

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**LARİNGSİN YASSI HÜCRELİ KARSİNOM  
OLGULARINDA PROLİFERATİF İNDEKS (Ki-67),  
TÜMÖR SÜPRESSÖR GEN PROTEİN İNDEKSİ (p53) VE  
GLUKOZ TRANSPORT PROTEİN (GLUT1 VE GLUT3)  
EKSPRESYONLARININ PROGNOSTİK ÖNEMİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Zeki GÜZEL  
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. M. Naci EDALİ**

**MALATYA – 2007**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**LARİNGSİN YASSI HÜCRELİ KARSİNOM  
OLGULARINDA PROLİFERATİF İNDEKS (Ki-67),  
TÜMÖR SÜPRESSÖR GEN PROTEİN İNDEKSİ (p53) VE  
GLUKOZ TRANSPORT PROTEİN (GLUT1 VE GLUT3)  
EKSPRESYONLARININ PROGNOSTİK ÖNEMİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Zeki GÜZEL  
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. M. Naci EDALI**

**Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından  
2005/79 proje numarası ile desteklenmiştir.**

## İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Larinksin Embriyolojisi	3
2.2. Larinksin Anatomisi	3
2.3. Larinksin Histolojisi	5
2.4. Larinksin İntraepitelyal Proliferatif Lezyonları	6
2.5. Larinksin Yassı Hücreli Karsinomu	8
2.6. Larinksin Yassı Hücreli Karsinomunda Prognostik Faktörler	13
2.7. Proliferasyon İndeksi (Ki-67)	15
2.8. Tümör Süpressör Gen Protein İndeksi (p53)	15
2.9. Glukoz Transport Proteinleri (GLUT1 ve GLUT3)	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Gereç	18
3.2. Klinik ve Demografik Parametrelerin Değerlendirilmesi	18
3.3. Histopatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi	18
3.4. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	19
3.5. İmmünoreaktivitenin Değerlendirilmesi	20
3.6. İstatiksel Çalışma Yöntemi	21
4. BULGULAR	22
4.1. Klinik ve Demografik Bulgular	22
4.2. Histopatolojik Bulgular	25
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	27
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
7. ÖZET	51
8. SUMMARY	53
9. KAYNAKLAR	55

## TABLolar DİZİNİ

<b><u>Tablolar</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<u>Tablo 1. Larinksin anatomik alt bölümleri</u>	<u>4</u>
<u>Tablo 2. Prekanseroz epitelyal değişikliklerde histopatolojik parametreler</u>	<u>7</u>
<u>Tablo 3. Türkiye MECC Kanser Kayıt Merkezi verileri</u>	<u>8</u>
<u>Tablo 4. Malign laringial hastalarda TNM evrelemesi (UICC/AJCC, 2002)</u>	<u>10</u>
<u>Tablo 5. Malign laringial hastalarda evre gruplaması (UICC/AJCC, 2002)</u>	<u>11</u>
<u>Tablo 6. Larinks, hipofarenks, trakea kanserlerinde histolojik sınıflandırma</u>	<u>11</u>
<u>Tablo 7. Glukoz transport proteini ailesi</u>	<u>17</u>
<u>Tablo 8. Tüm olguların yaş ortalama, ortanca ve standart sapma değerleri</u>	<u>22</u>
<u>Tablo 9. Demografik veriler ve klinik bulgular</u>	<u>23</u>
<u>Tablo10. Demografik ve klinik bulguların olgulara göre dağılımı</u>	<u>25</u>
<u>Tablo11. Histopatolojik bulgular</u>	<u>26</u>
<u>Tablo12. Histopatolojik bulguların olgulara dağılımı</u>	<u>27</u>
<u>Tablo13. Klinikopatolojik özellikler ve Ki-67 ekspresyonu</u>	<u>30</u>
<u>Tablo14. Klinikopatolojik özellikler ve p53 ekspresyonu</u>	<u>31</u>
<u>Tablo15. Klinikopatolojik özellikler ve GLUT1 ekspresyonu</u>	<u>32</u>
<u>Tablo16. Klinikopatolojik özellikler ve GLUT3 ekspresyonu</u>	<u>33</u>
<u>Tablo17. İmmünohistokimyasal bulgular</u>	<u>34</u>
<u>Tablo18. İmmünohistokimyasal çalışmalar ile hastalısız yaşam süresi arasındaki ilişkiler (Kaplan-Meier, log-rank test)</u>	<u>34</u>
<u>Tablo19. İmmünohistokimyasal çalışmalar ile toplam yaşam süresi arasındaki ilişkiler (Kaplan-Meier, log-rank test)</u>	<u>34</u>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekiller</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. İyi diferansiye LYHK	14
Şekil 2. Orta diferansiye LYHK	14
Şekil 3. Az diferansiye LYHK	14
Şekil 4. LYHK olgusunda Ki-67 immünoreaktivitesi	35
Şekil 5. LYHK olgusunda Ki-67 immünoreaktivitesi	35
Şekil 6. LYHK olgusunda p53 immünoreaktivitesi	36
Şekil 7. LYHK olgusunda p53 immünoreaktivitesi	36
Şekil 8. LYHK olgusunda GLUT1 immünoreaktivitesi	37
Şekil 9. LYHK olgusunda GLUT1 immünoreaktivitesi	37
Şekil10. LYHK olgusunda GLUT3 immünoreaktivitesi	38
Şekil11. LYHK olgusunda GLUT3 immünoreaktivitesi	38

## GRAFİKLER DİZİNİ

<b><u>Grafikler</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<u>Grafik 1. Olguların yaşlara göre dağılımı</u>	<u>22</u>
<u>Grafik 2. Ki-67 PI ve hastalıksız sağ kalım analizi (Kaplan-Meier, log-rank)</u>	<u>39</u>
<u>Grafik 3. Ki-67 PI ve toplam sağ kalım analizi (Kaplan-Meier, log-rank)</u>	<u>39</u>
<u>Grafik 4. p53 ve hastalıksız sağ kalım analizi (Kaplan-Meier, log-rank)</u>	<u>40</u>
<u>Grafik 5. p53 ve toplam sağ kalım analizi (Kaplan-Meier, log-rank)</u>	<u>40</u>
<u>Grafik 6. GLUT1 ve hastalıksız sağ kalım analizi (Kaplan-Meier, log-rank)</u>	<u>41</u>
<u>Grafik 7. GLUT1 ve toplam sağ kalım analizi (Kaplan-Meier, log-rank)</u>	<u>41</u>
<u>Grafik 8. GLUT3 ve hastalıksız sağ kalım analizi (Kaplan-Meier, log-rank)</u>	<u>42</u>
<u>Grafik 9. GLUT3 ve toplam sağ kalım analizi (Kaplan-Meier, log-rank)</u>	<u>42</u>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AJCC</b>	:	American Joint Committee on Cancer (Amerikan Birleşik Kanser Komitesi)
<b>CIS</b>	:	Karsinoma in situ
<b>GLUT</b>	:	Glukoz Transport Proteini
<b>LYHK</b>	:	Larinksin Yassı Hücreli Karsinomu
<b>MECC</b>	:	Middle East Cancer Consortium (Ortadoğu Kanser Konsorsiyumu)
<b>PBS</b>	:	Phosphat Buffer Solution
<b>PI</b>	:	Proliferasyon İndeksi
<b>UICC</b>	:	International Union Against Cancer (Dünya Kanser Savaş Kurumu)
<b>WHO</b>	:	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
<b>YHK</b>	:	Yassı Hücreli Karsinom

## 1. GİRİŞ

Larinksin yassı hücreli karsinomu (LYHK) üst solunum yolunun en sık görülen kanseridir. Tüm kanserlerin erkeklerde % 2,2'sini, kadınlarda % 0,4'ünü oluşturur. Çoğunlukla hayatın beşinci ve yedinci dekatları arasında görülür. Amerika Birleşik Devletleri'nde erkek:kadın oranı 5:1'tir. Laringial kanserlerin % 90'dan fazlasını yassı hücreli karsinomlar (YHK) oluşturur (1-3).

Ki-67 kısa yaşam süresine sahip, nonhiston nükleer bir protein olup hücre siklusunun G0 dışında kalan G1, G2, M ve S fazlarında eksprese edilir. Hücre proliferasyonunu gösteren Ki-67 nükleer immünoreaktivitesi ile tümör dokusundaki mitoz sayısı arasında iyi bir korelasyon vardır. Tümörlerde Ki-67 ile büyüme fraksiyonlarını göstermenin diagnostik önemi yanı sıra aynı zamanda bazı kanserlerde bağımsız bir prognostik değeri vardır (2,4,5).

p53 tümör supressör geni 17p13.1 kromozomunda yerleşmiştir. p53 proteini, DNA hasarlandığı zaman, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurup hücrenin hasarlanmış DNA'sını tamir etmesi için ona zaman kazandıran bir tümör süpressör gen ürünü proteindir. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozisi indükler. p53 mutasyonu olduğunda defektif DNA tamiri ve selektif büyümenin kazanılması, tümör oluşumu ve progresyonu ile sonuçlanır. p53, birçok kanser türünde çalışılmış olup mutant formlarının eksprese olduğunun saptanması genellikle kötü prognoz göstergesi olarak görülmektedir (2,4).

Günümüzde LYHK'larında Ki-67 ve p53 ekspresyonunun prognozdeki önemi tartışmalıdır, çünkü yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürde LHYK'larında, yüksek Ki-67



proliferasyon indeksinin (PI) kötü prognozla ilişkili olduğunu gösteren (8-12) ve prognoz ile ilişkisinin olmadığını belirten yayınlar (7,13) mevcuttur. Benzer şekilde p53 tümör supressör gen protein indeksinin kötü prognoz ile ilişkili olduğuna dair yayınların (11,14) yanı sıra prognostik önemi olmadığını bildiren araştırmalar da (7,13,15,16) bulunmaktadır.

Glukoz transport proteinleri (GLUT) glukozun enerjiden bağımsız olarak hücre dışından hücre içine alınmasında rol oynayan membran proteinleridir. Memeli hücrelerinde 13 tane GLUT izoformu tanımlanmıştır. Malign hücrelerin hızlanmış metabolizmaya, yüksek glukoz gereksinimine ve artmış glukoz uptake'ine sahip oldukları bilinmektedir. Malign hücreler içine glukoz girişinin artması glukoz transport proteinlerinin artmış ekspresyonu (özellikle GLUT1 ve GLUT3) ile ilişkilidir (17-19).

Literatürde az sayıda çalışmada baş boyun bölgesi, özofagus ve serviksin YHK'larında GLUT1 ve GLUT3 ekspresyonlarının kötü prognozla ilişkili olduğundan bahsedilmiştir (20-26). Ancak LYHK'larında Ki-67 ve p53 ekspresyonları ile GLUT1 ve GLUT3 ekspresyonları arasındaki ilişkiyi birlikte ele alan çalışma henüz bulunmamaktadır.

LYHK'ları benzer klinik ve histomorfolojik görünümüne rağmen farklı klinik seyir gösterebilmektedir. Bu deneysel çalışmada larenjektomi uygulanmış LYHK olgularında proliferatif indeks (Ki-67), tümör supressör gen protein indeksi (p53) ve glukoz transport protein (GLUT1 ve GLUT3) ekspresyonlarının konvansiyonel klinikopatolojik prognostik parametrelerle ilişkisi ve sağ kalım sürelerine etkisi araştırıldı. Prognostik önemi olduğu bilinen mevcut klinikopatolojik özelliklere ek olarak immünohistokimyasal çalışmalarla tümörün biyolojik davranışının daha iyi anlaşılması en uygun ve yeterli tedavi yönteminin seçilmesine olanak sağlayacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Larinksin Embriyolojisi

Larinksin supraglottik bölümü üçüncü ve dördüncü brankial arklardan köken alır, bu nedenle oral kavite ve orofarenks gelişimi ile ilişkilidir. Glottik ve subglottik bölgeler ise trakea ve akciğerlerin geliştiği altıncı brankial arktan köken alır (1,2,27). Bu iki farklı embriyolojik gelişim ventrikül seviyesinde birleşir. Farklı embriyolojik köken ve bağımsız lenfatik dolaşım yoluyla larinkste eşine az rastlanır bir kompartımanlaşma vardır. Supraglottik bölge bir kompartımanı, glottik ve subglottik bölgeler diğer kompartımanı oluşturur. İki kompartıman arasında boya çalışmaları ve histolojik olarak gösterilen anatomik bir bariyer mevcuttur (28). Bu anatomik bariyer laringial karsinomların büyüme ve yayılmasını etkilemektedir (29,30).

### 2.2. Larinksin Anatomisi

Larinks boynun ortasında, sindirim ve solunum yollarının birleştiği noktada yer alır. Hipofarenksin önünde 3. ve 6. servikal vertebralarda seviyesindedir (31). Larinksin üst sınırını epiglottun uç kısmı ve ariepiglottik foldlar, alt sınırını krikoid kırıkdağın alt kenarı oluşturur. Ön tarafta epiglottun lingual yüzü, tiroid kırıkdağ, krikoid kartilajın ön kavisi, tirohyoid membran ve krikotiroid membran sınırlar. Arka sınırı ise krikoid kırıkdağ ve aritenoid bölge oluşturur. Tümör yayılımında önemli olmakla birlikte piriform fossa ve preepiglottik mesafe larinksin bir bölümü değildir (27).

Larinks; supraglottis, glottis ve subglottis olmak üzere üç ana bölüme ayrılır. Supraglottik larinks, epiglottun üst ucu ile gerçek vokal kordlar arasında uzanır ve içerisinde epiglot, ariepiglottik foldlar, yalancı vokal kordlar, ventriküller ve aritenoid kartilajlar bulunur. Glottis, ventriküllerin apeksi ile vokal kordların 1 cm altında, yassı epitelin bittiği bölge arasında kalan bölgedir ve gerçek vokal kordları, ön ve arka

komissürleri içerir. Subglottis ise glottis ile krikoid kıkırdağın alt kenarı arasındaki alanı kapsar (1-3,27,31-33). Her bölge Dünya Kanser Savaş Kurumu (UICC) tarafından belirlenmiş alt bölgelere ayrılmıştır (Tablo 1) (33).

Tablo 1. Larinksin Anatomik Alt Bölümleri (UICC)	
1. Supraglottis	
a. Suprahyoid epiglot (tip, lingual ve laringial yüzler)	
b. Ariepiglottik fold, laringial yüzü	
c. Aritenoid	
d. İnfrahyoid epiglot	
e. Ventriküler bandlar	
2. Glottis	
a. Vokal kordlar	
b. Anterior komissür	
c. Posterior komissür	
3. Subglottis	

Larinks elastik konus, kıkırdaklar, intrinsik ve ekstrinsik kaslar, submukoza ve döşeyici müköz membrandan oluşmaktadır (27). Larinksin ana iskeletini oluşturan kıkırdaklar krikoid, tiroid, epiglot, aritenoid, kornikulat, kuneiform ve tritiseus (her zaman bulunmaz) kıkırdaklar olup elastik tipte olan epiglottis, kornikulat, kuneiform ve tritiseus dışındaki kıkırdaklar hyalin tiptedir. Epiglottis çok sayıda fenestrasyonlar içermektedir. Bu fenestrasyonlar ile epiglotun laringial yüzünden lingual yüzüne ve preepiglotik mesafeye tümör yayılımı mümkün olmaktadır. Krikoid ve tiroid kıkırdaklar yaş ilerledikçe önce kalsifiye sonra ossifiye olur (2,3,27,32,33). Laringial kıkırdakların ossifikasyonu tümör yayılımı açısından önemlidir. Sadece ossifiye olduğu zaman tümör metastazından etkilenir. Hyalin kıkırdak muhtemelen anjiogenezis inhibe edici faktör salgılamasından dolayı neoplazilerin yayılmasına dirençlidir (27). Hyoid kemik, larinksin dış kaslarının önemli bir bağlanma noktası olduğu için genellikle laringial iskeletin bir parçası olarak tanımlanır (33)

Larinksin ligamentleri tirohyoid, kuadranguler ve krikotiroid ligamentleri kapsar. Krikotiroid ligament (konus elastikus), tiroid kıkırdağın medialinde yukarıya doğru ilerler ve sagittal olarak sıkışarak üst kenarları önde tiroid kartilajın iç kısmına, arkada aritenoid kıkırdağın vokal çıkıntısına bağlanan vokal ligamentleri oluşturur (3,27,32).

Larinks kasları iki gruba ayrılır. Ekstresek kaslar omohyoid, sternohyoid, sternotiroid ve tirohyoid kaslardan oluşmaktadır. İntresek kaslar ise krikotiroid, posterior krikoaritenoid, lateral krikoaritenoid, interaritenoid ve tiroaritenoid kasları içermektedir (27). Ekstresek kaslar larinksin bir bütün halinde hareketi ve fiksasyonu ile ilgilidir. İntresek kaslar ise vokal kordun adduksiyon veya abduksiyonunda görev alarak fonasyonu sağlarlar (31).

Vagus siniri larinksin motor ve duyu innervasyonunu sağlar. Larinksin ventrikül ve vestibülünün, vokal foldlar üstünün duysusu vagus sinirinin internal laringial dalı tarafından taşınır. Vokal foldların alt bölümünün duysusu ise rekürren laringial sinir tarafından taşınır. Vagus sinirinin eksternal laringial dalı tarafından innerve edilen krikotiroid kas dışında kalan intresek kasların motor innervasyonu ise vagus sinirinin rekürren laringial dalı tarafından sağlanır (27,31,32).

Larinksin arterleri superior laringial ve inferior laringial arterdir. Eksternal karotis arterin bir dalı olan superior tiroid arterin superior laringial dalı larinksin üst kısmının kanlanmasını sağlar. Subklavian arterden çıkan tiroservikal turunkusun bir dalı olan inferior laringial dalı ise larinksin alt yarısının kanlanmasını sağlar (27,31,32).

Laringial lenfatikler ventrikülün üstü ve altını drene eden birbirinden bağımsız iki sistemden oluşmaktadır. Bu lenfatik sistemleri iki laringial kompartımanın embriyolojik kökenine karşılık gelmektedir (3). Supraglottik larinkste lenfatik ağ çok zengindir. Bu bölgenin lenfatikleri tirohyoid membrandan geçerek subdigastrik ve superior juguler nodlara drene olur. Glottik ve subglottik bölgelerin lenfatik drenajı ise krikotiroid membrandan geçerek paratrakeal nodlara, derin servikal nodlara ve prelaringial (Delphian) nodlara olur. Vokal kordlar çok az lenfatik kanal içerir, bu nedenle glottik karsinomlar nadiren bölgesel metastaz yapar (1,3,27).

### **2.3. Larinksin Histolojisi**

Epiglottisin lingual yüzeyi ve laringial yüzeyin üst kısmı nonkeratinize çok katlı yassı epitel ile örtülüdür. Yassı epitel, epiglottisin inferior laringial kısmında solunum tipi epitel ile birleşir. Solunum tipi epitel yalancı vokal kordları, ventrikülü ve subglottisi de örtmektedir. Gerçek vokal kordlar nonkeratinize çok katlı yassı epitel ile döşelidir. Sigara içmeyen erişkinlerin yarısında supraglottik ve subglottik bölgelerdeki silyalı solunum tipi epitel arasında yassı epitel adaları bulunmaktadır. Sigara içenlerde ise larinksteki silyalı solunum tipi epitel sıklıkla tamamen yassı epitel ile yer değiştirebilmektedir (1,2,27). Larinksin solunum epiteli silyalı kolumnar tiptedir. Kolumnar epitel nükleuslarındaki pozisyon farklılığı epitele psödostratifiye bir görünüm

verir. Silyalı epitel değişen kalınlıklarda olabilir. Kolumnar epitelin en alt kısmında küçük, yuvarlak hücrelerden oluşan bazal veya rezerv hücreler bulunur. Yassı epitelde dar sitoplazmalı, ovoid nükleuslu, yüzeye dik şekilde dizilenim gösteren bir bazal tabaka vardır. Mitoz normalde bu tabakada sınırlıdır (27). Özellikle siyah ırkta bazal tabakada dentritik melanositler görülebilir (2,27). Yüzeye doğru ilerledikçe yassı epitel nükleusları büyür, daha sferik bir hal alır ve veziküler kromatine sahiptir. Larinksin yassı epiteli beş ila yirmi beş hücre arasında değişen kalınlıklarda olabilir. Larinkste normalde parakeratozis yoktur ancak sigara gibi iritanlara maruziyet parakeratozis odaklarına neden olabilir (27).

Reinke mesafesi gerçek vokal kordların lamina propriası için kullanılan bir terim olup yassı epitel tabanı ile vokal ligament arasında kalan alandır. Bu alan birkaç kapiller ve lenfatiklerden fakirdir. Bu sınırlı vasküler yapı nedeniyle vokal kord karsinomları nadiren bölgesel metastaz yapar (1-3,27).

Larinksin çoğu yerinde serömüsinöz glandlar bulunur ve bunlar duktuslar vasıtasıyla yüzey epiteli ile ilişkilidir. Duktuslar kolumnar epitel, skuamöz epitel veya her iki tipte epitel ile döşeli olabilir. Bu duktuslardaki epitelde bazal hücre hiperplazisi ya da displazi mevcutsa, tanjansiyenel kesitlerde derin yassı epitel adaları invaziv karsinom ile karışabilir. Glandlar yaşlı bireylerde onkositik metaplazi gösterebilir (2,27).

#### **2.4. Larinksin İntraepitelyal Proliferatif Lezyonları**

**Keratozis:** En sık gerçek vokal kordları ve aritenoidler arası bölgeleri tutar. Basit hiperplazi, epitelyal hiperplazi, skuamöz hiperplazi, ve lökoplaki olarak ta adlandırılır. Sıklıkla sigara içenlerde, şarkıcılar ve sesini çok kullananlarda ortaya çıkar. Eğer hiperemi görülüyorsa bu, klinisyeni önemli bir lezyonun olabileceği (displazi/karsinoma in situ) yönünde uyarmalıdır. Mikroskopik olarak keratotik lezyonlar atipsiz hiperkeratotik epitel ve akantosiz ile karakterizedir (2).

**Displazi/karsinoma in situ:** Değişen derecelerde hücresel atipi, normal maturasyonun ve stratifikasyonun kaybı ile karakterizedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Collaborating Center for the Upper Respiratory Tract Tumours tarafından tanımlanan kriterlere (Tablo 2) göre larinksin intraepitelyal proliferatif lezyonları hafif, orta, şiddetli displazi ve karsinoma in situ (CIS) olmak üzere aşığaıda açıklandığı şekilde derecelendirilmiştir (1,2,34,35):

**1- Hafif displazi:** Nükleer anomaliler hafiftir ve epitelin bazal 1/3'ünde belirgindir. Üst kısımlarda bu görünüm minimal olup stratifikasyon ve maturasyon

mevcuttur. Parabazal kısımda birkaç mitoz görülebilir, fakat atipik mitoz yoktur. Keratozis ve kronik inflamasyon genellikle bulunur.

Tablo 2. Prekanseroz Epitelyal Değişikliklerde Histopatolojik Parametreler (WHO Klasifikasyonu)

1. Bazal hücrelerde polarite kaybı
2. Bazal hücre proliferasyonu
3. Artmış nükleer: sitoplazmik oran
4. Papiller submukozal uzanımı olan epitelyal hiperplazi
5. Düzensiz epitelyal stratifikasyon ve hüresel pleomorfizm
6. Stratum spinosum tabakasında tek hücre (diskeratozis) veya hücre gruplarında keratinizasyon.
7. Artmış mitoz, özellikle spinöz tabakada.
8. Atipik mitozların varlığı
9. Nükleer pleomorfizm ve hiperkromazi
10. Büyümüş, belirgin nükleol

**2- Orta displazi:** Nükleer anomaliler hafif displaziye göre daha fazladır ve nükleol belirginleşmeye başlamıştır. Değişiklikler epitelin alt 2/3'ünde görülür. Nükleer anomaliler yüzeyde devam edebilir fakat maturasyon ve stratifikasyon mevcuttur. Mitoz parabazal ve orta tabakalarda görülür fakat atipik mitoz yoktur. Lezyon keratozis ile birlikte olabilir.

