). Kist ve SHK ve NKNK olgu gruplarında GSTK1 boyanma skorlarının karşılaştırılmasına ait p değerleri Tablo 6'da yer almaktadır.

SHK grubu ile kist grubu karşılaştırıldığında epitel ve endotelde VEGF ile anlamlı boyanma farklılığı izlendi (p<0,05). İnflamatuvar hücrelerde VEGF ile anlamlı boyanma farklılığı saptanmadı (p>0,05). VEGF ile epitel, endotelyal hücreler ve inflamatuvar hücrelerde boyanma skorları karşılaştırıldığında NKNK grubu ile kist grubu arasında anlamlı fark görülmedi (p>0,05). Kist ve SHK ve NKNK olgu gruplarında VEGF boyanma skorlarının karşılaştırılmasına ait p değerleri Tablo 6'da yer almaktadır.

SHK grubu, kist grubu ile karşılaştırıldığında endotelde Kaspaz-3 ile anlamlı boyanma farklılığı izlendi (p<0,05). Epitel ve inflamatuvar hücrelerde Kaspaz-3 ile anlamlı boyanma farklılığı saptanmadı (p>0,05). Kaspaz-3 ile epitel, endotelyal hücre ve inflamatuvar hücrelerde boyanma skorları karşılaştırıldığında NKNK grubu ile kist grubu arasında anlamlı fark gözlenmedi (p>0,05). Kist ve SHK ve NKNK olgu gruplarında Kaspaz-3 boyanma skorlarının karşılaştırılmasına ait p değerleri Tablo 6'da yer almaktadır.

Tablo 6. Kist ve Karsinom Olgularında Boyanma Skorlarının Karşılaştırılması

	Boyanma Yeri	Karşılaştırılan Olgu Grupları (p değerleri)	
		Kist-SHK	Kist-NKNK
GSTK1	Epitel	0,775	0,219
	Endotel	**0,009**	0,079
	İnflamatuvar hücre	0,133	0,180
VEGF	Epitel	**0,028**	0,291
	Endotel	**0,001**	0,832
	İnflamatuvar hücre	0,089	0,796
Kaspaz-3	Epitel	0,077	0,439
	Endotel	**0,047**	0,552
	İnflamatuvar hücre	0,050	0,747

Mann-Whitney U Testi, p<0,05.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada GSTK1, VEGF ve Kaspaz-3 biyobelirteçlerinin larinks ve nazofarinks yerleşimli kist ve karsinomlarda hem normal doku ile hem de kendi aralarında ekspresyon farkı/benzerliği varlığı araştırılmıştır.

Bulgular belirteçler bazında sırayla tartışılacaktır.

4.1. GSTK1

4.1.1.Kist Grubu ile Normal Grup Arasındaki GSTK1 İlişkisi

Literatürde laringeal ve nazofaringeal kistler ile normal mukoza arasında GSTK1 ilişkisini araştıran çalışma henüz yoktur. Bizim çalışmamızda normal doku ile kist grubu arasında GTSK1 ekspresyonunda epitelyal komponent, endotelyal ve inflamatuvar hücrelerde anlamlı fark bulunmaması kistik lezyonların gelişiminde detoksifikasyon yolağında yer alan GSTK1 enziminin rolü olmadığını düşündürmüştür.

4.1.2.Larinks SHK ile Normal Grup Arasındaki GSTK1 İlişkisi

Literatürde immünhistokimyasal boyama yöntemini kullanan çalışmalar olduğu gibi, ELISA veya PCR yöntemiyle tümörlerde GST polimorfizmlerini veya gen delesyonlarını araştıran çalışmalar mevcuttur (122-126). GST alt tipleri çeşitli çalışmalarda anti kanser ilaçlara karşı direnç ile ilişkili olarak bulunmuştur (127-130). GSTK1'in, meme karsinomunda sisplatin direnci ile ilişkili olduğu saptanmıştır (15). Fakat bu çalışmalarda sadece tümör hücrelerindeki immünohistokimyasal ekspresyon değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda larinks SHK'leri ile normal doku arasında GSTK1 ekspresyonu karşılaştırıldığında epitelyal komponentte ve inflamatuvar hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmeyip yalnızca endotelde GSTK1 ekspresyonunda anlamlı fark görülmesi

aslında olası ilaç direncini destekleme yönünde değerlendirilebilir olsa bile özellikle epitelyal komponette farklılık olmayışı kesin bir yargıya varmayı engellemektedir.

4.1.3. Larinks SHK ile Kist Grubu Arasındaki GSTK1 İlişkisi

SHK'ler ile kist olguları arasındaki ilişkiyi araştıran çalışma henüz bulunmamaktadır. Çalışmamızda SHK grubu ile kist grubu karşılaştırıldığında ise epitelyal komponent ve inflamatuvar hücrelerde boyanma yönünde benzerlik vardır ve yalnızca endotelde istatistiksel olarak anlamlı boyanma farklılığı bulunmaktadır. Bu SHK grubunun normal dokuyla karşılaştırıldığında endotelde daha fazla GSTK1 eksprese etmesi ile benzer bir durumdur. Epitelyal komponent ve inflamatuvar hücrelerde boyanma açısından benzerliğin olması kist ve larinks SHK'leri arasında bir ilişkiyi yansıtmamaktadır; zira her iki grubun da her iki hücre grubunda normalden istatistiksel olarak anlamlı farklılığı bulunmamaktadır.

4.1.4.NKNK Grubu ile Normal Grup Arasındaki GSTK1 İlişkisi

Literatürde GST alt tiplerinin polimorfizm ve gen delesyonları nazofaringeal karsinom gelişimi ile ilişkili olduğunu destekleyen çalışmalar mevcuttur (131-137). Bizim çalışmamızda NKNK grubu normal dokular ile karşılaştırıldığında epitelyal komponent, endotel ve inflamatuvar hücrelerde GSTK1 ekspresyonunda anlamlı fark bulunmamakla birlikte bu bulgu, nazofaringeal biyopsilerin suboptimal olmasından kaynaklanabilir. Bu sebeple daha ileri ve daha fazla olgu grupları ile çalışmaların yapılması gerekmektedir.

4.1.5. NKNK ile Kist Grubu Arasındaki GSTK1 İlişkisi

NKNK'ler ile kist olguları arasındaki ilişkiyi araştıran çalışma henüz bulunmamaktadır. Çalışmamızda NKNK grubu kistler ile karşılaştırıldığında epitelyal komponent, endotelyal ve inflamatuvar hücrelerde GSTK1 ekspresyonunda fark olmaması,

kistler ile NKNK olgularının detoksifikasyon yolağındaki GSTK1 bazında ilişkili olmadığını düşündürmüştür.

