

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**LARİNGEAL KARSİNOMLARDA HUMAN PAPİLLOMAVİRUS
SAPTANMASI VE P16 POZİTİFLİĞİNİN PROGNOSTİK
KLİNİK VE HİSTOPATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hülya YENİ BAYRAKTAR

EYLÜL-2018

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**LARİNGEAL KARSİNOMLARDA HUMAN PAPİLLOMAVİRUS
SAPTANMASI VE P16 POZİTİFLİĞİNİN PROGNOSTİK
KLİNİK VE HİSTOPATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hülya YENİ BAYRAKTAR

DANIŞMAN

DOKTOR ÖĞRETİM ÜYESİ

Gupse TURAN

EYLÜL-2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde ve Doktor Öğretim Üyesi Gupse TURAN danışmanlığında Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Dr. Hülya YENİ BAYRAKTAR tarafından tez başlığı “Laringeal Karsinomlarda Human Papillomavirus saptanması ve p16 Pozitifliğinin Prognostik Klinik ve Histopatolojik Parametrelerle İlişkisi” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 11/09/2018 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “Tıpta Uzmanlık Tezi” olarak kabul edilmiştir.

İmza

JÜRİ BAŞKANI

İmza

ÜYE

İmza

ÜYE

İmza

ÜYE

İmza

ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Ramazan AKDEMİR

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanı

BEYAN

Bu çalışma Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 26/05/2017 tarih ve 71522473/050.01.04/120 sayılı oturumda görüşülen tez teklifi kararı ile onay alınarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

06/09/2018

Dr. Hülya YENİ BAYRAKTAR

TEŞEKKÜR

Tez danışanım olarak bana onur veren, uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimin hazırlanmasında çok büyük emeği olan, bilgisi, karakteri, yardımseverliği ile bana çok şey katarak her daim ablalık yapan sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Gupse Turan'a;

Asistanlığım süresince ve tezimin hazırlanma aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, eğitimimde büyük emeğe sahip, yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer hocam Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mustafa Kösem'e;

Kısa süreli çalışma fırsatım olsa da patoloji bilgisi ve bilimselliği ile tanıma şansına sahip olduğum çok değerli hocam Prof. Dr. Fahri Yılmaz'a;

Asistanlığım süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, her zaman destek olduklarımı hissettiren kliniğimizin sevgili uzmanlarına;

Birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım ve tüm patoloji çalışanlarına;

Asistanlığımın başlangıç aşaması olan en zorlu sürecini paylaştığım, çalışma arkadaşı olmaktan çok öteye geçen, beraber olmaktan büyük mutluluk duyduğum ve varlığıyla bana güç veren can dostum Uz. Dr. Bahar Memiş'e;

Her daim yanımda olan hayat arkadaşım Dr. Hakan Bayraktar ve güzel kızım Elif Ada'ya;

Beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca sevgi ve desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan kardeşim, annem ve babama;

Sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Hülya Yeni Bayraktar

Eylül-2018

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR.....	vi
TABLolar.....	vii
RESİMLER.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. LARİNKs EMBRİYOLOJİSİ.....	2
2.2. LARİNKs ANATOMİSİ.....	2
2.3. LARİNKs HİSTOLOJİSİ.....	5
2.4. LARİNKs TÜMÖRLERİ.....	7
2.4.1. Epidemiyoloji.....	7
2.4.2. Etyoloji.....	7
2.4.3. Patogenez.....	8
2.4.4. Patolojik Özellikler.....	9
2.4.5. Klinik.....	13
2.4.6. DSÖ (DSÖ-WHO) Sınıflaması.....	15
2.4.7. TNM Sınıflaması.....	16
2.4.8. Evreleme.....	16
2.4.9. Tedavi ve Prognostik Faktörler.....	16
2.5. HÜCRE SİKLUSU.....	20
2.6. p16 GENİ.....	23
2.7. Human Papillomavirus.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33

3.1. OLGULARIN SEÇİLMESİ.....	33
3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA.....	34
3.3. REAL TİME PCR İLE HPV DNA VARLIĞININ SAPTANMASI.....	35
3.4. p16 EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	44
3.5. İSTATİSTİK.....	44
4. BULGULAR.....	45
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇLAR.....	63
7. ÖZET.....	65
8. SUMMARY.....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	69
KAYNAKLAR.....	70