**3- Şiddetli displazi:** Yüzeyde stratifikasyon ve maturasyon korunmakla birlikte epitel kalınlığının 2/3'ünden fazlasını tutan nükleer anomali ve maturasyon kaybı vardır. Nükleer pleomorfizm yaygındır, bizar nükleuslar görülebilir. Bazılarında nükleoller çok belirgindir veya nükleuslar hiperkromatiktir. Epitelin üst kısımlarında mitoz mevcut olup atipik mitoz görülebilir. Hücrelerde bir miktar maturasyon ve stratifikasyon varlığı ile CIS'dan ayrılır. Sıklıkla keratozis ile birlikte.

**4- Karsinoma in situ:** Lezyon, yassı epiteli tam kat tutmuştur. Stromal invazyon dışında karsinomun hüresel özelliklerini gösterir. WHO'nun yeni sınıflamasında şiddetli displazi ile CIS ayrı kategorilere alınmıştır. Ancak çoğu diğer sınıflamada bu iki durum aynı grupta değerlendirilmektedir çünkü birbirinden ayırmak çok zordur.

Larinksin çoğu CIS lezyonları, keratinize hücrelerden (spinöz veya iyi diferansiye tip) oluşurken çok az bir kısmı uterin serviks (bazal tip) CIS'sunda olduğu gibi bazal hücre benzeri formdadır. Bir CIS varyantı olan papiller CIS, yassı epitel ile örtülü fibrovasküler bir stromaya sahip papiller yapılarla karakterizedir. LYHK'ların yaklaşık %75'inde eşlik eden CIS komponenti bulunur. Skuamöz intraepitelyal neoplazi

(SIN) veya laringial intraepitelyal neoplazi (LIN) gibi alternatif terminolojiler yaygın bir kabul görmemiştir. Son zamanlarda Ljubljana klasifikasyonu olarak bilinen alternatif bir derecelendirme sistemi önerilmiştir:

1. Basit Hiperplazi,
2. Anormal Hiperplazi
3. Atipik hiperplazi (“riskli” epitel)
4. Karsinoma in situ.

İlk iki kategori benign, üçüncüsü potansiyel malign, dördüncüsü gerçek malign olarak kabul edilmiştir. Ancak bu sınıflamada karsinoma insitu ile daha hafif lezyonlar arasındaki ayırımında yüzey keratin tabakasının varlığı söz konusu değildir. Bu nokta; WHO klasifikasyonu ile arasında önemli bir farktır. Ljubljana klasifikasyonu, WHO sistemine kolayca uyarlanabilecek özellikte değildir (2).

Displazi ve CIS’nun derecesi ile anöploidi insidansı, epidermal growth faktör reseptörü, Ki-67 ve p53 ekspresyonu arasında bir korelasyon mevcuttur. Displazili hastalarda en önemli problem invaziv YHK gelişme riskinin tahminidir. Genel olarak karsinom gelişme riski düşüktür çünkü hastalar genelde düşük dereceli lezyonlara sahiptir (2).

## 2.5. Larinksin Yassı Hücreli Karsinomu

**Epidemiyoloji:** Cilt tümörleri hariç tutulduğu takdirde larinks kanseri en sık rastlanan baş boyun bölgesi tümörüdür. Tüm kanserlerin erkeklerde %2,2’sini, kadınlarda %0,4’ünü oluşturur. Çoğunlukla hayatın beşinci ve yedinci dekatları arasında görülür. Amerika Birleşik Devletleri’nde erkek: kadın oranı 5:1’tir. Laringial kanserlerin %90’dan fazlasını YHK’lar oluşturur (1-3). Türkiye Ortadoğu Kanser Merkezi (MECC), 2000 yılı kayıt verilerine göre larinks kanseri ülkemizde erkeklerde en sık görülen dördüncü kanserdir (Tablo 3) (36).

Tablo 3. Türkiye MECC Kanser Kayıt Merkezi Verileri		
Erkek-2000	%	Kaba Hız
1. Bronş, akciğer	40,3	69,5
2. Kolorektal	6,7	11,7
3. Mide	5,9	10,2
4. Larinks	4,9	8,5
5. Mesane	4,8	8,3
6. Prostat	4	6,9
7. Diğer, deri	5,7	9,8

**Risk faktörleri:** Larinks kanserlerinin oluşumundaki risk faktörlerinin başında sigara gelmektedir (1-3). Nikotin karsinojen olmamakla beraber sigara dumanındaki katranın içerdiği polisiklik aromatik hidrokarbonlar karsinojenik etki gösterirler. Alkol ve sigaranın larinks kanseri üzerine sinerjistik etkisi vardır (37-40). Ayrıca sesin kötü kullanımı, keratozis (2), Human Papilloma Virüs (41,42), Herpes Simpleks Virüs (43), Epstein Bar Virüs (44) gibi viral enfeksiyonlar, radyasyon (45), larinks etkileyen her türlü iritan ajanlar, heredite ve Bloom's sendromu (46), Li-Fraumeni sendromu (47) da risk faktörleri arasında sayılabilir.

**Semptom ve bulgular:** Erken evre supraglottik tümörlerde spesifik değildir ve hastaların çoğu ileri evrelerde tanınırlar. Farengial rahatsızlık, ağrı ve yutma güçlüğü erken semptomlardır. İleri evrelerde ses kısıklığı, dispne, stridor, boyunda kitle, kulak ağrısı ortaya çıkar. Glottik tümörlerde erken evrede ses kısıklığı, ileri evrelerde ise hava yolu obstrüksiyonu ve dispne kendini belli eder. Erken subglottik kanserlerde boğazda rahatsızlık hissi, dispne, hemoptizi ilk semptomlardır. Tümörün vokal kordlara uzanımı ile ses kısıklığı ortaya çıkar (3,32,33).

**Tanı:** Laringial kanseri düşündürecek bu semptom ve bulgulara sahip tüm hastalara endoskopik muayene yapılmalı ve şüpheli lezyonlardan biyopsi alınmalıdır. Bilgisayarlı tomografi veya manyetik rezonans görüntüleme yöntemleri tümör uzanımı, hava yolu paterni, kıkırdak tutulumu, subglottik uzanım, pre-epiglottik ve paraglottik bölge invazyonu ve hipofarenks yayılımı konusunda bilgi verir. Dil kökü, retrokrikoidbölge, ekstralaringial yayılım ve lenf nodu tutulumu hem tomografi hem de manyetik rezonans ile izlenebilirken, bilgisayarlı tomografi kıkırdakların durumu hakkında daha iyi bilgi verir(32,33). Klinik ve radyolojik incelemeler tamamlandıktan sonra Dünya Kanser Savaş Kurumu (UICC) ve Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) 2002 yılı kriterlerine göre tümör evrelemesi (Tablo 4) ve evre gruplaması (Tablo 5) yapılır (2,3,48).

**Laringial malign tümörlerin histolojik tipleri:** Laringial malign tümörlerin histolojik klasifikasyonu, 1991 yılında WHO Collaborating Center for the Upper Respiratory Tract Tumours tarafından revize edilmiştir (Tablo 6). Ancak papiller karsinom, sebasöz karsinom, mukoid karsinom, malign granüler hücreli tümör, malign myoepitelyal tümör, andiferansiye karsinom gibi bu klasifikasyonda yer almamış fakat literatürde tanımlanmış neoplastik antiteler de mevcuttur.(34,35). Laringial kanserlerin % 90'dan fazlasını YHK'lar oluşturur (1-3).



Tablo 4. Malign laringial hastalarda TNM evrelemesi (UICC/AJCC, 2002)	
<b>Primer tümör (T)</b>	
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümör bulunamıyor
Tis	Karsinoma in situ
<b>Supraglottis</b>	
T1	Tümör bir tarafta subraglottisin bir bölgesinde sınırlı
T2	Tümör vokal kord fiksasyonu olmaksızın supraglottisin birden fazla bölgesini, glottisi veya subglottis dışındaki yerleri (vallekula, dil kökü, piriform sinüsün medial duvarını) tutmuş
T3	Tümör vokal kord fiksasyonu ile birlikte larinkse sınırlı ve/veya postkrikoid alan, preepiglottik doku, derin dil kökü invazyonundan biri mevcut
T4a	Tümör tiroid kartilaja invaze ve/veya boynun nonlaringial yumuşak dokusuna yayılmış
T4b	Tümör prevertebral boşluğa veya mediastene invaze olmuş veya karotisi tutmuş
<b>Glottis</b>	
T1	Tümör vokal kordlara sınırlı (anterior veya posterior komissür tutulmuş olabilir), vokal kord hareketleri normal
T1a	Tümör bir vokal korda sınırlı
T1b	Tümör her iki vokal kordda
T2	Tümör supraglottise ve/veya subglottise uzanmış, vokal kord hareketleri sınırlı
T3	Tümör vokal kord fiksasyonu ile birlikte larinkse sınırlı
T4a	Tümör tiroid kartilajı tutmuş ve/veya boyundaki nonlaringial yumuşak dokulara yayılmış
T4b	Tümör prevertebral boşluğa veya mediastene invaze olmuş veya karotisi tutmuş
<b>Subglottis</b>	
T1	Tümör subglottise sınırlı
T2	Tümör vokal korda yayılmış, vokal kor hareketleri normal veya sınırlı
T3	Tümör vokal kord fiksasyonu ile birlikte larinkse sınırlı
T4a	Tümör tiroid kartilajı tutmuş ve/veya boyundaki nonlaringial yumuşak dokulara yayılmış
T4b	Tümör prevertebral boşluğa veya mediastene invaze olmuş veya karotisi tutmuş
<b>Bölgesel lenf nodu (N)</b>	
NX	Bölgesel lenf nodu değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	En büyük boyutu 3 cm' yi geçmeyen, tek ipsilateral lenf noduna metastaz
N2a	En büyük boyutu 3 ile 6 cm arasında, tek ipsilateral lenf noduna metastaz
N2b	En büyük boyutu 6 cm' yi geçmeyen, birden çok ipsilateral lenf nodu metastazı
N2c	En büyük boyutu 6 cm' yi geçmeyen, bilateral veya kontralateral lenf nodu metastazları
N3	En büyük boyutu 6 cm' yi geçen lenf nodu metastazı
<b>Uzak metastaz (M)</b>	
MX	Uzak metastaz değerlendirilemiyor
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz mevcut

Tablo 5. Malign laringial hastalarda evre gruplaması (UICC/AJCC, 2002)			
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre II	T2	N0	M0
Evre III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Evre IVa	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
Evre IVb	T4b	Herhangi N	M0
	Herhangi T	N3	M0
Evre IVc	Herhangi T	Herhangi N	M1

Tablo 6. Larinks, Hipofarenks ve Trake Kanserlerinin Histolojik Klasifikasyonu	
1.	Yassı hücreli karsinom
2.	Verrüköz yassı hücreli karsinom
3.	İğsi hücreli karsinom
4.	Adenoid yassı hücreli karsinom
5.	Bazaloid yassı hücreli karsinom
6.	Adenokarsinom
7.	Asinik hücreli karsinom
8.	Mukoepidermoid karsinom
9.	Adenoid kistik karsinom
10.	Pleomorfik adenomla birlikte karsinom
11.	Epitelyal-myoepitelyal karsinom
12.	Berrak hücreli karsinom
13.	Adenoskuomöz karsinom,
14.	Dev hücreli karsinom
15.	Tükrük bezi kanalı karsinomu
16.	Karsinoid tümör
17.	Atipik karsinoid tümör
18.	Küçük hücreli karsinom
19.	Lenfoepitelyal karsinom

**Laringial kanserlerin lokalizasyonu, yayılım ve tedavisi:** Larinks tümörleri anatomik yerleşim yerlerine göre glottik, supraglottik, subglottik ve transglottik olarak 4 ayrı grupta incelenir ve değerlendirilirler:

1. Glottik: Tüm vakaların %60-65'ini oluşturur. Tümör en çok gerçek vokal kordun 1/3 anteriorundan gelişir. Etrafını çevreleyen kartilaj duvar ve lenfatik yapıların azlığı nedeniyle uzun süre lokalize kalırlar. Zamanla, ön komissürden karşı korda, posteriordan aritenoide, superiorda supraglottik bölgeye, inferiorda subglottik alana geçiş, anteriora tiroid kartilaja penetrasyon gerçekleşir. Vokal tendonun tiroid kartilaja tutunduğu yer olan anterior komissür (Broyle ligamenti) tümörün kartilaja yayılımı için uygun bölgedir. Çünkü kan ve lenf damarları içeren bu fibröz yapı, tümöre dirençli perikondriumdan yoksun tiroid kartilaja tutunur. T1 ve T2 tümörlerde boyun lenf nodlarına metastaz çok azdır bu nedenle profektik lenf nodu diseksiyonu gerekmez. Bir araştırmaya göre T1'den T4'e doğru lenf nodu metastazı %1,9, %16,7, %25, %65 şeklindedir. Erken lezyonlarda (T1,T2), radyasyon tedavisi mükemmel sonuç verir. Radyasyon tedavisi başarılı olmazsa sonraki tedavi koruyucu cerrahidir. Gerçek kordun yüzeysel invaziv YHK'ları endoskopik olarak kordektomi ile tedavi edilebilir. T2 glottik kanserlerde en iyi tedavi hemilarenjektomidir. Delfian lenf nodu glottik bölgenin primer yayılım yeridir ve paratrakeal lenf nodlarına, buradan da üst mediastinal lenf nodlarına drene olur (1-3,27,33,49).

2. Supraglottik: Tüm vakaların %30-35'ini oluşturur. Supraglottik tümörler, yalancı kord, ventrikül ve/veya epiglottun laringial veya lingual yüzeyini içine alır. Bu tümörler sıklıkla infrahyoid epiglotttan kaynaklanır ve epiglotttaki fenestrasyonlardan preepiglottik mesafeye yayılım eğilimi belirgindir. Ancak orofarenks hyoepiglottik ligament tarafından korunmuştur. Supraglottik tümörlerin sadece %1'i glottisi invaze eder. Kıkırdak invazyonu oldukça nadirdir. Supraglottik bölgede zengin lenfatik dolaşım mevcut olup lenf nodu metastazı ortalama %40'dır. Tedavi radyasyon ve larenjektomidir (1,2,27,33).

3. Transglottik: Laringial tümörlerin %5'inden daha azını oluşturur. Transglottik tümörler herhangi bir larinks bölgesinden kaynaklanan ve glottik bölgeyi de içine alan patolojilerdir. Agresif klinik seyir ve yüksek lenf nodu metastazı insidansına (ortalama %52) sahiptir. Tedavide total larenjektominin yanında boyun lenf nodu diseksiyonu da uygulanmalıdır (1-3,33).

4. Subglottik: %5'den azdır. Tümör gerçek vokal kordların 1 cm altı ile krikoid kıkırdağın alt kenarı arasındaki alanda lokalizedir. İzole subglottik tümörler oldukça

nadirdir. Superiora uzanıp glottisi tutabilir. Zayıf intertirokrikoid membranın tümörle destrüksiyonu, prelaringial duvarın invazyonu ve tiroid glandın invazyonu sık görülür. Trakeaya yayılım sık olduğu için, mümkün olduğunca distalden rezeke edilmelidir. Servikal lenf nodu metastazı %15-20, paratrakeal lenf nodu metastazı %50'dir. Bu nedenle paratrakeal lenf nodları ile birlikte radikal lenf nodu diseksiyonu uygulanmalıdır (1-3,33).

## **2.6. Larinksin Yassı Hücreli Karsinomunda Prognostik Faktörler**

**1. Klinik Evre ve lokalizasyon:** Bu iki faktör birbiriyle ilişkilidir ve bu nedenle genelde birlikte değerlendirilir. Çeşitli serilerde beş yıllık sağ kalım oranları aşağıdaki gibidir (2,49-51).

Glottik: %80

I: %90; II:%85; III%60; IV<%5

Supraglottik: %65

I: %85; II:%75; III%45; IV<%5

Transglottik: %50

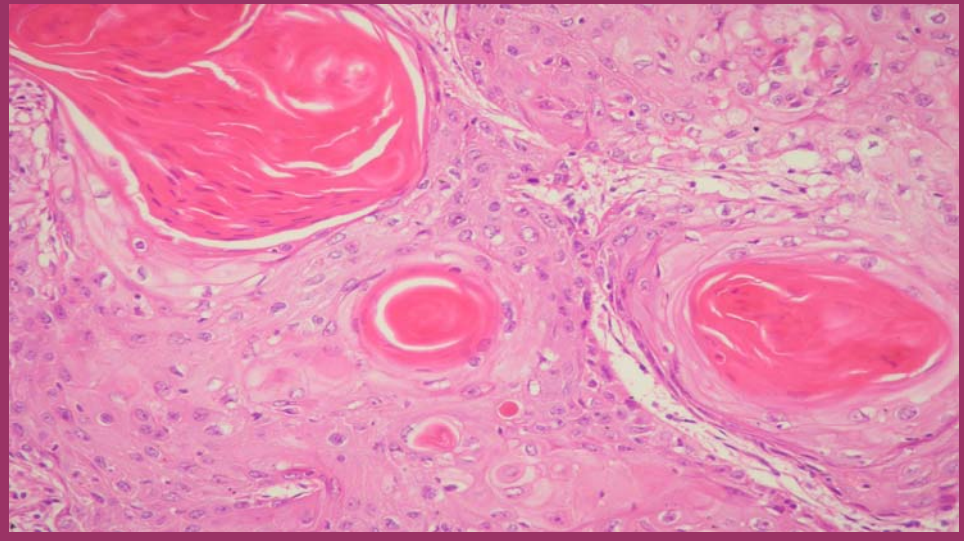
Subglottik: %40

**2. Histolojik derece:** LYHK'lar keratin formasyonu ve/veya interselüler köprülerin varlığı ile karakterize, skuamöz diferansiyasyon gösteren bir malign epitelyal tümördür (1,2). YHK'ların derecelenmesi ilk olarak 1927 yılında Broders tarafından oral neoplazilerde yapılmıştır. Broders bu çalışmasında karsinomların normal yassı epitele benzerliğini temel almıştır (52). LYHK'ları keratinizasyon derecesi, nükleer pleomorfizm ve mitoz sayısı esas alınarak iyi, orta ve az diferansiye olmak üzere 3 grupta derecelendirilir (Şekil 1,2,3). Çoğu glottik karsinomlar iyi ve orta derecede diferansiyedir. Ancak glottis dışı karsinomlar genellikle orta ve az diferansiyedir. Histolojik derece, klinik evrelemeden bağımsız bir prognostik parametredir. Nodal metastaz, uzak metastaz ve rekürrens oranları az diferansiye tümörlerde, iyi diferansiye olanlara göre anlamlı şekilde daha yüksektir (1-3,53-57).

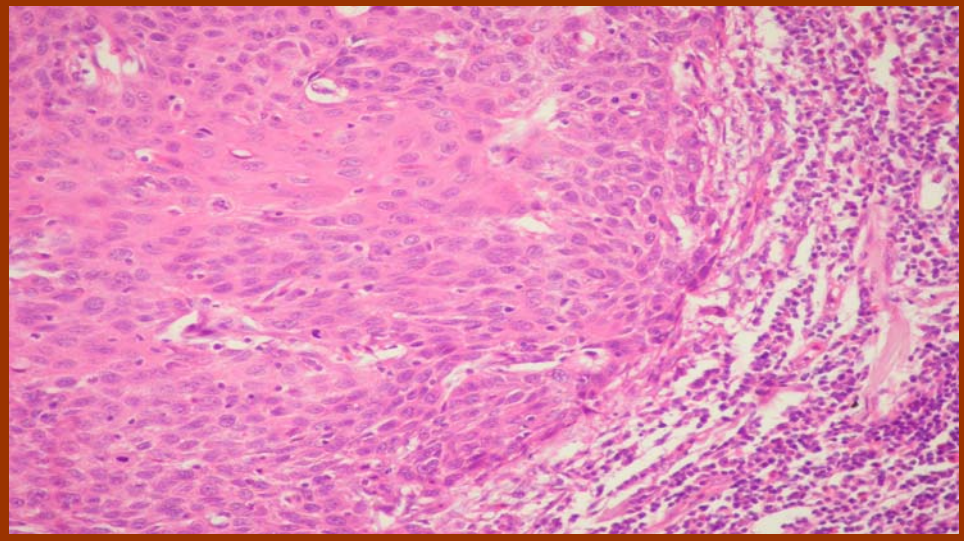
**3. Tümör boyutu:** Tümör çapı büyüdükçe metastaz ve nüks şansı artar. Radyoterapi uygulanan T1 glottik karsinomlu hastalarda tümör boyutu ile lokal rekürrens arasında anlamlı bir birliktelik gösterilmiştir (57,58).

**4. Lenf nodu:** Metastatik lenf nodu varlığı, sayısı, çapı ve ektranodal yayılım göstermesi önemli prognostik özelliklerdir. Ektranodal tümör yayılımı AJCC 2002 TNM evrelemesine dahil edilmemiştir. Ancak prognozu etkileyen ve patoloji raporunda kaydedilmesi gereken değerli bir parametredir (1,59-63).

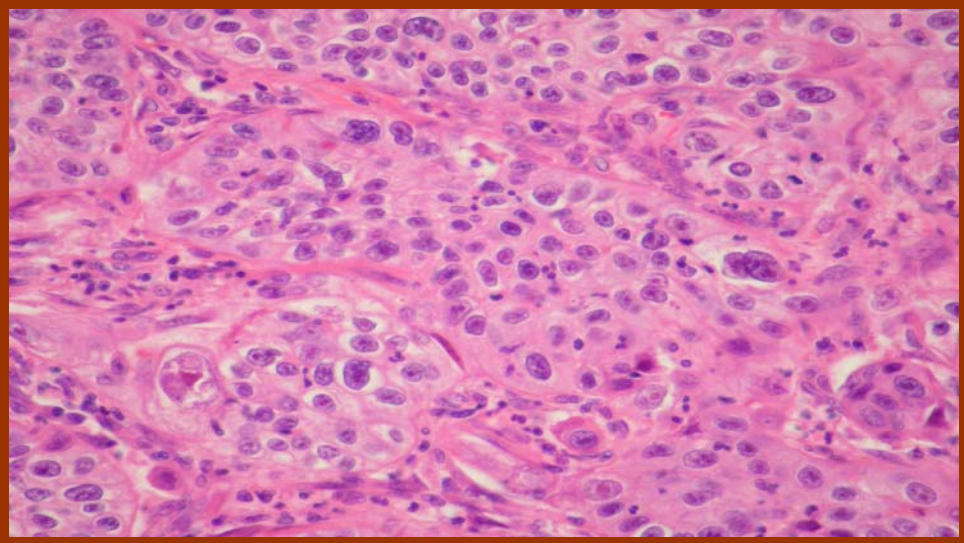
**Şekil 1. İyi diferansiye yassı hücreli karsinom (H&E, x200)**



**Şekil 2. Orta diferansiye yassı hücreli karsinom (H&E, x200)**



**Şekil 3. Az diferansiye yassı hücreli karsinom (H&E, x400)**



**5. Tümör kalınlığı:** Tümör kalınlığı az olanlarda yaşam süresi daha uzundur. İnvazyon derinliğinin tümörün lenf nodu yayılımını ve sağ kalım oranını etkileyen bir özellik olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Horizontal büyüme eğilimi olan tümörler vertikal büyüyenlere göre daha iyi prognoza sahiptir (64-67).

**6. Perinöral ve vasküler invazyon:** Perinöral ve vasküler invazyon varlığı lokal rekürrens ve servikal lenf nodu metastazında artışa neden olabilen kötü prognostik parametrelerdir (67-70).

### **2.7. Proliferasyon İndeksi (Ki-67)**

İlk kez 1983'de Gerdes ve arkadaşları tarafından, hücre siklus bağımlı nükleer proliferasyon belirleyicisi olarak tanımlanmıştır ve kortikal folliküllerin germinal merkez hücrelerinde, kortikal timositlerde, gastrointestinal mukozadaki boyun hücrelerinde, epidermin bazal hücreleri gibi proliferatif hücrelerde eksprese edildiği gösterilmiştir (71). Bu orjinal antikör sadece taze frozen kesitlerde çalışılmıştır, fakat ilk tanımlanmasından yaklaşık 10 yıl sonra formaline dirençli epitoplara tespit eden monoklonal antikörler (MIB-1, MIB-3) geliştirilmiştir (72).