4.2. VEGF

4.2.1. Kist Grubu ile Normal Grup Arasındaki VEGF İlişkisi

Literatüde VEGF hakkında yeni gelişen lezyonlara damarsal destek sağladığı yönünde çalışmalar vardır (143). Çalışmamızda kist grubu ile normal grup arasında VEGF ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamış olup temel patoloji mekanizmalarından olan VEGF'nin (99, 143), larinks ve nazofarinkste gelişen kistik dokuya normalden daha fazla destek vermediğini düşündürmüştür.

4.2.2.Larinks SHK ile Normal Grup Arasındaki VEGF İlişkisi

VEGF ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında özellikle baş boyun kanserlerinde prognostik faktörler ile ilişkilerinin araştırıldığı ve antianjiyogenetik tedavilerin önemini vurgulayan çok sayıda çalışma mevcuttur . VEGF'nin, tümörün T evresi, lenf nodu metastazı, tümör diferansiyasyonu gibi prognostik faktörler ile ilişkili olduğunu destekleyen çok sayıda çalışma olduğu gibi (103-106, 138-140, 144), herhangi bir ilişkinin desteklenemediği çalışmalar da mevcuttur (108, 141, 142). Çalışmamızda larinks SHK olguları hem tümör hücrelerinde hem de endotelyal hücrelerde VEGF ekspresyonunda normal dokulara göre anlamlı farklılık göstermektedir. Bu sonucumuz, literatürdeki VEGF'nin tümör gelişiminde rolü olduğu bildirilen çalışmalara benzer özelliktedir (145). Eşlik eden inflamatuar hücrelerde normal dokuya göre belirgin ekspresyon farkı bulunmaması, çalıştığımız tümör grubunda inflamatuvar hücrelerin VEGF ekspresyonu ile belirgin bir ilişkisi olmadığını düşündürebilir.

4.2.3.Larinks SHK ile Kist Grubu Arasındaki VEGF İlişkisi

Literatürde bu bölgede yerleşen kistlerin laringeal SCC gelişiminde rolü olup olmadığını araştıran çalışma henüz yoktur. Çalışmamızda, VEGF ile kist ve SHK grubu arasında inflamatuvar hücrelerde ekspresyon farkı izlenmeyip epitelyal komponent ve endotelyal hücrelerde ekspresyonda anlamlı fark izlenmesi aslında SHK grubu ile normal grubun karşılaştırılmasında elde edilen sonuçlar ile benzerdir. Bu sonucumuz, kist epiteli ve stroması ile normal doku arasında belirgin bir farklılık olmadığını bir kez daha gözler önüne sermiştir.

4.2.4. NKNK ile Normal Grup Arasındaki VEGF İlişkisi

Nazofaringeal karsinomlarda VEGF'nin özellikle metastaz ve prognoz ile ilişkili olduğunu destekleyen çalışmalar mevcuttur (109-111, 146). Çalışmamızda NKNK grubu normal doku ile karşılaştırıldığında epitelyal komponent, endotel ve inflamatuvar hücrelerde VEGF ekspresyonunda anlamlı fark bulunmamış olması çalıştığımız grupta VEGF'nin neoplastik süreç gelişiminde belirgin rolü olmadığını düşündürebilir. Sonuçları değerlendirirken nazofarinks spesmenlerinin niteliğini de göz önüne almakta fayda vardır. Yerleşim yeri dolayısıyla larinks gibi parsiyel veya total eksizyonu çok da mümkün olmayan nazofarinks tümörlerinde, tanı amaçlı yapılan biyopsi materyalleri genellikle çok küçük ve fragmante dokular halindedir. Dolayısıyla vasküler endotelyal yapıları veya inflamatuvar hücreleri yeterince inceleyebilmek için optimal olmamaktadırlar. Bu sebeple kesin yargıya varmak için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğu açıktır.

4.2.5. NKNK ile Kist Grubu Arasındaki VEGF İlişkisi

NKNK grubu kistler ile karşılaştırıldığında epitelyal komponent, endotel ve inflamatuvar hücrelerde VEGF ekspresyonunda farklılık gözlenmemesi, normal doku ile yapılan karşılaştırma sonuçları ile benzer niteliktedir.

4.3. KASPAZ-3

4.3.1.Kist Grubu ile Normal Grup Arasındaki Kaspaz-3 İlişkisi

Literatürde kistlerin gelişiminde Kaspaz-3 biyobelirtecinin rolü ile ilgili bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda Kaspaz-3 ekspresyonunda kist ve normal grupta epitelyal komponent, endotelyal ve inflamatuvar hücrelerde anlamlı farklılık izlenmemesi Kaspaz-3'ün kist gelişimini destekler nitelikte rolü olmadığını düşündürmüştür.

4.3.2.Larinks SHK ile Normal Grup Arasındaki Kaspaz-3 İlişkisi

Apoptotik faktörlerin baskılanmasının özellikle tümör gelişimi ve progresyonunda önemli rol oynadığını destekleyen birçok çalışma mevcuttur (27, 147-149). Bizim çalışmamızda tümör ile normal grup karşılaştırıldığında epitelyal komponent ve inflamatuvar hücrelerde Kaspaz-3 ekspresyonunda belirgin fark izlenmemektedir. İki olgu grubu arasında endotelde Kaspaz-3 ekspresyonunda anlamlı fark olması Kaspaz-3'ün larinks SHK gelişiminde rolü olabileceğini, ileride farklı tanı ve tedavi yöntemlerine temel oluşturabileceğini düşündürmüştür. Endotelde bulunan Kaspaz-3 ile apoptozun baskılanması ile anjiyogenezin engellenmesinin tedavide yol gösterici olabileceği düşündürmektedir.

4.3.3.Larinks SHK ile Kist Grubu Arasındaki Kaspaz-3 İlişkisi

Literatürde kist ile SHK arasında Kaspaz-3 ilişkisini araştıran çalışma henüz mevcut değildir. Kaspaz-3 ile kist ve SHK grubu arasında karşılaştırma yapıldığında vasküler endotelde izlenen boyanmada anlamlı fark olması, epitel ve inflamatuvar hücrelerde fark bulunmaması normal grup ile yapılan karşılaştırmaya benzer niteliktedir.

4.3.4.NKNK Grubu ile Normal Grup Arasındaki Kaspaz-3 İlişkisi

NKNK ile kist grubundaki Kaspaz-3 ekspresyonları karşılaştırıldığında ise epitelyal komponent, endotelyal veya inflamatuvar hücrelerde anlamlı fark bulunmamaktadır. Bu bulgu NKNK olgularının gelişiminde Kaspaz-3'ün rolü olmadığı yönünde yorumlanabilir; ancak suboptimal doku spesmenlerinin değerlendirmeyi ve sonuçları kısıtlı hale getirdiği göz önünde tutulmalıdır.

