



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ VE BAŞ BOYUN CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI**

**LARİNKS KANSERLİ HASTALARDA HUMAN
PAPİLLOMAVİRUS POZİTİFLİĞİ VE
KEMORADYOTERAPİ DUYARLILIĞI ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Turan ARLI

KAYSERİ – 2014



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ VE BAŞ BOYUN CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI

LARİNKS KANSERLİ HASTALARDA HUMAN
PAPİLLOMAVİRUS POZİTİFLİĞİ VE KEMORADYOTERAPİ
DUYARLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Turan ARLI

Danışman

Doç. Dr. Sedat ÇAĞLI

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TTU-2014-4906 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYSERİ – 2014

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında, her aşamada bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan ve destek olan danışman hocam Doç. Dr. Sedat ÇAĞLI'ya, uzmanlık eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen, her konuda rahatlıkla danıştığım ve engin tecrübelerinden faydalandığım saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Ercihan GÜNEY'e, Prof. Dr. Yaşar ÜNLÜ'ye, Prof. Dr. Mustafa ERKAN'a, Prof. Dr. İsmail KÜLAHLI'ya, Doç. Dr. İmdat YÜCE'ye, Doç. Dr. İbrahim KETENCİ'ye, Yrd. Doç. Dr. Mehmet İlhan ŞAHİN' e teşekkür ederim.

Bu araştırmanın yapılmasında emeği geçen Patoloji AD. Öğretim üyesi Prof. Dr. Özlem CANÖZ'e ve Biyolog Levent GÖRÜR'e teşekkür ederim.

Bu süreçte birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma ve diğer tüm KBB çalışanlarına teşekkür ederim.

Sadece bu dönemde değil tüm hayatım boyunca sevgi ve desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Dr. Turan ARLI

Ağustos 2014, KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
KISALTMALAR	vi
RESİM LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. LARİNXS KANSERLERİ	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Etyopatogenez	4
2.1.3. Semptomlar	6
2.1.4. Tanı	7
2.1.5. Larinks kanserleri klasifikasyonuna göre TNM sistemi	8
2.1.6. Tedavi.....	11
2.1.6.1. Larinks kanserlerinde cerrahi tedavi	12
2.1.6.2. Radyoterapi	13
2.1.6.3. Kemoterapi.....	14
2.2. HPV Araştırma metodları	15
3. HASTALAR VE YÖNTEM.....	18
3.1. HASTALAR	18
3.2. YÖNTEM.....	20
4. BULGULAR.....	28
4.1. RADYOTERAPİ GRUBU	29
4.2. EŞZAMANLI KEMORADYOTERAPİ(KRT) PROTOKOLÜ.....	29

4.3. İNDÜKSİYON KEMOTERAPİSİ PROTOKOLÜ	29
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇLAR	38
KAYNAKLAR	39
TEZ ONAY SAYFASI.....	52

LARİNKS KANSERLİ HASTALARDA HUMAN PAPİLLOMAVİRUS POZİTİFLİĞİ VE KEMORADYOTERAPİ DUYARLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Human Papillomavirüsün larinks kanseri etyolojisindeki rolü, prognoz, kemoradyoterapi duyarlılığı üzerine etkisini ve organ koruyucu yaklaşımların seçiminde endikatör olarak kullanımının araştırılması.

Materyal-Metod: Çalışmaya 2006-2011 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde larinks yassı hücreli kanseri nedeniyle radyoterapi, kemoradyoterapi veya indüksiyon kemoterapisi uygulanmış 52 hasta alınmıştır. Parafin bloklarda PCR yöntemi ile HPV araştırılmıştır. Değerlendirme sonuçları olguların klinikopatolojik sonuçlarıyla karşılaştırılarak incelenmiştir.

Bulgular: Araştırmaya dahil edilen hasta sayısı 52 olup hastaların 51 (% 98.07)'i erkek, 1 (%1.9)' i kadındı. Hastaların yaş ortalaması 63.5 (42-85) olarak bulundu. Hastaların 51 (% 98.07)'inde sigara, 11 (% 21,1)'inde sigara ile birlikte alkol kullanma öyküsü mevcuttu. Hastaların 28'inde supraglottik tümör, 24'ünde glottik tümör mevcuttu. Hastaların 28 tanesine tedavi olarak Radyoterapi, 14'üne Kemoradyoterapi 10'una ise İndüksiyon kemoterapisi uygulandı. 52 hastanın hiçbirinde HPV pozitifliği saptanmadı.

Sonuç: Bu çalışmada hiçbir hastada HPV pozitifliği saptanmadığı için tedavi cevabına veya prognoza etkisi değerlendirilememiştir. Bunun nedeni coğrafi farklılıklar, popülasyondaki cinsel davranış ve hijyen alışkanlığı farklılıkları ve uygulanan PCR yönteminin duyarlılığı olabilir.

Anahtar kelime: Human papillomavirus, PCR, Larinks kanseri

**TO EVALUATE PRESENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS AND ITS
EFFECT ON CHEMORADIOOTHERAPY SENSITIVITY IN LARYNX
CARCINOMAS**

ABSTRACT

Aim: To evaluate presence of Human Papillomavirus (HPV) in larynx cancers. If it is present point out its effect on chemoradiotherapy sensitivity and its use as an indicator for organ sparing approach.

Material and Method: 52 patients who have larynx squamous cell cancer and treated by radiotherapy, chemotherapy or induction chemotherapy between 2006-2011 in Erciyes University Faculty of Medicine were included in study. Presence of HPV was investigated by polymerase chain reaction (PCR) in paraffin blocks of the patients. These results were compared to clinicopathologic results of the patients.

Results: 51 men (98,07 %) and a woman (1,9 %) were included in the study. Mean age was 63,5 (42-85). 51 of patients (98,07 %) were smokers and 11 of these (21,1 %) were also alcoholic. 28 patients had supraglottic, 24 patients had glottic cancer. 28 of patients were treated by radiotherapy, 14 of by chemotherapy and 10 of by induction chemotherapy. HPV was not detected in all of specimens.

Conclusion: HPV positivity on prognosis and treatment in larynx cancers could not be evaluated because HPV was not detected at all. The reason for this can be differences in geography, sexual behaviors and hygienic habits of people; sensitivity of used PCR method.

Key-words: Human Papillomavirus, PCR, Larynx cancer

KISALTMALAR

5-FU	: 5-Florourasil
AJCC	: American Joint Commite on Cancer
ARK	: Arkadaşları
cGy	: Santigray
DBH	: Dot blot hibridizasyon
DNA	: Deoksiribon�kleik Asit
FISH	: Floresan in situ hibridizasyon
Gy	: Gray
HPV	: Human papillomavirus
IPC	: İnternal kontrol piki
ISH	: İn situ hibridizasyon
İK	: İndüksiyon Kemoterapisi
KRT	: Kemoradyoterapi
KT	: Kemoterapi
PCR	: Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RB	: Retinoblastom proteinini
RT	: Radyoterapi
SBH	: Southern blot hibridizasyon
TNM	: T (tümör), N (lenf nodu), M (metastaz)

RESİM LİSTESİ

Resim 1.	Vortex cihazı (elektro-mag)	20
Resim 2.	Santrifüj cihazı (Scilogex).....	20
Resim 3.	DNA izolasyonunda kullanılan ısıtmalı çalkalayıcı (mixing block) (BIOER)	21
Resim 4.	PCR amplifikasyonu yapılan thermal cycler cihazı (The GeneAmp® PCR System 9700).....	22
Resim 5.	Applied Biosystems Genetic Analyzer 310 cihazı ve bilgisayar donanımı (ABI 310)	23
Resim 6.	Tek tip pozitif sonuç.....	25
Resim 7.	Birden fazla HPV tipinin pozitif olduğu analiz sonucu	25
Resim 8.	HPV Negatif analiz sonucu.	26
Resim 9.	İnternal kontrolün (IPC) çalışmadığı geçersiz analiz sonucu.....	27

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Larinks kanseri evrelemesi.....	11
Tablo 2. HPV tanı yöntemlerinin karşılaştırılması.....	17
Tablo 3: F-HPV tiplendirme kitinde renk boyutlara göre subtiplerin belirlenmesi.	24
Tablo 4. Çalışmaya alınan hastaların özellikleri	28
Tablo 5. Hastaların aldıkları tedaviye göre nüks oranı ve HPV pozitifliği	29
Tablo 6. Literatürde bazı HPV araştırma yöntemleri ve pozitiflik oranları	36

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Larinks kanserleri erişkinde tüm kanserlerin % 2'sini, baş boyun bölgesi kanserlerinin % 25'ini oluşturur. Erkeklerde kadınlara oranla 4-30 kat daha fazla görülür (1, 2). Neredeyse tümü yüzey epitelinden köken alan larinks kanserlerinin % 95'inden fazlası yassı hücreli kanserlerdir (3).

Sigara kullanımı larinks kanseri gelişiminde en önemli risk faktörüdür. Bunun yanında bazı virüsler, bakteriler, radyasyon maruziyeti, gastro-özefageal reflü, genetik yatkınlık, diyet ve mesleki faktörler gibi pek çok faktör larinks kanseri gelişiminde rol alır (4).

Larinks karsinomlarında % 0-79 arasında değişen oranlarda HPV varlığı bildirilmektedir (5). Papillomavirüs; küçük, zarfsız, ikozahedral DNA virüsüdür. Yassı epitel hücrelerin nükleusunda çoğalır. Farklı genotipte 100'den fazla HPV tipi tanımlanmıştır. Deri, anogenital veya orofaringeal epitelyal hücreleri enfekte ederler. Larinks kanserlerinde en sık saptanan tipler ise yüksek risk grubundan olan HPV-16, 18, 31 ve 33'tür. HPV varlığı çeşitli yöntemlerle saptanmaktadır. Ancak en duyarlı olan yöntem polimeraze zincir reaksiyonu (PCR)' dir (6-8).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda HPV pozitif baş boyun kanserlerinin radyoterapiye daha iyi cevap verdiği ve prognozu iyi yönde etkilediği belirtilmektedir (9).

Larinks kanserlerinde cerrahi ve radyoterapi (RT) iki ana tedavi seçeneğidir. Erken evre tümörlerde (evre I-II) cerrahi ya da RT tek başına kullanılabilirken, ileri evre tümörlerde genellikle kombine tedaviler uygulanır (10).

Bu çalışmada larinks kanserli hastaların parafin kesitlerinde HPV sıklığını, HPV pozitifliğinin prognoz ve kemoradyoterapi duyarlılığı üzerine etkisinin ve organ koruyucu yaklaşımların seçiminde endikatör olarak kullanımının araştırılmasını amaçladık. HPV pozitifliğinin radyoterapi, indüksiyon kemoterapi ve KRT gibi cerrahi dışı tedavilerde prognoza etkisini araştırıp bu tedavilerden fayda sağlayabilecek hastalar daha biyopsi aşamasında diğer hastalardan ayırt edilebilecek ve uygun tedavi seçenekleri sunulabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. LARİNK KANSERLERİ

2.1.1. Epidemiyoloji

Larinks kanserleri erişkinde tüm kanserlerin % 2'sini, baş boyun bölgesi kanserlerinin % 25'ini oluşturur. Erkeklerde kadınlara oranla 4-30 kat daha fazla görülür (1, 2). Erkek kadın oranı en yüksek kanser larinks kanseridir (2). Kadınlarda sigara alışkanlığının artması bu oranın azalmasına neden olmuştur (3). Hastaların çoğu 50-70 yaş arasındadır (11). Daha genç yaşlarda görülme sıklığı % 1'in altındadır (12).

Neredeyse tümü yüzey epitelinden köken alan larinks kanserlerinin % 95'inden fazlası yassı hücreli kanserlerdir. Çoğu iyi veya orta derecede diferansiyedir. Nadiren adenokarsinom ve verrüköz karsinoma rastlanabilir. Diğer tip kanserler ise çok daha nadir görülür (3).

Larinks kanserinin büyük bir kısmı glottik kanserlerdir (% 55-75), supraglottik kanserler ikinci sıklıktadır (% 24-42). Sıklığı en az olan larinks kanseri ise subglottik kanserlerdir (% 1-6) (13).

Güney Avrupa ülkelerinde supraglottik karsinomlar, glottik karsinomlardan daha fazla görülürken, kuzey ve batı Avrupa ülkelerinde ise glottik karsinomlar çoğunluktadır (14). Ülkemizde larinks kanserlerinin % 59'u glottik, % 40'ı supraglottik, % 1'i ise subglottik bölgede görülmektedir (15).

Larinks kanserli hastalarda % 4-30 oranında ikincil kanserler gelişebilir. En sık akciğer, baş boyun ve özofagusta bildirilmiş olup, radyoterapinin bu riski % 10 oranında arttırabildiği belirtilmektedir (16).

2.1.2. Etyopatogeneze

Sigara ve alkol

Larinks kanseri oluşumunda pek çok faktör rol oynar. Bu faktörler kanser oluşumunda tek başına etkili olabileceği gibi, başka faktörlerle sinerjistik etki de gösterebilirler (16). Sigara kullanımı larinks kanseri gelişiminde en önemli risk faktörüdür (4). Sigara en yaygın çevresel etkindir ve hem başlatıcı hem de ilerletici etkisi vardır (17). Kadınlarda sigara içenlerin oranı erkeklere oranla daha düşüktür (18). Sigara ile ilgili yapılan araştırmalarda, primer kanserojen maddelerin katran, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, benzopiren ve nitrozamin olduğu saptanmıştır (4).

Sigara özellikle supraglottik ve glottik larinks kanserleri için bir risk faktörüdür. Sigaraya başlama yaşı ve kullanım süresi, tüketilen günlük sigara adeti ve yıllık paket sayısının kanser ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (17, 19). Sigara içenlerde larinks kanseri riski içmeyenlere göre 10-20 kat daha fazladır. Günde 2 paket sigara içenlerde kanser riski 4,4 kat, 2 paketten fazla içenlerde 10,4 kat artar. Larinks kanserli hastaların % 97'si sigara içmektedir (20).