Ki-67, 345 ve 395 kilodalton ağırlığında iki molekülden oluşan, 10. kromozom üzerinde yerleşmiş, nonhiston nükleer bir proteindir. Hücre siklusunun G0 dışında kalan G1, G2, M ve S fazlarında eksprese edilir. Hücre proliferasyonunu gösteren Ki-67 nükleer immünoreaktivitesi ile tümör dokusundaki mitoz sayısı arasında iyi bir korelasyon vardır. Bu antikör yardımıyla belirli bir hücre popülasyonunda büyüme fraksiyonunu tespit etmek mümkündür. Proliferasyon indeksi kabaca tümör grade'lemesi ile korelasyon gösterir ve bazı tümörlerin ayırıcı tanısında önemlidir. Tümörlerde Ki-67 ile büyüme fraksiyonlarını göstermenin sadece diagnostik bir önemi yoktur, aynı zamanda birçok kanserde bağımsız bir prognostik değere sahiptir(2,4,5).

LYHK'larda hücre proliferasyonunun prognozadaki önemi tartışmalıdır, çünkü yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Literatürde LYHK'nda, yüksek Ki-67 proliferasyon indeksinin kötü prognostik gösterge olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır (8-12,73) Bazı çalışmalarda ise survi ile ilişkisinin olmadığına işaret edilmektedir (7,13,16).

### **2.8. Tümör Süpressör Gen Protein İndeksi (p53)**

Hücre siklusu ile apoptozisin entegrasyonunda anahtar faktör, tümör süpressör gen ürünü bir protein olan p53'dür. p53 tümör süpressör geni 17p13.1 kromozomunda yerleşmiştir. Normalde esas fonksiyonu, DNA bir şekilde (radyasyon veya bazı ilaçlar etkisiyle) hasarlandığı zaman, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu

(proliferasyonu) G1 fazında durdurup hücrenin hasarlanmış DNA'sını tamir etmesi için ona zaman kazandırmasıdır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozisi indükler. Bu yüzden gen koruyucusu "guardian of the genome" olarak da tanımlanır. p53 bilindiği gibi kanser hastalarında mutasyonu en sık görülen proteindir. Defektif DNA tamiri ve selektif büyümenin kazanılması, tümör oluşumu ve progresyonu ile sonuçlanır. Tümöral dokularda immunohistokimyasal yöntemle gösterilen p53 proteini mutant p53 proteinidir. Normalde p53 gen ürünü proteinin intrasellüler yoğunluğu düşük ve yarı ömrü çok kısadır. Bu nedenle normal hücrelerde göstermek zordur. Mutasyona uğrayan genin yarı ömrü çok uzun olduğundan immunohistokimyasal olarak kanser hücresi nükleuslarında göstermek mümkün olmaktadır. P53 hemen her kanser türünde çalışılmış olup mutant formlarının eksprese olduğunun saptanması genellikle kötü prognoz göstergesi olarak görülmektedir (2,4,6,74,75).

Literatürde birçok çalışmada LYHK'larda mutant P53 proteini gösterilmiştir. Ancak kötü prognoz göstergesi olup olmadığı tartışmalıdır. Tümör süpressör gen protein indeksinin kötü prognoz ile ilişkili olduğuna dair yayınlar (11,14) yanı sıra prognoz ile ilişkisinin olmadığına bildiren araştırmalar da mevcuttur (7,10,12,13,15,16,76).

### **2.9. Glukoz Transport Proteinleri (GLUT1 ve GLUT3)**

Malign hücrelerin hızlanmış metabolizmaya, yüksek glukoz gereksinimine ve artmış glukoz uptake'ine sahip oldukları ilk olarak 1956 yılında Warburg tarafından gözlemlenmiştir. Malign hücrelerdeki artmış ATP ihtiyacı ve bunu karşılamak üzere hücre içine glukoz girişinin olması, glukoz transport proteinlerinin (GLUT) artmış ekspresyonu ile sağlanır (17). GLUT proteinleri glukozun enerjiden bağımsız olarak (kolaylaştırılmış difüzyon) hücre dışından hücre içine alınmasında rol oynayan membran proteinleridir. Memeli hücrelerinde 13 adet GLUT izoformu tanımlanmıştır (Tablo 7). GLUT proteinleri her dokuda farklılık göstermektedir. Bu farklılık her dokunun glukoz metabolizmasının göstergesidir. GLUT proteinlerinin her biri glukoz, fruktoz ve diğer heksoslar için farklı afinitelere sahiptir. Malign hücrelerin belirgin biyokimyasal karakteristik özellikleri arasında hücre yüzeyindeki glukoz taşıyıcı proteinlerin (özellikle GLUT1 ve GLUT3) ve glikolizisi sağlayan hücre içi enzimlerin (heksokinaz ve fosfofuruktokinaz) artışı; buna karşın glukoz-6-fosfataz enzim aktivitesindeki azalmaya bağlı düşük defosforilasyon hızı sayılabilir. GLUT1 özellikle eritrositlerde, beyin dokusunda, kan-beyin bariyeri endotel hücrelerinde ve plasentada

olmak üzere birçok dokuda değişen düzeylerde bulunur ve bazal glukoz uptake'inden sorumlu olduğuna inanılır. GLUT3 esas olarak nöronlar, testis ve plasentada eksprese edilir. (17-19).

Tablo 7. Glukoz Transport Proteini Ailesi				
Protein	Diğer isimler, Majör İzofrom	Gen Adı	Kromozom Lokusu	Majör Doku Ekspresyonu
GLUT1	GTR1, Hu: 492aa	<u>SLC2A1</u>	1p35-31.3	Eritrosit, beyin
GLUT2	GTR2, Hu: 524 aa	SLC2A2	3q26.2-27	Karaciğer, İlet hücreleri
GLUT3	GTR3, Hu: 496 aa	SLC2A3	12p13.3	Beyin (nöronal)
GLUT4	GTR4, Hu: 509 aa	SLC2A4	17p13	Kas, yağ, kalp
GLUT5	GTR5, Hu: 501 aa	SLC2A5	1p36.2	İntestin, testis, böbrek
GLUT6	GTR6, GLUT9, Hu: 507 aa	SLC2A6	9q34	Dalak, lökosit, beyin
GLUT7	GTR7, Rt: 528 aa	SLC2A7	1p36.2	Karaciğer
GLUT8	GTR8, GLUTX1, Hu: 477 aa	SLC2A8	9	Testis, beyin, blastokist
GLUT9	GTR9, GLUTX, Hu: 511/540aa	SLC2A9	4p15.3-16	Karaciğer, böbrek
GLUT10	GTR10, Hu: 541 aa	SLC2A10	20q12-13.1	Karaciğer, pankreas
GLUT11	GTR11, GLUT10, Hu: 496 aa	SLC2A11	22q11.2	Kalp, kas
GLUT12	GTR12, GLUT8, Hu: 617 aa	SLC2A12	6q23.2	Kalp, prostat
GLUT13	HMIT, Hu: 618/629 aa	SLC2A13		Beyin

Literatürde larinksisi de içeren az sayıda çalışmada baş ve boyun YHK'larında immünohistokimyasal olarak GLUT1 ve GLUT3 ekspresyonları gösterilmiş, artmış ekspresyonların agresiv biyolojik davranışla korele olduğu belirtilmiştir (20-25). LYHK'larında yapılan bir başka araştırmada ise GLUT1 ekspresyonu ile survi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamış ancak artmış GLUT3 ekspresyonunun kötü prognostik özellik olduğu gösterilmiştir (26).



### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Gereç**

Bu deneysel çalışmada Ocak 1993 ve Kasım 2004 tarihleri arasında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Kliniği'nde total, near-total veya parsiyel larenjektomi prosedürü uygulanmış, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda klasik tip YHK tanısı almış olan toplam 79 olgu çalışma kapsamına alındı. Klinik bulgular ve demografik bilgiler tespit edildi. Belirlenen histopatolojik parametreler iki gözlemci tarafından her olgu için yeniden değerlendirildi. Tümör dokusunu temsil eden parafin kesitlere standart streptavidin-biotin yöntemi kullanılarak Ki-67, p53, GLUT1 ve GLUT3 antikoları ile immünohistokimyasal boyama yapıldı.

#### **3.2. Klinik ve Demografik Parametrelerin Değerlendirilmesi**

Olgular en az 2 yıllık klinik takip süresini tamamlamış hastalardır. Hastalara ait yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, tümör lokalizasyonu (supraglottik, glottik, subglottik, transglottik), uygulanan cerrahi tedavi prosedürü (total, near-total, parsiyel larenjektomi), adjuvan tedavi (radyoterapi, kemoterapi), tümör evresi (TNM), hastalıksız ve toplam yaşam süreleri (tanı konulduğu tarih ve Kasım 2006 arası süre), rekürrens varlığına dair bilgiler kaydedildi.

#### **3.3. Histopatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi**

Olgulara ait Hematoksilen&Eosin (H&E) boyalı preparatlar iki gözlemci tarafından yeniden değerlendirildi. WHO sınıflandırması esas alınarak klasik tip YHK tanıları kontrol edildi. Hücresel pleomorfizm, mitotik aktivite ve keratinizasyon derecesine göre histolojik derece (iyi, orta, az diferansiye) tespit edildi. Tümör boyutu ve invazyon derinliği milimetre cinsinden ölçüldü. Olgular invazyon paternine göre itici özellikte olanlar ve tek hücre infiltrasyonu gösterenler şeklinde gruplandırıldı. Vasküler

invazyon, perinöral invazyon, cerrahi sınırlarda tümör varlığı (dil kökü ve trakea cerrahi sınır), kartilaj invazyonu var/yok şeklinde değerlendirildi. Epiglottisin tümörle invazyonu kartilaj invazyonu olarak kabul edilmedi. Tümör çevresi lenfositik infiltrasyon yoğunluğu hafif, orta, şiddetli şeklinde sınıflandırıldı. Laringial intraepitelyal lezyon varlığı kaydedildi. İntraepitelyal lezyonlar WHO 2001 sınıflandırması kriterlerine göre hafif, orta, şiddetli displazi ve CIS olarak derecelendirildi. Matastatik lenf nodu sayısı, en büyük matastatik lenf nodu çapı ve ektranodal tümör yayılımı değerlendirildi.

### **3.4. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi**

İmmünohistokimyasal boyamada kullanılmak üzere olgulara ait H&E boyalı preparatların tamamı taranarak tümör dokusunu temsil eden, kesit, fiksasyon ve doku takip problemi olmayan preparatlar ve bunlara ait parafin bloklar tespit edildi. Tespit edilen parafin bloklardan polysin kaplı lamalar üzerine 4 mikron kalınlığında olmak üzere birer adet kesit alındı. Kesitler 60 °C ısıdaki etüvde 1 saat bekletilerek deparafinizasyon sağlandı.

Ksilol ve derecesi giderek azalan alkollerden geçirilerek distile suda yıkandı. Antijen geri kazanımı (antigen retrieval) işlemi için pH6' da 10 mM sitrat tampon içerisine konularak mikrodalga fırında 20 dakika boyunca 700 watt ısıya tabi tutuldu. Daha sonra preparatlar oda ısısında 20 dakika boyunca soğumaya bırakıldı. Streptavidin-biotin immünperoksidaz boyama için oda ısısında soğutulmuş preparatlar %0,3 hidrojen peroksit ile 10 dakika muamele edilerek peroksidaz blokajı yapıldı. Kesitler fosfatla tamponlanmış salin solüsyonunda (PBS) yıkandı.

Oda sıcaklığında Ki-67, p53, GLUT1 ve GLUT3 primer antikorları ile 35'er dakika inkübasyon uygulandı. Kesitler PBS ile yıkandı. Biotinylated anti-mouse ve anti-rabbit immünglobulin (Linker Reagent, sarı solüsyon) 15 dakika uygulandı (DBS, Katalog no: KP-500). Kesitler PBS ile yıkandı. Streptavidin peroksidaz konjugatı (Tracer Reagent, kırmızı solüsyon ) ile 15 dakika muamele edildi (DBS, Katalog no: KP-500). Kesitler PBS ile yıkandı. Yirmi dakika AEC kromojen (DBS, Katalog No:K 003, AEC Chromogen / Substrate Kit Liquid Format) uygulandı.

Preparatlar deiyonize su ile yıkandıktan sonra 1 dakika süreyle Mayer hematoksilen ile kontrast boyama uygulandı. Çeşme suyu ile yıkanan preparatlar gliserin jel kullanılarak lamel ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal çalışmada kullanılan primer antikorların ürün bilgileri aşağıda belirtildiği gibidir:

- Antikor adı: Ki-67

Firma adı ve katalog numarası: Lab Vision Corporation, RM-9106-R7 (7.0ml)

Klon: SP6

Pozitif kontrol: Tonsil

HücreseL Lokalizasyon: Nükleer

- Antikor adı: p53

Firma adı ve katalog numarası: DakoCytomation, NP010

Klon: DO-7

Pozitif kontrol: Kolon karsinomu

HücreseL Lokalizasyon: Nükleer

- Antikor adı: GLUT1 Ab-1

Firma adı ve katalog numarası: Lab Vision Corporation, RB-078-R7 (7.0ml)

Klon: Poliklonal

Pozitif kontrol: Plasenta

HücreseL Lokalizasyon: Hücre membranı

- Antikor adı: GLUT3

Firma adı ve katalog numarası: Lab Vision Corporation, RB-9096-R7 (7.0ml)

Klon: Poliklonal

Pozitif kontrol: Plasenta

HücreseL Lokalizasyon: Sitoplazmik

### **3.5. İmmünoreaktivitenin Değerlendirilmesi**

Ki-67, p53, GLUT-1 ve GLUT-3 antikorları ile hazırlanan kesitler, olguların klinik seyirleri hakkında bilgi sahibi olmayan iki gözlemci tarafından ışık mikroskopunda değerlendirildi. Ki-67 için tonsil dokusu, p53 için kolon karsinomuna ait örnekler, GLUT1 ve GLUT3 için plasenta dokusu pozitif kontrol olarak kullanıldı. Ayrıca GLUT1 için her kesitte vasküler yapılarıdaki eritrositler internal kontrol olarak kullanıldı.

Ki-67 ve p53 için immünoreaktivitenin en yoğun olarak izlendiği alanlarda x400 büyütmede 1000 adet neoplastik hücre sayıldı. Boyanma şiddetine bakılmaksızın tüm nükleer boyanmalar pozitif kabul edildi. Nükleer immünoreaktivite gösteren

hücrelerin sayısı toplam neoplastik hücre sayısına (1000) bölünüp 100 ile çarpılarak Ki-67 PI ve p53 indeksleri hesaplandı. İstatiksel değerlendirmede Ki-67 ve p53 için %10 ve üzerindeki boyanmalar pozitif, %10'un altındaki boyanmalar negatif olarak gruplandırıldı.

GLUT1 antikoru için membranöz boyanma gösteren hücreler değerlendirildi. Bazı hücrelerde görülen sitoplazmik boyanmalar dikkate alınmadı. Tüm olgularda pozitif boyanan GLUT1 alanlarının yüzdesi kaydedildi. Buna göre hücrelerdeki membranöz boyanma %70'den fazlasında görülüyorsa (+++), bu oran %30-70 arasındaysa (++) , %30'un altındaysa (+) ve boyanma yoksa negatif (0) olarak kabul edildi. İstatiksel değerlendirmede %30 ve üzerindeki boyanmalar pozitif, %30'un altındaki boyanmalar negatif olarak gruplandırıldı.

GLUT3 antikoru için sitoplazmik ve membranöz boyanma gösteren hücreler değerlendirildi. GLUT3 ile tümör hücrelerinde görülen boyanma tüm kesitlerde %10'dan azdı. Bu nedenle yaygınlığına bakılmaksızın boyanma gösteren tüm olgular pozitif, boyanma göstermeyenler negatif olarak gruplandı.

### **3.6. İstatiksel Çalışma Yöntemi**

İstatiksel değerlendirmeler SPSS 13.0 istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. İstatiksel olarak  $p \geq 0,05$  anlamsız,  $p < 0,05$  anlamlı kabul edildi.

Ki-67 PI, p53 indeksi, GLUT1 ve GLUT3 immünoaktiviteleri ile klinikopatolojik özellikler olan cinsiyet, operasyon yaşı, tümör lokalizasyonu, T(tümör), N(lenf nodu), klinik evre gruplaması, histolojik grade, lenf nodu metastazı, tümör çapı, tümör kalınlığı, ektranodal yayılım, vasküler invazyon, perinöral invazyon, kartilaj invazyonu, isterstisyel kronik inflamasyon, invazyon paterni, tümör nüksü/tümöre bağlı ölüm parametreleri arasındaki korelasyonun araştırılmasında Pearson Chi-Square ( $\chi^2$ ) veya Fisher's Exact testi kullanıldı.

Ki-67 PI, p53 indeksi, GLUT1 ve GLUT3 immünoaktiviteleri ile survi arasındaki ilişkinin analizinde Kaplan-Meier metodu uygulandı ve log-rank testi ile karşılaştırıldı.

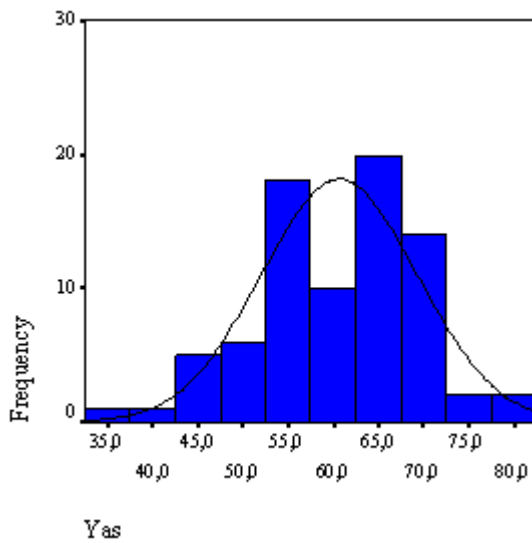
## 4. BULGULAR

### 4.1. Klinik ve Demografik Bulgular

LYHK nedeniyle cerrahi tedavi uygulanmış, retrospektif olarak incelenen 79 olgunun 77 tanesi erkek (%97,5), 2 tanesi kadın (%2,5) hastadır. Tanı konulduğu andaki yaşların ortalaması 61, standart sapması 8,7'dir (Tablo 8). En küçük yaş 37, en büyük yaş 79 olarak tespit edildi. Olguların yaşlara göre dağılımı Grafik 1'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Tüm olguların yaş ortalaması, ortanca ve standart sapma değerleri n=79	
Ortalama	60,63
Ortanca	61,00
Standart sapma	8,669

Grafik 1. Olguların yaşlara göre dağılımı



Toplam 79 hastadan 1 tanesi dışındakiler sigara içen hastalardır. Olguların 57 tanesi transglottik (%71,3), 16 tanesi supraglottik (%20), 6 tanesi glottik (%7,5) yerleşim göstermektedir. İzole subglottik yerleşimli tümör saptanmadı.

Dünya Kanser Savaş Kurumu (UICC) ve Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) 2002 yılı kriterlerine göre yapılan klinik evrelendirmeye göre olguların 3 (%3,8) tanesi T1, 9 (%11,4) tanesi T2, 42 (%53,2) tanesi T3, 25 (%31,6) tanesi T4; 50 (%63,3) tanesi N0, 13 (%16,5) tanesi N1, 16 (%20,3) tanesi N2 evresindedir. Uzak metastaz gösteren olgu saptanmadı. Hastaların 2 (%2,5) tanesi evre I, 7 (%8,9) tanesi evre II, 34 (%43) tanesi evre III, 36 (%45,6) tanesi evre IV olarak gruplandırıldı.

En az 36 ay takip süresine sahip 70 olguda ortalama hastalıksız sağ kalım yaşı 62,4, kümülatif survi ya da klinik takip ortalaması 64,06 dır. En kısa sağ kalım süresi tümör nedeniyle ölüm görülen bir vakada 7 ay olup, en uzun sağ kalım süresi 156 aydır. Takip süreleri içinde hastaların 17 (% 21,5) tanesinde nüks ya da tümöre bağlı ölüm görülmüştür. 9 (% 11,4) olguda klinik progresyon hakkında bilgi elde edilememiştir. Cerrahi sonrası hastaların 27 tanesine adjuvan tedavi (radyoterapi, kemoterapi ya da radyoterapi ile birlikte kemoterapi) uygulanmıştır. Olgulara ait demografik veriler ve klinik bulgular tablo 9 ve 10'da özetlenmiştir.

Tablo 9. Demografik veriler ve klinik bulgular

Sayı	Cinsiyet	Yaş	Lokalizasyon	T	N	M	Evre Grup	Cerrahi tedavi	Adjuvan tedavi	Sigara	Hastalıksız Survî	Toplam Survî
1	E	64	TG	4	0	0	IV	TL+BBD	RT	+	28	28
2	E	71	TG	4	2	0	IV	TL+BBD	RT	+	18	30
3	E	55	TG	4	0	0	IV	TL+BBD	RT	+	31	31
4	E	64	TG	4	0	0	IV	NTL	RT	-	34	34
5	E	46	TG	2	0	0	II	PL	-	+	34	34
6	E	54	SG	3	2	0	IV	PL+BBD	RT	+	10	12
7	E	63	G	2	0	0	II	PL	-	+	37	37
8	K	66	TG	3	0	0	III	PL+BBD	RT	+	40	40
9	E	60	SG	3	2	0	IV	PL+BBD	RT	+	40	40
10	E	72	G	3	0	0	III	PL+ sol BD	-	+	42	42
11	E	52	TG	3	0	0	III	PL+BBD	-	+	44	44
12	E	69	TG	3	0	0	III	PL+BBD	-	+	46	46
13	E	55	TG	4	1	0	IV	TL+BBD	-	+	?	?
14	E	68	TG	4	0	0	IV	TL+BBD	-	+	47	47
15	E	55	TG	4	0	0	IV	TL+BBD	-	+	49	49
16	E	79	TG	3	2	0	IV	TL+BBD	-	+	?	?
17	E	62	TG	4	0	0	IV	TL+BBD	RT+KT	+	40	44
18	E	71	SG	3	0	0	III	TL+BBD	-	+	31	31
19	K	67	TG	3	0	0	III	NTL+BBD	RT	+	47	47
20	E	75	TG	3	2	0	IV	NTL+BBD	-	+	18	18
21	E	65	SG	1	2	0	IV	PL+Sol BD	-	+	55	58
22	E	37	TG	3	0	0	III	TL+BBD	-	+	61	61
23	E	56	SG	3	0	0	III	PL+BBD	-	+	63	63
24	E	66	G	2	0	0	II	PL+ sol BD	-	+	65	65
25	E	63	SG	3	0	0	III	TL+ BBD	-	+	65	65
26	E	70	SG	2	1	0	III	PL+BBD	-	+	66	66
27	E	52	TG	4	0	0	IV	TL+BBD	-	+	69	69
28	E	70	G	1	0	0	I	PL	-	+	40	40
29	E	56	TG	3	0	0	III	PL+ sol BD	RT	+	?	?