4.3.5.NKNK ile Kist Grubu Arasındaki Kaspaz-3 İlişkisi

NKNK grubu kistler ile karşılaştırıldığında epitelyal komponent, endotel ve inflamatuvar hücrelerde NKNK ekspresyonunda farklılık olmaması yine kist dokusu ile normal dokunun benzer olduğunu göstermesi yanı sıra çalıştığımız tümör grubunda Kaspaz-3'ün belirgin olarak yer almadığını düşündürebilir.

Çalışmanın Sınırlılıkları

Bu çalışmada nazofarinks ve larinks kistleri ile karsinomları arasında VEGF, GSTK1 ve Kaspaz-3 açısından farklılık veya benzerlik olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışmanın kısıtlayıcı taraflarından bir tanesi olgu gruplarındaki vaka sayılarının az olmasıdır. Her bir olgu grubu için daha fazla sayıda preparat değerlendirilmesi, daha sağlıklı sonuçlara ulaşılabilmesi açısından kıymetlidir.

Literatürdeki 'normal' tanımlamalarını incelediğimizde; VEGF, MMP-9 ve e-cadherin belirteçlerinin laringeal SHKun klinik davranışı ile ilişkilerini araştıran bir çalışmada immünhistokimyasal olarak VEGF boyamasının değerlendirme aşamasını açıklarken, 'normal epitelde olduğu gibi VEGF'nin boyanmadığı durumlarda' şeklinde bir söz dizisi kullanarak normal epitelde VEGF immünhistokimyasal boyanmasının olmadığı belirtilmiştir (147). VEGF belirtecinin normal epitelde boyanması ile ilgili bilgi veren bu çalışma dışında,

endotelde veya inflamatuvar hücrelerde; ayrıca GSTK1 ve Kaspaz-3 belirteçlerinin de normal doku elemanlarında boyanma skoru hakkında literatürde henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda normal grupta bütün belirteçlerde ve değerlendirilen tüm hücresel elemanlarda boyanma olduğu saptanmış olduğundan belki de öncelikle, bu belirteçlerin normal dokularda ekspresyonu konusunda ileri çalışmalar yapılmalıdır.

Bir başka konu başlığı ise aslında olgu gruplarının etiyolojik faktörlerinin bire bir benzer olmaması ile ilişkilidir. Sadece yerleşim yeri bazında larinks normal doku, larinks kist ve laringeal SHK veya nazofarinks normal doku, nazofarinks kist ve NKNK şeklinde gruplandırma yapılarak, bu grupları karşılaştırmak bakış açımızın ve belki de sonuçlarımızın iyi yönde değişmesini sağlayabilir. Elbette bu durum, vaka gruplarındaki olgu sayıları daha az olacağından daha uzun bir zaman aralığındaki olguları taramayı gerektirecektir.

Günlük pratikte karşımıza çıktığı üzere, nazofarinks karsinomlarının tanısı için değerlendirdiğimiz biyopsi materyallerin niteliği birçok konuda bizi kısıtlamaktadır. Laringeal tümörlerde hem biyopsi açısından, hem de opere edilebilirlikleri düşünüldüğünde pek karşımıza çıkmayan bu durum, nazofarinks tümör biyopsileri için önem arz etmektedir. Özellikle bu çalışmada uygulanan belirteçlerin endotel hücrelerindeki boyanmaları hususunda nazofarinks karsinom preparatlarında zorlanılmıştır. Biyopsi genelde çok küçük ve sadece tümör dokusundan ibaret olduğu için hem endotel boyanması değerlendirmesinde kısıtlılık yaratmıştır, hem de normal gruba dahil olan nazofarinks karsinom olgularının sayısının 1 ile sınırlı kalmasına neden olmuştur.

5. SONUÇLAR

Çalışmadaki amacımız kistik lezyonların karsinom gelişiminde rolü olup olmadığını araştırmaktı. Normal grup ve kist grubu arasında istatistiksel anlamlılığa ulaşan GSTK1, VEGF ve Kaspaz-3 ekspresyonu saptamamamız kist ve normal grupta epitelyal, endotelyal ve inflamatuvar hücrelerin benzer özellikte olduğu yönünde destek vermiştir. Bu bulgular GSTK1, VEGF, Kaspaz-3 biyobelirteçleri bazında kistlerin karsinom gelişiminde predispozan olmadığını düşündürmüştür.

Bu çalışma, immünhistokimyasal değerlendirmenin yalnızca epitelyal komponette değil, endotelyal ve inflamatuvar hücrelerde yapılması açısından özelliklidir. GSTK1, VEGF ve Kaspaz-3 ile normal doku endotel hücreleri ile tümör endotel hücrelerinin boyanma farklılığı göstermesi nedeniyle tümör stromasının da tedavinin yönlendirilmesi ve değerlendirilmesinde faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Ancak vaka sayımızın sınırlı olması nedeniyle destekleyici çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

1. Heyes R, Lott DG. Laryngeal Cysts in Adults: Simplifying Classification and Management. Otolaryngol Head Neck Surg. 2017 July 1:194599817715613.
2. Tsarapkin GY, Tovmasyan AS, Arzamazov SG, Kishinevskii AE. Differential Diagnostic and the Treatment Strategy for the Management of the Nasopharyngeal Cystic Lesions. Vestn Otorinolaringol. 2017;82(4): 52-55.
3. Cheah R, Srivastava R, Stafford ND, Beavis AW, Green V, Greenman J. Measuring the Response of Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma to Irradiation in a Microfluidic model Allowing Customized Therapy. Int J Oncol. 2017 Oct;51(4): 1227-1238.
4. Matoba T, Ijichi K, Yanagi T, Kabaya K, Kawakita D, Beppu S, Torii J, Murakami S. Chemo-selection with Docetaxel, Cisplatin and 5-Fluorouracil (TPF) Regimen Followed by Radiation Therapy or Durgery for Pharyngel-al and Larygeal carcinoma. Jpn J Clin Oncol. 2017 Aug 18:1-7.
5. Imano N, Murakami Y, Nakashima T, Takeuchi Y, Takahash I, Doi Y et al. Clinical Outcomes of Concurrent Chemoradiotherapy with Volumetric Modulated Arc Therapy in Patients with Locally Advanced Nasopharyngeal Carcinoma. Jpn J Radiol. 2017 Sep 8. Doi: 10.1007/s11604-017-0680-5.
6. Guo Z, Wang Y, Zhao Y, Jin Y, An L, Wu B, L,u Z et al. Genetic Polymorphisms of Long Non-Coding RNA GAS5 Predict Platinum-Based Concurrent Chemoradiotherapy Response in Nasopharyngeal Carcinoma Patients. Oncotarget. 2017 Jul 31;8(37):62286-62297.
7. Haleshappa RA, Thanky AH, Kuntegowdanahalli L, Kanakasetty GB, Dasappa L, Jacob L. Epidemiology and Outcomes of Nasopharyngeal Carcinoma: Experience from a Regional Cancer Center in Southern India. South Asian J Cancer. 2017 Jul-Sep;6(3): 122-124.
8. Chen X, Gao L, Sturgis EM, Liang Z, Zhu Y, Xia X et al. HPV16 DNA and Integration in Normal and Malignant Epithelium: Implications for the Etiology of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. Ann Oncol. 2017 May 1;28(5):1105-1110.
9. Khan JA, Siddque MA, Haque MN, Kundu SC, Ahmed MU, Bhuiyan AS. Etiology of LAryngeal Squamous Cell Carcinoma: Study of 50 Cases in Mymensingh Medical College Hospital.