KISALTMALAR

HPV: Human Papillomavirus

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

WHO: World Health Organization

SCC: Skuamöz Hücreli Karsinom

AJCC/UICC: Amerika Birleşik Kanser Komitesi/Uluslararası Kanser Kontrol Birliği

BT: Bilgisayarlı Tomografi

MR: Magnetik Rezonans

PCNA: Proliferasyon Hücre Nükleer Antijeni

CDK: Siklin Bağımlı Kinaz

RB: Retinoblastom

RT: Radyoterapi

KT: Kemoterapi

BBA: Büyük büyütme alanı

EBV: Epstein Barr Virus

TABLULAR

Tablo 1: Risklerine göre HPV tipleri.....	34
Tablo 2: Kullanılan primer grupları.....	46
Tablo 3: PCR protokolünün gerçekleştirildiği sıcaklık, süre ve döngü sayıları.....	47
Tablo 4: PCR protokolünün gerçekleştirildiği sıcaklık, süre ve döngü sayıları.....	51
Tablo 5: Tanımlayıcı Özelliklerin Dağılımı.....	54
Tablo 6: Patolojik parametreler.....	55
Tablo 7: Sigara/alkol kullanımına göre p16 ile boyanma oranları.....	58
Tablo 8: Farklı lokalizasyonlardaki tümörlerde p16 ekspresyonu.....	58
Tablo 9: Histolojik derecelerine göre tümörlerde p16 ekspresyonu.....	59
Tablo 10: Lenfovasküler invazyon varlığına göre tümörlerde p16 ekspresyonu.....	59
Tablo 11: Perinöral invazyon varlığına göre tümörlerde p16 ekspresyonu.....	60
Tablo 12: Kıkırdak invazyonu varlığına göre tümörlerde p16 ekspresyonu.....	60
Tablo 13: Larinks dışı yumuşak doku invazyon varlığına göre tümörlerde p16 ekspresyonu.....	61
Tablo 14: Lenf nodu metastazının varlığına göre tümörlerde p16 ekspresyonu.....	61

RESİMLER

Resim 1: Larinks histolojisi.....	15
Resim 2: İyi diferansiye skuamöz hücreli karsinom (Hemotoksilen Eozin, X100)...	62
Resim 3: İyi diferansiye SCC'de p16 negatifliği, skor 0 (immünperoksidaz, X100).	62
Resim 4: Orta derece diferansiye SCC'de p16 ile tümör hücrelerinin %10'unda yamalı orta şiddette boyanma, skor 1 (immünperoksidaz, X100).....	63
Resim 5: İyi diferansiye SCC'de p16 ile tümör hücrelerinin %10'unda yamalı orta şiddette boyanma, skor 2 (immünperoksidaz, X100).....	63
Resim 6: İyi diferansiye SCC'de p16 ile sitoplazmik ve nükleer skor 3 boyanma (immünperoksidaz, X100).....	64

ŞEKİLLER

Şekil 1: Larinks kompartmanları.....	12
Şekil 2: Hücre siklusu.....	30
Şekil 3: Hücre siklusu regülasyon proteinleri.....	32
Şekil 4: Human Papillomavirus yaşam döngüsü ve genomunun organizasyonu.....	38
Şekil 5: HPV'nin E6 ve E7 proteinleri ile p53 ve RB üzerine etkileri.....	40
Şekil 6: HPV tip16,33 pozitif olgunun amplifikasyon eğrisi.....	56
Şekil 7: HPV tip16,33 pozitif olgunun amplifikasyon eğrisi.....	57
Şekil 8: p16 boyanma oranları dağılımı.....	58

1.GİRİŞ

Larinks kanseri baş boyun bölgesinin en sık kanseridir ve erkeklerde daha sık görülür (Rosai and Ackerman, 2004). Larinks kanserlerinin %95'den fazlası skuamöz hücreli karsinomlardır (de Oliveira et al., 2006). Glottik bölge en sık yerleşim yeridir. İkinci sırada supraglottik bölge gelmektedir (Rosai and Ackerman, 2004). Bu kanserlerin gelişiminde sigara ve alkol etkisi uzun zamandır bilinmektedir (Manjarrez et al., 2006). Larinks kanseri ve hereditenin ilişkisini aydınlatmak için çeşitli çalışmalar yapılmış ve son yıllarda yapılan çalışmalarda diğer faktörlere ek olarak Human Papillomavirus (HPV) enfeksiyonu üzerinde durulmaya başlanmıştır (Chen et al., 2017a). HPV ilişkili baş-boyun kanseri orofaringeal kanserde kanıtlanmış olup, laringeal kanserlerdeki rolü henüz tartışmalıdır. HPV ilişkili baş-boyun kanserlerinin daha genç yaş grubunda görüldüğü, kemoterapi/radyoterapiye daha iyi yanıt verdiği ve yüksek sağkalım oranlarına sahip olduğu ortaya konmuştur. HPV'nin bu tümörlerde saptanmasının güvenilirliği klinikte tedavi yaklaşımlarını belirlemek açısından gelecekte önemli olacaktır (Stasikowska-Kanicka et al., 2011, Mendelsohn et al., 2010).