Alkol kullananlarda larinks karsinomu riski 2,2 kat daha fazladır (21). Sigara ile birlikte alkol kullanımı kanser için sinerjistik etki oluşturur. Alkoliklerde özellikle supraglottik larinks kanseri riski iki kat fazladır (22). Sigara kullanmayan alkol tiryakilerinde larinks kanseri riskinin 2,46 kat, alkol hiç almayan sigara tiryakilerinde 9,3 kat fazla olduğu saptanmıştır (23). Sigara ile birlikte alkol tüketenlerde ise bu risk 26 kat artmaktadır (24).

Çevresel ve mesleki faktörler

Asbest, ağır metaller, kömür tozu ve talaşa maruz kalma da larinks kanseri riskini arttırmaktadır (17, 25). Çiftçiler, ağaç ve odun işçileri, hardal gazı işçileri, nikel işçileri, kömür işçileri, lastik sanayi çalışanları, deri ve tekstil işçileri, krom madeni işçileri,

boya sanayi çalışanları ve asbeste maruz kalanlar larinks kanseri gelişimi açısından risk içeren meslek gruplarıdır (26, 27).

Üretim denetleyicileri, tekstil, inşaat ve belediye işçileri ile şoförlerde, özellikle supraglottik tümörlerin görülme riskinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca silika ve pamuk tozları, sülfirik asit, kauçuk ürünleri, diesel ve benzin egzozu ile polisiklik aromatik hidrokarbonlara uzun süre maruz kalma sonucunda supraglottik larinks kanseri riskinin belirgin olarak arttığı saptanmıştır (11, 12, 28).

Viral Risk Faktörleri

Human papillomavirüs (HPV), cinsel yolla bulaşan, seksüel olarak aktif yetişkinlerde ve adölesanlarda görülen en yaygın enfeksiyonlardan biridir (29). Papillomavirüs; küçük, zarfsız, ikozahedral DNA virüsüdür. Yassı epitel hücrelerinin nükleusunda çoğalır. Çift zincirli DNA'ya sahiptir (30). Farklı genotipte 100'den fazla HPV tipi tanımlanmıştır. Tüm tanımlanan tipler epiteliotropiktir. Deri, anogenital veya orofaringeal epitelyal hücreleri enfekte ederler. HPV'yi esas olarak temsil eden alt tipleri HPV-16, -18, -31, -33, -39, -45, -52, -58 ve -69'dur. Bu tipler "yüksek riskli" tiplerdir. Servikal ve diğer anogenital kanserlerde rol oynarlar. HPV -6 ve -11 "düşük riskli" tipler olup, habis lezyonlarda çok nadiren bulunurlar (31). Larinks kanserleri için önemli risk faktörlerin birisi de human papillomavirüs (HPV) dür (32). Larinks karsinomlarında % 0-79 arasında değişen oranlarda HPV varlığı bildirilmektedir (5). Larinksin papillom ve kanserlerinde farklı HPV tiplerine rastlanmaktadır. Larinksin en sık görülen benign tümörü olan rekürren respiratuar papillamatozis, düşük riskli HPV-6 ve -11 ile ilişkilidir. Papillomlar yaklaşık % 2 olguda malign transformasyon gösterebilir. Papillomlardan gelişen larinks kanserlerinde de virüsün bu tiplerine rastlanır. Larinks kanserlerinde en sık saptanan tipler ise yüksek risk grubundan olan HPV-16, -18, -31 ve -33'tür (6-8).

HPV karsinojenik etkisini viral genomun konak genomuna entegrasyonu ile gerçekleştirir. Entegrasyon E6 ve E7 onkogenlerin artmış ekspresyonuna neden olur. E7 gen ürünü ise Retinoblastom proteinini (RB) inaktive ederek bir tümör süpresör gen olan p16 INK4a geninin (CDKN2A) ürünü olan p16 proteininin üretimini artırır (33-35).

Ayrıca herpes simplex enfeksiyonu ile larinks l koplakileri ve kanseri arasında iliŐki olabileceğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (36, 37).

Radyasyon

Radyasyonun karsinogenik etkisi doz, fraksiyon ve dağılım oranına bağlıdır. Larinks kanserinde, radyoterapiden yıllar sonra oluşan tümörlerin, rekürren tümör değil, radyasyona bağlı olarak oluşan ikinci primer tümörler olduğu savunulmaktadır (16, 17, 38).

Gastro zofagiyal ve Larengofarengeal Reflü

Laringofarengeal reflü larinkste kanser gelişiminde rol oynayan etkenlerden biridir. Larinks kanserli hastalarda % 58 - 63,9 oranında bulunmuş olup, bu oran kontrol olgulara göre anlamlı derecede yüksektir (39). Gastrik rezeksiyon geçiren hastalarda da benign ve malign larinks lezyonları kontrollere göre daha sık bulunmuş ve duodeno-gastro-özofagial reflü de risk faktörü olarak ileri sürülmüŐtür (40).

Diyet

Sebze, meyve, bitkisel yağlar ve balıktan zengin ‘Akdeniz tipi’ diyetle beslenenlerde, larinks kanseri riskinin azaldığı gözlenmiştir. Bunun A, E ve C vitaminleri, beta karoten ve çoklu doymamıŐ yağların koruyucu etkisine bağlı olduğu  ne sürülmüŐtür (2, 41).

2.1.3. Semptomlar

Larinks kanserlerinde semptomlar tümörün yerleşim yerine göre farklılıklar gösterir. Larinks karsinomunun temel bulgusu ses kısıklığıdır (42). Ses kısıklığı en sık görülen bulgulardan birisidir (43). Tümör vokal kordlara yerleŐmiŐse ilk belirti ses kısıklığı olacaktır (44). Glottik bölge kaynaklı kanserlerde çok erken ortaya çıkan bir semptom olmasına rağmen subglottik ve supraglottik kanserlerde çok geç olurur veya hiç oluŐmayabilir. Kanser in vokal kordun mukozasını, tiroaritenoid kası veya krikoaritenoid eklemi tutması sonucu mukoza vibrasyonundaki bozulmaya bağlı olarak ortaya çıkar.

Dispne ve stridor tümör kitlesinin basısının solunum yolunu etkilemesine bağlıdır. Subglottik tümörlerde ilk semptom olabilir, diğer yerleŐimlerde ise daha ileri evrelerde görülür (43).

Epiglot ve hipofarenks kanserlerinde boğaz ağrısı ve yutkunmakla ağrı sık karşılaşılan bir bulgudur. Aynı taraftaki kulağa yansıyan ağrılarda yayılım 10. sinir yoluyla ve piriform sinüs, dil kökü ve vallekula yerleşimli lezyonlar için karakteristiktir (42).

Öksürük ise supraglottik lezyonlarda daha sık rastlanan bir semptomdur (43). Supraglottik bölgede süperior laringeal sinir tutulumu ile oluşan hipoestezi veya anesteziye bağlı olarak aspirasyon sonucu görülebilir (42, 45).

Supraglottik bölge tümörlerinde yabancı cisim hissi veya ağrı, mekanik etkiyle sesin boğuk çıkması (ağızda haşlanmış patates varmış gibi), yutma problemleri, laringeal sekresyonların aspirasyonuna bağlı olarak öksürük, odinofaji ve tek taraflı otalji, ağız kokusu, boğazda gıcıklanma, dolgunluk ve hemoptizi görülür (46). Tümörün boyutu büyükse dispne ortaya çıkar. Subglottik tümörlerde boğazda rahatsızlık hissi, tümör büyüdükçe vokal kord ya da inferior laringeal sinir tutulumuna bağlı ses kısıklığı, dispne ve hemoptizi ortaya çıkabilir (47).

Disfaji tümörün larinks sınırlarını aştığını gösterir. Tümörün direkt yayılımı veya nodal metastaz sonucu boyunda kitle ile başvurabilir. Kilo kaybı gibi malignite belirtileri de uzak metastaz ihtimalini akla getirmelidir (10).

2.1.4. Tanı

Larinks kanserinde erken tanı, hastaların sağkalımı ve hastalığın prognozu yönünden çok önemlidir. Uygulanacak tedavi yönteminin seçiminde detaylı hikayenin, fizik muayene ve görüntüleme yöntemleri ile desteklenmesi gereklidir. Larinks kanserli olguların erken dönemde tanınması fonksiyonel cerrahi şansını arttırmaktadır. Lezyonun iyi tanımlanması ise tedavinin başarısını yükseltmektedir (48).

Hikayede ses kısıklığı, boğaz ağrısı, disfaji, odinofaji sık rastlanılan semptomlardır. Ses kısıklığı glottik kanserlerde erken belirti olmasına rağmen subglottik ve supraglottik kanserlerde geç belirtidir. Boğaz ağrısı ve disfaji supraglottik kanserlerde erken belirtidir. Hemoptizi ve yansıyan kulak ağrısı daha nadir rastlanılan semptomlardandır. Dispneye hava yolunu tıkayan büyük kanserlerde rastlanır. Boyun metastazları da özellikle supraglottik kanserlerde sık rastlanan bulgulardır (48).

Larinks muayenesine indirekt laringoskopi ile başlanmalıdır. Lezyonun yeri, uzandığı bölgeler ve vokal kord hareketleri hakkında yeterli bilgi veren bir muayene yöntemidir. Palpasyon özellikle larinks dışına taşmış tümörlerde değerlidir. Laringeal krepitasyonun kaybı postkrikoid bölge tutulumunu akla getirmelidir. Lenfatik metastazları tespit amacıyla tüm boyun bölgeleri dikkatle palpe edilmelidir. Larinks kanserli vakalarda tümörün yayılma bölgeleri hakkında tedavi öncesi yeterli bilgiye sahip olmak gerekmektedir. Supraglottik kanserlerde, preepiglottik boşluk, paraglottik boşluk, piriform sinüs, aritenod tutulumu tedaviyi etkileyebilir. Glottik kanserlerde ise ön komissür, ventrikül, paraglottik boşluk ve subglottik yayılım önemlidir. Subglottik kanserlerde ise trakea, özefagus yayılımı gözden kaçırılmamalıdır. İlerlemiş olgularda larinks üzerinde kitle ve kızarıklık görülebilir. Yine ilerlemiş olgularda palpasyonda larinksin ağrılı ve hassas olması, larinks iskeletinde genişleme, fizyolojik krepitasyonun kaybolması, tirohyoid ve krikotiroid membran bölgesinde dolgunluk gibi bulgular tespit edilebilir (48).

Bilgisayarlı tomografi tümörün hacmi, uzanımı, kıkırdak tutulumu ve muayenede görülemeyen bölgelerin durumu hakkında çok değerli bilgiler verir. Manyetik rezonans görüntüleme ise submukozal tümör uzanımını bilgisayarlı tomografiden daha iyi gösterir. Ancak bilgisayarlı tomografi daha ucuzdur ve boyun metastazlarını göstermede manyetik rezonans görüntülemeyle değeri benzerdir. Bu nedenle bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntülemeye tercih edilmektedir.

Genel anestezi altında yapılan direkt laringoskopi ameliyat öncesi evrelendirme için çok önemlidir. Bu sırada biyopsi de alınır. Biyopsi alınırken şüpheli lezyonların yüzeylerinden alınan biyopsilerin enflamatuvar olabileceği ve derindeki malign lezyonların gözden kaçabileceği unutulmamalıdır. Rutin olarak özefagus, bronşiyal sistem, trakea ikinci primer tümörler açısından gözden geçirilmelidir (48).

2.1.5. Larinks kanserleri klasifikasyonuna göre TNM sistemi

AJCC (American Joint Committee on Cancer) tarafından 2010 yılında son düzenlenmiş şekline göre larinks kanserleri şöyle sınıflandırılır (49).

TNM Sistemi: T (tümör), N (lenf nodu), M (metastaz) öğelerini kapsamaktadır.

Primer tümör

Tx: Tümör değerlendirilemedi.

To: Primer tümör yok.

Tis: Karsinoma in situ.

Supraglottik Tümör

T1: Tümör supraglottisin bir alt bölgesine sınırlıdır, kord hareketleri normaldir.

T2: Tümör supraglottisin birden fazla alt bölgesinin mukozasını, glottisi veya supraglottis dışındaki bir bölgeyi (örneğin dil kökü mukozası, vallekula, piriform sinüs medial duvarı) tutmuştur, kord hareketleri normaldir.

T3: Tümör larinks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır ve/veya post-krikoid bölge, preepiglottik dokular, paraglottik alan invazedir ve/veya minör tiroid kıkırdak invazyonu (iç korteks) mevcuttur.

T4a: Tümör tiroid kıkırdağı invaze etmiş ve/veya larinks dışına, boyun yumuşak dokularına, tiroide, özefagusa yayılmış.

T4b: Tümör prevertebral boşluğu(aralık), mediastinal yapıları invaze etmiş veya karotid arteri kaplamış.

Glottik Tümör

T1: Tümör vokal kordlara sınırlıdır ve kord hareketleri normaldir. (anterior veya posterior komissür invazyonu olabilir.)

T1a: Tümör tek bir vokal korddadır.

T1b: Her iki vokal kordda da tümör mevcuttur.

T2: Tümör supraglottis ve/veya subglottise uzanmaktadır ve/veya kord hareketleri kısıtlanmıştır.

T3: Tümör larinks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır ve/veya paraglottik alan invazyonu vardır (iç korteks)

T4a: Tümör tiroid kıkırdağı invaze etmiş ve/veya larinks dışına, boyun yumuşak dokularına, tiroide, özefagusa yayılmış.

T4b: Tümör prevertebral boşluğu, mediastinal yapıları invaze etmiş veya karotid arteri kaplamış.

Subglottik Tümör

T1: Tümör subglottiste sınırlıdır.