Tablo 9. Demografik veriler ve klinik bulgular (devamı)

Sayı	Cinsiyet	Yaş	Lokalizasyon	T	N	M	Evre grup	Cerrahi tedavi	Adjuvan tedavi	Sigara	Hastaliksız Survi	Toplam Survi
30	E	56	SG	3	0	0	III	PL+BBD	-	+	75	75
31	E	57	SG	2	0	0	II	PL+sağ BD	-	+	60	60
32	E	60	TG	3	0	0	III	PL+BBD	-	+	75	75
33	E	47	TG	2	2	0	IV	TL+BBD	-	+	77	77
34	E	57	TG	3	0	0	III	PL	-	+	77	77
35	E	67	TG	4	0	0	IV	TL+BBD	RT	+	78	78
36	E	74	TG	3	0	0	III	NTL+BBD	-	+	41	41
37	E	57	TG	4	1	0	IV	TL+BBD	RT	+	?	?
38	E	61	TG	3	0	0	III	TL+BBD	-	+	84	84
39	E	53	SG	3	1	0	III	NTL+BBD	-	+	86	86
40	E	68	TG	3	1	0	III	TL+BBD	RT	+	89	89
41	E	46	TG	3	0	0	III	NTL+BBD	RT	+	?	?
42	E	70	TG	3	2	0	IV	TL+BBD	-	+	18	18
43	E	60	TG	4	2	0	IV	TL+BBD	-	+	40	40
44	E	70	TG	3	1	0	III	TL+BBD	-	+	94	94
45	E	65	SG	2	0	0	II	TL+BBD	-	+	97	97
46	E	58	TG	3	0	0	III	TL+BBD	-	+	?	?
47	E	65	SG	3	2	0	IV	PL+BBD	-	+	?	?
48	E	50	TG	4	2	0	IV	TL+BBD	RT+KT	+	18	18
49	E	43	TG	4	0	0	IV	TL+Sol BD	RT+KT	+	?	?
50	E	50	TG	4	2	0	IV	TL+BBD	RT+KT	+	12	12
51	E	63	SG	2	0	0	II	PL+BBD	-	+	102	102
52	E	67	G	1	0	0	I	Sağ VK+ön K	-	+	104	104
53	E	50	SG	3	0	0	III	PL+BBD	-	+	105	105
54	E	70	TG	3	1	0	III	TL+BBD	RT	+	24	24
55	E	40	TG	4	1	0	IV	TL+BBD	-	+	106	106
56	E	56	TG	3	0	0	III	TL+sol BD	-	+	107	107
57	E	67	TG	3	1	0	III	TL+sol BD	RT+KT	+	68	69
58	E	56	SG	3	1	0	III	PL+sağ BD	-	+	108	108
56	E	55	TG	4	1	0	IV	TL+BBD	RT	+	12	12
60	E	63	G	2	0	0	II	Sol VK	-	+	?	?
61	E	64	TG	3	0	0	III	TL+sağ BD	-	+	84	84
62	E	53	TG	4	2	0	IV	TL+BBD	RT	+	7	7
63	E	72	TG	3	2	0	IV	TL+sağ BD	-	+	12	12
64	E	60	TG	4	0	0	IV	TL+sağ BD	-	+	116	116
65	E	65	TG	3	1	0	IV	TL+BBD	KT	+	119	119
66	E	63	TG	3	0	0	III	TL+sol BD	KT	+	15	15
67	E	54	TG	4	0	0	IV	TL+BBD	-	+	123	123
68	E	56	TG	3	0	0	III	TL+BBD	-	+	124	124
69	E	57	TG	4	0	0	IV	TL+BBD	-	+	134	122
70	E	46	TG	3	0	0	III	TL+sol BD	-	+	142	42
71	E	68	TG	4	0	0	IV	TL+BBD	KT	+	12	12
72	E	60	TG	3	2	0	IV	TL+sağ BD	KT	+	14	14
73	E	68	TG	3	0	0	III	TL+sağ BD	-	+	132	132
74	E	78	TG	4	0	0	IV	TL+BBD	RT	+	14	14
75	E	51	SG	3	1	0	III	TL+sol BD	-	+	132	132
76	E	60	TG	4	0	0	IV	TL+sol BD	RT	+	154	120
77	E	60	TG	3	0	0	III	TL+sol BD	-	+	154	156
78	E	64	TG	3	0	0	III	TL+BBD	-	+	130	130
79	E	67	TG	4	2	0	IV	TL + Sol BD	-	+	18	18

(T):Tümör evresi, (N):Lenf nodu evresi, (M):Metastaz evresi, (E):Erkek, (K):Kadın, (TG):Transglottik, (SG):Supraglottik, (G):Glottik, (TL):Total larenjektomi, (NTL):Near total larenjektomi, (PL):Parsiyel larenjektomi, (VK):Kordektomi, (ön K):Ön komissür eksizyonu, (BD):Boyun diseksiyonu, (BBD):Bilateral boyun diseksiyonu, (RT):Radyoterapi, (KT):Kemoterapi, (+): Var, (-): Yok, (?): Bilgi yok

Tablo 10. Demografik ve klinik bulguların olgulara göre dağılımı	
Cinsiyet Erkek: 77 (97,5) Kadın: 2 (%2,5)	Operasyon yaşı (yıl) <61: 40 (%50,6) ≥61: 39 (%49,4)
Tümör lokalizasyonu Transglottik: 57 (%72,2) Supraglottik: 16 (%20,3) Glottik: 6 (%7,6) Subglottik: 0 (%0)	T (tümör) T1: 3 (%3,8) T2: 9 (%11,4) T3: 42 (%53,2) T4: 25 (%31,6)
N (lenf nodu) N0: 50 (%63,3) N1: 13 (%16,5) N2: 16 (%20,3)	Klinik evre gruplaması (Evre I,II,III,IV) Evre I: 2 (%2,5) Evre II: 7 (%8,9) Evre III: 34 (%43) Evre IV: 36 (%45,6)
Klinik evre gruplaması (erken, ileri) Erken evre I-II: 9 (%11,4) İleri evre III-IV: 70 (%88,6)	Rekürrens/tümöre bağlı ex Yok: 52 (% 65,8) Var: 18 (% 22,8) Veri yok:9 (% 11,4)

#### 4.2. Histopatolojik Bulgular

Çalışmamızdaki LYHK olgularının 24 (%30,4)'ü iyi diferansiye, 50 (%63,3)' si orta diferansiye, 5 (% 6,3)'ü az diferansiye lezyonlardır. Makroskobik olarak ölçülen en küçük tümör çapı 0,5 cm, en büyük tümör çapı 6 cm olup ortalama tümör çapı 2,77 cm'dir. Tümör kalınlıkları 0,3 cm ve 3 cm arasında değişmekte olup ortalama tümör kalınlığı 1,2 cm'dir.

Olguların 21 (%26,6)'inde vasküler invazyon, 13 (%83,5)'ünde perinöral tutulum, 21 (%26,6)'inde kartilaj invazyonu, 21 (%26,6)'inde lenf nodu metastazı, 5 (%6,3)'inde ektranodal yayılım saptandı.

Olguların çoğunda (%55,7) tümöre karşı orta derecede bir interstisyel kronik inflamasyon mevcutken %13,9'ünde hafif, % 30,4'ünde yoğun kronik inflamasyon izlendi. Tümöral infiltrasyon paterni % 40,5 olguda itici tarzda, % 59,5 olguda tek hücre yada hücre grubu infiltrasyonu şeklindedir.

Tümör çevresi epitelin 57 (%72,2)'sinde CIS tespit edildi. 5 (%6,3) olguda şiddetli, 4 (% 5,1) olguda orta derecede displazi saptanırken tümöral örneklemenin az olduğu 13 (%16,5) olguda prekanseröz lezyon saptanmadı. Mikroskobik olarak 9 (%11,4) olguda cerrahi sınırdaki tümöral infiltrasyon mevcuttur. Olgulara ait histopatolojik bulgular tablo 11 ve 12'de özetlenmiştir.



Tablo 11. Histopatolojik bulgular

Sayı	Grade	Tümör Çapı (mm)	Tümör Kalınlığı (mm)	Vasküler invazyon	Perinöral invazyon	Kartilaj invazyonu	CS	Kronik inflamasyon	Displazi	İnvazyon Paterni	LN metastazı	EN Y
1	Orta	25	10	-	+	+	-	Orta	CIS	infiltratif	-	-
2	Orta	25	15	+	-	+	+	Hafif	CIS	infiltratif	+	-
3	Orta	20	15	-	+	+	-	Hafif	CIS	İtici	-	-
4	Orta	35	15	+	+	+	-	Orta	CIS	infiltratif	-	-
5	Orta	18	10	-	-	-	-	Ağır	CIS	İtici	-	-
6	Orta	35	20	+	-	-	+	Orta	CIS	İtici	+	+
7	İyi	9	5	-	-	-	-	Orta	CIS	İtici	-	-
8	İyi	30	10	-	-	-	+	Orta	CIS	İtici	-	-
9	Orta	35	10	+	-	-	+	Orta	şiddetli	infiltratif	+	-
10	Az	15	7	-	-	-	-	Hafif	CIS	infiltratif	-	-
11	Orta	23	15	-	+	-	-	Orta	CIS	infiltratif	-	-
12	İyi	25	14	-	-	-	-	Ağır	CIS	İtici	-	-
13	Orta	45	30	+	-	+	-	Orta	şiddetli	infiltratif	+	-
14	İyi	25	15	-	-	+	-	Orta	yok	İtici	-	-
15	Orta	25	8	-	-	+	-	Hafif	CIS	infiltratif	-	-
16	Orta	35	14	-	-	-	+	Ağır	CIS	infiltratif	+	-
17	Orta	32	10	+	-	+	-	Hafif	CIS	infiltratif	-	-
18	Az	20	10	-	-	-	-	Ağır	yok	İtici	-	-
19	Orta	50	7	-	-	-	-	Orta	CIS	infiltratif	-	-
20	Orta	40	20	+	-	-	+	Ağır	şiddetli	İtici	+	-
21	Orta	12	3	-	-	-	-	Ağır	CIS	İtici	+	-
22	Orta	45	7	-	-	-	-	Orta	CIS	infiltratif	-	-
23	Orta	30	8	-	-	-	-	Ağır	CIS	İtici	-	-
24	İyi	10	3	-	-	-	-	Ağır	orta	infiltratif	-	-
25	Orta	17	7	-	-	-	-	Orta	şiddetli	İtici	-	-
26	Orta	35	9	-	-	-	-	Orta	CIS	infiltratif	-	-
27	Orta	25	16	+	-	+	-	Hafif	CIS	infiltratif	-	-
28	İyi	10	5	-	-	-	-	Orta	CIS	İtici	-	-
29	Orta	14	9	-	-	-	-	Orta	CIS	infiltratif	-	-
30	Orta	40	15	-	-	-	+	Ağır	CIS	İtici	-	-
31	İyi	15	4	-	-	-	-	Orta	CIS	İtici	-	-
32	İyi	30	13	-	-	-	-	Ağır	CIS	İtici	-	-
33	Orta	40	6	+	-	-	-	Ağır	CIS	İtici	-	-
34	İyi	30	13	-	-	-	-	Ağır	orta	İtici	-	-
35	Orta	40	6	+	+	+	-	Orta	orta	infiltratif	-	-
36	Orta	17	8	-	-	-	-	Orta	CIS	infiltratif	-	-
37	Orta	10	12	+	+	+	-	Hafif	CIS	infiltratif	-	-
38	Orta	22	10	+	-	-	-	Orta	CIS	infiltratif	-	-
39	Orta	35	14	+	+	-	-	Ağır	CIS	infiltratif	+	-
40	Orta	40	16	+	-	-	-	Orta	CIS	infiltratif	+	-
41	İyi	35	19	-	-	-	-	Ağır	şiddetli	İtici	-	-
42	Az	35	7	+	+	-	-	Orta	orta	infiltratif	+	+
43	Orta	25	15	+	-	+	-	Orta	CIS	İtici	+	+
44	Orta	25	14	-	-	-	-	Ağır	yok	infiltratif	+	-
45	İyi	25	6	-	-	-	-	Ağır	CIS	infiltratif	-	-
46	İyi	50	18	-	-	-	-	Ağır	CIS	İtici	-	-
47	Orta	30	13	-	-	-	-	Orta	CIS	infiltratif	+	+
48	İyi	30	15	+	-	+	-	Hafif	yok	infiltratif	+	-
49	Orta	40	25	-	+	+	-	Orta	CIS	infiltratif	-	-
50	Orta	55	28	-	-	-	-	Orta	CIS	infiltratif	+	-
51	Orta	40	9	-	-	-	-	Orta	CIS	infiltratif	-	-
52	İyi	10	5	-	-	-	-	Orta	CIS	İtici	-	-
53	Orta	30	15	-	-	-	-	Orta	yok	İtici	-	-
54	Orta	20	17	-	-	-	-	Ağır	CIS	infiltratif	+	-
55	Orta	20	8	-	-	-	-	Ağır	CIS	infiltratif	-	-
56	Orta	15	15	-	-	-	-	Orta	CIS	İtici	-	-
57	Orta	20	10	-	-	-	-	Orta	CIS	İtici	+	-
58	Orta	15	9	-	-	-	+	Orta	CIS	İtici	-	-
56	İyi	25	15	-	-	-	-	Orta	CIS	infiltratif	-	-
60	Orta	5	4	-	-	-	-	Orta	CIS	İtici	-	-
61	Orta	30	10	-	-	-	-	Ağır	CIS	İtici	-	-
62	Orta	60	15	+	+	+	+	Hafif	yok	infiltratif	+	+
63	Orta	25	17	+	+	-	-	Orta	CIS	infiltratif	+	-
64	İyi	15	8	-	-	-	-	Ağır	yok	infiltratif	-	-
65	Orta	35	9	-	-	-	-	Orta	CIS	infiltratif	-	-
66	Orta	25	17	-	+	-	-	Orta	yok	infiltratif	-	-
67	Orta	30	20	-	+	+	-	Hafif	CIS	infiltratif	-	-
68	Orta	35	20	-	-	-	-	Orta	CIS	infiltratif	-	-

Tablo 11. Histopatolojik bulgular (devamı)

Sayı	Derece	Tümör Çapı (mm)	Tümör Kalınlığı (mm)	Vasküler invazyon	Perinöral invazyon	Kartilaj invazyonu	CS	Kronik inflamasyon	Displazi	İnvazyon paterni	LN metastaz	ENY
69	Orta	30	9	-	-	+	-	Ağır	CIS	İtici	-	-
70	Orta	20	15	-	-	-	-	Ağır	CIS	İtici	-	-
71	İyi	30	6	+	-	+	-	Orta	yok	İtici	-	-
72	Az	30	25	+	-	-	-	Hafif	yok	infiltratif	+	-
73	Orta	25	6	-	-	-	-	Ağır	CIS	infiltratif	-	-
74	Orta	20	8	-	-	+	-	Orta	CIS	infiltratif	-	-
75	İyi	50	13	-	-	-	-	Orta	yok	infiltratif	-	-
76	İyi	50	18	-	-	+	-	Orta	CIS	infiltratif	-	-
77	İyi	40	9	-	-	-	-	Orta	yok	infiltratif	-	-
78	Orta	45	15	-	-	-	-	Orta	CIS	infiltratif	-	-
79	İyi	15	9	-	-	+	-	Orta	yok	İtici	+	-

(CS):Cerrahi sınırdaki tümörün infiltrasyonu, (LN):Lenf nodu, (ENY):Ekstranodal yayılım

Tablo 12. Histopatolojik bulguların olgulara dağılımı

Histolojik Derece İyi: 24 (% 30,4) Orta: 50 (% 63,3) Az: 5 (% 6,3)	İnterstisyel kronik inflamasyon: Hafif: 11 (% 13,9) Orta: 44 (% 55,7) Ağır: 24 (% 30,4)
Vasküler invazyon Yok: 58 (% 73,4) Var: 21 (% 26,6)	Perinöral invazyon Yok :66 (% 16,5) Var: 13 (% 83,5)
Kartilaj invazyonu Yok: 58 (% 73,4) Var: 21 (% 26,6)	İnvazyon paterni İtici (iyi sınırlı): 32 (% 40,5) Tek hücre yayılımı: 47 (% 59,5)
Tümör çapı (mm) < 30 : 39 (% 49,4) ≥ 30: 40 (50,6)	Tümör derinliği (mm) < 10 : 31 (% 39,2) ≥ 10: 48 (60,8)
Lenf nodu metastazı Yok: 58 (% 73,4) Var: 21 (% 26,6)	Ekstranodal yayılım Yok: 74 (%93,7) Var: 5 (% 6,3)

### 4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

Tüm olgular Ki-67 ile boyanma göstermiş olup boyanma oranları %1 ile %83 arasında değişmektedir (Şekil 4,5). Olguların 27 (%34,2) tanesi %10'un altında, 52 (%65,8) tanesi %10'un üzerinde Ki-67 ekspresyonu göstermiştir. Tümörlerin histolojik dereceleri ile Ki-67 PI %10'un üzerindeki olgular arasında iyi:%62,5, orta:%66, az:%80 şeklinde oransal bir artış mevcut olmasına rağmen bu ilişki anlamlı bulunmadı (p=0,754). Tümör çapı 30 mm ve üzerinde olan olgularda Ki-67 PI'nin de arttığına dair ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,023). Tümör kalınlığındaki artış ile Ki-67 PI artışı arasında oransal bir ilişki olmasına rağmen bu ilişki anlamlı değildi (p=0,145). Ki-67 PI ile diğer klinikopatolojik özellikler olan cinsiyet, operasyon yaşı, tümör lokalizasyonu, T(tümör), N(lenf nodu), klinik evre gruplaması, lenf nodu metastazı, ekstranodal yayılım, vasküler invazyon, perinöral invazyon, kartilaj invazyonu,

isterstisyel kronik inflamasyon, invazyon paterni, tümör nüksü/tümöre bağlı ölüm arasında istatikselsel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı. Klinikopatolojik özellikler ile Ki-67 ekspresyonu arasındaki istatikselsel ilişkiler tablo 13'te özetlenmiştir.

Olguların 12 (%15,2) tanesinde p53 ile hiç boyanma görülmedi. Diğer olgularda boyanma oranları %1 ile %96 arasında değişmektedir (Şekil 6,7). p53 için %0-10 arası boyanma 36 (%45,6) olguda, %10 üstü boyanma 43 (%54,4) olguda tespit edildi. İyi diferansiye tümörlerde az diferansiye olanlara göre p53 pozitifliği (p53>%10) anlamlı şekilde yüksek bulundu (p=0,036). Perinöral invazyon gösteren olgularda p53 ekspresyonunda anlamlı bir azalma tespit edildi (p=0,031). Düşük p53 ekspresyonu gösteren olgularda lenf nodu metastazı daha fazla olmasına rağmen bu ilişki istatikselsel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,314). Diğer klinikopatolojik özellikler olan cinsiyet, operasyon yaşı, tümör lokalizasyonu, T (tümör), klinik evre gruplaması, tümör derinliği, tümör kalınlığı, ektranodal yayılım, vasküler invazyon, kartilaj invazyonu, isterstisyel kronik inflamasyon, invazyon paterni, tümör nüksü/tümöre bağlı ölüm arasında istatikselsel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Klinikopatolojik özellikler ile p53 ekspresyonu arasındaki istatikselsel ilişkiler tablo 14'te özetlenmiştir.

Olguların 6 (%7,6) tanesi dışındaki kesitlerde GLUT1 ile boyanma görüldü (Şekil 8,9). Olgular, hiç boyanmayanlar da dahil edilmek suretiyle 45 (%57) olguda GLUT1 ile hafif boyanma (<%30); 32 (%43) olguda yoğun boyanma (≥%30) göstermiştir. T1'den T4 tümörlere doğru gidildikçe GLUT1 ekspresyonu oranı artmakla beraber ilişki anlamı değildir (p=0,134). Glottik yerleşimli 6 olgunun hiçbiri GLUT1 ile yoğun boyanma göstermezken, supraglottik tümörlerin %37,5'i, transglottik tümörlerin %49,1'i yoğun boyanma göstermiştir. Kartilaj invazyonu gösteren toplam 21 olgunun 13 (%61,9) tanesi GLUT1 ile yoğun boyanma gösterirken bu oran istatikselsel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,070). Diğer klinikopatolojik özellikler olan cinsiyet, operasyon yaşı, N (lenf nodu), tümör derinliği, tümör kalınlığı, lenf nodu metastazı, ektranodal yayılım, histolojik derece, vasküler invazyon, perinöral invazyon, isterstisyel kronik inflamasyon, invazyon paterni, tümör nüksü/tümöre bağlı ölüm arasında istatikselsel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Klinikopatolojik özellikler ile GLUT1 ekspresyonu arasındaki istatikselsel ilişkiler tablo 15'te özetlenmiştir.

GLUT3 ile olguların 52 (%65,8) tanesi boyanma göstermezken, 27 (%34,2) olgu pozitif boyanmıştır (Şekil 10,11). GLUT3 pozitifliği ile operasyon yaşı arasında negatif bir korelasyon saptandı (p=0,017). Diğer klinikopatolojik özellikler olan cinsiyet, T (tümör), N (lenf nodu), tümör derinliği, tümör kalınlığı, lenf nodu metastazı,

ekstranodal yayılım, histolojik derece, vasküler invazyon, perinöral invazyon, kartilaj invazyonu, isterstisyel kronik inflamasyon, invazyon paterni, tümör nüksü/tümöre bağlı ölüm arasında istatikselsel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Klinikopatolojik özellikler ile GLUT3 ekspresyonu arasındaki istatikselsel ilişkiler tablo 16'da özetlenmiştir.

Ki-67 PI, p53 indeksi, GLUT1 ve GLUT3 immünoreaktiviteleri ile hastalısız survi ve toplam survi arasındaki ilişkilerin analizinde Kaplan-Meier metodu uygulandı ve log-rank testi ile karşılaştırıldı (Tablo 18,19).

Ki-67 PI için yapılan survi analizinde Ki-67 pozitif (>%10) olgularda ortalama hastalısız sağ kalım süresi 74,131 ay (Grafik 2), ortalama toplam sağ kalım süresi 74,242 ay (Grafik 3) olarak hesaplandı. Ki-67 negatif (≤%10) olgularda ortalama hastalısız ve toplam sağ kalım sürelerinin 90,451 ay olduğu görüldü. Bu fark istatikselsel olarak anlamlı bulunmamakla birlikte (hastalısız survide p=0,323, toplam survide p=0,321) Ki-67 PI yüksek olan hastalarda ortalama sağ kalım süresinin daha kısa olduğu gözlemlendi.

p53 için yapılan survi analizinde p53 pozitif (>%10) olgularda ortalama hastalısız sağ kalım süresi 87,931 ay (Grafik 4), ortalama toplam sağ kalım süresi 88,025 ay (Grafik 5) olarak ölçüldü. p53 negatif (≤%10) olgularda ortalama hastalısız ve toplam sağ kalım süreleri 72,105 ay olarak hesaplandı. . Bu fark istatikselsel olarak anlamlı bulunmadı (hastalısız survide p=0,060, toplam survide p=0,058) ancak p53 pozitif olan hastalarda ortalama sağ kalım sürelerinin daha uzun olduğu gözlemlendi.

GLUT1 için yapılan survi analizinde GLUT1 pozitif (≥%30) olgularda ortalama hastalısız sağ kalım süresi 93,690 ay (Grafik 6), ortalama toplam sağ kalım süresi 93,690 ay (Grafik 7) olarak tespit edildi. GLUT1 negatif (<%30) olgularda ortalama hastalısız sağ kalım süresi 69,761 ay, ortalama toplam sağ kalım süresi 69,886 ay olarak hesaplandı. İstatikselsel olarak anlamlı bulunan bu analizde (hastalısız ve toplam survide p=0,002) literatür bilgilerinin aksine GLUT1 pozitif olan hastalarda ortalama sağ kalım sürelerinin daha uzun olduğu gözlemlendi.

GLUT3 için de GLUT1'e benzer bir durum tespit edildi. GLUT3 için yapılan survi analizinde GLUT3 pozitif olgularda ortalama hastalısız sağ kalım süresi 97,504 ay (Grafik 8), ortalama toplam sağ kalım süresi 97,677 ay (Grafik 9) olarak hesaplandı. GLUT3 negatif olgularda ortalama hastalısız sağ kalım süresi 70,254 ay, ortalama toplam sağ kalım süresi 70,335 aydır. İstatikselsel olarak anlamlı bulunan bu analizde (hastalısız ve toplam survide p=0,011) GLUT3 pozitif olan hastalarda ortalama sağ kalım sürelerinin daha uzun olduğu gözlemlendi.