Bu çalışmadaki amacımız histopatolojik olarak laringeal skuamöz hücreli karsinom tanısı konmuş hastaların parafine gömülü tümör örneklerinde HPV varlığını saptayarak ve HPV'nin indikatörü olarak kabul edilen p16 protein ekspresyonunun HPV için pozitif ve negatif olgularda histopatolojik, prognostik ve klinik parametrelerle ilişkisini araştırmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. LARİNKS EMBRİYOLOJİSİ

Larinks ve trakeobronşiyal ağaç embriyolojik olarak dördüncü haftada median laringotrakeal yarık şeklinde farinks ventral duvarından gelişmeye başlar. Yarık derinleştikçe kenarları bir septum olacak şekilde kaynaşır ve laringotrakeal tüpü oluşturur. Oluşan tüp respiratuvar epitelin geliştiği endoderm ile kaplanır. Kaudal uçtan bronşlar, sağ ve sol akciğer lobları gelişirken kranial uçtan larinks ve trakea gelişir (Sadler and Langman, 2004).

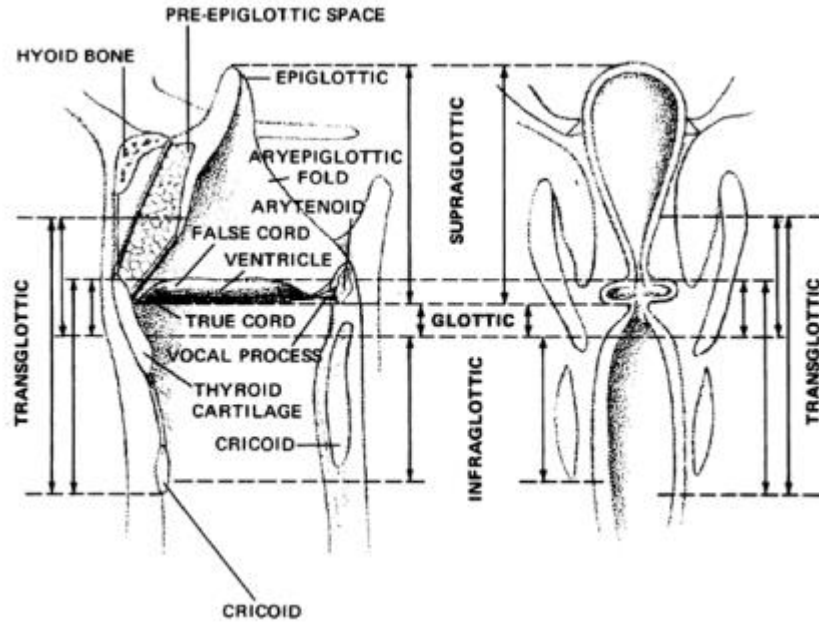
Larinks epiteli laringotrakeal tübün kranial ucunun endoderminden gelişir. Larinksin kıkırdakları dördüncü ve altıncı brankial yay çiftlerindeki kıkırdaklardan ve nöral krestten köken alan mezenkimden gelişir. Laringotrakeal tübün kranial ucundaki mezenkim hızla çoğalır ve aritenoid şişkinliği meydana getirir. Bu şişkinlikler yarık şeklindeki deliği T harfi şeklinde laringeal girişe ve gelişmekte olan laringeal lümeni dar bir yarığa dönüştürür. Laringeal epitel hızlı bir şekilde çoğaldıkça lümen tıkanır ancak onuncu haftaya kadar rekanalize olur. Bu sırada laringeal ventriküller oluşur. Ventriküller plica vestibularis ve plica vokalisi oluşturan müköz membran katlantıları ile sınırlanır. Epiglot üçüncü ve dördüncü faringeal yayların ventral ucunda mezenkimal hücrelerin çoğalmasıyla oluşan hipobrankiyal kabartının kaudal kısmından gelişir. Laringeal kaslar faringeal yayların dördüncü ve altıncı çiftlerindeki miyoblastlardan gelişir. Larinks ve epiglottisin gelişmesi doğumdan sonraki ilk üç yılda hızlı bir şekilde gerçekleşir ve yetişkin halini alır. Supraglottik bölge üçüncü ve dördüncü brankiyal arklardan, glottik ve subglottik bölgeler ise altıncı brankiyal arktan gelişir. Supraglottik laringeal bölge bukkofarengeal tomurcuktan gelişir, glottik ve subglottik laringeal bölge ise trakeobronşiyal tomurcuktan gelişir (Sternberg, 1997).