T2: Tümör vokal kordlara uzanmakla birlikte kord hareketleri normal veya kısıtlanmıştır.

T3: Tümör larinks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır.

T4a: Tümör krikoid veya tiroid kıkırdağı invaze etmiş ve/veya larinks dışına, boyun yumuşak dokularına, tiroide, özefagusa yayılmış.

T4b: Tümör prevertebral boşluğu, mediastinal yapıları invaze etmiş veya karotid arteri kaplamış.

Bölgesel lenf nodları

Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilememektedir.

No: Bölgesel lenf nodu metastazı yoktur.

N1: En büyük çapı 3 cm.'yi geçmeyen tek bir ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır.

N2a: En büyük çapı 3-6 cm. arasında tek ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır.

N2b: Hiçbirinin çapı 6 cm.'yi geçmeyen multipl ipsilateral lenf nodlarında metastaz vardır.

N2c: Hiçbirinin çapı 6 cm.'yi geçmeyen bilateral veya kontralateral lenf nodlarında metastaz vardır.

N3: Bir lenf nodunda 6 cm.'den büyük metastaz vardır.

Uzak metastazlar

Mx: Uzak metastazlar değerlendirilememektedir.

Mo: Uzak metastaz yoktur.

M1: Uzak metastaz vardır

Tablo 1. Larinks kanseri evrelemesi (49)

EVRE 0	Tis	N0	M0
EVRE 1	T1	N0	M0
EVRE 2	T2	N0	M0
EVRE 3	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
EVRE 4A	T4A	N0	M0
	T4A	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4A	N2	M0
EVRE 4B	T4B	HERHANGİ BİR N	M0
	HERHANGİ BİR T	N3	M0
EVRE 4C	HERHANGİ BİR T	HERHANGİ BİR N	M1

2.1.6. Tedavi

Larinks kanserinde optimal tedavi şekli tartışma konusudur. Larinks kanserlerinde cerrahi ve radyoterapi (RT) iki ana tedavi seçeneğidir. Erken evre tümörlerde (evre I-II) cerrahi ya da RT tek başına kullanılabilir. İleri evre tümörlerde genellikle kombine tedaviler uygulanır. Kemoterapi (KT) daha çok kombine tedavi planı içinde ya da palyatif tedavide yer alır (48).

Larinks kanserli hastada tedavi yöntemi belirlerken hastanın yaşı, tümörün evresi, tümörün tuttuğu bölge, hastanın genel durumu önemlidir. Ayrıca sesin korunması için mesleki ve çevresel faktörler, aile desteği, hastanın tedavi modalitesi seçimi, tedavi uygulanan merkezin şartları gibi faktörlerde tedavi şeklini belirlemede yardımcı olur. En uygun tedavi yöntemi baş boyun cerrahı, radyasyon ve medikal onkoloji, radyoloji,

patoloji, anestezi doktoru ve ses terapistinden oluşan konsey tarafından belirlenmeli tedavi seçenekleri hastaya sunulmalı ve nihai kararı hasta vermelidir (10).

2.1.6.1. Larinks kanserlerinde cerrahi tedavi

Cerrahi tedavide primer tümörün rezeksiyonu ile birlikte bölgesel lenf nodlarının eksizyonunun yapılması esastır.

Primer tümörün rezeksiyonu(larenjektomiler)

Genel olarak parsiyel ve total larenjektomiler olarak ikiye ayrılabilir.

Parsiyel larenjektomiler

Organ korumanın önemi ve cerrahi tekniklerin gelişmesi ile birlikte konservatif yaklaşımlar yaygınlaşmıştır (50). Parsiyel larenjektomi larinksin konuşma, yutma ve solunum fonksiyonlarının korunmasını amaçlayan cerrahi prosedürlerdir. Larinksin kanserli bölgesi onkolojik kurallara uygun olarak çıkarılır (51). Günümüzde tümör yerleşimine göre endoskopik lazer cerrahisi, laringofissur kordektomi, horizontal ve vertikal parsiyel larenjektomi, suprakrikoid larenjektomi, hemilarenjektomi vb. yöntemler kullanılmaktadır. Parsiyel larenjektomi prosedürleri için bir vokal kord, mobil bir aritenoid ve krikoid kıkırdağın olması yeterli görülmektedir.

İlerlemiş tümörler de bile parsiyel cerrahi teknikler ile elde edilen başarılı sonuçlar ve sağkalım oranları sayesinde parsiyel larenjektomiler daha sık ve yaygın olarak yapılmaya başlanmıştır (52). Bununla birlikte parsiyel cerrahi uygulanacak hastaların pulmoner ve kardiyak fonksiyonları yeterli düzeyde olmalıdır (10).

Total larenjektomi

Tüm larinksin, hiyoid kemiğin, üst trakeal halkaların ve sıklıkla prelaringeal adelelerin de rezeke edildiği ve kalıcı trakeostomiye de içeren cerrahi tedavi yöntemidir (53, 54). Organ koruma cerrahisinin uygun olmadığı T3-T4 supraglottik veya glottik kanserde, subglottik kanserde, hem vertikal hem de horizontal larenjektominin başarısız olduğu durumlarda, parsiyel larenjektomiye izin vermeyen pulmoner ve kardiyak durumlarda, RT'nin başarısız olduğu nüks gösteren supraglottik ve glottik kanserlerde total larenjektomi hala yerini korumaktadır (55).

Larinks kanserlerinde bölgesel lenf nodlarının eksizyonu (Boyun diseksiyonları)

Baş boyun kanserlerin de genel kural olarak gizli metastaz riski % 20'den fazlaysa boyunun elektif tedavisi önerilir (56, 57).

Larinks kanserlerinde N(+) olgularda terapötik, N(0) olgularda profilaktik amaçlı olarak boyun diseksiyonları uygulanmaktadır. Yapılış şekline göre boyun diseksiyonları kapsamlı veya seçici olabilir (58). Larinks kanserinde boyun metastazının evresine göre boyun diseksiyonları uygulanabilir. Erken evre glottik kanserlerde boyuna metastaz oranı oldukça düşüktür ve elektif boyun diseksiyonun yeri yoktur. Erken evre supraglottik larinks kanserlerinde boyun N(0) bile olsa, yüksek oranda ve çift taraflı boyun metastazı yapma potansiyeline sahiptir. Dolayısıyla tedavi planı her iki boynu da içermelidir. Çift taraflı boyun diseksiyonuyla (genellikle selektif yeterlidir) birlikte uygulanan parsiyel larenjektomiler hastalığın patolojik olarak kesin evrelemesini ve gerekirse ek tedavi planlarının yapılabilmesini sağlar.

İleri evre glottik kanserler de metastaz yapma potansiyeline sahiptir (59). İleri evre glottik kanserlerde boyun N(0) ise tümörün evresine göre tek taraflı veya çift taraflı boyun diseksiyonu uygulanır. Klinik olarak pozitif boyunun tedavisi tutulan lenf nodunun evresine ve lokalizasyonuna bağlıdır. Bu amaçla radikal, modifiye radikal ve selektif lateral boyun diseksiyonları uygulanabilir (60). N(+) boyunda N1 ise selektif boyun diseksiyonu N2 veya N3 ise modifiye radikal veya radikal boyun diseksiyonu yapılır. İleri evre supraglottik kanserlerde çift taraflı boyun metastazı riski yüksek olduğundan boyun diseksiyonları evreye bakılmaksızın çift taraflı yapılmalıdır (59).

2.1.6.2. Radyoterapi

Larinks kanserlerinde radyoterapi tümörün yayılım bölgeleri, hastanın tıbbi durumu, hasta ve yakınlarının seçimi ile tedaviyi yapacak merkezin deneyimleri ve olanaklarına göre primer tedavi şekli olarak ya da kemoterapi ve/veya cerrahi tedavi ile birlikte kombine olarak da kullanılmaktadır (43).

Radyoterapi ile hücredeki temel etkilenen yapının DNA ve nükleer membran olduğu düşünülmektedir (61). DNA'da meydana gelen radyokimyasal olaylar radyasyonun direkt ve indirekt etkileriyle ortaya çıkar. Direkt etki, iyonizan radyasyonun doğrudan

hücrenin kritik yapılarıyla etkileşmesi sonucu olur. Bu etkileşme daha çok parçacık radyasyonların özelliğidir. Günlük hayatta tedavide kullanılan radyasyon indirekt mekanizmalar ile etki eder. İnsan yapısının büyük kısmını oluşturan su molekülleri radyasyonun etkinliğini arttırmaktadır. Bu mekanizma RT'nin neden özellikle hipoksik baş boyun malignansilerinde etkinliğinin az olduğunu da açıklamaktadır (62).

RT erken evre glottik veya supraglottik kanserlerde, cerrahi veya medikal olarak inoperabl kabul edilen olgularda veya operasyonu kabul etmeyenlerde önemli bir tedavi seçeneğidir. Larinkse 50-70 Gray(Gy) arasında 5-8 hafta RT verilmektedir. Tedavi esnasında genellikle ayaktan tedavi yapılması, cerrahiye göre biraz daha kaliteli ses sağlanması, cerrahi morbiditeyi engellemesi RT'nin avantajlarından (10). Radyoterapinin akut mukozit, farenjit, kondronekroz, laringeal ödem ve yeni tümör oluşumunu indüklemesi gibi dezavantajları vardır. Ayrıca radyoterapi sonrası nüksün saptanmasının zorluğu da başka bir dezavantajdır.

2.1.6.3. Kemoterapi

Larinks kanserlerinde kemoterapi bugün için tek başına küratif değildir (43). Kemoterapi neoadjuvan (indüksiyon), adjuvan (cerrahi ve/veya RT sonrası) ve konkomitan (eşzamanlı RT ile birlikte) olarak tedavide kullanılmaktadır. İndüksiyon kemoterapi (İK)'si giderek yaygınlaşan bir şekilde ileri evre baş boyun yassı hücreli karsinomlarında organ korunmasını amaçlayan bir tedavi protokolü olarak uygulanmaya başlamıştır.

Larinks kanserlerinde İK için en sık kullanılan rejimler sisplatin veya karboplatin ile birlikte 5-florourasil (5-FU) kullanılmasıdır (63). Yeni ajanlardan paklitaksel, dositaksel, gemsitabin, vinorelbin, topotekan larinks kanserlerinde test edilmektedir (59). Eşzamanlı KRT cerrahi yapılamayacak ya da önerilen cerrahiyi kabul etmeyen hastalarda uygulanan organ koruyucu bir tedavi seçeneğidir. Lokal ve bölgesel kontrolü artırmak için düşük dozda kemoterapotik ilaç kullanılmaktadır (64).

2.2. HPV Araştırma metodları

İmmunohistokimyasal boyama

Bu yöntemde HPV ile enfekte hücrelerde, kapsid antijenlerinin varlığı araştırılır. Human papillomavirus ile enfekte hücrelerde immünohistokimyasal yöntemlerle HPV kapsid antijenlerinin tespiti ise sensitivitesi çok az olmakla beraber ancak prodüktif HPV enfeksiyonunda mümkündür. Bu nedenle HPV enfeksiyonunun tanısı öncelikle viral nükleik asidin saptanması esasına dayanmaktadır (65).

Elektron Mikroskopi

Bu yöntemle enfekte keratinositler içindeki virionlar, nükleus içinde dizilmiş 55 nm çaplı kristalize partiküller şeklinde saptanabilir. Ancak sensitivitesinin düşük olması, ekonomik olmayışı ve lezyonun tamamen taranması pratik olmadığından kullanımı yaygın değildir (66).

Hibridizasyon testleri

Hibridizasyon, birbirini tamamlayıcı nitelikte iki tek iplikçikli nükleik asit molekülünün birbirine bağlanmasıdır. Pratikte, bilinen diziye sahip işaretli bir prob, bir hedef bölgeye bağlanarak iki iplikçikli yeni bir molekül ortaya çıkarır. Daha sonra bu işaretli molekül belirlenir (67).

- İn situ hibridizasyon (ISH)
- Southern blot hibridizasyon (SBH)
- Dot blot hibridizasyon (DBH)
- Floresan in situ hibridizasyon (FISH) (68)

Southern blot ve dot blot yöntemlerinde alınan örnekten hücresel DNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması gerekmektedir. Southern blot yönteminde DNA, restriksiyon enzimleri ile sindirilir, büyüklüğüne göre ayrılır, filtrelerde immobilize edilir ve ardından radyoaktif veya kimyasal olarak işaretlenmiş problemler ile belirlenmiş HPV tipine göre problemler. İşaretlenmiş tek sarmal viral DNA veya RNA problemleri çift sarmal hibrid oluşturmak üzere tamamlayıcı sarmal ile birleşir. Dot blot hibridizasyon yönteminde

DNA örneği restriksiyon enzimleri ile sindirilmek yerine denatüre edilir. Bu yöntem hızlı bir tekniktir ve daha az oranda DNA ile sonuç verebilir; ancak Southern blot kadar spesifik değildir (69). In situ ve filtre in situ hibridizasyon yöntemlerinde dokudan DNA izolasyonu gerekmez, doku veya smearlardaki viral sekanslar direkt araştırılır, ancak hücresel sekanslar ile çapraz hibridizasyon önlenemediği için yanlış pozitiflik ayırt edilemez (70).

Hibrid yakalama testi

Sinyal çoğaltma kullanılarak yapılan direkt DNA tespittir. Sentetik oligonükleotidler ile kaplanmış küçük cam veya metal boncuklar, sıvı fazlı hibridizasyon formatına benzer şekilde uygulanmaktadır. Oluşan hibridler, bağlanmayan problardan santrifüjleme veya manyetik alan uygulanması ile ayrılmaktadır. Bu amaçla kullanılan oligonükleotid, sıklıkla belirleyici bir prob ile eşlenen ‘yakalama probu’dur. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)’na göre özgüllüğünün nispeten az olması, dezavantajdır (71-73).