10. Menicagli R, Bolla G, Menicagli L, Esseiridou A. Industrial Pollutants and Nasopharyngeal Cancer: An Open Question. Gulf J Oncolog. 2017 May;1(24):70-74.
11. Nakanishi Y, Wakisaka N, Kondo S, Endo K, Sugimoto H, Hatano M et al. Progression of understanding for the role of Epstein-Barr virus and management of nasopharyngeal carcinoma. Cancer Metastasis Rev. 2017 Aug 17. doi: 10.1007/s10555-017-9693-x.
12. Chang, Jun Liu, Jin Hui Yang, Fei Zhou Huang, Wan Pin Nie, CHu Ping Liu, Xian Hai Mao et al. Glutathione-s-transferase A 4 (GSTA4) suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting AKT pathway. Am J Transl Res. 2017;9(2): 301-315.
13. Zmorzynski S, Swiderska-Kolacz G, Koczkodaj D, Filip AA. Significance of polymorphisms and expression of enzyme-encoding genes related to glutathione in hematopoietic cancers and solid tumors. Biomed Res Int. 2015;2015:853573
14. Rao AK, Parameswar P, Majumdar S, Uppala D, Kotina S, Vennamaneni NH. Evaluation of Genetic Polymorphisms in Glutathione S-Transferase Theta1, Glutathione S-Transferase Mu1, and Glutathione S-Transferase Mu3 in Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma with Deleterious Habits using Polymerase Chain Reaction. Int J Appl Basic Med Res. 2017 Jul-Sep;7(3):181-185.
15. Kalinina EV, Berozov TT, Shtil AA, Chernov NN, Glasunova VA, Novichkova MD. Nurmadov NK. Expression of genes of glutathione transferase isoforms GSTP1-1, GSTA4-4, and GSTK1-1 in tumor cells during the formation of drug resistance to cisplatin. Bull Exp Biol Med. 2012 Nov;154(1):64-7.
16. Yang X, He C, Xie W, LİU Y, Xia J, Yang Z et al. Glutathione S-transferases are involved in thiamethoxam resistance in the field whitefly Bemisia tabaci Q (Hemiptera: Aleyrodidae). Pestic Biochem Physiol. 2016 Nov;134:73-78.
17. Crawford DR, Ilic Z, Guest I, Milne GL, Hayes JD, Sell S. Characterization of liver injury, oval cell proliferation and cholangiocarcinogenesis in glutathione S-transferase A3 knockout mice. Carcinogenesis. 2017 Jul 1;38(7):717-727.
18. Li H, Li L. Relationship of GSTP1 lower expression and multidrug resistance reversing of curcumin on human colon carcinoma cells. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2015 Aug 11;95(30):2478-82.
19. Chen S, Jiao JW, Sun KX, Zong ZH, Zhao Y. MicroRNA-133b targets glutathione S-transferase π expression to increase ovarian cancer cell sensitivity to chemotherapy drugs. Drug Des Devel Ther. 2015 Sep 16;9:5225-35.

20. Manzo A, Montanino A, Carillo G, Costanzo R, Sandomenico C, Normanno N et al. Angiogenesis Inhibitors in NSCLC. Int J Mol Sci. 2017 Sep 21;18(10). pii: E2021.
21. Loizzi V, Del Vecchio V, Gargano G, De Liso M, Kardashi A, Naglieri E et al. Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis and Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer. Int J Mol Sci. 2017 Sep 14;18(9). pii: E1967.
22. Bandoh N, Hayashi T, Takahara M, Kishibe K, Oqino T, Katayama A et al. VEGF and bFGF expression and microvessel density of maxillary sinus squamous cell carcinoma in relation to p53 status, spontaneous apoptosis and prognosis. Cancer Lett. 2004 May 28;208(2):215-25.
23. Tae K, El Naggar AJ, Yoo E, Feng L, Lee JJ, Hong WK et al. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. Clin Cancer Res. 2000 Jul;6(7):2821-8.
24. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. J Natl Cancer Inst. 2002 Jun 19;94(12):883-93.
25. Taillade L, Alexandre I, Billemont B, Meric JB, Sultan-Amar V, Rixe O. Angiogenesis: a new therapeutic target of thoracic and laryngopharyngeal carcinoma. Bull Cancer. 2009;96 Suppl 1:S45-55. doi: 10.1684/bdc.2008.0775.
26. Ileri AB, Köseoğlu RD, Markoç F, Etikan İ, Atilgan A, Deresoy FA. Immunohistochemical Analysis of the Extrinsic Apoptosis Process in the Non-Neoplastic and Neoplastic Prostate. Turk Patoloji Derg. 2017 Oct 6. doi: 10.5146/tjpath.2017.01409.
27. Xu Q, Gaso S, Liu J. The expression of caspase-3, bFGF and MVD in laryngeal squamous cell carcinoma and the relationship among them. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. 2013 Oct;27(19):1084-7.
28. Kang N, Zhang JH, Qui F, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Inhibition of EGFR signaling augments oridonin-induced apoptosis in human laryngeal cancer cells via enhancing oxidative stress coincident with activation of both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. Cancer Lett. 2010 Aug 28;294(2):147-58. doi: 10.1016/j.canlet.2010.01.032.
29. Wang X, Tang C. Galangin suppresses human laryngeal carcinoma via modulation of caspase-3 and AKT signaling pathways. Oncol Rep. 2017 Aug;38(2):703-714. doi: 10.3892/or.2017.5767.