2.2. LARİNKS ANATOMİSİ

Larinks anatomik olarak orta hatta yerleşimli, dil kökünden trakeaya uzanan ve üçüncü servikal vertebra ile altıncı servikal vertebralardan arasındaki seviyede yerleşen,

havanın trakeaya giriş çıkışını kontrol eden, ses oluşturulmasında ve yutmada görev yapan organımızdır. Kıkırdak doku, kas dokusu ve fibroelastik bağ dokusundan oluşur. Her iki lateral kısımda büyük damarlarla komşuluğu vardır. Kıkırdakların üzerinde membranlar, ligamanlar ve kaslar yerleşmiştir (Mills, 2012).

Larinks fonksiyonel olarak supraglottik, glottik ve subglottik olmak üzere üç bölümden oluşur. Supraglottik kısım gerçek vokal kordların üzerindeki larinks olarak tanımlanır ve epiglottis (laringeal ve lingual yüz), yalancı vokal kordlar, ventrikül, ariepiglottik kıvrımlar ve aritenoid kıkırdakları içerir. Glottik kısım gerçek vokal kordlar, anterior ve posterior kommissürden oluşur. Subglottik kısım ise gerçek vokal kord seviyesinin 1 cm altından başlayarak krikoid kıkırdağın alt kenarına kadar uzanan, trakeada sonlanan larinks olarak tanımlanır (Mills et al., 2015), (Şekil 1).



Şekil 1: Larinks kompartmanları (Cocke and Wang, 1976)

Larinks tek ve çift kıkırdaklardan oluşur. Çift kıkırdaklar; aritenoid, küneiform, kornikulat kıkırdak, tek kıkırdaklar; epiglot, tiroid ve krikoid kıkırdaktır. Tiroid kıkırdak larinksin en geniş ve en büyük kıkırdağı olup larinksin yumuşak doku elemanlarını taşıyarak iç anatomisini koruyan önemli bir yapıdır. Hava yolunun açık kalmasını sağlar. Dil kökü ve hyoidin arkasında yer alır. Epiglot elastik kıkırdak, diğerleri ise yaşlandıkça kemikleşen hiyalin kıkırdak yapısındadır (Mills et al., 2015).

Tirohyoid membran tiroid kıkırdak ile hyoid kemik arasında uzanır. Bu membranın lateralindeki boşluktan arter, ven ve sinirler geçer. Konus elastikus krikoid kıkırdaktan vokal ligamente uzanan, glottik ve subglottik alanı paraglottik mesafeden ayıran elastik bir membrandır. Kuadranguler membran aritenoid kıkırdak ve epiglot arasında uzanan ince submukozal bağ dokusundan oluşur. Krikoid membran tiroid kıkırdak alt kenarından krikoid kıkırdak üst kısmına uzanır (Moore et al., 2014).

Larinks kasları intrensik ve ekstrensik olmak üzere iki gruba ayrılır. Ekstresek kaslar komşu yapılardan larinkse uzanarak larinksin pozisyonunu ayarlayan, hiyoid altı ve hiyoid üstü kaslardır. Ekstresek kaslar; omohyoid, sternohyoid, sternotiroid, tirohyoid, mylohyoid, geniohyoid, stilohyoid ve digastrik kaktır. Omohyoid, sternohyoid ve sternotiroid kaslar inspiyum sırasında larinksi aşağı çekerler. Stilohyoid, digastrik, mylohyoid, geniohyoid, tirohyoid ve stilofaringeus kasları yutma sırasında larinksi yukarı kaldırır. İntrensek kaslar larinks kıkırdakları arasında uzanırlar ve bu kasların hareketiyle ses tellerinin durumu değişir. İntrensek kaslar; krikoaritenoid posterior, krikotiroid, internal tiroaritenoid, krikoaritenoid lateralis, interaritenoid, eksternal tiroaritenoid, ariepiglottik, tiroepiglottik kaktır. Krikoaritenoid posterior kası rima glottisi açar. Krikoaritenoid lateralis kası, tiroaritenoid kas, interaritenoid kaslar da rima glottisi kapatır. Krikotiroid kas plika vokalisi uzatır ve gerginliği sağlar (Moore et al., 2014).