Tablo 13. Klinikopatolojik özellikler ve Ki-67 ekspresyonu

Klinikopatolojik özellikler	Ki-67 ≤10	Ki-67 >10	p
Cinsiyet Erkek: 77 (97,5) Kadın: 2 (%2,5)	27 0	50 2	0,302
Operasyon yaşı (yıl) <61: 40 (%50,6) ≥61: 39 (%49,4)	11 16	29 23	0,241
Tümör yerleşimi Transglottik: 57 (%72,2) Supraglottik: 16 (%20,3) Glottik: 6 (%7,6) Subglottik: 0 (%0)	18 6 3 0	39 10 3 0	0,632
T (tümör) T1: 3 (%3,8) T2: 9 (%11,4) T3: 42 (%53,2) T4: 25 (%31,6)	2 3 12 10	1 6 30 15	0,498
N (lenf nodu) N0: 50 (%63,3) N1: 13 (%16,5) N2: 16 (%20,3)	16 5 6	34 8 10	0,865
Klinik evre gruplaması (Evre I,II,III,IV) Evre I: 2 (%2,5) Evre II: 7 (%8,9) Evre III: 34 (%43) Evre IV: 36 (%45,6)	1 3 8 15	1 4 26 21	0,381
Klinik evre gruplaması (erken, ileri) I-II: 9 (%11,4) III-IV: 70 (%88,6)	4 23	5 47	0,483
Lenf nodu metastazı Yok: 58 (% 73,4) Var: 21 (% 26,6)	20 7	38 14	1,000
Ekstranodal yayılım Yok: 74 (%93,7) Var: 5 (% 6,3)	25 2	49 3	0,777
Histolojik Derece İyi: 24 (% 30,4) Orta: 50 (% 63,3) Az: 5 (% 6,3)	9 17 1	15 33 4	0,754
Tümör çapı (mm) < 30 : 39 (% 49,4) ≥ 30: 40 (50,6)	18 9	21 31	0,034
Tümör derinliği (mm) < 10 : 31 (% 39,2) ≥ 10: 48 (60,8)	14 13	17 35	0,145
Vasküler invazyon Yok: 58 (% 73,4) Var: 21 (% 26,6)	21 6	37 15	0,600
Perinöral invazyon Yok :66 (% 16,5) Var: 13 (% 83,5)	22 5	44 8	0,722
Kartilaj invazyonu Yok: 58 (% 73,4) Var: 21 (% 26,6)	19 8	39 13	0,789
Kronik inflamasyon: Hafif: 11 (% 13,9) Orta: 44 (% 55,7) Ağır: 24 (% 30,4)	3 16 8	8 28 16	0,846
İnvazyon paterni İtici : 32 (% 40,5) Tek hücre: 47 (% 59,5)	10 17	22 30	0,810
Rekürrens/tümöre bağlı ölüm Yok: 52 (% 65,8) Var: 18 (% 22,8) Veri yok:9 (% 11,4)	19 6 -	33 12 -	1,000

Tablo 14. Klinikopatolojik özellikler ve p53 ekspresyonu			
Klinikopatolojik özellikler	p53 ≤10	p53 >10	p
Cinsiyet Erkek: 77 (97,5) Kadın: 2 (%2,5)	36 1	41 1	0,928
Operasyon yaşı (yıl) <61: 40 (%50,6) ≥61: 39 (%49,4)	19 18	21 21	1,000
Tümör yerleşimi Transglottik: 57 (%72,2) Supraglottik: 16 (%20,3) Glottik: 6 (%7,6) Subglottik: 0 (%0)	26 7 4 0	31 9 2 0	0,594
T (tümör) T1: 3 (%3,8) T2: 9 (%11,4) T3: 42 (%53,2) T4: 25 (%31,6)	3 2 21 11	0 7 21 14	0,119
N (lenf nodu) N0: 50 (%63,3) N1: 13 (%16,5) N2: 16 (%20,3)	22 5 10	28 8 6	0,349
Klinik evre gruplaması (Evre I,II,III,IV) Evre I: 2 (%2,5) Evre II: 7 (%8,9) Evre III: 34 (%43) Evre IV: 36 (%45,6)	2 1 17 17	0 6 17 19	0,146
Klinik evre gruplaması (erken, ileri) I-II: 9 (%11,4) III-IV: 70 (%88,6)	3 34	6 36	0,388
Lenf nodu metastazı Yok: 58 (% 73,4) Var: 21 (% 26,6)	25 12	33 9	0,314
Ekstranodal yayılım Yok: 74 (%93,7) Var: 5 (% 6,3)	34 3	40 2	0,542
Histolojik Derece İyi: 24 (% 30,4) Orta: 50 (% 63,3) Az: 5 (% 6,3)	6 28 3	18 22 2	0,036
Tümör çapı (mm) < 30 : 39 (% 49,4) ≥ 30: 40 (50,6)	20 17	19 23	0,502
Tümör derinliği (mm) < 10 : 31 (% 39,2) ≥ 10: 48 (60,8)	16 21	15 27	0,645
Vasküler invazyon Yok: 58 (% 73,4) Var: 21 (% 26,6)	25 12	33 9	0,314
Perinöral invazyon Yok :66 (% 16,5) Var: 13 (% 83,5)	27 10	39 3	0,031
Kartilaj invazyonu Yok: 58 (% 73,4) Var: 21 (% 26,6)	28 9	30 12	0,800
Kronik inflamasyon: Hafif: 11 (% 13,9) Orta: 44 (% 55,7) Ağır: 24 (% 30,4)	6 21 10	5 23 14	0,766
İnvazyon paterni İtici : 32 (% 40,5) Tek hücre: 47 (% 59,5)	13 24	19 23	0,491
Rekürrens/tümöre bağlı ölüm Yok: 52 (% 65,8) Var: 18 (% 22,8) Veri yok:9 (% 11,4)	25 8 -	27 10 -	1,000

Tablo 15. Klinikopatolojik özellikler ve GLUT1 ekspresyonu			
Klinikopatolojik özellikler	GLUT1 < 30	GLUT1 ≥ 30	p
Cinsiyet Erkek: 77 (97,5) Kadın: 2 (%2,5)	43 2	34 0	0,213
Operasyon yaşı (yıl) <61: 40 (%50,6) ≥61: 39 (%49,4)	21 24	19 25	0,498
Tümör yerleşimi Transglottik: 57 (%72,2) Supraglottik: 16 (%20,3) Glottik: 6 (%7,6) Subglottik: 0 (%0)	29 10 6 0	28 6 0 0	0,061
T (tümör) T1: 3 (%3,8) T2: 9 (%11,4) T3: 42 (%53,2) T4: 25 (%31,6)	3 7 24 11	0 2 18 14	0,134
N (lenf nodu) N0: 50 (%63,3) N1: 13 (%16,5) N2: 16 (%20,3)	28 7 10	22 6 6	0,873
Klinik evre gruplaması (Evre I,II,III,IV) Evre I: 2 (%2,5) Evre II: 7 (%8,9) Evre III: 34 (%43) Evre IV: 36 (%45,6)	2 6 18 19	0 1 16 17	0,226
Klinik evre gruplaması (erken, ileri) I-II: 9 (%11,4) III-IV: 70 (%88,6)	8 37	1 33	0,070
Lenf nodu metastazı Yok: 58 (% 73,4) Var: 21 (% 26,6)	32 13	26 8	0,619
Ekstranodal yayılım Yok: 74 (%93,7) Var: 5 (% 6,3)	43 2	31 3	0,429
Histolojik Derece İyi: 24 (% 30,4) Orta: 50 (% 63,3) Az: 5 (% 6,3)	17 24 4	7 26 1	0,100
Tümör çapı (mm) < 30 : 39 (% 49,4) ≥ 30: 40 (50,6)	23 22	16 18	0,821
Tümör derinliği (mm) < 10 : 31 (% 39,2) ≥ 10: 48 (60,8)	19 26	12 22	0,643
Vasküler invazyon Yok: 58 (% 73,4) Var: 21 (% 26,6)	33 12	25 9	1,000
Perinöral invazyon Yok :66 (% 16,5) Var: 13 (% 83,5)	38 7	28 6	1,000
Kartilaj invazyonu Yok: 58 (% 73,4) Var: 21 (% 26,6)	37 8	21 13	0,70
Kronik inflamasyon: Hafif: 11 (% 13,9) Orta: 44 (% 55,7) Ağır: 24 (% 30,4)	5 24 16	6 20 8	0,445
İnvazyon paterni İtici : 32 (% 40,5) Tek hücre: 47 (% 59,5)	18 27	14 20	1,000
Rekürrens/tümöre bağlı ölüm Yok: 52 (% 65,8) Var: 18 (% 22,8) Veri yok:9 (% 11,4)	29 10 -	23 8 -	1,000

Tablo 16. Klinikopatolojik özellikler ve GLUT3 ekspresyonu			
Klinikopatolojik özellikler	GLU3 negatif	GLUT3 pozitif	p
Cinsiyet Erkek: 77 (97,5) Kadın: 2 (%2,5)	50 2	27 0	0,302
Operasyon yaşı (yıl) <61: 40 (%50,6) ≥61: 39 (%49,4)	21 31	19 8	0,017
Tümör yerleşimi Transglottik: 57 (%72,2) Supraglottik: 16 (%20,3) Glottik: 6 (%7,6) Subglottik: 0 (%0)	37 11 4 0	20 5 2 0	0,959
T (tümör) T1: 3 (%3,8) T2: 9 (%11,4) T3: 42 (%53,2) T4: 25 (%31,6)	2 7 29 14	1 2 13 11	0,606
N (lenf nodu) N0: 50 (%63,3) N1: 13 (%16,5) N2: 16 (%20,3)	33 6 13	17 7 3	0,140
Klinik evre gruplaması (Evre I,II,III,IV) Evre I: 2 (%2,5) Evre II: 7 (%8,9) Evre III: 34 (%43) Evre IV: 36 (%45,6)	1 6 20 25	1 1 14 11	0,493
Klinik evre gruplaması (erken, ileri) I-II: 9 (%11,4) III-IV: 70 (%88,6)	7 45	2 25	0,711
Lenf nodu metastazı Yok: 58 (% 73,4) Var: 21 (% 26,6)	37 15	21 6	0,600
Ekstranodal yayılım Yok: 74 (%93,7) Var: 5 (% 6,3)	49 3	25 2	0,777
Histolojik Derece İyi: 24 (% 30,4) Orta: 50 (% 63,3) Az: 5 (% 6,3)	15 34 3	9 16 2	0,861
Tümör çapı (mm) < 30 : 39 (% 49,4) ≥ 30: 40 (50,6)	24 28	15 12	0,482
Tümör derinliği (mm) < 10 : 31 (% 39,2) ≥ 10: 48 (60,8)	21 31	10 17	0,813
Vasküler invazyon Yok: 58 (% 73,4) Var: 21 (% 26,6)	39 13	19 8	0,789
Perinöral invazyon Yok :66 (% 16,5) Var: 13 (% 83,5)	43 9	23 4	1,000
Kartilaj invazyonu Yok: 58 (% 73,4) Var: 21 (% 26,6)	40 12	18 9	0,422
Kronik inflamasyon: Hafif: 11 (% 13,9) Orta: 44 (% 55,7) Ağır: 24 (% 30,4)	5 29 18	6 15 6	0,231
İnvazyon paterni İtici : 32 (% 40,5) Tek hücre: 47 (% 59,5)	23 29	9 18	0,469
Rekürrens/tümöre bağlı ölüm Yok: 52 (% 65,8) Var: 18 (% 22,8) Veri yok:9 (% 11,4)	33 14 -	19 4 -	0,384



Tablo 17. İmmünohistokimyasal bulgular				
Sayı	Ki-67 (%)	p53 (%)	GLUT1*	GLUT3 +/-
1.	16	1	1	-
2.	7	72	3	-
3.	14	0	2	-
4.	62	1	1	-
5.	18	26	1	-
6.	23	60	2	-
7.	7	77	1	-
8.	37	1	1	-
9.	16	5	1	-
10.	38	0	1	+
11.	22	3	1	-
12.	24	42	2	-
13.	11	65	2	+
14.	6	78	3	-
15.	33	0	2	-
16.	20	1	1	-
17.	22	48	1	-
18.	31	85	1	+
19.	43	96	0	-
20.	14	0	2	-
21.	6	0	1	-
22.	13	0	3	-
23.	32	1	1	-
24.	5	28	1	-
25.	3	36	2	-
26.	54	0	2	+
27.	34	38	1	+
28.	15	6	1	-
29.	12	0	2	+
30.	13	0	1	-
31.	33	44	0	+
32.	12	67	1	-
33.	24	42	1	-
34.	8	72	2	-
35.	7	8	1	+
36.	35	3	0	-
37.	24	1	3	+
38.	5	1	1	+
39.	48	0	0	-
40.	32	96	1	-
41.	28	21	1	+
42.	83	1	0	-
43.	3	6	2	+
44.	26	1	1	-
45.	5	25	1	-
46.	55	71	1	-
47.	6	42	1	-
48.	28	1	1	+
49.	6	68	1	-
50.	18	0	1	-
51.	35	95	2	-
52.	7	2	1	+
53.	42	87	2	+
54.	28	12	1	+
55.	9	34	2	+
56.	46	5	1	-
57.	5	63	3	+
58.	6	4	1	+
59.	14	36	1	-
60.	25	44	0	-
61.	26	7	2	-
62.	32	7	2	+
63.	1	0	2	-
64.	5	3	1	+
65.	4	35	1	-
66.	9	25	3	-
67.	8	64	2	+
68.	22	2	3	+
69.	7	90	3	-
70.	24	46	3	+
71.	18	71	2	-

72.	2	23	1	-
73.	4	1	3	-
74.	3	18	2	-
75.	2	16	3	-
76.	35	22	3	+
77.	36	64	2	+
78.	34	93	3	+
79.	25	84	1	-

\*GLUT1 (1: <%30, 2: %30-70, 3: >%70)

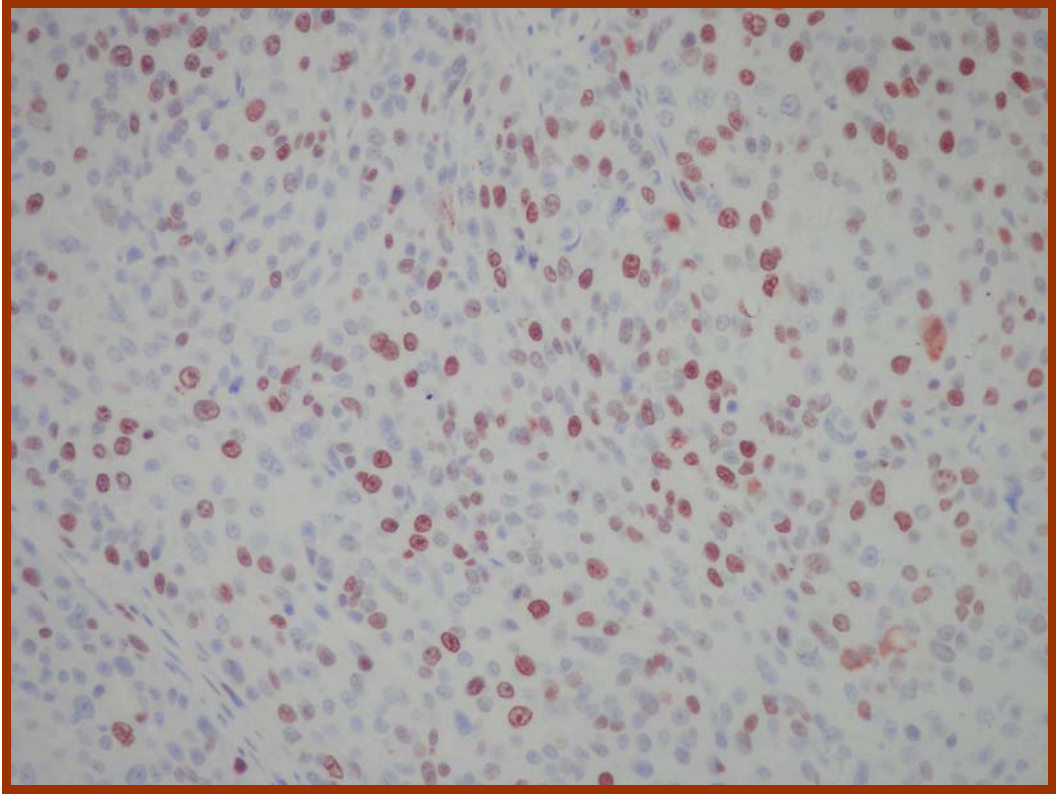
Tablo 18. İmmünohistokimyasal çalışmalar ile hastalısız yaşam süresi arasındaki ilişkiler (Kaplan-Meier, log-rank test)

İmmünohistokimya	Ortalama (ay)	SD	p
Ki-67 ≤%10 >%10	90,451 74,131	7,691 6,411	0,323
p53 ≤%10 >%10	72,105 87,931	6,257 7,532	0,060
GLUT1 <%30 ≥%30	69,761 93,690	5,119 8,636	0,002
GLUT3 negatif pozitif	70,254 97,504	5,583 8,530	0,011

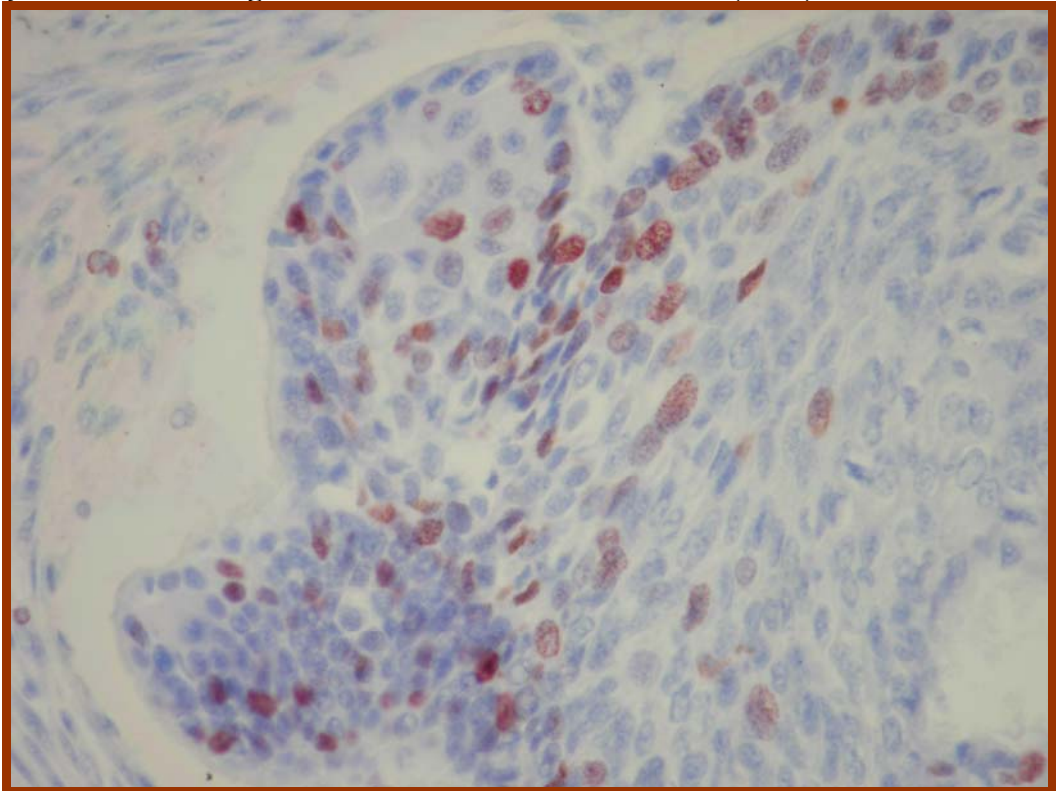
Tablo 19. İmmünohistokimyasal çalışmalar ile toplam yaşam süresi arasındaki ilişkiler (Kaplan-Meier, log-rank test)

İmmünohistokimya	Ortalama (ay)	SD	p
Ki-67 ≤%10 >%10	90,451 74,242	7,691 6,407	0,321
p53 ≤%10 >%10	72,105 88,025	6,257 7,530	0,058
GLUT1 <%30 ≥%30	69,886 93,690	5,105 8,636	0,002
GLUT3 negatif pozitif	70,335 97,677	5,577 8,512	0,011

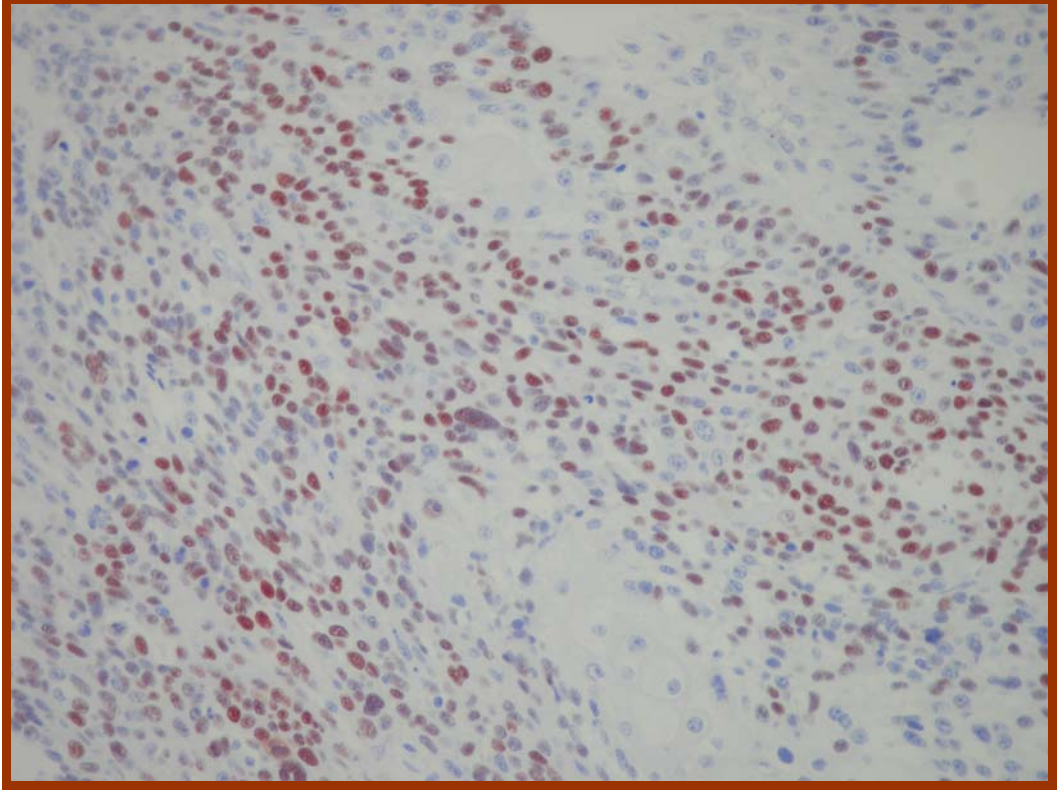
**Şekil 4. LYHK olgusunda Ki-67 immünoreaktivitesi (x200)**



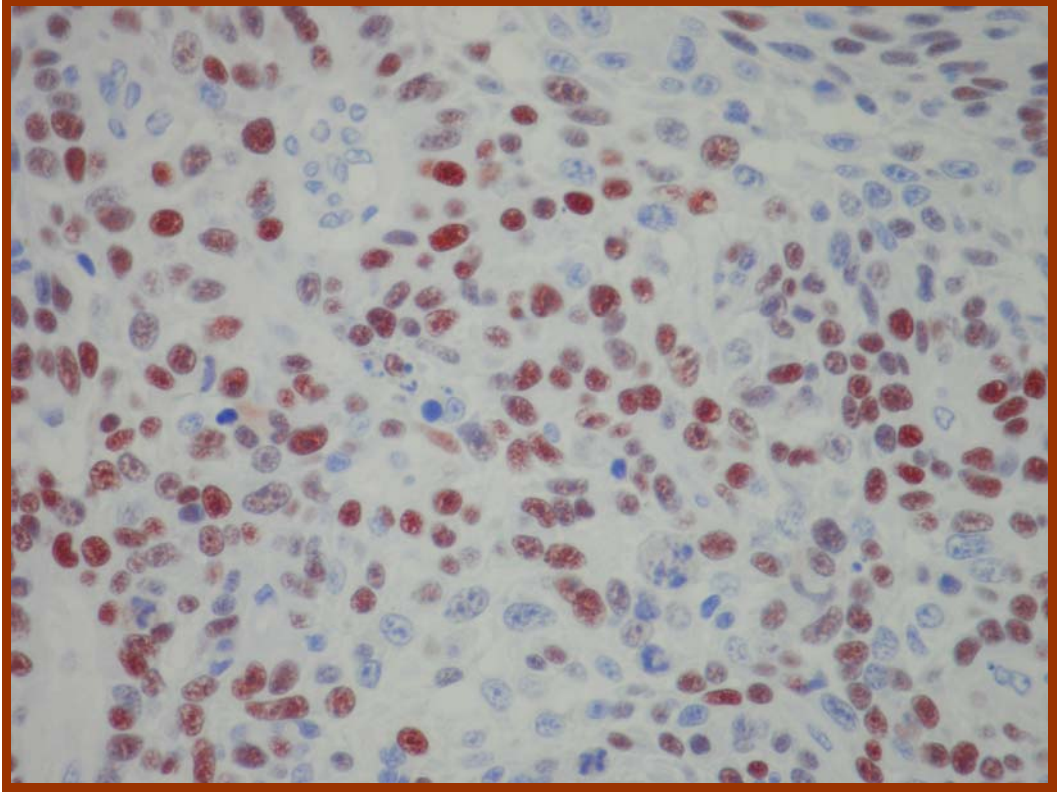
**Şekil 5. LYHK olgusunda Ki-67 immünoreaktivitesi (x400)**