30. Chen C, Wu J, Zhu P, Xu C, Yao L. Investigating isoquinoline derivatives for inhibition of inhibitor of apoptosis proteins for ovarian cancer treatment. Drug Des Devel Ther. 2017 Sep 11;11:2697-2707. doi: 10.2147/DDDT.S137608.
31. Leon Barnes, John W. Eveson, Peter Reichart, David Sidransky, World Health Organization Classification of Tumours. Chapter II Nasopharynx pp 81-98 and Chapter 3 Hypopharynx, Larynx and Trachea pp107-134.
32. Operative Tecniques in Laryngology Rosen, C.A.: Simpson B, 2008, XXVI, 312. P Hardcover, ISBN: 978-3-540-25806-3.
33. Fechner RE, Mills SE (1997) Larynx and pharynx. In: Sternberg SS (ed) Histology for pathologists. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 391-403.
34. Hirano M, Sato K (1993) Histological Color Atlas of the Human Larynx. Singular, San Diego, pp 1-112.
35. Delahunty JE, Cherry J. The Laryngeal Saccule. J Laryngol Otol 1969; 83:803-815.
36. Broyles, EN. Anatomical Observations Concerning the Laryngeal Appendix. Ann Otol Rhinol Laryngol 1959; 68:461-470.
37. Hollinger LD, Barnes DR, Smid LJ. Laryngocele and Saccular Cysts. Ann Otol Rhinol Laryngol 1978; 87:675-685.
38. DeSanto LW. Laryngocele, Laryngeal Mucocele, Large Saccules and Laryngeal Saccular Cysts: A Developmental Spectrum. Laryngoscope 1974; 84:1291-1296.
39. DeSanto LW, Devine KD, Weiland LH. Cysts of the Larynx-Classification. Laryngoscope 1970; 80:145-176.
40. Newman BH, Taxy JB, Laker HI. Laryngeal Cysts in Adults: A Clinicopathologic Study of 20 Cases. Am J Clin Pathol 1984; 81:715-720.
41. Ramesar K, Albizzati C. Laryngeal Cysts: A Clinical Relevance of a Modified Working Classification. J Laryngol Otol 1988; 102:923-925.
42. Forte V, Fuoco G, James A. A New Classification System for Congenital Laryngeal Cysts. Laryngoscope 2004; 114(6):1123-7.
43. Weber PC, Kenna MA, Casselbrant ML. Laryngeal Cysts: A Cause of Neonatal Airway Obstruction. Otolaryngol Head Neck Surg 1993; 109:129-134.
44. Mitchell DB, Irwin BC, Bailey CM, et al. Cysts of the Infant Larynx. J Laryngol Otol 1987; 101:833-837.
45. Civantos FJ, Hollinger LD. Laryngoceles and Saccular Cysts in Infants and Children. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1993; 109:129-134.

46. Leon Barnes, Surgical Pathology of the Head and Neck, Third Edition, Chapter 3 Diseases of the Larynx, Hypopharynx and Tracea pp 115-119.
47. Myssiorek D, Persky M. Laser Endoscopic Treatment of Laryngoceles and Laryngeal Carcinomas. Laryngoscope 1978; 88:680-688.
48. McGavran MH, Bauer WC, Ogura JH (1961). The Incidence of Cervical Lymph Node Metastases From Epidermoid Carcinoma of the Larynx and Their Relationship to Certain Characteristics of the Primary Tumor: A Study Based on the Clinical and Pathological Findings for 96 Patient Treated by Primary En Bloc Laryngectomy and Radical Neck Dissection. Cancer 14: 55-66.
49. Olofsson J, van Nostrand AW (1973). Growth and Spread of Laryngeal and Hypopharyngeal Carcinoma with Reflections on the Effect of Preoperative Irradiation. 139 Cases Studied by Whole Organ Serial Sectioning. Acta Otolaryngol Suppl 308:1-84.
50. Barnes C, Sexton M, Sizeland A, Tiedemann K, Berkowitz RG, Waters K (2001). Laryngo-Pharyngeal Carcinoma in Childhood. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 61:83-86.
51. Ohlms LA, McGill T, Healy GB (1994). Malignant Laryngeal Tumors in Children: A 15 Year Experience with Four Patients. Ann Otol Rhinol Laryngol 103:686-692.
52. Cattaruzza MS, Maisonneuve P, Boyle P (1996). Epidemiology of Laryngeal Cancer. Eur J Cancer B Oral Oncol 32B:293-305.
53. Rafferty MA, Fenton JE, Jones AS (2001). The History, Etiology and Epidemiology of Laryngeal Carcinoma. Clin Otolaryngol 26:442-446.
54. Tuyns AJ, Esteve J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F, Boffeta P, Crosignani P, del Moral A, Lehmann W, Merletti F, Pequignot G, Riboli E, Sancho-Garnier H, Terracini B, Zubiri A, Zubiri L (1988). Cancer of the Larynx/Hypopharynx, Tobacco and Alcohol: IARC International Case-Control Study in Italy, Spain, Switzerland an France. Int J Cancer 41:483-491.
55. Zatonski W, Becher H, Lissowska J, Wahrendorf J (1991). Tobacco, Alcohol and Diet in the Etiology of Laryngeal Cancer: A Population-Based Case-Control Study. Cancer Causes Control 2:3-10.
56. Bosetti C, talamini R, Levi F, Negri E, Framceschi S, Airoldi L, La Vecchia C (2002). Fried Foods: A Risk Factor for Laryngeal Cancer? Br J Cancer 87:1230-1233.
57. Browne K, Gee JB (2000). Asbestos Exposure and Laryngeal Cancer. Ann Occup Hyg 44:239-250.
58. Maier H, Tisch M (1997). Epidemiology of Laryngeal Cancer: Results of the Heidelberg Case-Control Study. Acta Otolaryngol Suppl 527:160-164.