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Bu teknik bir DNA örneğindeki hedef sekansları çoğaltarak hibridizasyon metodlarından daha yüksek oranda spesifite ve sensitivite elde eder. PCR için rölatif olarak daha az miktardaki DNA yeterli olabilir. Hücre süspansiyonlarından ekstrakte edilen DNA veya formalinle fıkse edilmiş parafine yatırılmış doku kültürleri üzerinde çalışabilir. Geniş bir spektrumda HPV tiplerini araştırmak için yüksek oranda korunmuş oligonükleotid primer çiftleri seçilir. Tip spesifik oligomerler daha sonra spesifik HPV tipleri arasında ayırım yapmak için prob gibi kullanılır (74).

PCR'ın sensitivitesi her ne kadar yüksekse de kontaminasyon riski mevcuttur. Kontaminasyon yolları arasında çevresel yol, dışardan gelen DNA ve primer seçiminde varyasyonu sayabiliriz. PCR bazen yanlış pozitif sonuç verebilir. Bu durum çeşitli viral tiplerle oluşan "çifte infeksiyon" olarak algılanabilecek rekombine olayları akla getirir (75).

Tablo 2. HPV tanı yöntemlerinin karşılaştırılması (76)

YÖNTEM	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
Southern Blot		Sınırlı klinik uygulama Karmaşıklık Standardizasyonu zor
FISH		Yeterince duyarlı değil Tip tayini yanlışlıkları Hatalı sonuçlar Zaman alıcı ve yorucu
Hybrid yakalama	Duyarlılığı yüksek Kantitatif Hızlı ve ucuz	Özgüllüğü düşük
PCR	Duyarlılığı yüksek Tüm HPV tiplerini saptama	Kontaminasyon riski yüksek

3. HASTALAR VE YÖNTEM

3.1. HASTALAR

Bu çalışmaya Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz-Baş Boyun Cerrahisi ve Onkoloji Kliniği'nde Ocak 2006-Aralık 2011 tarihleri arasında başvuran larinks yassı hücreli kanserli 57 hasta alındı. Bu 57 hastanın 2'si parafin bloklarına ulaşamadığı için, 3'ünün parafin bloklarında yeterli doku olmadığı için çalışmaya alınmadı. Toplam 52 hasta çalışmaya alındı. Primer tedavi olarak RT, eşzamanlı KRT ve İndüksiyon kemoterapisi (İK) verilen hastalar çalışmaya alındı. Kontrol grubu olarak 15 tane yeni tanı almış (Ocak 2014-Mayıs 2014 tarihleri arasında) larinks karsinom hastası alındı.

Radyoterapi protokolü erken evre 28 hastaya uygulandı. 2006-2009 yılları arası 17 hasta konvansiyonel (2 boyutlu) planlama ile tedavi edilirken 2009 sonrası 11 hastaya konformal tedavi planlanarak radyoterapi uygulaması yapıldı. Bu hastaların 20 tanesinde glottik bölge tümörü mevcuttu, 8'inde ise supraglottik tümör mevcuttu. Bu hastalara paralel karşılıklı ışın alanları kullanılarak, tüm laringeal kıkırdaklar tedavi sahası içinde olacak şekilde tedavi yapıldı. Larinks yassı hücreli kanseri tanısı konulan hastalara fraksiyon başına 225 cGy (Santigray)'den RT dozu haftada 5 gün olmak üzere 29 fraksiyon küratif RT tedavisi verilmistir. Bu 28 hasta tedavi sonrası ortalama 50 (12-86) .

KRT protokolü 14 hastaya uygulandı. Bu tedavi kolundaki hastalara RT verilmeden önce haftalık 50 mg/m² sisplatin verilmiştir. Haftalık kan üre azotu ve kreatinin

değerleri takip edilmiştir. Fraksiyon başına sisplatin sonrası 200 cGy/gün'den ışıın dozu 60-70 fraksiyondan verilmiştir. Bu hastaların 3 ünde glottik, 10 unda supraglottik tümör mevcuttu. Bu 14 hasta tedavi sonrası ortalama 32 (5-84) ay takip edildi. ay takip edildi.

İndüksiyon kemoterapi protokolü 10 hastaya uygulandı. Sisplatin 50 mg/m²/gün 1-5. Günler ve 5-fluorourasil 1000 mg/m²/gün 1-5. günler şeklinde 21 günde bir uygulandı. Sisplatin 4-6 saatlik infüzyon, 5-Fluorourasil 24 saatlik infüzyon olarak verildi. Kemoterapi öncesi yeterli oral hidrasyonu takiben sisplatin 1000cc serum fizyolojik içinde, 5-FU ise 1000 cc % 5 dekstroz içinde uygulandı. Sisplatin tedavisinde doz redüksiyonuna gidilmezken, tedavi öncesi serum kreatinin seviyesinin % 25'den daha fazla arttığı veya kreatinin klirensinin 40 ml/dakika'dan daha azı olduğu durumlarda sisplatin kesildi. Antiemetik profilaksisi olarak deksametazon ve serotonin reseptör antagonistleri kullanıldı. Bu gruptaki hastaların 9'unda supraglottik tümör, bir tanesinde glottik tümör mevcuttu.

Her hastanın dosyasına tarafımızdan kaydedilen yaş, cins, şikayet, alışkanlıklar, fizik muayene bulguları, görüntüleme, tedavi protokolleri ve sonuçları gözden geçirilerek kaydedildi.

Retrospektif bir çalışma olup, çalışmaya alınan olguların tümünde histopatolojik olarak kanıtlanmış larinks yassı hücreli kanseri vardı. Parafin bloklarına ve veri kayıtlarına ulaşamayan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Bu parafin bloklardan PCR yöntemi ile HPV DNA araştırıldı.

Yöntemin kontrolü için servikal smear alınan hastaların örneklerinden PCR yöntemiyle HPV DNA araştırıldı.

Parafin dokuların kontrolü için 15 tane yeni tanı almış (Ocak 2014-Mayıs 2014 tarihleri arasında) larinks yassı hücreli karsinom hastası alındı. Bu hastaların taze dokularından DNA izolasyonu yapıldı. PCR yöntemi ile HPV varlığı araştırıldı.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. PCR yöntemi ile HPV Araştırılması

DNA izolasyonu

1. 25-50 mg formalinle tespit edilmiş, parafin bloğa gömülmüş doku örneklerinden 10 μ kalınlığında 10-20 yaprak kesilerek, 1,5 ml'lik ependorf tüplerine alındı.
2. 1 ml ksilol eklendi, kapak kapatılıp kuvvetli vortexlenip oda ısısında 5 dakika bekletildi. 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi, üstteki sıvı döküldü (Resim1-2).
3. 1 ml % 100 etanol eklendi, kapak kapatılıp kuvvetli vortexlendi. 2 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi, üstteki sıvı döküldü.
4. Süpernatant kısım atıldı. Üzerine 180 μ l ATL Buffer eklendi. 20 μ l proteinaz K eklenerek vortexle karıştırıldı.
5. 56 C°'de 1 saat (örnek tamamen eriyene kadar) inkübe edildi (sık sık çalkalama yapıldı).
6. 90 C°'de 1 saat inkübe edildi.(sık sık çalkalama yapıldı) (Resim 3).



Resim 1: Vortex cihazı(elektro-mag)



Resim 2: Santrifüj cihazı(Scilogex)



Resim 3. HPV DNA izolasyonunda kullanılan ısıtmalı çalkalayıcı(mixing block)(BIOER).

7. Kapaktaki damlaların ayrılması için tüpler 3000 rpm de quick spin yapıldı.

8. Tüplerin üzerine 200 µl AL Buffer eklenip ve 15 sn. pulse-vorteks ile karıştırıldı. Tüpler quick spin yapıldı. Tüplere 200 µl % 96-100 etanol eklendi ve 15 sn. pulse-vorteks ile karıştırıldı.

9. 1,5 ml tüp kapaktaki damlaların ayrılması için tüpler 3000 rpm de quick spin yapıldı.

10. Tüplerin içeriği, kenarı ısıtmadan, dikkatli bir şekilde QIAamp MinElute 2 ml collection tüplere yerleştirilmiş spin kolonlara aktarılıp, kapağı kapatıldı ve 8000 rpm'de 1 dak. santrifuj edildi. Kolonlar yeni 2 ml collection tüplere aktarılıp flow-through içeren collection tüpler atıldı. Santrifüj sonrası tüp içeriğinin tamamı membranı geçmeyenler, kolon tamamen boşalana kadar yüksek hızda yeniden santrifüj edildi.

11. QIAamp MinElute kolonuna 500 µl AW1 buffer eklenip kapağı kapatılarak ve 8000 rpm'de 1 dak. santrifuj edildi. Kolonlar yeni 2 ml collection tüplere aktarıldı. Flow-through içeren collection tüpler atıldı

12. QIAamp MinElute kolonununa 500 µl AW2 buffer eklenip kapağı kapatılarak ve 8000 rpm'de 1 dak. santrifuj edildi. Kolonlar yeni 2 ml collection tüplere aktarılıp Flow-through içeren collection tüpler atıldı.

13. Membranın kuruması için tam hızda (14000 rpm) 3 dk santrifüj yapıldı.

14. QIAamp MinElute kolonunu temiz 1.5 ml'lik bie tüp içine koyulup, Flow-through içeren collection tüpler atıldı. QIAamp MinElute kolonunun kapağı dikkatli bir şekilde açılıp membranın ortasına 20-100 µl ATE buffer uygulandı.

15. Kapağı kapatılıp, oda ısısında 1 dk bekletildi. Tam hızda (14000 rpm) 1 dk santrifüj edildi.

HPV Tiplendirilmesi

1. DNA İzolasyonu yapılmış dokulara PCR karışımı konuldu. HPV typing- molgentix SL (lot no: 1072012) kiti kullanılarak multipleks-floresan PCR yöntemi ile 15 tip HPV genotipi taranmıştır.

- PCR MİX den 6.25 µl, PRIMER Mix den 3.75 µl ve DNA 2.5 µl karıştırıldı.

-Toplam 12.5 µl olacak şekilde PCR tüpüne pipetlendi.

2.Ürünler PCR cihazına yüklendi (Resim 4).



Resim 4. PCR amplifikasyonu yapılan thermal cycler cihazı.(The GeneAmp® PCR System 970)

Taq aktivasyonu için 95°C de 15dk bekletildi.

Denatürasyon için 95°C 30 sn bekletildi

Primerlerin hedef DNA ya bağlanması için 64°C 30 sn bekletildi.

} Bu işlemler 35 kez
tekrarlandı.

Genişleme için 72°C 30 sn bekletildi.

Final genişleme için 60°C 10 dk bekletildi.

Ürünler 4-20 °C de muhafaza edildi.

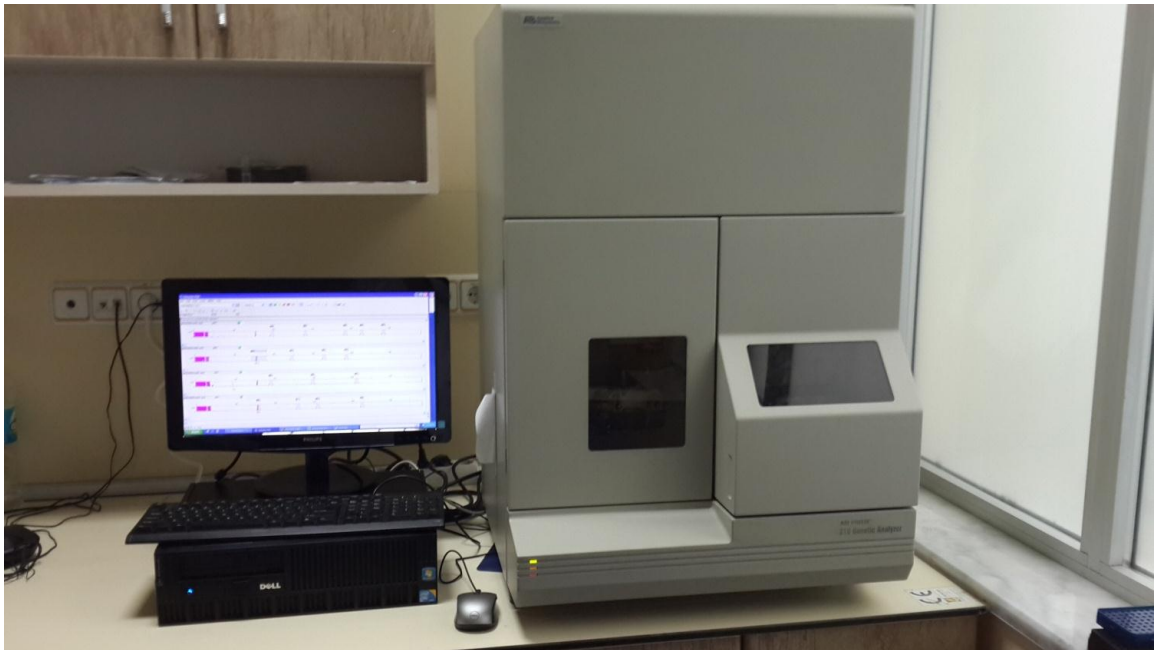
3. Ürünler ABI 310 cihazının örnek yükleme tüplerinde karıştırıldı.

-0.3 µl GeneScan™-500 LIZ™

-20µl Hi-Di™ Formamide (ABI P/N 4311320) eklendi.

-2 µL PCR ürünü eklendi.

4.ABI prism 310 genetik analyser marka cihaz ile fragmentlerin yürütmesi yapıldı (Resim 5).