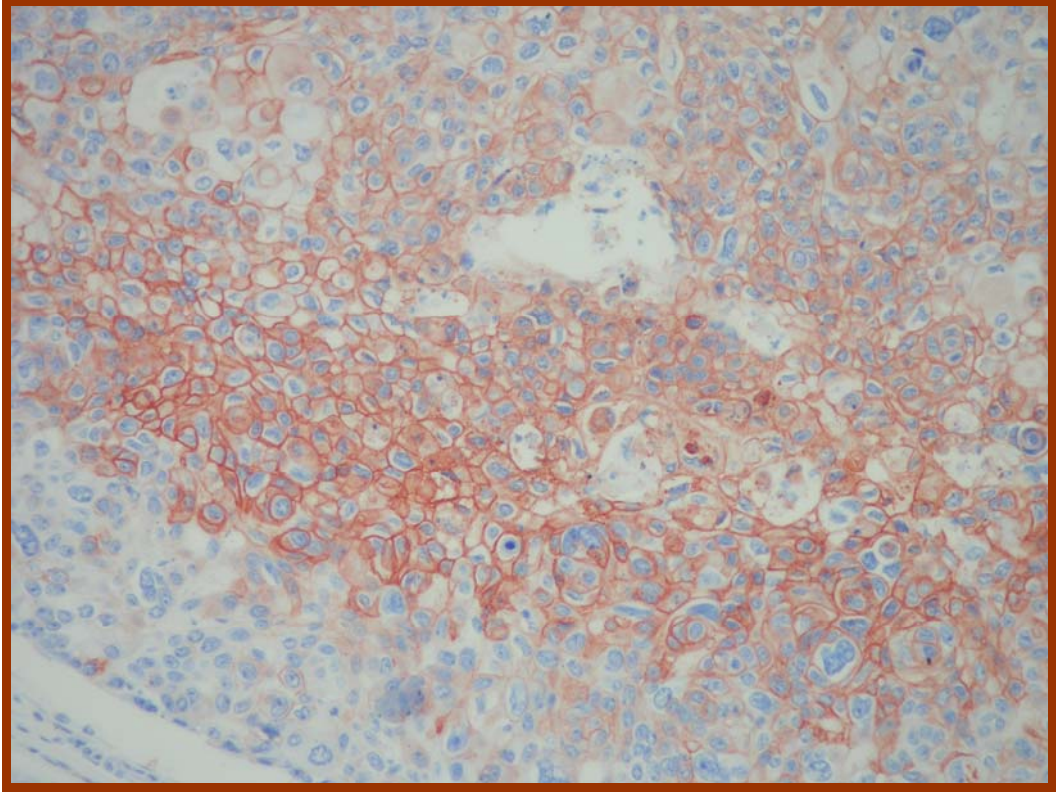
**Şekil 6. LYHK olgusunda p53 immünoreaktivitesi (x200)**



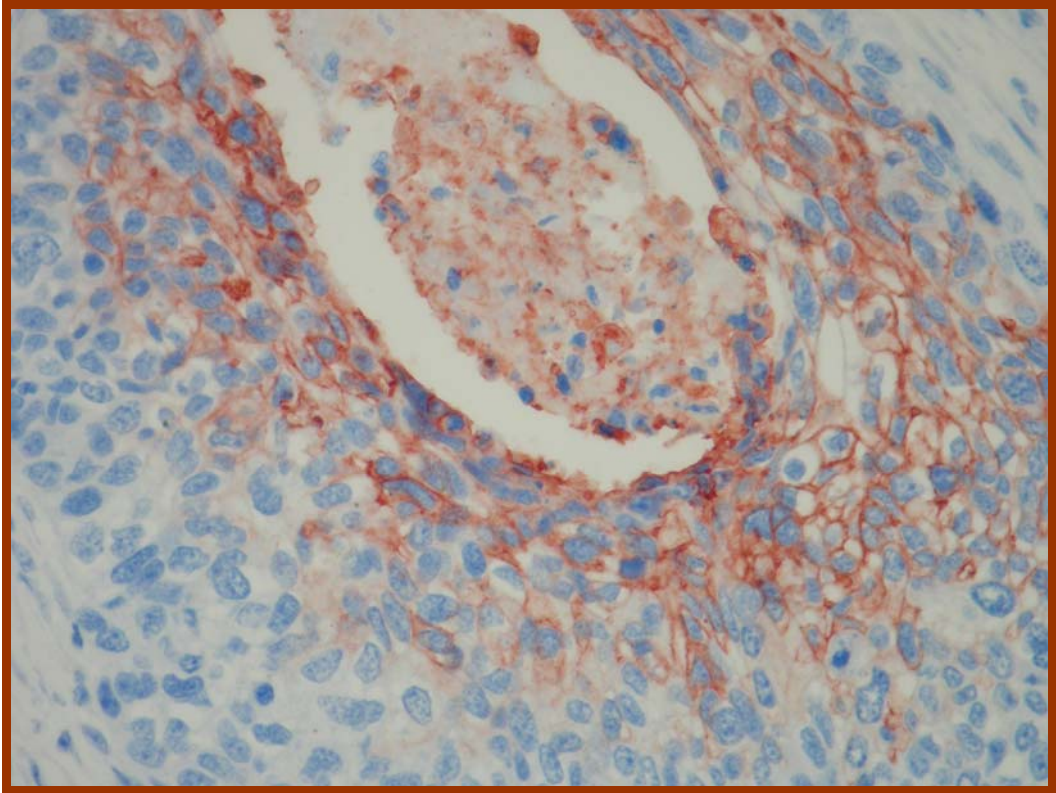
**Şekil 7. LYHK olgusunda p53 immünoreaktivitesi (x400)**



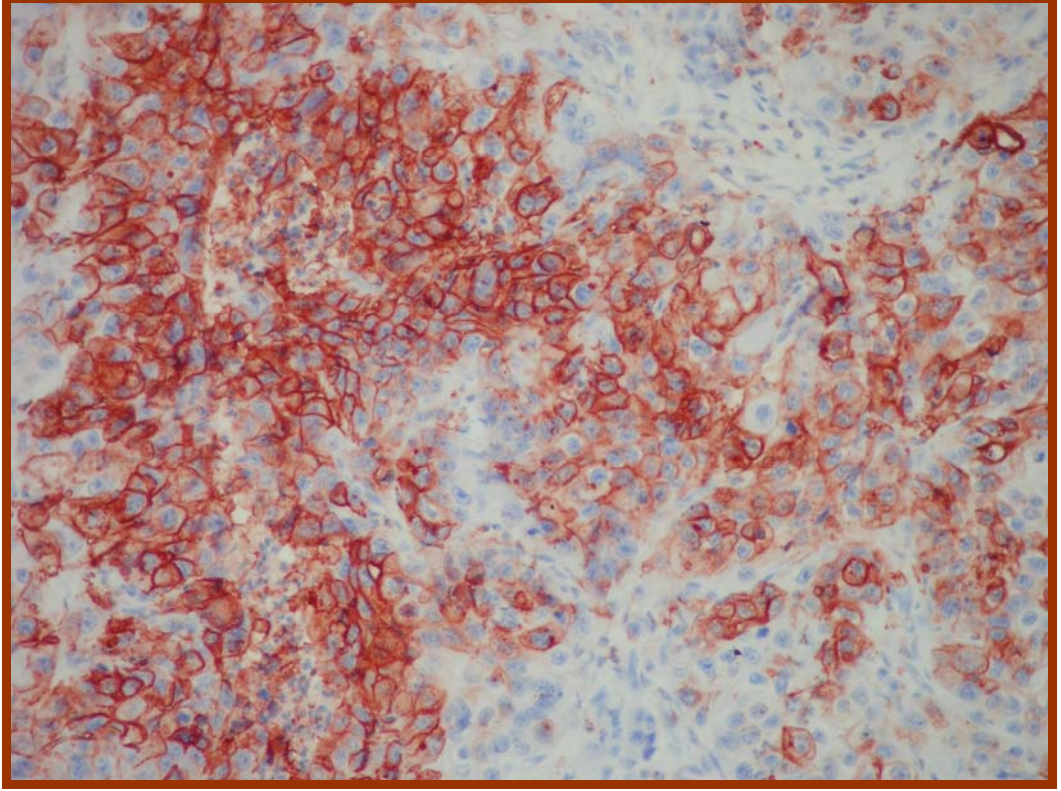
**Şekil 8. LYHK olgusunda GLUT1 immünoreaktivitesi (x200)**



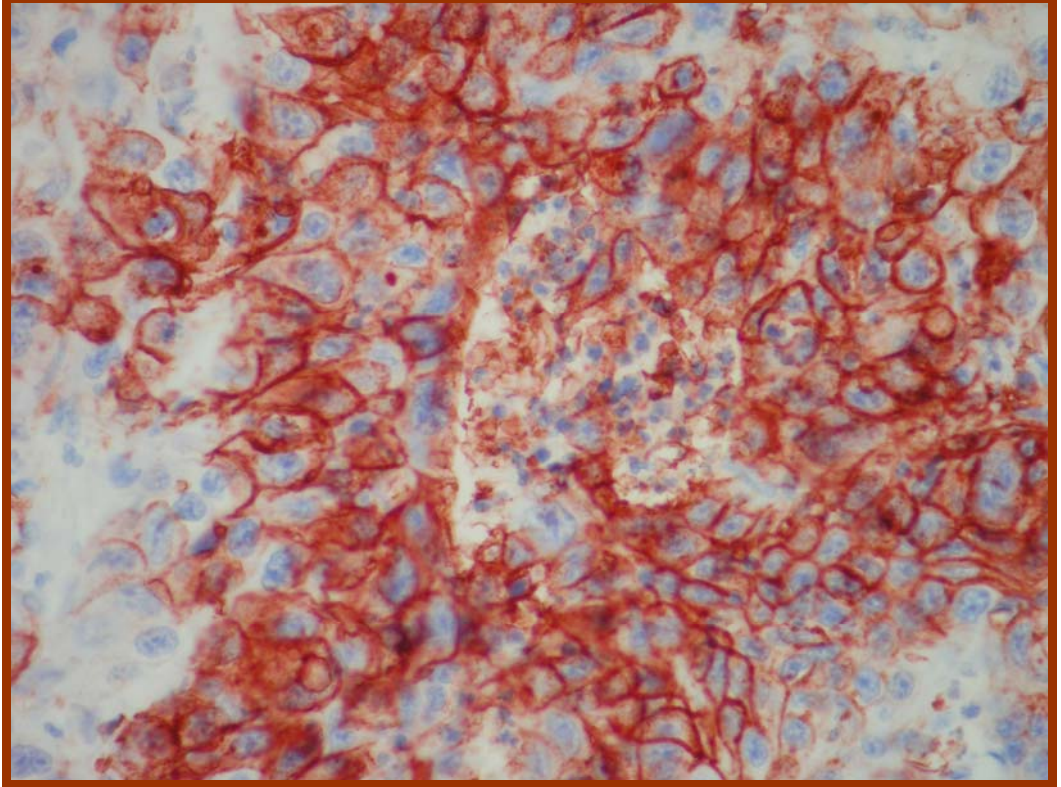
**Şekil 9. LYHK olgusunda GLUT1 immünoreaktivitesi (x400)**



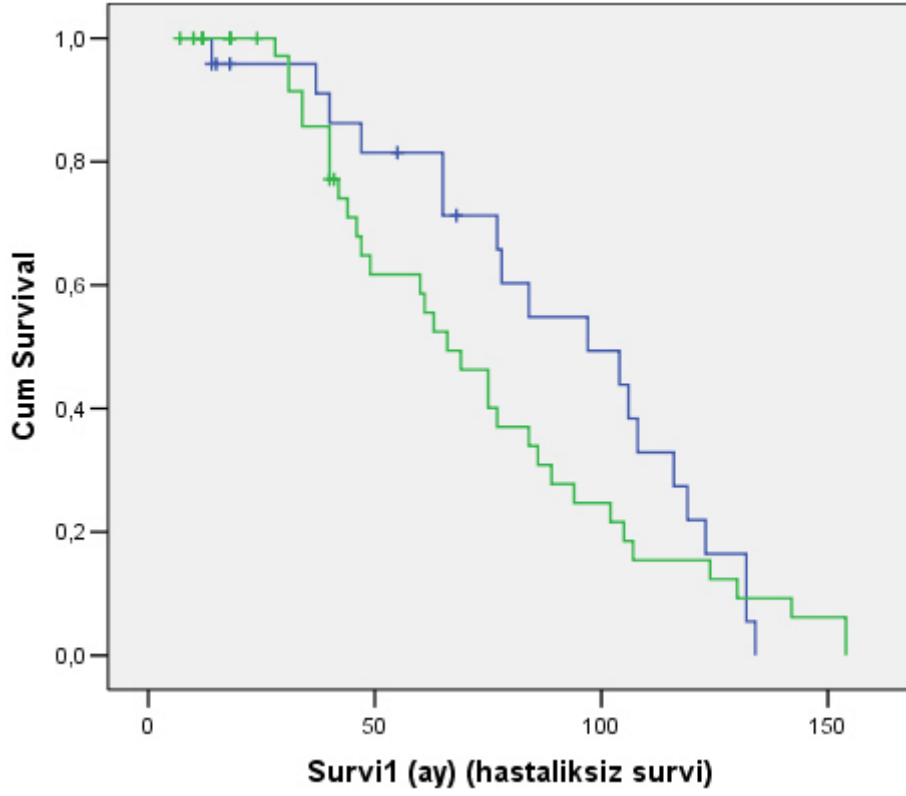
**Şekil 10.LYHK olgusunda GLUT3 immünoreaktivitesi (x200)**



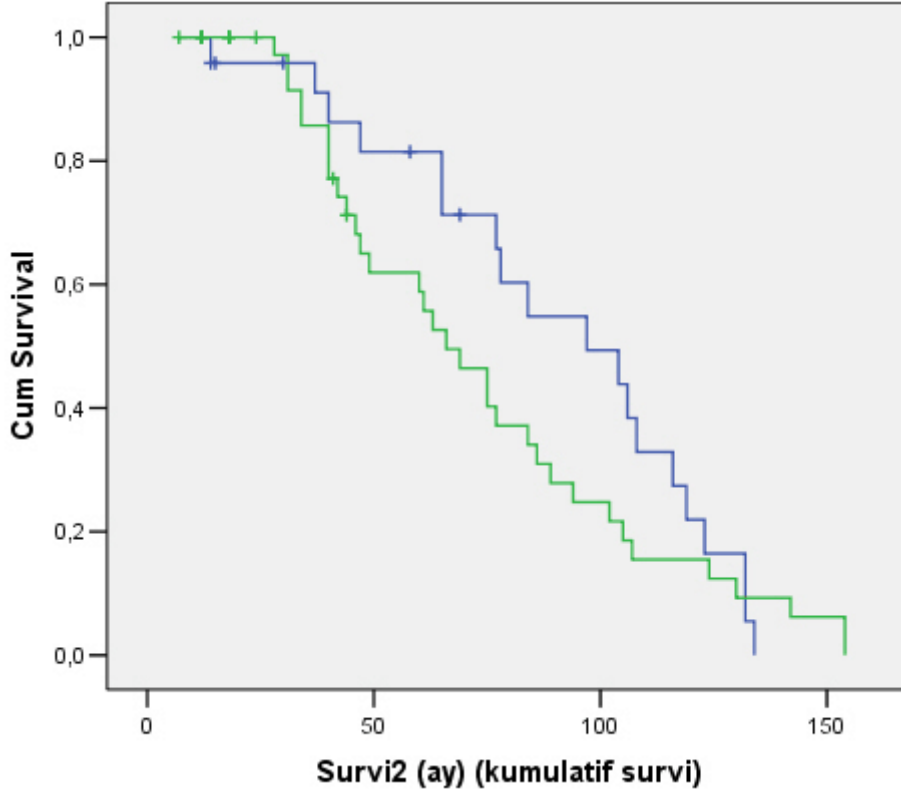
**Şekil 11.LYHK olgusunda GLUT3 immünoreaktivitesi (x400)**



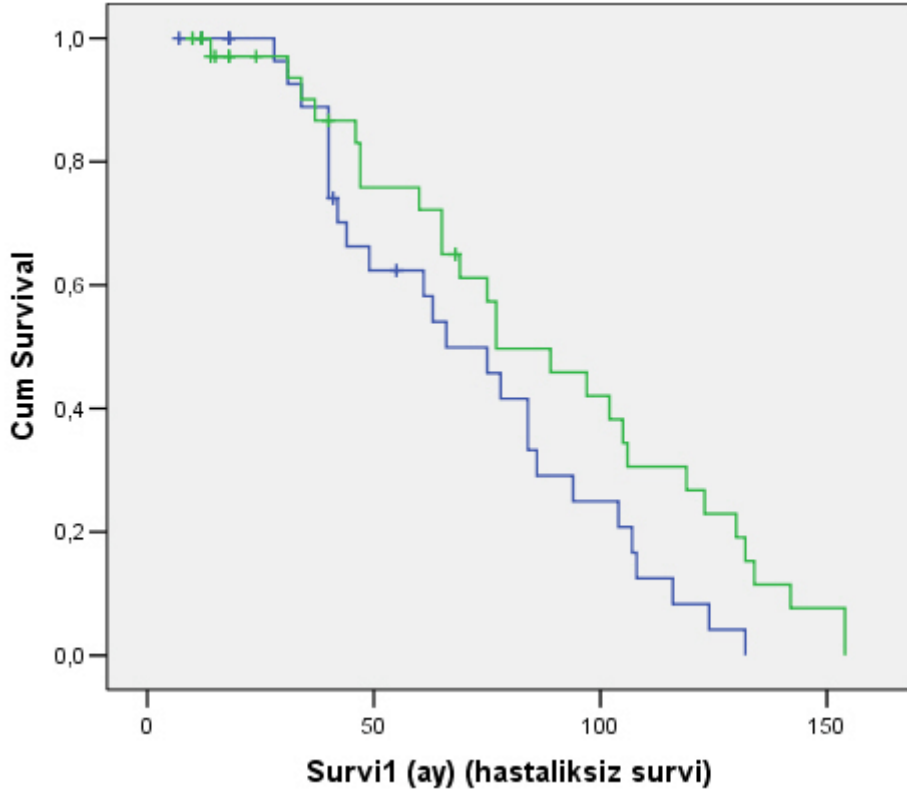
**Grafik 2.** Grafik 2. Ki-67 PI ve hastaliksiz sağ kalım ilişkisi (Kaplan-Meier, log-rank test): mavi çizgi Ki-67 ≤ %10, yeşil çizgi Ki-67 > %10.



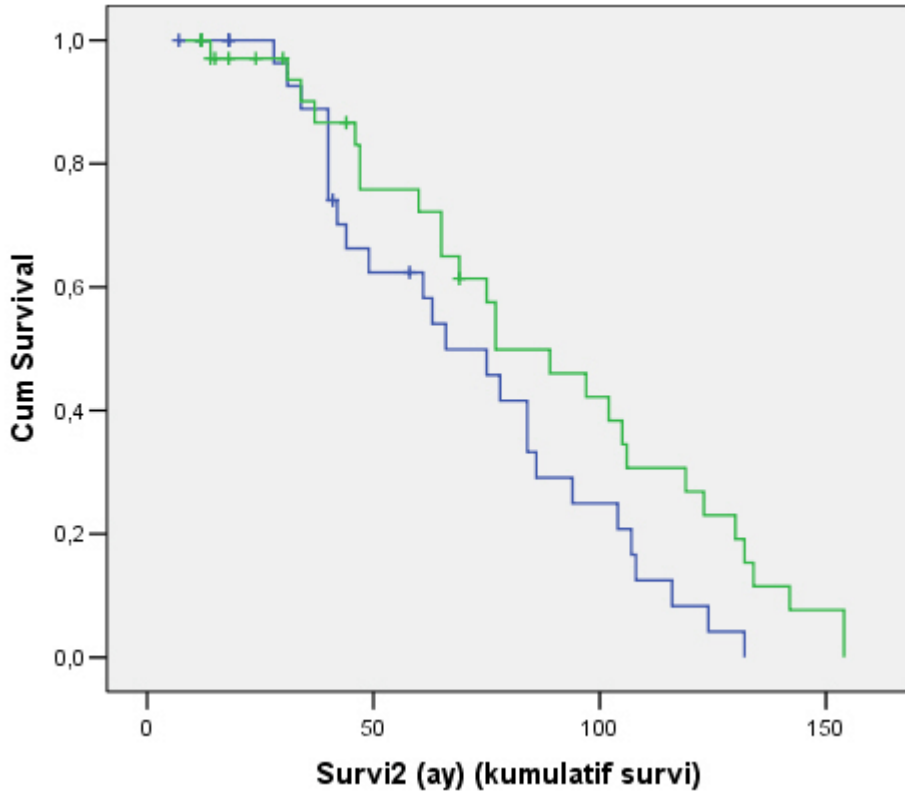
**Grafik 2.** Ki-67 PI ve toplam sağ kalım ilişkisi (Kaplan-Meier, log-rank test): mavi çizgi Ki-67 ≤ %10, yeşil çizgi Ki-67 > %10.



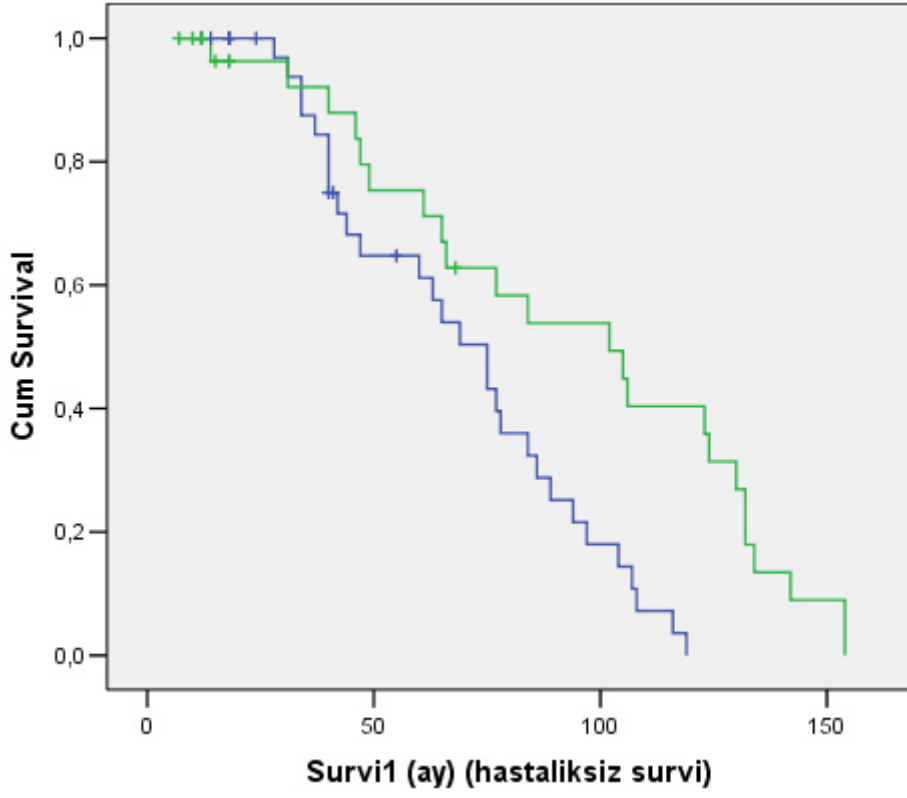
**Grafik 3.** p53 indeksi ve hastaliksız sağ kalım ilişkisi (Kaplan-Meier, log-rank test): mavi çizgi p53 ≤ %10, yeşil çizgi p53 > %10.