59. World Cancer Research Fund (WCRF) (1997). Lung. In: Food Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective (Part II, Cancers, nutrition and food), American Institute for Cancer research: Washington D.C. pp 130-147.
60. Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP (1997). Human Papillomavirus (HPV) in Head and Neck Cancer. An Association of HPV 16 with Squamous Cell Carcinoma of Waldeyer's Tonsillar Ring. Cancer 79: 595-604.
61. Shen J, Tate JE, Crum CP, Goodman ML (1996). Prevalence of Human Papillomaviruses (HPV) in Benign and Malignant Tumors of the Upper Respiratory Tract. Mod Pathol 9:15-20.
62. Rihkanen H, Peltomaa J, Syrjanen S (1994). Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) DNA in Vocal Cords Without Laryngeal Papillomas. Acta Otolaryngol 114:348-351.
63. Zheng W, Blot WJ, Shu XO, Gao YT, Ji BT, Ziegler RG, Fraumeni JFJr (1992). Diet and Other Risk Factors for Laryngeal Cancer in Shangai, China. Am J Epidemiol 136:178-191.
64. Freije JE, Beatty TW, Campbell BH, Woodson BT, Schultz CJ, Toohill RJ (1996). Carcinoma of the Larynx in Patients with Gastroesophageal Reflux. Am J Otolaryngol 17:386-390.
65. Ma B, Corry J, Rischin D, Leong T, Peters LJ (2001). Combined Modality Treatment for Locally Advanced Squamous-Cell Carcinoma of the Oropharynx in a Woman With Bloom's Syndrome: A Case Report and Review of the Literatüre. Ann Oncol 12:1015-1017.
66. Berkower AS, Biller HF, (1988). Head and Neck Cancer Associated with Bloom's Syndrome. Laryngoscope 98:746-748.
67. Magnano M, Cavalot AL, Gervasio CF, Lerda W, Gabriele P, Orecchia R, Ruoredda MG, Beltramo G, Ragona R, Cortesina G (1999). Surgery or Radiotherapy for Early Stages Carcinomas of the Glottic Larynx. Tumori 85:188-193.
68. Nguyen-Tan PF, Le QT, Quivey JM, Singer M, Terris DJ, Goffinet DR, Fu KK (2001). Treatment Results and Prognostic Factors of Advanced T3-4 Laryngeal Carcinoma: the University of San Francisco (UCSF) and Standford University Hospital (SUH) experience. Int J Radiat Oncol Biol Phys 50:1172-1180.
69. Bryne M, Jenssen N, Boysen M (1995). Histological Grading in the Deep Invasive Margins of Oral Squamous Cell Carcinomas Has High Prognostic Value. J Pathol 166:375-381.

70. Hirvikoski P, Kumpulainen E, Virtaniemi J, Johansson R, Haapasalo H, Marin S, Halonen P, Helin H, Raitiola H, Pukander J, Kellokumpu-Lehtinen P, Kosma VM (1997). P53 Expression and Cell Proliferation as Prognostic Factors in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. J Clin Oncol 15:3111-3120.
71. Ferlito A, Rinaldo A, (2000). The Pathology and Management of Subglottic Cancer. Eur Arch Otorhinolaryngol 257:168-173.
72. Chen PS, Lin YC, Lin YS. Nasopharyngeal Branchial Cleft Cyst. J Chin Med Assoc 2012 Dec; 75(12):660-2.
73. Righi S, Boffano P, Pateras D, Malvé L, Chiodo D, Boson M. Thornwaldt Cysts. J Craniofac Surg 2014 Sep; 25(5):e456-7.
74. Bruce M. Wenig, Atlas of Head and Neck Pathology, Second Edition. Chapter 7 Non-Neoplastic Lesions p187.
75. Shanmugaratnam K, Sobin LH (1978). Histological Typing of Upper Respiratory Tract Tumours. Geneva, World healt Organization 1978:32-3.
76. Shanmugaratnam K (1991). Histological Typing of Tumours of the Upper Respiratory Tract and Ear. 2nd ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
77. IARC Working Group (1997). Epstein Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpes Virus / Human Herpes 8.
78. Raab Traub N (2002). Epstein Barr Virüs in the Pathogenesis of Nasopharyngeal Carcinoma. Semin Cancer Biol 12:431-441.
79. Zou XN, Lu SH, Liu B (1994). Volatile N-nitrosamines and Their Precursors in Chinese Salted Fish-a Possible Etiological Factor for Nasopharyngeal Carcinoma in China. Int J Cancer 59:155-158.
80. Yu MC, Garabrant DH, Huang TB, Henderson BE (1990). Occupational and Other Dietary Risk Factors for Nasopharyngeal Carcinoma in Guangzhou, China. Int J Cancer 45:1033-1039.
81. Hildesheim A, Dosemeci M, Chan CC, Chen CJ, Cheng YJ, Hsu MM, Chen IH, Mittl BF, Sun B, Levine PH, Chen JY, Brinton LA, Yang CS (2001). Occupational Exposure to Woodi Formaldehyde and Solvents and Risk of Nasopharyngeal Carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 10:1145-1153.
82. Chen CL, Hsu MM (2000). Second Primary Epithelial Malignancy of Nasopharynx and Nasal Cavity After Successful Curative Radiation Therapy of Nasopharyngeal Carcinoma. Hum Pathol 31:227-232.
83. Sülen Sarıoğlu, Baş Boyun Patolojisi 2014, Nazofarinks Ünitesi, s. 49.

84. Chen CL, Hsu MM (2000). Second Primary Epithelial Malignancy of Nasopharynx and Nasal Cavity After Successful Curative Radiation Therapy of Nasophrayngeal Carcinoma. Hum Pathol 31:227-232.
85. Shanmugaratnam K (1978). Histological Typing of Nasopharyngeal Carcinoma. IARC Sci Publ 3-12.
86. Weiland LH (1978). The Histopathological Spectrum of Nasopharyngeal Carcinoma. IARC Sci Publ 41-50.
87. Reddy SP, Raslan WF, Gooneratne S, Kathuria S, Marks JE (1995). Prognostic Significance of Keratinization in Nasopharyngeal Carcinoma. Am J Otolaryngol 16:103-108.
88. Neel HBI (1985). Nasopharyngeal Carcinoma. Clinical Presentation, Diagnosis, Treatment and Prognosis. Otolaryngol Clin North Am 18:479-490.
89. Dildar KONUKOĞLU, Tülay AKÇAY, Glutatyon Metabolizması ve Klinik Önemi T Klin Tıp Bilimleri 1995. 15:214-218.
90. Klaassen CD, Amdur MO, Doull J; (3rd Ed, 1986) Macmillan Publishing; Principles of Toxicology Chapter Casarett and Doull's Toxicology, (2005).
91. Thier R, Brüning T, Roos PH, Rihs HP, Golka K, Ko Y, Bolt HM. Markers of Genetic Susceptibility in Human Environmental Hygiene and Toxicology: The Role of Selected CYP, NAT and GST Genes. Int J Hyg Environ Health 206: 149-171, June 2003.
92. Guengerich FP, Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics. Edited by Ioannides C. John Wiley and Sons Ltd, USA, 2002.
93. Cantürk P, Mide antrum Mukoza Örneklerinde Sitokrom P450 Gen Ekspresyonunun mRNA Düzeyinde Belirlenmesi, Ege Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, İzmir, 2008.
94. Arzu Kaya KOÇDOĞAN, Meme kanserli Hastalarda Glutatyon S-Transferaz İzozimlerin Çoklu İlaç Direnç Mekanizmasındaki Proteinlerle Olan İlişkisinin İncelenmesi, Kırıkkale Üniversitesi Doktora Tezi, Eylül, 2016.
95. Yasemin Aksoy, Kanserde İlaç Direncinin Üstesinden Gelmenin Yolları: Yeni İlaçların Tasarımı, Türkiye Klinikleri J Med Sci 2010; 30(6): 2011-6.
96. Lesley I, McLellan C, Roland Wolf Glutathione and Glutathione-Dependent Enzymes in Cancer Drug Resistance Ninewells Hospital and Medical School, Dundee, UK.
97. Birsen Tozkoparan, Sevim peri Aytaç Kanser Kemoterapisinde Terapötik Hedef Olarak Glutatyon S-Transferazlar Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi Cilt 27 / Sayı 2 / Temmuz 2007 / ss. 139-164.

98. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 9th edition, 2015, Chapter I The Cell as a Unit of Health and Disease, pp 18-20.
99. Lionello M, Staffieri A, Marioni G. Potential Prognostic and Therapeutic Role for Angiogenesis Markers in Laryngeal Carcinoma. Acta Otolaryngol 2012 June; 132(6):574-82.
100. Bonhin RG, Rocha VB, Carvalho GM, Guimaraes AC, Crespo AN, Chone CT, Amstalden EM. Correlation Between Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Presence of Lymph Node Metastasis in Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Larynx. Braz J Otorhinolaryngol 2015 Jan-Feb; 81(1):58-62.
101. Chatziavramidis A, Tsinaslanidou Z, Valeri R, Konstantinidis I, Constantinidis J. Brush Cytology with Immunocytochemical Evaluation of VEGF Expression Versus Biopsy in Clinically Precancerous Laryngeal Lesions: Can We Diagnose Laryngeal Cancer Only With Brush Cytology? Anal Cell Pathol (Amst). 2015; 2015:256182.
102. Bonhin RG, de Carvalho GM, Guimaraes AC, Rocha VB, Chone CT, Crespo AN, Amstalden EM. Histologic Correlation of VEGF and COX-2 Expression With Tumor Size in Squamous Cell Carcinoma of The Larynx and Hypopharynx. Ear Nose Throat J 2017 Apr-May; 96(4-5):176-182.
103. Sun D, Wang Y, Liu H, Kong W, Liu B. Prognostic Value of Ki67 and VEGF Expression in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. Chinese Journal of Clinical Oncology, Feb 2006, Volume 3, Issue 1, pp 20-24.
104. Kong H, Ciu J, Wang L, Dong Z. The expression of Galectin-3 and VEGF in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi 2009 Feb; 23(3):109-12.
105. Liu Y, Qui Y, Zhang X, Tian Y, Huang D, Zhou X, Tan P, Yu C, Qi L, Xiao J. The Expression and Correlation of HMGB1 and VEGF Protein in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi 2011 Mar; 25(6):265-9.
106. Wang Z, Chen Y, Li X, Xu L, Ma W, Chang L, Ju F. Expression of VEGF-C/VEGFR-3 in Human Laryngeal Squamous Cell Carcinomas and its Significance for Lymphatic Metastasis. Asian Pac J Cancer Prev 2012; 13(1):27-31.
107. Korampalli TS, Stafford ND. Expression of Angiogenic Factors in Laryngeal Carcinoma. Mol Clin Oncol 2013 Nov; 1(6):1013-1018.
108. Akdeniz O, Akduman D, Haksever M, Ozkarakas H, Muezzinoglu B. Relationships Between Clinical Behavior of Laryngeal Squamous Cell Carcinomas and Expression of VEGF, MMP-9 and E-cadherin. Asian Pac J Cancer Prev 2013; 14(9):5301-10.

109. Li J, Huang G, Nong H, Xu Z, Tang A, Kuang G, Wei M. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Tumor Angiogenesis Correlates with Biological Behaviors of Nasopharyngeal Carcinoma. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi 1999 Aug; 13(8):343-4.
110. Guang-Wu H, Sunagawa M, Jie-En L, Shimada S, Gang Z, Tokeshi Y, Kosugi T. The Relationship Between Microvessel Density, The Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), and the Extension of Nasopharyngeal Carcinoma. Laryngoscope 2000 Dec; 110(12):2066-9.
111. Wakisaka N, Wen QH, Yoshizaki T, Nishimura T, Furukawa M, Kawahara E, Nakanishi I. Assosiation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression with Angiogenesis and Lymph Node Metastasis in Nasopharyngeal Carcinoma. Laryngoscope 1999 May;109(5):810-4.
112. Vinar KUMAR, Abul K. ABBAS, Jon C. ASTER, Robbins Basic Pathology, 9th Ed, Chapter I Cell Injury, Cell Death and Adaptations, p 18.
113. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 9th edition, 2015, Chapter II Cellular Responses to Stress and Toxic Insults: Adaptation, Injury and Death, 53-58.
114. Loro L, Vintermyr OK, Johannessen AC. Apoptosis in Normal and Diseased Oral Tissues. Oral Dis. 2005;11(5):274–87. Epub 2005/08/27.
115. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic Instability—An Evolving Hallmark of Cancer. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2010;11(3):220–8.
116. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: A Question of Life or Death. Nature Reviews Cancer. 2006 Jun; 6(6):449–58.
117. Fulda S. Tumor Resistance to Apoptosis. International Journal of Cancer. 2009 Feb 1;124(3):511–5.
118. Fulda S, Pervaiz S. Apoptosis Signaling in Cancer Stem Cells. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2010;42(1):31–8.
119. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. BioMed Research International. 2014;2014:150845.
120. Yusuf F, Ilyas S, Damanik HA, Fatchiyah F. Microbiota Composition, HSP-70 and Caspase-3 Expression as Marker for Colorectal Cancer Patients in Aceh, Indonesia. Acta Med Indones 2016 Oct;48(4): 289-299.
121. De Oca J, Azuara D, Sanchez-Santos R, Navarro M, Capella G, Moreno V, Sola A, Hotter G, Biondo S, Oscorio A, Marti-Raqué J, Rafecas A. Caspase-3 Activity, Response

to Chemotherapy and Clinical Outcome in Patients with Colon Cancer. Int J Colorectal Dis 2008 Jan; 23(1):21-7.