Resim 5: Applied Biosystems Genetic Analyzer 310 cihazı ve bilgisayar donanımı (ABI 310)

Sonuçların analizleri

Bu HPV kiti ile 15 HPV tipi tespit edilmektedir. Bu tipler HPV tip 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 6 ve 11 dir. Her HPV tipi ilgili amplikonun boyutu ve rengine göre tespit edilmektedir. Benzer boyutta olan tipler farklı florokromlar ile etikenlenmektedir. Primerleri etiketlemek için FAM, VIC, NET ve PET boya ları kullanılmaktadır. Bu florokromların renkleri sırasıyla mavi, yeşil, sarı-siyah ve kırmızıdır. Turuncu renkli olan LIZ boyası ise boyut standardını belirlemek için kullanılır (Tablo 3).

HPV F-PCR ürünleri elektroforetogramda spesifik renk ve boyutta pikler halinde tespit edilir.

İnsan polimorfik DNA sekansı (D18S391 Short Tandem Repeat) kontrol için amplifiye edilmektedir. Bu ürünün varlığı HPV negatif örneklerde DNA bütünlüğünün olduğunu ve PCR inhibitörlerinin olmadığını gösterir.

Viral yükün düşük veya yüksek olduğu durumlarda testin sensitivitesini etkilememek için kontrol sekansının amplifikasyon durumuna dikkat etmek gerekir.

Tablo 3: F-HPV tiplendirme kitinde renk boyutlara göre subtiplerin belirlenmesi.

HPV Tipi	PCR ürünü rengi	Boyut
HPV-58	PET	156
HPV-33	6-FAM	196
HPV-6	PET	256
HPV-16	NED	296
HPV-35	VIC	327
HPV-18	6-FAM	386
HPV-56	6-FAM	428
HPV-31	6-FAM	489
HPV-68	NED	189
HPV-39	VIC	244
HPV-59	6-FAM	283
HPV-52	PET	308
HPV-51	VIC	389
HPV-45	NED	414
HPV-11	PET	424
D18S391	VIC	140-180

HPV Pozitifliği

HPV varlığı elektroforetogramda floresan pikler şeklinde tespit edilir. Tiplendirme piklerin boyut ve renklerine göre yapılır. Yüksek viral yüklü örneklerde internal kontrol piki(IPC) tespit edilemeyebilir. Sonuç geçerlidir.



Resim 6: Tek tip pozitif sonuç.



Resim 7: Birden fazla HPV tipinin pozitif olduğu analiz sonucu

HPV Negatifliği

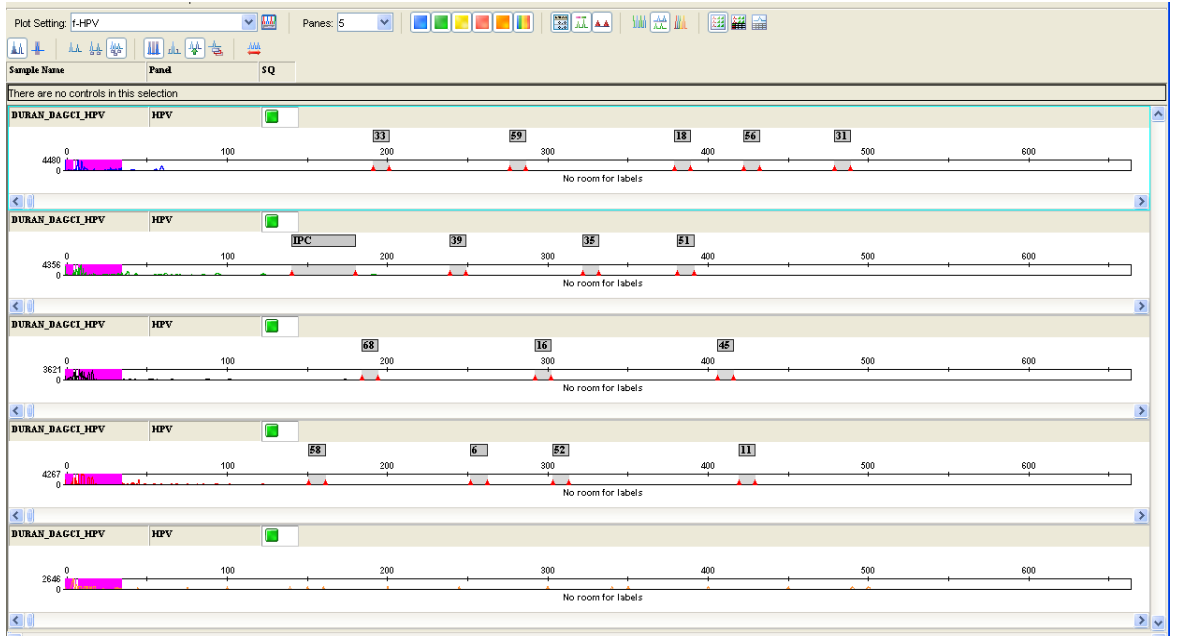
HPV negatif örneklerde HPV'ye spesifik pikler olmaz. Çalışmada internal kontrol pikinin(IPC) tespit edilip, analiz edilen örnekte herhangi bir DNA pikinin görülmediği durum HPV negatif olarak değerlendirildi. IPC amplifikasyonu zayıf olanların tüm prosedürü tekrar edildi.



Resim 8: HPV Negatif analiz sonucu.

Geçersiz sonuç

Elektroforetogramda hiçbir pik yoktur. Hem HPV ürünün hem de insan DNA ürününün olmaması uygunsuz örnek tipi veya örneğin toplanması veya hazırlanması sırasında bir hata nedeniyle olabilir. Analiz edilen örnekte internal kontrol DNA pikinin tespit edilmediği durumda sonuç geçersiz kabul edilip çalışma tekrarlandı.



Resim 9: İnternal kontrolün(IPC) çalışmadığı geçersiz analiz sonucu.

4. BULGULAR

Araştırmaya dahil edilen hasta sayısı 52 olup hastaların 51(% 98.07)'i erkek, 1(% 1.9)'i kadındı. Hastaların genel olarak yaş ortalaması 63.5 (42-85) olarak bulundu. Hastaların 51 (98.07)'inde sigara içme, 11 (% 21,1)'inde sigara ile birlikte alkol kullanma öyküsü mevcuttu. Hastaların 28 (% 53,8)'inde supraglottik tümör, 24 (% 46,2)'ünde glottik tümör mevcuttu. Hastaların 28 (% 53,8) tanesine tedavi olarak radyoterapi, 14 (% 26,9)'üne kemoradyoterapi 10 (% 19,2)'una ise indüksiyon kemoterapisi uygulandı.

Tablo 4. Çalışmaya alınan hastaların özellikleri

Hasta Özellikleri		Ortalama	%
Yaş		63,5 (42-85)	---
Cinsiyet	Erkek	51	98,07
	Kadın	1	1,9
Yerleşim	Supraglottik	28	53,8
	Glottik	24	46,2
Evre	Erken	28	53,8
	Geç	24	46,2

4.1. RADYOTERAPİ GRUBU

Hastalardan 6 tanesinde nüks saptanıp opere edildi. 3 ünde 1 yıl sonra nüks saptanırken 1 inde 6 ay sonra 1 inde 2 yıl, 1 inde ise 3 yıl sonra nüks gelişti. 1 hasta tedaviden bir yıl sonraki konrollerinde nüks yoktu fakat kanser dışı sebepten(barsak perforasyonu) exitus oldu.

Bu 28 hastanın hiçbirinde PCR yöntemi ile HPV DNA sı saptanmadı.

4.2. EŞZAMANLI KEMORADYOTERAPİ(KRT) PROTOKOLÜ

Hastalardan 2 tanesinde yaklaşık 1 yıl sonra nüks saptanıp opere edildi. Bir hastada ise primer tümör tedaviye cevap verirken boyun metastazı sebat ettiği için boyun diseksiyonu yapıldı. İki hasta tedavi başladıktan sonraki 3 ay içerisinde ex oldu.

Bu 14 hastanın hiçbirinde PCR yöntemi ile HPV DNA saptanmadı.

4.3. İNDÜKSİYON KEMOTERAPİSİ PROTOKOLÜ

Bu hastaların takibinde iki tanesinde nüks gelişti ve opere edildi. Opere edilenlerden bir tanesi operasyondan 6 ay sonra ex oldu.

Bu 10 hastanın hiçbirinde PCR yöntemi ile HPV DNA saptanmadı.

Tablo 5. Hastaların aldıkları tedaviye göre nüks oranı ve HPV pozitifliği

	Hasta Sayısı	Nüks Oranı	HPV Pozitifliği
RT	28(% 53)	6(% 21)	0
KRT	14(% 27)	2(% 14)	0
İKT	10(% 19)	2(% 20)	0
TOPLAM	52(% 100)	10(19,2)	0

4.4. KONTROL GRUBU

Yeni tanı almış larinks yassı hücreli karsinom hastalarının taze dokularından DNA izolasyonu yapıldı. Hiçbirinde PCR ile HPV saptanmadı.

Yöntemin kontrol grubu olan hastaların servikal smearlarda PCR ile yapılan analizde farklı tiplerde HPV pozitifliği saptandı.

5. TARTIŞMA

Larinks kanserleri dünyada en yaygın altıncı kanser türü olup tüm malign tümörlerin % 3'ünü, baş ve boyun kanserlerinin yaklaşık % 25'ini oluşturur. Bu kanserlerinin % 95'den fazlasında yassı hücreli kanserler görülmektedir (77, 78). Larinks kanserleri genellikle hayatın 5. dekadında veya daha ileri yaşlarda ve erkeklerde görülür ancak kadınlarda 1950 'li yıllardan itibaren artan sigara kullanma alışkanlığına paralel olarak giderek artan bir insidans söz konusudur (2). Larinks kanserleri multifazik ve multifaktöriyel etyopatogeneze sahip olup sigara bağımlılığı en sık görülen bağımsız risk faktörüdür. Sigara; özellikle glottik, alkol ise supraglottik tümörler için etyolojik faktör niteliğindedir. Sigara ve alkol kullanımı birlikte olduğunda kanser gelişimi açısından birbirinin etkilerini potansiyelize edecek tarzda etkileşim göstermektedir (79).

Bizim çalışmamızda hastaların % 98'i erkek % 2'si kadın olup yaşları 42 ile 86 (63,5) arasında değişmekteydi. Hastalarımızın % 98'inde sigara, % 21' inde sigara ile birlikte alkol kullanımı mevcuttu.

Günümüzde teknolojik gelişmelerle birlikte hastalıkların seyrini öngörmeye değerli olabilecek belirteçlerin araştırılmasına olan ilgi gün geçtikçe artmıştır. Elde edilecek yeni verilerle tedavide başarıyı etkileyebilecek faktörler daha biyopsi aşamasında tespit edilerek hastalara uygun farklı tedavi seçenekleri sunulabilecektir. Hastanın yaşı, cinsiyeti, tümörün yerleşim yeri, evresi, metastatik lenf nodu varlığı bilinen prognostik faktörlerdir (80). Ayrıca akciğer kanserlerinde Epitelyal Growth Hormon Reseptör mutasyonu varlığı, meme kanserlerinde östrojen reseptör ve progesteron reseptör durumu, papiller tiroid kanserlerinde BRAF mutasyonu, medüller tiroid karsinomunda

kalsitonin değerleri, nazofarinks kanserlerinde Epstein-barr virüsü prognozu etkileyen bilinen önemli belirteçlerdir (81-86). Human papillomavirüs larinks kanseri, serviks kanseri gibi birçok kanserin etyolojinde rol oynayan ve prognozu etkileyen önemli belirteçlerden biridir (31, 87-90).

Human papillomavirus hücre kültürü veya laboratuvar hayvanlarında üretilmemektedir. Serolojik testler de yeterince duyarlı değildir (91).

Human papillomavirus varlığının tespiti viral nükleik asidin saptanması esasına dayanan immunohistokimyasal boyama, elektron mikroskopi, hibridizasyon testleri (İn situ hibridizasyon, southern blot hibridizasyon, Dot blot hibridizasyon, Floresan in situ hibridizasyon), hibrid yakalama testi ve PCR 'dır.

İmmünohistokimyasal boyama HPV'nin kapsid antijenlerine karşı geliştirilmiş antikorları saptamaya yönelik testlerdir. özgülüğü yüksek (%30-50) olmasına karşın, prekanseröz ve kanseröz lezyonlarda duyarlılığı azdır (92, 93).

Elektron mikroskopisinin özgülüğünün düşük olması, ekonomik olmayışı ve lezyonun tamamen taranması pratik olmadığından kullanımı yaygın değildir (66).

Southern blot duyarlılığı yüksek bir yöntemdir. Ancak zaman alıcı prosedürlere sahip olduğundan ve radyoaktif işaretli proplar ile çalışıldığından klinik kullanım için pratik değildir (94). Dot blot hibridizasyon kullanımı kolay, ucuz, sadeleştirilmiş fakat daha az duyarlı bir Southern blot yöntemidir. Bazı viruslarla çapraz reaksiyona girerek ayırt edememe, yalancı negatiflik başlıca dezavantajlarıdır (94, 95). in situ hibridizasyon sensivitesinin düşük olması nedeniyle rutinde kullanılmamaktadır. Hücre başına 20-50 virus saptayabilir. Klinik açıdan sadece pozitif sonuçlar anlamlı iken, yalancı negatiflik oranında oldukça yüksektir (96).

Hibrid yakalama testi sinyal çoğaltma kullanılarak yapılan direkt DNA tespitidir. Bu yöntemin duyarlılığı yüksektir ancak özgülüğü düşüktür (94, 97).

PCR tekniği, basitliği ve esnekliği nedeniyle yaygınlaşmış olup mikrobiyal patojenlerin saptanması, klinik izolatların identifikasyonu ve suş alt tiplendirmelerinde kullanılmakta olan bir metoddur (98, 99). Taze ya da parafinize dokularda spesifik DNA ya da RNA bölgelerinin amplifikasyonunu sağlar (100).