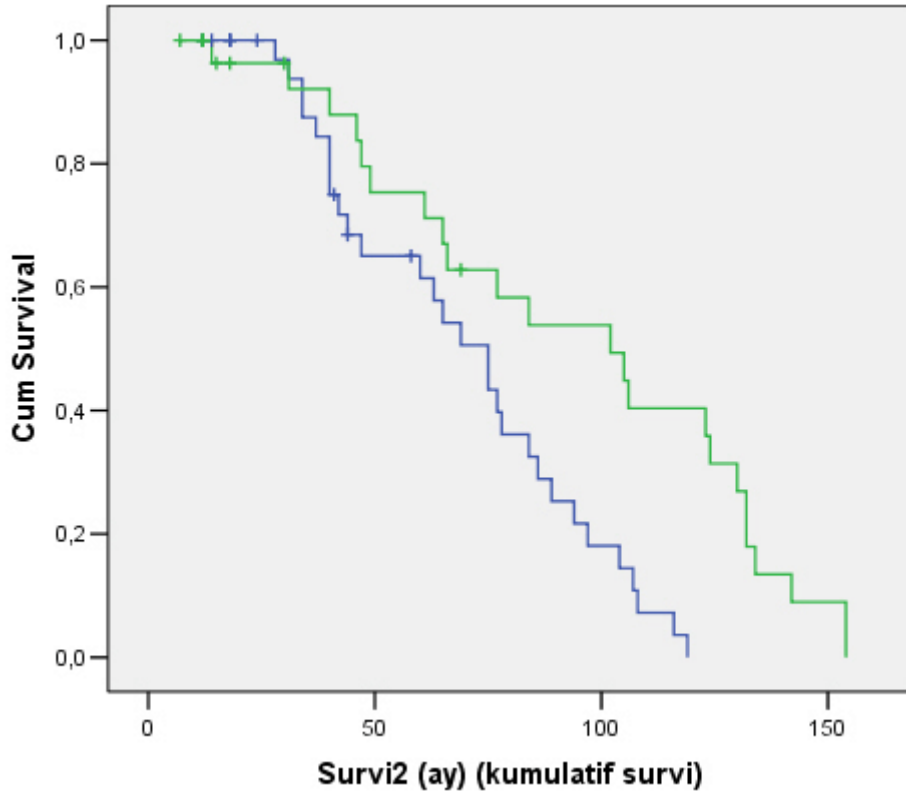
**Grafik 4.** p53 indeksi ve toplam sağ kalım ilişkisi (Kaplan-Meier, log-rank test): mavi çizgi p53 ≤ %10, yeşil çizgi p53 > %10.



**Grafik 5.** GLUT1 ekspresyonu ve hastaliksiz sağ kalım ilişkisi (Kaplan-Meier, log-rank test): mavi çizgi GLUT1<%30, yeşil çizgi GLUT1≥%30.

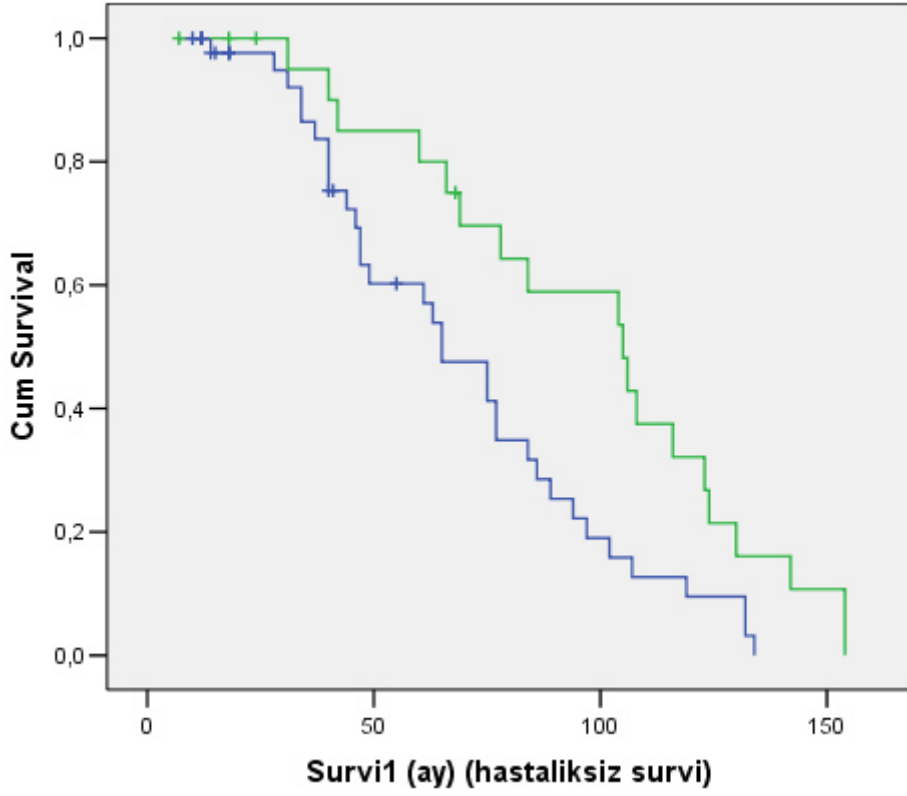


**Grafik 6.** GLUT1 ekspresyonu ve toplam sağ kalım ilişkisi (Kaplan-Meier, log-rank test): mavi çizgi GLUT1<%30, yeşil çizgi GLUT1≥%30.

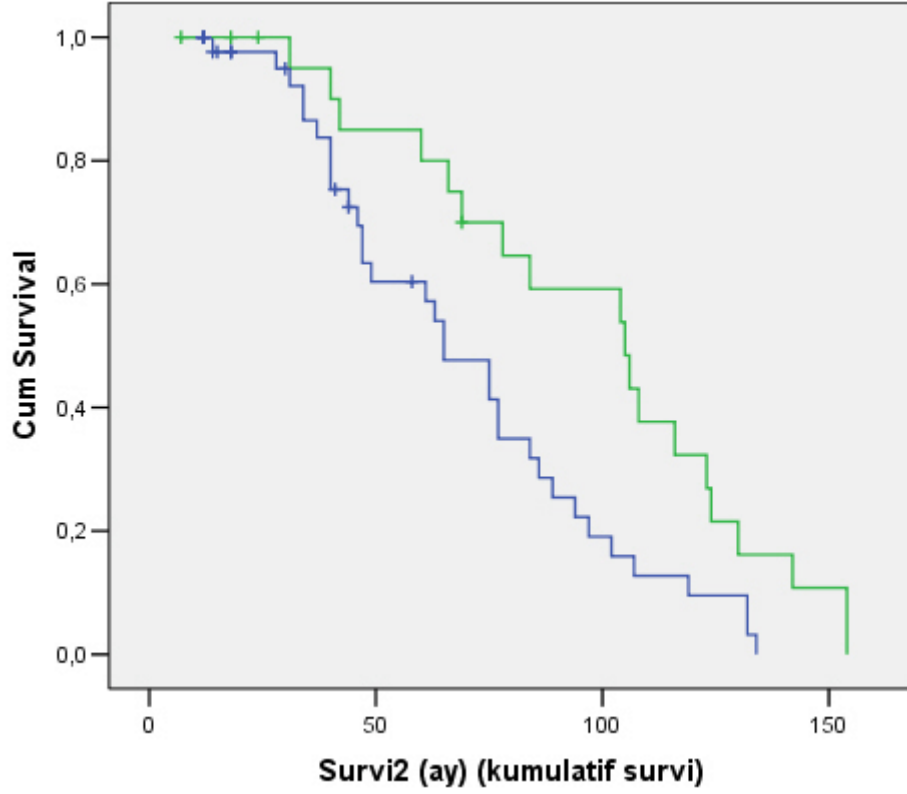




**Grafik 7.** GLUT3 ekspresyonu ve hastaliksız sağ kalım ilişkisi (Kaplan-Meier, log-rank test): mavi çizgi GLUT3 negatif, yeşil çizgi GLUT3 pozitif.



**Grafik 8.** GLUT3 ekspresyonu ve hastaliksız sağ kalım ilişkisi (Kaplan-Meier, log-rank test): mavi çizgi GLUT3 negatif, yeşil çizgi GLUT3 pozitif.



## 5. TARTIŞMA

Cilt tümörleri hariç tutulduğu takdirde larinks kanseri en sık rastlanan baş boyun bölgesi tümörüdür. Çoğunlukla hayatın beşinci ve yedinci dekatları arasında görülür. Laringial kanserlerin % 90'dan fazlasını YHK'lar oluşturur. LYHK'larda aynı evre ve ortak klinik özelliklere sahip olmalarına rağmen olguların yaşam süreleri farklı olmaktadır. Bu nedenle konvansiyonel klinikopatolojik özelliklere ek olarak, tümörlerin biyolojik davranışını belirlemeye yönelik prognostik faktörler ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir (1-3,7).

İlk kez 1983'de Gerdes ve arkadaşları tarafından, hücre siklus bağımlı nükleer proliferasyon belirleyicisi olarak tanımlan Ki-67, hücre siklusunun G0 dışında kalan G1, G2, M ve S fazlarında eksprese edilir. Hücre proliferasyonunu gösteren Ki-67 nükleer immünoaktivitesi ile tümör dokusundaki mitoz sayısı arasında iyi bir korelasyon vardır. Artmış Ki-67 PI birçok kanserde bağımsız bir prognostik değere sahiptir (2,4,5,71). Pich ve arkadaşları, standart hale gelmiş metodlar ile değerlendirilirler ise, proliferatif aktivitenin, baş ve boyun tümörlerinde ucuz ve güvenilir bir prognostik etken olarak dikkate alınabileceğini belirtmişlerdir (73) .

p53 proteini, DNA hasarlandığı zaman, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurup hücrenin hasarlanmış DNA'sını tamir etmesi için ona zaman kazandıran bir tümör süpressör gen ürünü proteindir. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozisi indükler. p53 mutasyonu olduğunda defektif DNA tamiri ve selektif büyümenin kazanılması, tümör oluşumu ve progresyonu ile sonuçlanır. p53, birçok kanser türünde çalışılmış olup mutant formlarının eksprese olduğunun saptanması genellikle kötü prognoz göstergesi olarak görülmektedir (2,4,6,74,75).

Günümüzde LYHK'lerde hücre proliferasyonunun (Ki-67) ve p53 ekspresyonunun prognozadaki önemi tartışmalıdır, çünkü yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Açıklan ve arkadaşları Ki-67 ekspresyonunun klinik faktörler, histopatolojik derece ve prognozla ilişkisini araştırdıkları 63 LYHK olgusunu kapsayan çalışmalarında yüksek Ki-67 PI'nin yaş, T evresi, lenf nodu metastazı, rekürrens artışı ve kısa sağ kalım süresi arasında anlamlı korelasyon olduğunu göstermişler. Aynı çalışmada tümör lokalizasyonu ve histopatolojik derece ile Ki-67 PI arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir (8). Fumic-Dunkic ve arkadaşları, LYHK nedeni ile cerrahi geçirmiş 48 hastayı içeren çalışmalarında yüksek Ki-67 PI ile TNM evrelemesi arasında bir korelasyon olduğuna işaret etmişlerdir (9). Liu ve arkadaşlarının 59 serilik larinks ve hipofarenks YHK'ü üzerinde yaptıkları araştırmada Ki-67 PI lenf nodu metastazı gösteren lezyonlarda daha yüksek oranda bulunmuş, yüksek Ki-67 PI'nin T evresi ve tümör dediferansiasyonu ile korele, hastaliksız sağ kalım ile ters orantılı olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada p53 ekspresyonu ile klinikopatolojik veriler arasında anlamlı bir ilişki saptanmamış ve prognostik değeri olmadığı belirtilmiştir (10). Rodriguez Tojo ve arkadaşlarının 11 LYHK bazaloid varyant vakası üzerinde yaptıkları çalışmada 81.8% oranında yüksek p53 (>%10); %72.7 oranında da yüksek Ki-67 (>%50) ekspresyonu varlığını göstermişlerdir. Yüksek Ki-67 ve p53 ekspresyonların bu varyantın kötü olan prognozu ile ilişkili olabileceğine işaret etmişlerdir (11). Sittel ve arkadaşları transoral lazer cerrahisi ile tedavi edilen ve rekürrens gelişen hastalarda Ki-67 PI yüksekliğini anlamlı bulmuşlar ancak p53 ekspresyonu ile rekürrens arasında bir ilişki olmadığını vurgulamışlardır (12). Narayana ve arkadaşları, sadece radyoterapi ile tedavi edilmiş T1 glottik karsinomlu hastalarda yaptıkları araştırmada p53 ekspresyonu gösteren olgularda lokal rekürrens oranının daha fazla olduğunu göstermişlerdir (14).

Yukarda özetlenen araştırmaların aksine diğer bazı çalışmalarda ise Ki-67 ile p53 ekspresyonlarının prognostik önemi olmadığı belirtilmiştir. Teppo ve arkadaşlarının 100 LYHK olgusunda yaptıkları çalışmada ileri evre tümör, supraglottik lokalizasyon ve yüksek apoptotik indeksin sağ kalım süresini olumsuz etkilediğini göstermişler ancak Ki-67 PI ile p53 ekspresyonlarının surviyi olumsuz etkilemediğini belirtmişlerdir (16). Çallı ve arkadaşları, 37 LYHK olgusunda yaptıkları çalışmada Ki-67 PI ile p53 ekspresyonları ile klinikopatolojik parametreler ve survi arasında anlamlı ilişki görmemişlerdir (7). Lera ve arkadaşları ise LYHK ogularında klinikopatolojik özellikler ile Ki-67 PI ve p53 ekspresyonları arasında ilişki görmemişler ancak yüksek Ki-67 PI

ne sahip olgularda survinin daha kısa olduğunu belirtmişlerdir. p53'ün surviyi etkilemediğini göstermişlerdir (15). Hirvikoski ve arkadaşları da benzer şekilde Ki-67 PI ve p53 ile survi arasında anlamlı bir korelasyon ortaya koymamışlardır (13).

Bizim çalışmamızda ise demografik ve klinikopatolojik veriler ile Ki-67 PI arasında Chi-square ( $\chi^2$ ) testi ile yapılan karşılaştırmalarda tümör çapı 30 mm ve üzerinde olan olgularda Ki-67 PI'nin de arttığına dair ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0,023$ ). Bazı çalışmalarda tümör boyutu ile lokal rekürrens arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (57,58). Çalışmamızda tümörlerin histolojik dereceleri ile Ki-67 PI %10'un üzerindeki olgular arasında iyi:%62,5, orta:%66, az:%80 şeklinde oransal bir artış mevcut olmasına rağmen bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. İnvazyon derinliğinin tümörün lenf nodu yayılımını ve sağ kalım oranını etkileyen bir özellik olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (64-67). Bizim olgularda tümör kalınlığındaki artış ile Ki-67 PI artışı arasında oransal bir ilişki olmasına rağmen bu ilişki anlamlı değildi ( $p=0,145$ ). Çalışmamızda  $\chi^2$  testi ile yapılan karşılaştırmalarda, Ki-67 PI ile diğer klinikopatolojik özellikler olan cinsiyet, operasyon yaşı, tümör lokalizasyonu, T (tümör), N (lenf nodu), klinik evre gruplaması, lenf nodu metastazı, ektranodal yayılım, vasküler invazyon, perinöral invazyon, kartilaj invazyonu, isterstisyel kronik inflamasyon, invazyon paterni, tümör nüksü/tümöre bağlı ölüm arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı.

p53 ile demografik ve klinikopatolojik verilerimiz arasında  $\chi^2$  testi uygulayarak yaptığımız karşılaştırmalarda literatürdeki önceki yayınların aksine yüksek p53 ekspresyonu ile bazı iyi prognoz göstergeleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edildi. Histolojik derece, klinik evrelemeden bağımsız bir prognostik parametre olup nodal/uzak metastaz ve rekürrens oranları az diferansiye tümörlerde, iyi diferansiye olanlara göre anlamlı şekilde daha yüksektir (1-3,53-57). Bizim çalışmamızda iyi diferansiye tümörlerde az diferansiye olanlara göre p53 pozitifliği ( $p53>\%10$ ) anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p=0,036$ ). Perinöral invazyon varlığı, lokal rekürrens ve servikal lenf nodu metastazında artışa neden olabilen kötü bir prognostik parametre olarak kabul edilmektedir (67-70). Bizim çalışmamızda perinöral invazyon görülen olgularda p53 ekspresyonunda anlamlı bir azalma tespit edildi ( $p=0,031$ ). Ayrıca düşük p53 ekspresyonu gösteren olgularda lenf nodu metastazının daha fazla olduğunu tespit etmemize rağmen bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=0,314$ ). Diğer klinikopatolojik özellikler olan cinsiyet, operasyon yaşı, tümör lokalizasyonu, T (tümör), klinik evre gruplaması, tümör derinliği, tümör kalınlığı, ektranodal yayılım,

vasküler invazyon, kartilaj invazyonu, isterstisyel kronik inflamasyon, invazyon paterni, tümör nüksü/tümöre bağlı ölüm arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı.

GLUT proteinleri glukozun enerjiden bağımsız olarak hücre dışından hücre içine alınmasında rol oynayan membran proteinleridir. GLUT1 özellikle eritrositlerde ve beyin dokusunda olmak üzere birçok dokuda değişen düzeylerde bulunur ve bazal glukoz uptake'inden sorumlu olduğuna inanılır. GLUT3 esas olarak nöronlarda eksprese edilir. Malign hücrelerin hızlanmış metabolizmaya, yüksek glukoz gereksinimine ve artmış glukoz uptake'ine sahip oldukları bilinmektedir. Malign hücrelerdeki artmış ATP ihtiyacı ve bunu karşılamak üzere hücre içine glukoz girişinin olması, GLUT proteinlerinin artmış ekspresyonu ile sağlanır Öte yandan tümör hipoksisine bağlı olarak artış gösteren faktör-1-alfa'nın, Glut-1 reseptörlerini up-regüle etmesi de glukoz kullanımını arttıran etmenlerden birisi olarak gösterilmiştir (17-19).

Literatürde az sayıda çalışmada baş ve boyun bölgesi YHK'larında immünohistokimyasal olarak GLUT1 ve GLUT3 overekspresyonları gösterilmiş, artmış ekspresyonların agresif biyolojik davranışla korele olduğu belirtilmiştir (20-25).

Oliver ve arkadaşları 54 olguluk oral YHK olgusunda yaptıkları çalışmada GLUT1 ekspresyonu ile lokal rekürrens, bölgesel lenf nodu metastazı ve hastaliksız survi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Bu çalışmada yoğun GLUT1 boyanması ile bölgesel lenf nodu metastazı ve tümöre bağlı ölüm arasında anlamlı korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada tümördeki nekrotik alanlardaki yoğun boyanmaya dikkat çekmişler, bazı alanlarda yüzeysel epitel tabakasında bazı alanlarda ise bazal tabakada daha fazla boyanma olduğunu gözlemlemişlerdir (20). Kato ve arkadaşları 98 özofagus YHK cerrahi spesmenini kapsayan çalışmalarında GLUT1 pozitifliği (>%30) ile TNM evresi ve patolojik evre arasında anlamlı bir korelasyon olduğunu göstermişler, GLUT1 pozitif tümörlerde survinin belirgin olarak daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada GLUT1 ekspresyonu ile cinsiyet, yaş, lokalizasyon, histolojik derece, lenfovasküler invazyon arasında ilişki tespit edilmemiştir. Normal özofagus yassı epitelinde bazal tabakada boyanma olduğunu ve yoğun boyanma gösteren kanser hücrelerinde ise membranöz boyanma yanında bazen sitoplazmik boyanma da görüldüğüne işaret etmişlerdir (25). Aynı araştırmacılar diğer bir çalışmalarında pozitron emisyon tomografisi (PET) yöntemi ile florodeoksiglukoz (FDG) uptake'inin GLUT1 ekspresyonuyla olan korelasyonunu incelemişlerdir. Dolaşımdan glukoz taşıyıcı proteinler aracılığı ile hücre içerisine transport edilen FDG vücutta glukoz ile oldukça benzer biyodanılım gösterir. PET, bir lezyonun artmış FDG

aktivitesine sahip olup olmadığını gösteren ve malign/benign dokuların ayırımını değerlendirmede kullanılan bir yöntemdir. Yaptıkları çalışmada özofagus YHK'unda FDG uptake' i ile GLUT1 immünoaktivitesi arasında korelasyon bulmuşlar ve her iki ölçümdeki yüksek değerlerin kötü prognoz ile ilişkili olduğunu açıklamışlardır (22). Kunkel ve arkadaşları, 118 oral YHK olgusunda yaptıkları çalışmada yüksek GLUT1 ekspresyonu (>%50) ve yüksek FDG uptake'i gösteren olguların daha kısa surviyeye sahip olduklarını ve prognoz açısından negatif bir belirteç olduğunu göstermişlerdir (23). Mineta ve arkadaşları, 99 hipofarenks karsinomu olgusunda GLUT1 ekspresyonu ile yaş, cinsiyet, lokalizasyon, histolojik derece, tümör boyutu, lenf nodu durumu ve tümör evresi arasında korelasyon tespit etmemişler fakat aynı çalışmada kuvvetli GLUT1 pozitifliği olan hastalarda (>%70) hastaliksız yaşam süresinin daha kısa olduğunu göstermişler ve GLUT1 pozitifliğinin bağımsız bir kötü prognostik faktör olduğunu belirtmişlerdir (24). LYHK'larda yapılan 48 vakalık bir araştırmada ise GLUT1 ekspresyonu oranlarının surviyi etkilemediği ancak GLUT3 aşırı ekspresyonunun kötü prognoz belirteci olduğunu göstermişlerdir (26).

Bizim çalışmamızda ise demografik, klinik ve patolojik veriler ile GLUT1 arasında Chi-square ( $\chi^2$ ) testi ile yapılan karşılaştırmalarda T1'den T4 tümörlere doğru gidildikçe GLUT1 ekspresyonu oranı artmakla beraber ilişki anlamı değildi ( $p=0,134$ ). Glottik yerleşimli 6 olgunun hiçbiri GLUT1 ile yoğun boyanma göstermezken, supraglottik tümörlerin %37,5'i, transglottik tümörlerin %49,1'i yoğun boyanma göstermiştir. Kartilaj invazyonu gösteren toplam 21 olgunun 13 (%61,9) tanesi GLUT1 ile yoğun boyanma gösterirken bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,070$ ). Diğer klinikopatolojik özellikler olan cinsiyet, operasyon yaşı, N(lenf nodu), tümör derinliği, tümör kalınlığı, lenf nodu metastazı, ektranodal yayılım, histolojik derece, vasküler invazyon, perinöral invazyon, isterstisyel kronik inflamasyon, invazyon paterni, tümör nüksü/tümöre bağlı ölüm arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı.