122. Li Q, Wang L, Chen Y, Du Y, Kong P, Li Y, Xu X. Polymorphisms of GSTM-1, GSST1 and Susceptibility of Laryngeal and Hypopharyngeal Carcinomas. Lİ Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. 2009 Dec;23(24): 1105-7, 1111.
123. Chatzimichalis M, Xenellis J, Tzagaroulakis A, Sarof P, Banis K, Gazouli M, Bibas A. GSTT1, GSTM1, GSTM3 and NAT2 Polymorphisms in Laryngeal Squamous Celle Carcinoma in Greek Population. J Laryngol Otol. 2010 Mar; 124(3):318-23.
124. Konig-Greger D, Riechelmann H, Wittich U, Gronau S. Genotype and Pthenotype of Glutathione-S-Transferase in Patients with head and Neck Carcinoma. Otolaryngol Head neck Surg. 2004 Jun; 130(6): 718-25
125. Lafuente A, Maristany M, Arias C, Cuchi A, Lafuente MJ, Molina R, Ballesta A, Trasserra J. Glutathione and Glutathione S-Trasnferases in Human Squamous Cell Carcinomas of the Larynx and GSTM1 Dependent Risk. Anticancer Res. 1998 Jan-Feb;18(1A): 107-11.
126. Olshan AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA. GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1 and NAT Polymorphisms, Tobacco Use and the Risk of Head and Neck Cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000 Feb;9(2): 185-91.
127. Makhtar SM, Husin A, Baba AA, Ankathil R. Association of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Ile105Val Polymorphisms with Clinical Response to Imathinib Mesylate Treatment Among Malaysian Chronic Myeloid Leukaemia patients. J Genet. 2017 Sep;96(4): 633-639.
128. Marchewka Z, Piwowar A, Ruzik S, Dlugosz A. Glutathione S-Transferases Class Pi and Mi and Their Significance in Oncology. Postepy Hig Med Dosw (online). 2017 Jun 19;71(0): 541-550.
129. Mohana K, Achary A. Human Cytosolic Glutathione S-Transferases; Quantitative Analysis of Expression, Comparative Analysis of Structures and Inhibition Strategies of Isozymes Involved in Drug resistance. Drup metab Rev. 2017 Aug;49(3): 318-337.
130. Wang X, Li Y, Chen W, Wang Y, Hiu L, Liu J, Li N, Zhang L, Zou Y, Wang F. Nrf-2/Gst-alfa Mediated Imatinib Resistance Through Rapid 4-HNE Clearance. Exp Cell Res. 2017 Apr 15;353(2):72-78.
131. Wu M, Huang S, Liu D, Peng M, Yang F, Wang X. Association of the p53 or GSTM1 Polymorphism with the Risk of Nasopharyngeal carcinoma: A Meta-Analysis. Mol Clin Oncol. 2016 feb;4(2): 221-228.

132. Liu RR, Chen JC, Li MD, Li T, Tan Y, Zhang M. A Meta-Analysis of Glutathione S-Transferase M1 and T1 Genetic Polymorphism in Relation to Susceptibility to Nasopharyngeal Carcinoma. Int J Clin Exp Med. 2015 Jul 15;8(7):10626-32.
133. Tiawawech D, Srivatanakul P, karalak A, Ishida T. Glutathione S-Transferase M1 Gene Polymorphism in Thai Nasopharyngeal Carcinoma. Asian Pac J Cancer prev. 2005 Jul-Sep;6(3): 270-5.
134. Guo X, O'Brien SJ, Zeng Y, Nelson GW, Winkler CA. GSTM1 and GSTT1 Gene Deletions and Risk for Nasopharyngeal Carcinoma in Han Chinese. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008 Jul; 17(7): 1760-3.
135. Zhuo X, Cai L, Xiang Z, Li Q, Zhang X. GSTM1 and GSTT1 Polymorphisms and Nasopharyngeal Cancer Risk: An Evidence-Based Meta-Analysis. J Exp Clin Cancer Res. 2009 Apr 1;28:46.
136. Ben Chaaben A, Mariaselvam C, Salah S, Busson M, Dulphy N, Douik H et al. Polymorphisms in Oxidative Stress-Related Genes Are Associated with Nasopharyngeal Carcinoma Susceptibility. Immunobiology. 2015 Jan;220(1):20-5.
137. Deng ZL, Wei YP, Ma Y. Frequent Genetic Deletion of Detoxifying Enzyme GSTM1 and GSTT1 Genes in Nasopharyngeal Carcinoma Patients in Guangxi Provience, China. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 2004 Oct;26(10): 598-600.
138. Zhang T, Liu M, Wang C, Lin C, Sun Y, Jin D. Down-regulation of MiR-206 Promotes Proliferation and Invasion of Laryngeal cancer by Regulating VEGF Expression. Anticancer Res. 2011 Nov;31(11): 3859-63.
139. Chen G, Liu Y, Wang J, Luo L, Chen P, Ding, Gong S. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Cyclooxygenase-2 in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma and Its Significance. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2006;26(1): 105-7.
140. Düzen B, Taş A, Demir M, Usta U, Yağız R, Koten M, Karasalihoğlu A. Effect of the Levels of Vascular Endothelial Growth Factor-A and C on the Prognosis of Patients With Laryngeal Carcinoma. Kulan Burun Boğaz Ihtis Derg. 2011 May-Jun;21(3): 122-8.
141. Wilkie MD, Emmett MS, Santosh S, Lightbody KA, Lane S, Goodyear PW et al. Relative Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. Head neck. 2016 May;38(5):775-81.
142. Matkar PN, Ariyagunarajah R, Leong Poi H, Singh KK. Friends Turned Foes: Angiogenic Growth Factors Beyond Angiogenesis. Biomolecules. 2017 Oct 2;7(4). pii: E74.

143. Chen LJ, Kaji H. Modeling Angiogenesis with Micro- and Nanotechnology. Lab Chip. 2017 Oct 5.doi: 10.1039/c7lc00774d.

144. Yang HF, Tang WP. Vascular Endothelial Growth factor Gene Expression in Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line Induced by Hypoxia in vitro. Ai Zheng. 2003 Feb;22(2): 160-3.

145. Matsumoto K, Ema M. Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours. J Biochem. 2014 Jul;156(1):1-10. doi: 10.1093/jb/mvu031.

146. Zhang R, Zhao Y, Zhang S, Lv J. The Expressions of EphrinB2 and VEGF in Nasopharyngeal Carcinoma and Their Clinical Significance. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. 2013 feb;27(4): 178-80.

147. Sung JY, Na K, Kim HS. Down-Regulation of Inositol polyphosphate 4-Phosphatase Type II Expression in Colorectal Carcinoma. Anticancer Res. 2017 Oct;37(10):5525-5531.

148. Li T, Ding ZL, Zheng YL, Wang W. MiR-484 Promotes Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) Progression Through Inhibiting Apaf-1 Associated With the Supression of Apoptosis. Biomed Pharmacother. 2017 Oct 2;96: 153-164.

149. Sheng N, Yan L, You W, Tan G, Gong J, Chen H, Yang Y, Hu L, Wang Z. Knockdown of SLC39A7 Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells. Acta Biochim Biophys Sin (Shangai). 2017 Oct 1;49(10):926-934.