PCR ile viral yükün yüksek olmasına gerek kalmaksızın çok küçük miktarlarda bile spesifik DNA sekansları çoğaltılabilir ve yüzbin hücre içinde enfekte bir hücreyi bulabilir (101). Rosemary ve ark. (102) baş boyun kanserlerinde HPV saptama oranını southern blot'ta % 24, dot blot'ta % 6, İn situ hibridizasyon'da % 18, PCR' da ise % 34 olarak saptamışlar. Li ve ark. (103)'nın yaptığı 55 çalışmayı içeren bir metaanalizde PCR'ın HPV saptama oranını PCR dışı çalışmalara göre daha yüksek olduğunu göstermiş ve PCR'ın daha sensitif yöntem olduğunu belirtmiştir.

Human papillomavirus tanı yöntemleri arasında en duyarlı metod olan PCR referans test olarak kabul edilmektedir (98, 99). Ancak bu yüksek sensitivite oranı da yüksek yanlış pozitifliğe sebep olabilir (104).

Bu çalışmada human papillomavirus tespitinde diğer moleküler yöntemlere göre sensitivitesi ve spesifitesi daha yüksek olan ayrıca moleküler esaslı HPV araştırma metodlarından altın standart olan PCR yöntemi kullanılmıştır.

Human papillomavirüs (HPV), cinsel yolla bulaşan, seksüel olarak aktif yetişkinlerde ve adölesanlarda görülen en yaygın enfeksiyonlardan biridir (29). Human papillomavirüs servikal kanserin primer etiyolojik ajanı olup, servikal kanser ve prekürsör lezyonların % 93-100'ünde HPV-DNA tespit edilmektedir. Human papillomavirüs varlığını ve HPV tiplerinin dağılımını tespit etmek hastalığın tedavisinde ve son zamanlarda geliştirilen aşılama programlarının düzenlenmesinde önemlidir (88, 89). İllades-aguiar ve ark.(105) Güney Meksika'da serviks kanserli 133 kadının örneklerinden PCR ile HPV varlığını araştırmışlar ve olguların % 100'ünde HPV pozitifliği saptanmıştır. Milutin Gasperov ve ark. (106) sitolojik olarak yüksek grade'li skuamöz intraepitelyal lezyon tespit edilen Hırvat kadınlardan toplanan örneklerin % 86,7'sinde PCR ile HPV pozitifliği saptamışlardır. Üsubütün ve ark. (107) ülkemizde yaptıkları daha kapsamlı bir çalışmada invaziv serviks kanseri olan 248 vakada HPV prevalansı % 93,5 olarak bildirilmiştir. Serviks karsinomlarının dışında vulvar, anal ve penil kanserlerin bir kısmının HPV ile ilişkili olduğu görülmüştür (31). Yapılan çalışmalarda vulvar yassı hücreli kanserlerde HPV görülme sıklığı % 50, penil kanserlerde % 30- 50, vajinada görülen kanserlerde % 30-60 oranında HPV varlığı saptanmıştır. Anal ve perianal kanserlerde de benzer oranlar söz konusudur ancak bu tür kanserlerin dünya çapında görülme oranı oldukça düşüktür (88, 89).

Baş boyun ve laringeal kanserlerin bir bölümünden HPV'ler sorumlu tutulmaktadır (29). Perez-Ayala'nın (108) Granada ve ıspanya'da yaptığı çalışmada baş-boyun kanserli hastalarda HPV pozitifliği % 54 olarak saptanmış iken Hoshikawa'nın (71) Tokyo'da yaptığı çalışmada HPV pozitifliği % 20,6 olarak saptanmış ve coğrafik farklılıkların HPV görülme oranını etkilediği belirtilmiştir. Mc kaig ve ark. (102) yaptığı çalışmalarında baş ve boyun karsinomu olan hastalardaki ortalama HPV sıklığı % 34.5 olup bunların % 40'ında HPV-16 pozitif bulunmuştur.

Baş boyun kanserlerinde özellikle tonsil ve orofarenks kanserlerinde HPV saptanma oranı yüksektir. Herrero ve ark. (109) oral kavite kanserlerinde HPV prevelansını % 23 olarak belirtmiş, oral kavite ve orofarinks kanserlerinde birden fazla cinsel eşi olan veya oral seks yapanlarda daha yüksek oranda HPV pozitifliği tespit etmişler. Gillison ve ark. (110) 2000 yılında baş boyun kanserli 253 hastanın 62'sinde HPV pozitifliği saptamışlar. Çalışmada oral kavite kanserlerinde % 12, orofarinks kanserlerinde %56,6, hipofarenks kanserlerinde % 9,5, larinks kanserlerinde % 18,6 oranında HPV pozitifliği saptanmışken nazofarinks karsinomlu 2 hastada HPV pozitifliği saptanmamıştır. Stina Syrjanen'in 2005 yılında yaptığı çalışmasında HPV görülme sıklığı tonsiller karsinomlarda % 51, orofarenks karsinomlarında % 31-55, larinks karsinomlarında % 25 ve sinonazal karsinomlarda % 21 olarak saptanmıştır (111). Fakhry ve ark. (112) yaptığı çalışmada 34 larinks karsinomlu hastanın hiçbirinde HPV pozitifliği saptanmamışken 62 orofarenks kanserli hastanın 38'inde (% 61) HPV pozitifliği saptanmıştır. Pintos ve ark. (113)'nın 2008 yılında Kanada'da yaptıkları çalışmalarında tonsil kökenli yassı hücreli kanserlerde % 43 oranında HPV pozitifliği saptamışlar. Da Silva ve ark. (114) çalışmalarında Onkojenik HPV genomu saptanan bireylerde dil kanseri gelişme riskinde %25 artış bildirilmiştir.

Liu ve ark. (103) larinks kanserli hastaların parafin dokularında PCR yöntemiyle % 41 oranında HPV pozitifliği saptamışlar. Pozitif çıkanların % 83'ünde HPV-16, % 17'sinde ise HPV-18 bulunmuş. Lassen ve ark. (87) Danimarka'da 428 larinks kanseri hastanın 71 (% 16,5)'inde immünohistokimyasal boyama ile HPV pozitifliği elde etmiştir. Bauman 38 larinks kanserli hastanın 6 (%15,7) tanesinde PCR ile HPV pozitifliği saptamıştır (115). Pintos ve ark. (116) Kanada'da yaptığı çalışmada 52 larinks karsinomlu hastanın 8 (% 15,3)' inde PCR yöntemi ile HPV saptanmıştır. Hassumi-Fukasawa (117) Brezilya'da 63 larinks kanserli hastanın dokularında PCR ile HPV

varlığını araştırmış. Bu olguların 10 tanesinde internal kontrol saptanmamış, kalan 53 olgunun 7 (%13,2)'sinde HPV pozitifliği saptanmıştır.

Öktem ve ark. (70) ülkemizde 2000 yılında yapılan çalışmasında 20 adet larinks kanserli hastanın hiçbirinde PCR yöntemiyle HPV varlığı saptanmamıştır. Bu negatif sonucu coğrafi farklılıklara bağlı olabileceğini belirtmiştir. Fakhry ve ark. (112) 2008 yılında Amerika'da yaptığı çalışmada 62 orofarenks kanserli hastanın 38 (% 61)'inde HPV pozitifliği saptanmış ancak 34 larinks kanserli olgunun hiçbirinde HPV pozitifliği saptanmamıştır. Bu sonucun Gillison ve ark. (118) 2004 yılında yaptığı tarama çalışmasının sonuçlarıyla benzer şekilde HPV'nin baş boyun kanserlerinde özellikle orofarenks kanserleri ile ilişkili olduğunu belirtmiştir. Gallo ve ark.(5)'nin 2009 yılında yaptığı çalışmada 68 larinks lezyonu (41 larinks kanseri, 4 displazi, 5 laringeal papillom ve 18 bening laringeal lezyon) olgusunda PCR yöntemiyle HPV varlığını araştırmışlar. 5 laringeal papillom lezyonunun 4'ünde HPV pozitifliği saptanmış iken larinks kanserli ve diğer benign larinks lezyonların hiçbirinde HPV pozitifliği saptanmamıştır. Bu çalışmada larinks malign lezyonlarında HPV negatif olmasının sebebi olarak “vur ve kaç” teorisi gösterilmiş. Bu teoriye göre HPV hücrelere yerleşip E6 ve E7 genleri aracılığıyla malign transformasyonu tetikledikten sonra hücrelerde ölüyor. Bu yüzden malign dokudan alınan biyopsilerde HPV DNA'sı saptanamıyor (101, 119).

Bizim çalışmamızda 52 larinks kanseri vakasının parafin bloklarından PCR yöntemiyle HPV pozitifliğini araştırdık. Yaptığımız analizde hiçbir vakada HPV pozitifliğine rastlayamadık.

Çalışmamızdaki negatif sonucun parafin dokuların eski olmasından kaynaklanabileceği şüphesi üzerine kontrol amaçlı olarak 15 tane yeni tanı almış (Ocak 2014-Mayıs 2014) larinks kanseri olgusu dahil edildi. Bu hastaların taze dokularından DNA izolasyonu yapıp PCR yöntemiyle analiz edilip HPV araştırıldı. Bu vakaların da hiçbirinde de HPV pozitifliğine rastlayamadık. Bu da parafin blokların eski olmasının negatifliğin sebebi olmayabileceğini bize gösterebilir. Çalışmamızda HPV typing- molgentix SL (lot no: 1072012) kiti kullanılmıştır. Bu kit laboratuvarımızda rutin kullanılan bir kittir. Yöntemin kontrolü için servikal smearlarda PCR ile yapılan analizlerde farklı HPV tipleri saptandı. Hastanemizde aynı kitle kadın doğum, baş boyunun larinks dışı vakalar ve diğer birçok bölümle ilgili parafin dokularda birçok farklı HPV tipini saptamıştır.

Ayrıca larinks kanserli bir olgunun penisindeki benign lezyondan HPV varlığı araştırılmış ve PCR ile yapılan analizde HPV-6 pozitifliği saptandı. Aynı olgunun larinks kanserli dokusunda da HPV varlığı araştırıldı ancak larinks kanserli dokuda HPV saptanmadı. Bütün bunlar çalışmanın negatif olmasının kit ile ilgili olmadığını gösterebilir. Bu sonuçları ve bizim çalışmamızı da gözönüne alarak coğrafik popülasyon farklılıkları, tümör lokalizasyonları ve popülasyondaki cinsel davranış ve hijyen alışkanlığı farklılıklarının HPV görülme sıklığını etkilediği söylenebilir.

Tablo 6. Literatürde bazı HPV araştırma yöntemleri ve pozitiflik oranları

Araştırmacı	Vaka sayısı	Doku	Teknik	HPV oranı (%)
lessen ve ark. (87).	156	Parafin	immünohistokimya	22,4
Kaya ve ark. (120).	21	Parafin	in situ hib.	47
Kahn ve ark. (71).	42	Parafin	Southern blot	2,3
Löning ve ark. (121).	5	Parafin	Dot blot	40
Kiyabu ve ark. (122).	10	Parafin	PCR	40
Perez-ayala ve ark.(108).	48	Parafin	PCR	54
hoshikawa ve ark(71).	34	Parafin	PCR	20,6
Oktem ve ark. (70).	22	Parafin	PCR	0
Gallo ve ark. (5).	40	Taze doku	PCR	0
Major ve ark. (8).	18	Taze doku	PCR	44
Duray ve ark. (123).	59	Parafin	PCR	79
Morshed ve ark. (124).	130	Parafin	PCR	27,6
Fakhry ve ark. (112).	34	Parafin	ISH	0
Fukasawa ve ark. (117).	53	Parafin	PCR	13
Güvenç ve ark. (125).	47	Taze doku ve parafin	PCR	10,6
Deilson ve ark. (126).	110	Parafin	PCR	37,3
Almadori ve ark. (100).	45	Taze doku	PCR	37,3
Gorgoulis ve ark. (127).	154	Parafin	PCR	13
Brandwein ve ark. (128).	40	Parafin	PCR	8
Bu çalışma	52	Parafin	PCR	0

Serviks kanserlerinde HPV 18 varlığı az diferansiyasyon ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Ayrıca HPV 18 varlığı ile lenf nodu metastazı ilişkisi gözlenmiştir (7). HPV 18 pozitif servikal kanserlerde rekürrens oranı % 45 iken HPV 16 pozitif kanserlerde bu oran % 16'dır. HPV pozitif vulva ve penil karsinomların prognozu HPV içermeyenlerden daha

iyi olmaktadır. Anal ve perianal kanserlerde de benzer bir durum söz konusudur (88, 89).

Lindel ve arkadaşları (9) orofarinksin HPV pozitif yassı hücreli karsinomlarının diğerlerine göre radyoterapiye daha duyarlı ve dolayısıyla daha iyi prognozlu olduklarını bildirmişlerdir. Wittekindt ve ark. (90) yaptığı çalışmada tonsiller karsinomlarda HPV pozitifliğinin prognozu iyi yönde etkilediğini saptamıştır. Lassen ve ark. (87) 'nın Danimarka'da yaptığı çalışmalarında 794 baş boyun kanseri vakasında immünohisokimyasal boyama ile HPV araştırmışlar. HPV pozitif olan hastaların radyoterapiye daha duyarlı oldukları ve HPV'nin prognozu iyi yönde etkilediği saptanmıştır (87). Hassumi-Fukasawa'nın (117) Brezilya'da yaptıkları çalışmada HPV pozitifliğinin orofarenks kanserlerine benzer şekilde larinks kanserlerinde de prognozu iyi yönde etkilediğini belirtmişlerdir. Syrjanen ve ark. (111) yaptığı çalışmada tonsiller, orofarengeal, sinonazal ve laringeal kanserlerde human papillomavirüs pozitif kanserlerin prognozunun daha iyi olduğu belirtilmiştir.