GLUT3 ile olgularımızın 52 (%65,8) tanesi boyanma göstermezken, 27 (%34,2) olgu pozitif boyanmıştır. GLUT3 pozitifliği ile operasyon yaşı arasında negatif bir korelasyon saptandı ( $p=0,017$ ). Diğer klinikopatolojik özellikler olan cinsiyet, T (tümör), N (lenf nodu), tümör derinliği, tümör kalınlığı, lenf nodu metastazı, ektranodal yayılım, histolojik derece, vasküler invazyon, perinöral invazyon, kartilaj invazyonu, isterstisyel kronik inflamasyon, invazyon paterni, tümör nüksü/tümöre bağlı ölüm arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Çalışmamızda Kaplan-Meier metodu ve log-rank testi ile Ki-67 PI için yaptığımız survi analizinde Ki-67 pozitif (>%10) olgularda ortalama hastalıksız sağ kalım süresi 74,131 ay (Grafik 2), ortalama toplam sağ kalım süresi 74,242 ay (Grafik 3) olarak hesaplandı. Ki-67 negatif (≤%10) olgularda ortalama hastalıksız ve toplam sağ kalım sürelerinin 90,451 ay olduğu görüldü. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamakla birlikte (hastalıksız survide p=0,323, toplam survide p=0,321) Ki-67 PI yüksek olan hastalarda ortalama sağ kalım süresinin daha kısa olduğunu gözledik.

p53 için yaptığımız survi analizinde p53 pozitif (>%10) olgularda ortalama hastalıksız sağ kalım süresi 87,931 ay (Grafik 4), ortalama toplam sağ kalım süresi 88,025 ay (Grafik 5) olarak ölçüldü. p53 negatif (≤%10) olgularda ortalama hastalıksız ve toplam sağ kalım süreleri 72,105 ay olarak hesaplandı. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (hastalıksız survide p=0,060, toplam survide p=0,058) ancak p53 pozitif olan hastalarda ortalama sağ kalım sürelerinin daha uzun olduğunu gözledik.

GLUT1 için yaptığımız survi analizinde GLUT1 pozitif (≥%30) olgularda ortalama hastalıksız sağ kalım süresi 93,690 ay (Grafik 6), ortalama toplam sağ kalım süresi 93,690 ay (Grafik 7) olarak tespit edildi. GLUT1 negatif (<%30) olgularda ortalama hastalıksız sağ kalım süresi 69,761 ay, ortalama toplam sağ kalım süresi 69,886 ay olarak hesaplandı. İstatistiksel olarak anlamlı fark gözlenen bu analizde (hastalıksız ve toplam survide p=0,002) literatür bilgilerinin aksine GLUT1 pozitif olan hastalarda ortalama sağ kalım sürelerinin daha uzun olduğu sonucunu elde ettik.

GLUT3 için de GLUT1'e benzer bir durum tespit edildi. GLUT3 için yaptığımız survi analizinde GLUT3 pozitif olgularda ortalama hastalıksız sağ kalım süresi 97,504 ay (Grafik 8), ortalama toplam sağ kalım süresi 97,677 ay (Grafik 9) olarak hesaplandı. GLUT3 negatif olgularda ortalama hastalıksız sağ kalım süresi 70,254 ay, ortalama toplam sağ kalım süresi 70,335 aydır. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunan bu analizde (hastalıksız ve toplam survide p=0,011) GLUT3 pozitif olan hastalarda ortalama sağ kalım sürelerinin daha uzun olduğunu tespit ettik.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ve literatürdeki bilgiler Ki-67, p53, GLUT1 ve GLUT3 ile yapılan immünohistokimyasal boyamaların LYHK olgularında prognostik rolünün belirlenmesi için daha fazla çalışmaya gereksinim olduğunu düşündürmektedir. İmmünohistokimyasal sonuçlar ile prognoz korelasyonunu değerlendirmek için hasta sayısının azlığı, hastaların genelde yaşlı kişiler olması nedeniyle tümör dışı ölüm vakalarının çokluğu ve larinksin anatomik kompleks yapısından dolayı aynı kriterlere sahip olmayan hastaların olması bu çalışmanın kısıtlılıkları olarak göze çarpan hususlardır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu deneysel çalışmada Ocak 1993 ve Kasım 2004 tarihleri arasında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Kliniği'nde total, near-total veya parsiyel larenjektomi prosedürü uygulanmış, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda klasik tip YHK tanısı almış ve en az 2 yıl klinik takibi olan toplam 79 olgu çalışma kapsamına alındı. Ki-67, p53, GLUT1 ve GLUT3 antikorları uygulanan olgularda elde edilen immünohistokimyasal sonuçların prognostik önemi olduğu bilinen klinikopatolojik özellikler ile ilişkisi ve sağ kalım sürelerine etkisi araştırıldı.

1) Ki-67 PI ile tümör çapı arasında pozitif bir korelasyon mevcuttur ( $p=0,023$ ). İstatiksel olarak ilişki anlamlı bulunmamakla beraber tümör diferansiyasyonu azaldıkça Ki-67 PI'nin arttığı gözlemlendi. Sağ kalım süreleri Ki-67 pozitif olgularda (74 ay) Ki-67 negatif olgulara (90 ay) göre daha kısa olmakla beraber aradaki fark istatiksel olarak anlamlı değildi. Proliferatif aktivite ile diğer klinikopatolojik parametrelerin korelasyonunda anlamlı sonuç elde edilmedi.

2) Artmış p53 ekspresyonu ile bazı iyi prognoz göstergeleri arasında anlamlı ilişki tespit edildi; p53 ekspresyonu ile tümör diferansiyasyonu arasında pozitif korelasyon ( $p=0,036$ ), perinöral invazyon arasında negatif korelasyon ( $p=0,031$ ) gözlemlendi. p53 negatif olgularda lenf nodu metastazının daha fazla olduğunu tespit etmemize rağmen bu ilişki istatiksel olarak anlamlı bulunmadı. Sağ kalım süreleri p53 pozitif olgularda (88 ay) p53 negatif olgulara (72 ay) kıyasla daha fazla olmakla birlikte aradaki fark istatiksel olarak anlamlı bulunmadı. p53 ile diğer klinikopatolojik prognostik faktörlerin korelasyonunda anlamlı sonuç elde edilmedi.

3) Yaygın GLUT1 boyanması gösteren olgularda sağ kalım süresi anlamlı şekilde uzun bulundu; GLUT1 pozitif olgularda 94 ay, GLUT1 negatif olgularda 70



ay ( $p=0,002$ ). GLUT1 ile klinikopatolojik parametrelerin korelasyonunda anlamlı sonuç elde edilmedi.

4) GLUT3 pozitif olgularda sağ kalım süresi anlamlı şekilde uzun bulundu; GLUT3 pozitif olgularda 98 ay, GLUT3 negatif olgularda 70 ay ( $p=0,011$ ). GLUT3 pozitifliği ile operasyon yaşı arasında negatif bir korelasyon saptandı ( $p=0,017$ ). Diğer klinikopatolojik parametrelerle korelasyonunda anlamlı sonuç elde edilmedi.

## 7. ÖZET

### LARİNKSİN YASSI HÜCRELİ KARSİNOM OLGULARINDA PROLİFERATİF İNDEKS (Ki-67), TÜMÖR SÜPRESSÖR GEN PROTEİN İNDEKSİ (p53) VE GLUKOZ TRANSPORT PROTEİN (GLUT1 VE GLUT3) EKSPRESYONLARININ PROGNOSTİK ÖNEMİ

**Amaç:** Bu deneysel çalışmada larinksin yassı hücreli karsinom olgularında proliferatif indeks (Ki-67), tümör süpressör gen protein indeksi (p53) ve glukoz transport protein (GLUT1 ve GLUT3) ekspresyonlarının konvansiyonel prognostik parametrelerle ilişkisi ve sağ kalım sürelerine etkisi araştırıldı.

**Gereç ve Yöntem:** Klasik tip yassı hücreli karsinom tanısı almış ve larenjektomi uygulanmış olan 79 olgu çalışma kapsamına alındı. Tümörü örnekleyen parafin kesitlere streptavidin-biotin yöntemi kullanılarak Ki-67, p53, GLUT1 ve GLUT3 antikorları uygulandı. İmmünohistokimyasal sonuçlarla konvansiyonel prognostik parametreler arasındaki ilişkinin araştırılmasında Pearson Chi-Square ( $\chi^2$ ) veya Fisher's Exact testi kullanıldı. Sağ kalım sürelerinin analizinde Kaplan-Meier metodu ve log-rank testi uygulandı.

**Bulgular:** Ki-67 PI ile tümör çapı arasında pozitif bir korelasyon mevcuttur ( $p=0,023$ ). Artmış p53 ekspresyonuyla bazı iyi prognostik faktörler arasında anlamlı ilişki tespit edildi; p53 ekspresyonuyla tümör diferansiyasyonu arasında pozitif korelasyon ( $p=0,036$ ), perinöral invazyon arasında negatif korelasyon ( $p=0,031$ ) gözlemlendi. GLUT1 ( $p=0,002$ ) ve GLUT3 ( $p=0,011$ ) pozitif olgularda sağ kalım süreleri anlamlı şekilde uzun bulundu. Ki-67 PI ve p53 ekspresyonlarının sağ kalım süresine etkileri anlamlı değildi. Diğer klinikopatolojik özelliklerle immünohistokimyasal sonuçlar arasında anlamlı ilişki bulunmadı.

**Sonuç:** Bu çalışmadaki sonuçlar Ki-67 ve p53 ekspresyonlarının larinksin yassı hücreli karsinomlarında sağ kalım süresiyle ilişkisi olmadığını göstermektedir. GLUT1 ve GLUT3 pozitifliği sağ kalım sürelerini anlamlı şekilde uzatmaktadır. Bazı iyi prognostik faktörler (iyi diferansiye ve perinöral invazyon göstermeyen) ile artmış p53 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir.

**Anaktar Kelimeler:** Larinks, yassı hücreli karsinom, Ki-67, p53, glukoz transport proteinleri, GLUT1, GLUT3, prognoz.

## 8. SUMMARY

### THE PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF THE PROLIFERATIVE INDEX (Ki-67), TUMOUR SUPPRESSOR GENE PROTEIN INDEX (p53) AND GLUCOSE TRANSPORTER PROTEINS (GLUT1 AND GLUT3) EXPRESSIONS IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA CASES OF THE LARYNX

**Objectives:** The aim of this experimental study was to investigate the relationships of proliferative index (Ki-67), tumor suppressor gene protein index (p53), and glucose transporter protein (GLUT1 and GLUT3) expressions with conventional prognostic parameters in squamous cell carcinoma cases of the larynx, and their effects on the survival durations.

**Materials and Methods:** 79 cases who diagnosed with conventional laryngeal squamous cell carcinoma and who have undergone laryngectomy participated in the study. A representative paraffin section from each tumor was immunostained with the Ki-67, p53, GLUT1, and GLUT3 antibodies using the streptavidin-biotin method. In examining the relationships between these immunohistochemical results and the conventional prognostic parameters, the Pearson Chi-Square ( $\chi^2$ ) or Fisher's Exact test was used. Survival duration was analysed using the Kaplan-Meier method and log-rank test.

**Results:** There was a positive correlation between Ki-67 PI and tumour size ( $p=0,023$ ). The overexpression of p53 was found to be significantly associated with some of the well-prognostic factors; p53 expression was positively correlated with tumor differentiation ( $p=0,036$ ) and negatively correlated with perineural invasion ( $p=0,031$ ). The survival duration was found significantly prolonged in cases with

GLUT1 (p=0,002) and GLU3 (p=0,011) positive score. The effects of Ki-67 PI and p53 expressions on survival duration were not significant. No significant relationships between other clinicopathological characteristics and immunohistochemical results were detected

**Conclusion:** The results of the present study indicated that Ki-67 PI and p53 expressions were not significantly associated with survival durations. The positivity of GLUT1 and GLU3 significantly prolonged patient survival duration. Some well-prognostic factors (well-differentiated tumours and cases with no perineural invasion) were found to be significantly associated with p53 overexpression.

**Key Words:** Larynx, squamous cell carcinoma, Ki-67, p53, glucose transporter proteins, GLUT1, GLUT3, prognosis.

## 9. KAYNAKLAR

1. Gnepp DR. Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001:1-78.
2. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th ed. Toronto: Mosby Inc, 2004:335-48.
3. Mills SE, Carter D et al. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. In: Kirchner JA, Carter D. Pathology of the Larynx. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004:1007-31.
4. Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2002.
5. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol.* 1990 Jun;1(3):199-206.
6. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Inc, 2005.
7. Calli C, Calli A, Pinar E, et al. Expression of Ki-67 and p53 in laryngeal squamous cell carcinomas. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg.* 2005 Jul-Aug;15(1-2):9-13.
8. Acikalin MF, Oner U, Tel N, et al. Prognostic significance of Ki-67 expression for patients with laryngeal squamous cell carcinoma primarily treated by total laryngectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2004 Aug;261(7):376-80.
9. Fumic-Dunkic L, Katic V, Janjanin S, et al. Retrospective analysis of Ki-67 antigen expression in paraffin tissue blocks of laryngeal squamous cell carcinoma. *Am J Otolaryngol.* 2003 Mar-Apr;24(2):106-10.
10. Liu M, Lawson G, Delos M, et al. Prognostic value of cell proliferation markers, tumour suppressor proteins and cell adhesion molecules in primary squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2003 Jan;260(1):28-34.
11. Rodriguez Tojo MJ, Garcia Cano FJ, Infante Sanchez JC, et al. Immunoexpression of p53, Ki-67 and E-cadherin in basaloid squamous cell carcinoma of the larynx. *Clin Transl Oncol.* 2005 Apr;7(3):110-4.
12. Sittel C, Eckel HE, Damm M, et al. Ki-67 (MIB1), p53, and Lewis-X (LeuM1) as prognostic factors of recurrence in T1 and T2 laryngeal carcinoma. *Laryngoscope.* 2000 Jun;110(6):1012-7.
13. Hirvikoski P, Kumpulainen E, Virtaniemi J, et al. Enhanced apoptosis correlates with poor survival in patients with laryngeal cancer but not with cell proliferation, bcl-2 or p53 expression. *Eur J Cancer.* 1999 Feb;35(2):231-7.

14. Narayana A, Vaughan AT, Gunaratne S, et al. Is p53 an independent prognostic factor in patients with laryngeal carcinoma? *Cancer*. 1998 Jan 15;82(2):286-91.
15. Lera J, Lara PC, Perez S, et al. Tumor proliferation, p53 expression, and apoptosis in laryngeal carcinoma: relation to the results of radiotherapy. *Cancer*. 1998 Dec 15;83(12):2493-501.
16. Teppo H, Soini Y, Melkko J, et al. Prognostic factors in laryngeal carcinoma: the role of apoptosis, p53, proliferation (Ki-67) and angiogenesis. *APMIS*. 2003 Apr;111(4):451-7.
17. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol*. 2005 Mar;202(3):654-62.
18. Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol*. 2001 Oct-Dec;18(4):247-56.
19. Joost HG, Bell GI, Best JD, et al. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 Apr;282(4):E974-6.
20. Oliver RJ, Woodwards RT, Sloan P, et al. Prognostic value of facilitative glucose transporter Glut-1 in oral squamous cell carcinomas treated by surgical resection; results of EORTC Translational Research Fund studies. *Eur J Cancer*. 2004 Mar;40(4):503-7.
21. Yen TC, See LC, Lai CH, et al. 18F-FDG uptake in squamous cell carcinoma of the cervix is correlated with glucose transporter 1 expression. *J Nucl Med*. 2004 Jan;45(1):22-9.
22. Kato H, Takita J, Miyazaki T, et al. Correlation of 18-F-fluorodeoxyglucose (FDG) accumulation with glucose transporter (Glut-1) expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2003 Jul-Aug;23(4):3263-72.
23. Kunkel M, Reichert TE, Benz P, et al. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2003 Feb 15;97(4):1015-24.
24. Mineta H, Miura K, Takebayashi S, et al. Prognostic value of glucose transporter 1 expression in patients with hypopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res*. 2002 Nov-Dec;22(6B):3489-94.
25. Kato H, Takita J, Miyazaki T, et al. Glut-1 glucose transporter expression in esophageal squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness. *Anticancer Res*. 2002 Sep-Oct;22(5):2635-9.
26. Baer S, Casaubon L, Schwartz MR, et al. Glut3 expression in biopsy specimens of laryngeal carcinoma is associated with poor survival. *Laryngoscope*. 2002 Feb;112(2):393-6.
27. Sternberg SS. Histology for Pathologists. In: Mills SE, Fechner ER. *Larynx and Pharynx*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott – Raven, 1997:391-403.
28. Myers EN, Alvi A. Management of carcinoma of the supraglottic larynx: evolution, current concepts, and future trends. *Laryngoscope*. 1996 May;106(5 Pt 1):559-67.
29. Pressman JJ, Simon MB, Monell C. Anatomical studies related to the dissemination of cancer of the larynx. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1960 Sep-Oct;64:628-38.
30. Bocca E, Pignataro O, Mosciaro O. Supraglottic surgery of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1968 Dec;77(6):1005-26.
31. Omur M, Dogan O, Kaleli C. *Larinks Kanseri ve Boyun*. Istanbul: Haseki Hastanesi Vakfi, 1992.

32. Lalwani AK. Current Diagnosis&Treatment in Otolaryngology - Head&Neck Surgery. 1st ed. McGraw-Hill, 2004.
33. Lee KJ. Essential Otolaryngology: Head and Neck Surgery. 8th ed. McGraw-Hill, 2002.
34. Shanmugaratnam K, Sobin LH. The World Health Organization histological classification of tumours of the upper respiratory tract and ear. A commentary on the second edition. *Cancer*. 1993 Apr 15;71(8):2689-97.
35. Ferlito A. The World Health Organization's revised classification of tumours of the larynx, hypopharynx, and trachea. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1993 Sep;102(9):666-9.
36. Tuncer M. Sağlık Bakanlığı Kanser Kayıt Merkezi Verileri. 2000. <http://www.saglik.gov.tr/extras/birimler/ksdb/MURAT%20TUNCER-2.ppt>
37. Boffetta P, Gridley G, Gustavsson P, et al. Employment as butcher and cancer risk in a record-linkage study from Sweden. *Cancer Causes Control*. 2000 Aug;11(7):627-33.
38. Brandenburg JH, Kellermann G. Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility in laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol*. 1978 Mar;104(3):151-2.
39. Sturgis EM, Wei Q, Spitz MR. Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol*. 2004 Dec;31(6):726-33.
40. Do KA, Johnson MM, Doherty DA, et al. Second primary tumors in patients with upper aerodigestive tract cancers: joint effects of smoking and alcohol (United States). *Cancer Causes Control*. 2003 Mar;14(2):131-8.
41. Hobbs CG, Birchall MA. Human papillomavirus infection in the etiology of laryngeal carcinoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004 Apr;12(2):88-92.
42. McKaig RG, Baric RS, Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck*. 1998 May;20(3):250-65.
43. Pou AM, Vrabec JT, Jordan J, Wilson D, Wang S, Payne D. Prevalence of herpes simplex virus in malignant laryngeal lesions. *Laryngoscope*. 2000 Feb;110(2 Pt 1):194-7.
44. Goldenberg D, Benoit NE, Begum S, et al. Epstein-Barr virus in head and neck cancer assessed by quantitative polymerase chain reaction. *Laryngoscope*. 2004 Jun;114(6):1027-31.
45. Rabbett WF. Juvenile laryngeal papillomatosis. The relation of irradiation to malignant degeneration in this disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1965 Dec;74(4):1149-63.
46. Berkower AS, Biller HF. Head and neck cancer associated with Bloom's syndrome. *Laryngoscope*. 1988 Jul;98(7):746-8.
47. Potzsch C, Voigtlander T, Lubbert M. p53 Germline mutation in a patient with Li-Fraumeni Syndrome and three metachronous malignancies. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2002 Aug;128(8):456-60. Epub 2002 Aug 10.
48. American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. 6th ed. New York, NY: Springer, 2002:47-57.
49. Barnes L, Johnson JT. Pathologic and clinical considerations in the evaluation of major head and neck specimens resected for cancer. Part I. *Pathol Annu*. 1986;21 Pt 1:173-250.
50. Manni JJ, Terhaard CH, de Boer MF, et al. Prognostic factors for survival in patients with T3 laryngeal carcinoma. *Am J Surg*. 1992 Dec;164(6):682-7.
51. Pera E, Moreno A, Galindo L. Prognostic factors in laryngeal carcinoma. A multifactorial study of 416 cases. *Cancer*. 1986 Aug 15;58(4):928-34.



52. AC Broders. Carcinoma of the mouth: types and degrees of malignancy. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*, 1927;17:90-93
53. Wiernik G, Millard PR, Haybittle JL. The predictive value of histological classification into degrees of differentiation of squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx compared with the survival of patients. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):411-7.
54. Arthur K, Farr HW. Prognostic significance of histologic grade in epidermoid carcinoma of the mouth and pharynx. *Am J Surg*. 1972 Oct;124(4):489-92.
55. Roland NJ, Caslin AW, Nash J, et al. Value of grading squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*. 1992 May-Jun;14(3):224-9.
56. Chung CK, Stryker JA, Abt AB, et al. Histologic grading in the clinical evaluation of laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol*. 1980 Oct;106(10):623-4.
57. Small W Jr, Mittal BB, Brand WN, et al. Results of radiation therapy in early glottic carcinoma: multivariate analysis of prognostic and radiation therapy variables. *Radiology*. 1992 Jun;183(3):789-94.
58. Dinshaw KA, Sharma V, Agarwal JP, et al. Radiation therapy in T1-T2 glottic carcinoma: influence of various treatment parameters on local control/complications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000 Oct 1;48(3):723-35.
59. Tomik J, Skladzien J, Modrzejewski M. Evaluation of cervical lymph node metastasis of 1400 patients with cancer of the larynx. *Auris Nasus Larynx*. 2001 Aug;28(3):233-40.
60. Jakobsson PA. Histologic grading of malignancy and prognosis in glottic carcinoma of the larynx. *Can J Otolaryngol*. 1975;4(5):885-92.
61. Barona de Guzman R, Martorell MA, Basterra J, et al. Prognostic value of histopathological parameters in 51 supraglottic squamous cell carcinomas. *Laryngoscope*. 1993 May;103(5):538-40.
62. Moe K, Wolf GT, Fisher SG, et al. Regional metastases in patients with advanced laryngeal cancer. Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996 Jun;122(6):644-8.
63. Hirabayashi H, Koshii K, Uno K, et al. Extracapsular spread of squamous cell carcinoma in neck lymph nodes: prognostic factor of laryngeal cancer. *Laryngoscope*. 1991 May;101(5):502-6.
64. Yilmaz T, Hosal S, Gedikoglu G, et al. Prognostic significance of depth of invasion in cancer of the larynx. *Laryngoscope* 1998; 108: 764-8.
65. Moore C, Kuhns JG, Greenberg RA. Thickness as prognostic aid in upper aerodigestive tract cancer. *Arch Surg*. 1986 Dec;121(12):1410-4.
66. Ilknur AE, Calli C, Calli A, et al. Larinks skuamöz hücreli karsinomlarında tümör invazyon derinliği ile servikal lLenf nodu metastazı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi. *Türk Otolaringoloji Arşivi*. 2004; 42(1):11-16.
67. Yilmaz T, Hosal S, Gedikoglu G, et al. Prognostic significance of depth of invasion in cancer of the larynx. *Laryngoscope*. 1998 May;108(5):764-8.
68. Carter RL, Tanner NS, Clifford P, et al. Perineural spread in squamous cell carcinomas of the head and neck: a clinicopathological study. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1979 Aug;4(4):271-81.
69. Fagan JJ, Collins B, Barnes L, et al. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998 Jun;124(6):637-40.
70. Resnick JM, Uhlman D, Niehans GA, et al. Cervical lymph node status and survival in laryngeal carcinoma: prognostic factors. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995 Sep;104(9 Pt 1):685-94.

71. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983 Jan 15;31(1):13-20.
72. Cattoretti G, Becker MH, Key G, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*. 1992 Dec;168(4):357-63.
73. Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol*. 2004 Sep;15(9):1319-29.
74. Engin K, Özyardımcı N. Akciğer Kanseri: Tanı ve tedavide temel ilkeler ve uygulamalar. İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti. 2001.
75. Oren M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem*, 1999 Dec; 274(51):36031-34.
76. Motamed M, Banerjee AR, Bradley PJ, et al. MIB-1 and p53 expression in radiotherapy-resistant T1aN0M0 glottic squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 2001 Jun;26(3):227-30.