Buna karşılık bazı çalışmalarda da HPV varlığının kötü prognoz göstergesi bazılarında ise prognoza etkisi olmadığı belirtilmiştir. Brandwein ve ark. (128)'nin çalışmasında 40 laringeal kanserli hastanın 25'i postoperatif takip edilmiş, HPV pozitif olanların prognozunun daha kötü olduğu belirtilmiştir. Clayman ve ark. (129) larinks ve hipofarinks kanserli 65 hastayı içeren serilerinde 30 vakada HPV DNA pozitifliği saptayarak % 46'lık bir oran elde etmişlerdir. Hastalar ortalama 42 ay takip edilmiş ve HPV pozitif hastaların prognozunun daha kötü olduğu belirtilmiştir. Geisler ve ark. (130) 'nın 190 baş boyun bölgesi karsinomunu dahil ettikleri çalışmalarında HPV varlığının prognoz ile ilişkisi olmadığı göstermiştir. Snijders ve ark.(72) baş boyun kanserlerinde human papillomavirüs varlığının prognoz ile ilişkisi olmadığını belirtmişlerdir.

Bu çalışmada larinks kanserlerinde human papillomavirüs pozitifliği saptanmadığı için karşılaştırma yapılamamış, tedaviye cevaba ve prognoza etkisi değerlendirilememiştir.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda larinks kanserli hastaların parafin bloklarından PCR yöntemiyle HPV DNA'sı araştırılmış, hiçbirinde HPV DNA saptanmamıştır. Tüm hastalarda HPV negatif olduğundan HPV pozitifliğinin larenks kanserlerinde tedaviye cevaba ve prognoza etkisi değerlendirilememiştir. Bizim çalışmamızda HPV pozitifliği 0/52 (% 0)'dir. Her ne kadar literatürde laringeal karsinomlarda HPV pozitiflik oranı % 0-79 olarak belirtilmişse de sonuçlarımız literatürdeki oranlardan daha düşük görünmektedir. Bunun nedenleri; coğrafi farklılıklar, popülasyondaki cinsel davranış ve hijyen alışkanlığı farklılıkları ve uygulanan PCR yönteminin duyarlılığı olabilir. Mevcut bulgularla HPV tayininin larinks kanserli olgularda tedavi seçimi ve prognoz tayini açısından çok uygun bir belirteç olmadığı kanaatine varılmıştır.

Hasta sayısının az olması, her ne kadar taze dokuda kontrolü yapılmış olsa da çalışılan parafin dokuların eski olması çalışmamızın eksik kısımları olarak sayılabilir.

Prospektif, canlı-taze dokuda, hasta sayısının daha çok olduğu ve çok merkezli çalışmalar ile bu konuda daha güçlü bulular elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Mendenhall WM, Hinerman RW, Amdur RJ, Mancuso AA, Villaret DB,KT R. Larynx. in Principles and Practice of Radiation Oncology, B.L. Perez CA, Halperin EC, Schmid-Ullrich RK, Editor.2004, Lippincott Williams&Wilkins: Philadelphia. p. 1094-116.
2. Gallus S, Bosetti C, Franceschi S, Levi F, Negri E,La Vecchia C. Laryngeal cancer in women: tobacco, alcohol, nutritional, and hormonal factors. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003; 12(6): 514-7.
3. Mendenhall WM, Million RR, Stringer SP,Cassisi NJ. Squamous cell carcinoma of the glottic larynx: a review emphasizing the University of Florida philosophy. South Med J 1999; 92(4): 385-93.
4. Cattaruzza MS, Maisonneuve P,Boyle P. Epidemiology of laryngeal cancer. Eur J Cancer B Oral Oncol 1996; 32B(5): 293-305.
5. Gallo A, Degener AM, Pagliuca G, Pierangeli A, Bizzoni F, Greco A, et al. Detection of human papillomavirus and adenovirus in benign and malignant lesions of the larynx. Otolaryngol Head Neck Surg 2009; 141(2): 276-81.
6. Rosai J. Respiratory tract. in Rosai and Ackerman's Surgical Pathology.2004, Elsevier: China. p. 335-359.
7. Du J, Chen GG, Vlantis AC, Chan PK, Tsang RK,van Hasselt CA. Resistance to apoptosis of HPV 16-infected laryngeal cancer cells is associated with decreased Bak and increased Bcl-2 expression. Cancer Lett 2004; 205(1): 81-8.
8. Major T, Szarka K, Sziklai I, Gergely L,Czegledy J. The characteristics of human papillomavirus DNA in head and neck cancers and papillomas. J Clin Pathol 2005; 58(1): 51-5.
9. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH,Aebersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. Cancer 2001; 92(4): 805-13.

10. Beasley N J, J GP. Cancer of the Larynx, Paranasal Sinuses, and Temporal Bone. in Lee KJ (ed), *Essential Otolaryngology: Head & Neck Surgery*. 2002: McGraw-Hill, USA. p. 596-616.
11. Elci OC, Akpınar-Elci M, Blair A, Dosemeci M. Risk of laryngeal cancer by occupational chemical exposure in Turkey. *Journal of occupational and environmental medicine* 2003; 45(10): 1100-1106.
12. Elci OC, Akpınar-Elci M, Blair A, Dosemeci M. Occupational dust exposure and the risk of laryngeal cancer in Turkey. *Scand J Work Environ Health* 2002; 28(4): 278-84.
13. Ersoy A, Pınar E, Çallı Ç, Öncel S, Çallı A. Larenks kanserlerinde tümör yerleşimine göre invazyon derinliği ve tümör çapının değerlendirilmesi. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg.* 2008; 18(5): 284-288.
14. Licitra L, Bernier J, Grandi C, Locati L, Merlano M, Gatta G, et al. Cancer of the larynx. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 47(1): 65-80.
15. Elci OC, Dosemeci M, Blair A. Occupation and the risk of laryngeal cancer in Turkey. *Scand J Work Environ Health* 2001; 27(4): 233-9.
16. Gao X, Fisher SG, Mohideen N, Emami B. Second primary cancers in patients with laryngeal cancer: a population-based study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56(2): 427-35.
17. Koufman JA, Burke AJ. The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am* 1997; 30(1): 1-19.
18. Korczynska B, Korzeniowski S, J S. Cancer of the larynx in females. *Cancer Radiotherapie* 2003; (7): 380-5.
19. Dosemeci M, Gokmen I, Unsal M, Hayes RB, Blair A. Tobacco, alcohol use, and risks of laryngeal and lung cancer by subsite and histologic type in Turkey. *Cancer Causes Control* 1997; 8(5): 729-37.
20. Çankaya H, Garça M F, Miçooğulları E D, F KA. Larenks Kanserli Hastalarda Yaklaşımımız. *Van Tıp Dergisi* 2013; 20(1): 8-12.

21. Williams RR,Horm JW. Association of cancer sites with tobacco and alcohol consumption and socioeconomic status of patients: interview study from the Third National Cancer Survey. J Natl Cancer Inst 1977; 58(3): 525-47.
22. Kaya S. Larenks Anatomisi. in.2002, Bilimsel Tıp Yayınevi: Ankara.
23. Blackwell KE, Fu YS,Calcaterra TC. Laryngeal dysplasia. A clinicopathologic study. Cancer 1995; 75(2): 457-63.
24. Sasaki CT,Jassin B. Cancer of the pharynx and larynx. Am J Med 2001; 111 Suppl 8A: 118S-123S.
25. Cowles SR. Cancer of the larynx: occupational and environmental associations. South Med J 1983; 76(7): 894-8.
26. Bacciu A, Mercante G, Ingegnoli A, Ferri T, Muzzetto P, Leandro G, et al. Effects of gastroesophageal reflux disease in laryngeal carcinoma. Clin Otolaryngol Allied Sci 2004; 29(5): 545-8.
27. Galli J, Cammarota G, Calo L, Agostino S, D'Ugo D, Cianci R, et al. The role of acid and alkaline reflux in laryngeal squamous cell carcinoma. Laryngoscope 2002; 112(10): 1861-5.
28. Elci OC, Akpınar-Elci M, Blair A,Dosemeci M. Risk of laryngeal cancer by occupational chemical exposure in Turkey. J Occup Environ Med 2003; 45(10): 1100-6.
29. Grassmann K, Kratzer F, Petry KU,Iftner T. Functional characterization of naturally occurring mutants of human papillomavirus type 16 with large deletions in the non-coding region. Int J Cancer 1996; 68(2): 265-9.
30. Heilmann V,Kreienberg R. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. Curr Womens Health Rep 2002; 2(1): 27-33.
31. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 2000; 92(9): 690-8.
32. Manjarrez ME, Ocadiz R, Valle L, Pacheco C, Marroquin A, De la Torre C, et al. Detection of human papillomavirus and relevant tumor suppressors and oncoproteins in laryngeal tumors. Clin Cancer Res 2006; 12(23): 6946-51.

33. Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(9): 4350-4.
34. Syrjanen KJ. HPV infections in benign and malignant sinonasal lesions. *J Clin Pathol* 2003; 56(3): 174-81.
35. Shanmugaratnam K, Sobin LH. The World Health Organization histological classification of tumours of the upper respiratory tract and ear. *Cancer* 1993; 71(8): 2689-2697.
36. Almadori G, Cadoni G, Cattani P, Galli J, Bussu F, Ferrandina G, et al. Human papillomavirus infection and epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7(12): 3988-93.
37. Smith EM, Summersgill KF, Allen J, Hoffman HT, McCulloch T, Turek LP, et al. Human papillomavirus and risk of laryngeal cancer. *Annals of Otolaryngology and Laryngology* 2000; 109(11): 1069-1076.
38. Ferlito A, Rinaldo A, Marioni G. Laryngeal malignant neoplasms in children and adolescents. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1999; 49(1): 1-14.
39. Dagli S, Dagli U, Kurtaran H, Alkim C, Sahin B. Laryngopharyngeal reflux in laryngeal cancer. *Turk J Gastroenterol* 2004; 15(2): 77-81.
40. Cianci R, Galli J, Agostino S, Bartolozzi F, Gasbarrini A, Almadori G, et al. Gastric surgery as a long-term risk factor for malignant lesions of the larynx. *Arch Surg* 2003; 138(7): 751-4; discussion 755.
41. Riboli E, Kaaks R, Esteve J. Nutrition and laryngeal cancer. *Cancer Causes Control* 1996; 7(1): 147-56.
42. Toprak M. Larenks ve larengefarenksin tümörleri. in *Otorinolaringoloji Bas ve Boyun Cerrahisi*. 2000, Nobel Tıp Kitapevleri: Çapa, İstanbul. p. 585-651.
43. Hızalan İ, Özuysal S, Onart S, Çoskun H, Özkan L, K AM. Larenks kanserleri. in *Bas-Boyun Kanserleri*, Engin K and E. L, Editors. 2003, Nobel Tıp Kitapevleri: İstanbul. p. 343-435.

44. Cingi E. Kulak Burun Bogaz Hastalıkları. in.1995, Etam A.S Matbaa Tesisleri: Eskisehir p. 580-91.
45. Yazıcıoğlu E. Larenksin malign neoplazmları. in Kulak Burun Bogaz Hastalıkları ve Bas-Boyun Cerrahisi, Çelik O, Editor.2002, Turgut Yayıncılık: İstanbul. p. 659-666.
46. Erisen L. Larenks Kanseri. in Bas Boyun Kanseri, E.L. Engin K, Editor.2003, Nobel Tıp Kitapevi: İstanbul. p. 345-81.
47. Zatterstrom UK, Wennerberg J, Ewers SB, Willen R, Attewell R. Prognostic factors in head and neck cancer: histologic grading, DNA ploidy, and nodal status. Head Neck 1991; 13(6): 477-87.
48. Koç C. in Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi.2003, Güneş Kitabevi Ltd. Şti: Ankara. p. 1183-1216.
49. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. Annals of surgical oncology 2010; 17(6): 1471-1474.
50. Johnson JT, Myers EN, Hao SP, Wagner RL. Outcome of open surgical therapy for glottic carcinoma. Ann Otol Rhinol Laryngol 1993; 102(10): 752-5.
51. Baserer N, Kiyak E, Oysu Ç, Aslan I, Yazıcıoğlu E, Biliciler N, et al. Larenks karsinomunda fonasyon teknikleri. Kulak Bu ır un Bogaz İhtis Der 1996; 3: 674-7.
52. Haliloğlu T, Yıldırım G, Varnalı Y, M K. T3 larenks kanserlerinde parsiyel cerrahi. KBB İhtisas Dergisi 1999; (2): 187-9.
53. Cevanşır B, Başarer N, Yazıcıoğlu E, Laryngectomies partielles frontolaterales et frontoanteriores, in Proceedings of the XV. World Congress of ORL Head and Neck Surgery. 1993: İstanbul. p. 798-801.
54. Bailey B J. Glottic carcinoma. in Surgery of larynx, Bailey B J and Biler H F, Editors.1985, WB Saunders Comp: Philadelphia. p. 257.
55. Pearson W B. Management of primary site of larynx and hypopharynx. in Operative challenges in otolaryngology head and neck surgery, P.W. B, Editor.1990, Year Book Medical Publisher: Chicago. p. 145-53.

56. Robbins KT, Medina JE, Wolfe GT, Levine PA, Sessions RB, Pruet CW. Standardizing neck dissection terminology: official report of the Academy's Committee for Head and Neck Surgery and Oncology. Archives of Otolaryngology—Head & Neck Surgery 1991; 117(6): 601.
57. Robbins KT, Clayman G, Levine PA, Medina J, Sessions R, Shaha A, et al. Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery. Archives of otolaryngology–head & neck surgery 2002; 128(7): 751-758.
58. Barutçu O, Larenks Kanserli Hastalarda KI-67, Cerb-B2, E-Cadherin Ekspresyonları ve Bu Belirteçlerin Klinik Önemi, in Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı. 2012, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi: Çanakkale.
59. Frederick L, Greene J. AJCC Cancer Staging Atlas. in. 2006, Springer: Chicago.
60. Spiro RH, Gallo O, Shah JP. Selective jugular node dissection in patients with squamous carcinoma of the larynx or pharynx. Am J Surg 1993; 166(4): 399-402.
61. Özyar E. Bas boyun malignansilerinde radyoterapi. in Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Bas Boyun Cerrahisi, Çelik O, Editor. 2002, Asya Tıp Kitabevi, Turgut yayıncılık: İstanbul. p. 934-49.
62. Meredith ADE, Randall C, Shaw H. Advanced laryngeal cancer: A management perspective. The Journal of Laryngology & Otology 1987; 101(10): 1046-1054.
63. Cohen EE. Role of epidermal growth factor receptor pathway-targeted therapy in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. J Clin Oncol 2006; 24(17): 2659-65.
64. Vokes EE, Schilsky RL, Weichselbaum RR, Kozloff MF, Panje WR. Induction chemotherapy with cisplatin, fluorouracil, and high-dose leucovorin for locally advanced head and neck cancer: a clinical and pharmacologic analysis. J Clin Oncol 1990; 8(2): 241-7.
65. Yarkin F. Human papillomavirus: patogenezi, epidemiyoloji ve tanı. in 2. Ulusal Viroloji Kongresi Kitabı. 2005. p. 20-31.

66. Dinç B, Kolposkopi uygulanan hastalarda Real-Time PCR ile Human papillomavirus (HPV) tanısı. , in Gazi Üniversitesi. 2005: Ankara.
67. Li J,Hanna B A. Moleküler Mikrobiyoloji: Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. in.2006, Palme Yayıncılık: Ankara.
68. Korkmaz E, Üst Solunum Yolları Malign Lezyonlarında HPV Tip 16, 18, 31 Ve 33'ün Araştırılması, in Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. 2007, Fırat Üniversitesi: Elazığ.
69. Syrjänen SM. Basic concepts and practical applications of recombinant DNA techniques in detection of human papillomavirus (HPV) infections. APMIS 1990; 98(1-6): 95-110.
70. Öktem F, Aydın S, Öz F, Toprak M,Ada M. The Role of Human Papilloma Virus Infection in Head and Neck Cancer. K.B.B. ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi 2000; 8(1): 51-7.
71. Hoshikawa T, Nakajima T, Uhara H, Gotoh M, Shimosato Y, Tsutsumi K, et al. Detection of human papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinomas by polymerase chain reaction. Laryngoscope 1990; 100(6): 647-50.
72. Snijders P, Van den Brule A, Meijer C,Walboomers J. Papillomaviruses and cancer of the upper digestive and respiratory tracts. in Human pathogenic papillomaviruses.1994, Springer. p. 177-198.
73. Tutkun A, İnanlı S, Dadaszade N, Öztürk Ö, Batman Ç,A ŞM, Larinks skuamöz hücreli karsinomlarında in situ hibridizasyon yöntemi ile HPV araştırılması, in 25. Ulusal Türk Otorinolarenjoloji ve Baş-Boyun Cerrahisi Kongresi. 1999: İzmir.
74. McKaig RG, Baric RS,Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. Head & neck 1998; 20(3): 250-265.
75. Tommasino M,Crawford L. Human papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle. Bioessays 1995; 17(6): 509-518.
76. Ağaçfıdan A. Cinsel Yolla Bulasan Virüsler. in Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji, A.H. Ustaçelebi S, Badur S, Editor.2004, Güneş Kitabevi: Ankara. p. 285-92.

77. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(4): 212-36.
78. Yazıcı F, Ç Ç. HPV ve ekstrasjenital organ karsinomları. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics* 2009; 2(1): 29-33.
79. Karasalihoğlu AR. Kulak burun boğaz hastalıkları ve baş-boyun cerrahisi. in. 2003, Güneş Kitabevi: Ankara. p. 189-217.
80. Teppo H, Soini Y, Melkko J, Koivunen P, Alho OP. Prognostic factors in laryngeal carcinoma: the role of apoptosis, p53, proliferation (Ki-67) and angiogenesis. *APMIS* 2003; 111(4): 451-7.
81. D'Angelo SP, Janjigian YY, Ahye N, Riely GJ, Chaft JE, Sima CS, et al. Distinct clinical course of EGFR-mutant resected lung cancers: results of testing of 1118 surgical specimens and effects of adjuvant gefitinib and erlotinib. *J Thorac Oncol* 2012; 7(12): 1815-22.
82. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365(9472): 1687-717.
83. Romei C, Ciampi R, Faviana P, Agate L, Molinaro E, Bottici V, et al. BRAFV600E mutation, but not RET/PTC rearrangements, is correlated with a lower expression of both thyroperoxidase and sodium iodide symporter genes in papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15(2): 511-20.
84. Deng H, Zeng Y, Lei Y, Zhao Z, Wang P, Li B, et al. Serological survey of nasopharyngeal carcinoma in 21 cities of south China. *Chin Med J (Engl)* 1995; 108(4): 300-3.
85. de-Vathaire F, Sancho-Garnier H, de-The H, Pieddeloup C, Schwaab G, Ho JH, et al. Prognostic value of EBV markers in the clinical management of nasopharyngeal carcinoma (NPC): a multicenter follow-up study. *Int J Cancer* 1988; 42(2): 176-81.

86. Toledo SP, Lourenco DM, Jr., Santos MA, Tavares MR, Toledo RA,Correia-Deur JE. Hypercalcitoninemia is not pathognomonic of medullary thyroid carcinoma. Clinics (Sao Paulo) 2009; 64(7): 699-706.
87. Lassen P, Eriksen JG, Krogdahl A, Therkildsen MH, Ulhoi BP, Overgaard M, et al. The influence of HPV-associated p16-expression on accelerated fractionated radiotherapy in head and neck cancer: evaluation of the randomised DAHANCA 6&7 trial. Radiother Oncol 2011; 100(1): 49-55.
88. Parkin DM, Almonte M, Bruni L, Clifford G, Curado MP,Pineros M. Burden and trends of type-specific human papillomavirus infections and related diseases in the latin america and Caribbean region. Vaccine 2008; 26 Suppl 11: L1-15.
89. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. Virology 2009; 384(2): 260-5.
90. Wittekindt C, Gultekin E, Weissenborn SJ, Dienes HP, Pfister HJ,Klussmann JP. Expression of p16 protein is associated with human papillomavirus status in tonsillar carcinomas and has implications on survival. Adv Otorhinolaryngol 2005; 62: 72-80.
91. Yarkin F, Chauvin S, Konomi N, Wang W, Mo R, Bauchman G, et al. Detection of HPV DNA in cervical specimens collected in cytologic solution by ligation-dependent PCR. Acta Cytol 2003; 47(3): 450-6.
92. Fife KH, Cramer HM, Schroeder JM,Brown DR. Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. J Med Virol 2001; 64(4): 550-9.
93. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 2003; 348(6): 518-27.
94. Bovicelli A, Bristow RE, Montz FJ. HPV testing: where are we now? Anticancer Res 2000; 20(6C): 4673-80.
95. Kessler, II. Venereal factors in human cervical cancer: evidence from marital clusters. Cancer 1977; 39(4 Suppl): 1912-9.

96. Brennan MM, Lambkin HA, Sheehan CD, Ryan DD, O'Connor TC, Kealy WF. Detection of high-risk subtypes of human papillomavirus in cervical swabs: routine use of the Digene Hybrid Capture assay and polymerase chain reaction analysis. *Br J Biomed Sci* 2001; 58(1): 24-9.
97. Zaravinos A, Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int J Biol Markers* 2009; 24(4): 215-22.
98. Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; (31): 80-8.
99. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127(8): 940-5.
100. Almadori G, Cadoni G, Cattani P, Posteraro P, Scarano E, Ottaviani F, et al. Detection of human papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinoma by polymerase chain reaction. *Eur J Cancer* 1996; 32A(5): 783-8.
101. Matzow T, Boysen M, Kalantari M, Johansson B, Hagmar B. Low detection rate of HPV in oral and laryngeal carcinomas. *Acta Oncol* 1998; 37(1): 73-6.
102. McKaig RG, Baric RS, Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck* 1998; 20(3): 250-65.
103. Li X, Gao L, Li H, Gao J, Yang Y, Zhou F, et al. Human papillomavirus infection and laryngeal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis* 2013; 207(3): 479-88.
104. Lindeberg H, Krogdahl A. Laryngeal cancer and human papillomavirus: HPV is absent in the majority of laryngeal carcinomas. *Cancer Lett* 1999; 146(1): 9-13.
105. Illades-Aguir B, Cortes-Malagon EM, Antonio-Vejar V, Zamudio-Lopez N, Alarcon-Romero Ldel C, Fernandez-Tilapa G, et al. Cervical carcinoma in Southern Mexico: Human papillomavirus and cofactors. *Cancer Detect Prev* 2009; 32(4): 300-7.
106. Milutin Gasperov N, Sabol I, Matovina M, Spaventi S, Grce M. Detection and typing of human papillomaviruses combining different methods: polymerase

chain reaction, restriction fragment length polymorphism, line probe assay and sequencing. *Pathol Oncol Res* 2008; 14(4): 355-63.

107. Usubutun A, Alemany L, Kucukali T, Ayhan A, Yuce K, de Sanjose S, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer specimens from Turkey. *Int J Gynecol Pathol* 2009; 28(6): 541-8.
108. Perez-Ayala M, Ruiz-Cabello F, Esteban F, Concha A, Redondo M, Oliva MR, et al. Presence of HPV 16 sequences in laryngeal carcinomas. *Int J Cancer* 1990; 46(1): 8-11.
109. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(23): 1772-83.
110. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(9): 709-20.
111. Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 2005; 32 Suppl 1: S59-66.
112. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute* 2008; 100(4): 261-269.
113. Pintos J, Black MJ, Sadeghi N, Ghadirian P, Zeitouni AG, Viscidi RP, et al. Human papillomavirus infection and oral cancer: a case-control study in Montreal, Canada. *Oral Oncol* 2008; 44(3): 242-50.
114. da Silva CE, da Silva ID, Cerri A, Weckx LL. Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 104(4): 497-500.
115. Baumann JL, Cohen S, Evjen AN, Law JH, Vadivelu S, Attia A, et al. Human papillomavirus in early laryngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2009; 119(8): 1531-7.

116. Pintos J, Franco EL, Black MJ, Bergeron J, Arella M. Human papillomavirus and prognoses of patients with cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer* 1999; 85(9): 1903-9.
117. Hassumi-Fukasawa MK, Miranda-Camargo FA, Guimarães MC, Simões RT, Donadi EA, Soares CP, et al. Possible implication of Mdm2 as a prognostic marker in invasive laryngeal carcinoma. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 2012; 269(7): 1795-1804.
118. Gillison ML. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin Oncol* 2004; 31(6): 744-54.
119. Nevels M, Tauber B, Spruss T, Wolf H, Dobner T. "Hit-and-run" transformation by adenovirus oncogenes. *J Virol* 2001; 75(7): 3089-94.
120. Kaya H, Kotiloglu E, Inanli S, Ekicioglu G, Bozkurt SU, Tutkun A, et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) DNA in larynx and lung carcinomas. *Pathologica* 2001; 93(5): 531-4.
121. Loning T, Ikenberg H, Becker J, Gissmann L, Hoepfer I, zur Hausen H. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J Invest Dermatol* 1985; 84(5): 417-20.
122. Kiyabu MT, Shibata D, Arnheim N, Martin WJ, Fitzgibbons PL. Detection of human papillomavirus in formalin-fixed, invasive squamous carcinomas using the polymerase chain reaction. *The American journal of surgical pathology* 1989; 13(3): 221-224.
123. Duray A, Descamps G, Arafa M, Decaestecker C, Remmelink M, Sirtaine N, et al. High incidence of high-risk HPV in benign and malignant lesions of the larynx. *Int J Oncol* 2011; 39(1): 51-9.
124. Morshed K. Association between human papillomavirus infection and laryngeal squamous cell carcinoma. *J Med Virol* 2010; 82(6): 1017-23.
125. Güvenç MG, Midilli K, İnci E, Ergin S, Sar M, Özergil E, et al. Larenksin primer karsinomlarında human papillomavirüs (HPV) varlığının ve larenks karsinomu ile HPV ilişkisinin araştırılması. in XXVII. Türk Ulusal Otolarengoloji ve Bas Boyun Cerrahisi Kongresi.

126. de Oliveira DE, Bacchi MM, Macarenco RS, Tagliarini JV, Cordeiro RC, Bacchi CE. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection, p53 expression, and cellular proliferation in laryngeal carcinoma. *American journal of clinical pathology* 2006; 126(2): 284-293.
127. Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, Kyrouti A, Rassidakis AN, Ikonomopoulos JA, et al. Human papilloma virus (HPV) is possibly involved in laryngeal but not in lung carcinogenesis. *Human pathology* 1999; 30(3): 274-283.
128. Brandwein M, Nuovo G, Biller H. Analysis of prevalence of human papillomavirus in laryngeal carcinomas. Study of 40 cases using polymerase chain reaction and consensus primers. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 1993; 102(4 Pt 1): 309-313.
129. Clayman GL, Stewart MG, Weber RS, el-Naggar AK, Grimm EA. Human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. Relationship to survival. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 120(7): 743-8.
130. Geisler SA, Olshan AF, Weissler MC, Cai J, Funkhouser WK, Smith J, et al. p16 and p53 Protein expression as prognostic indicators of survival and disease recurrence from head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8(11): 3445-53.

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Turan ARLI'ya ait "Larinks Kanserli Hastalarda Human Papillomavirus Pozitifliği ve Kemoradyoterapi Duyarlılığı Üzerine Etkisinin Araştırılması" adlı uzmanlık tezi, jürimiz tarafından Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 01/10/2014

JÜRİ

İmza

Başkan : Doç. Dr. Sedat GAZLİ



Üye : Prof. Dr. İsmail KÜLAHLI
Dip. No: 7154-KBB Hastalıkları
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi



Üye : Doç. Dr. Mustafa Sağıt