Larinksi besleyen arterler; arteria laringea superior (arteria tiroidea superiorun dalı) ve arteria laringea inferior (arteria tiroidea inferiorun dalı). Venleri arterler ile birlikte uzanır. Vena laringea superior, vena tiroidea superiora, vena tiroidea superior vena jugularis internaya açılır. Vena laringea inferior ise vena tiroidea inferiora, bu da vena brakiosefalikaya açılır (Moore et al., 2014).

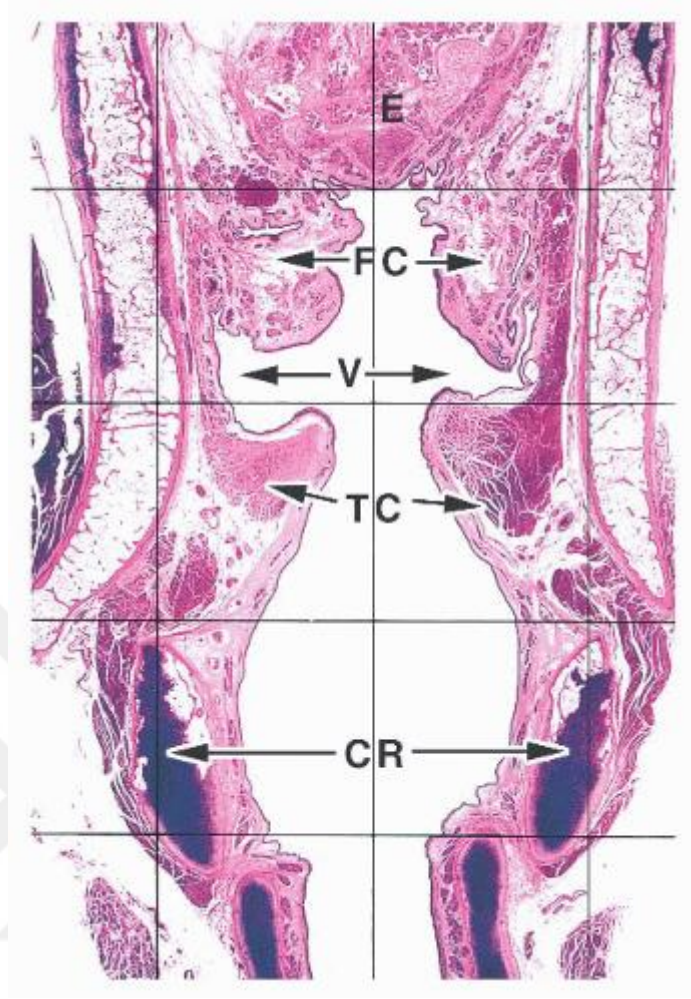
Larinksin lenfatik sistemi derin ve yüzeysel olmak üzere iki gruba ayrılır. Yüzeysel lenfatikler mukozanın yüzeyinde bulunur. Derin lenfatikler ise submukoza ve altındaki dokularda bulunur. Gerçek vokal kordlar az sayıda lenfatik içermesi nedeniyle glottik karsinomlar nadiren bölgesel metastaz yapar. Vokal kordlardan servikal lenfatiklere drenaj krikoid membran boyunca olur. Subglottik lenfatikler Delphian nodu ya da prelaringeal nod içine drene olarak pretrakeal, paratrakeal ve supraklavikuler lenf nodlarına dökülür. Supraglottik bölge lenfatiklerden zengindir

ve bu drenaj tirohyoid membran boyunca üst servikal lenf nodlarına ve anterosuperior lenf gruplarına olur. Piriform sinüs lenfatiklerden zengin bir bölgedir. Drenajı lateral olarak derin servikal lenf nodlarına ve bazı durumlarda paratrakeal lenf nodlarına olur (Mills et al., 2015).

Larinksin innervasyonu X. kafa çifti nervus vagusun dalları olan nervus laringeus süperior ve nervus laringeus inferior (nervus recurrens) tarafından sağlanır. Nervus laringeus süperior boynun üst kısmında nervus vagustan ayrılır. Arteria karotis interna ve eksternanın medialinde seyrederek. Eksternal ve internal laringeal olmak üzere iki dala ayrılır. Eksternal dalı krikotiroid kasının motor, supraglottik bölge ve glottik bölgenin duyu siniridir. İnternal laringeal dalı, süperior laringeal arterle beraber tirohyoid membranı delerek larinkse girer. Vokal kord seviyesine kadar olan larinksin duyu innervasyonunu yapar. Paralizisinde supraglottik duyu kaybı ile beraber aspirasyon meydana gelir. Nervus laringeus inferior subglottik bölgenin duyusunu alır ve krikotiroid kas hariç bütün larinks kaslarının innervasyonunu sağlar. Tek taraflı paralizisinde sesde boğukluk, çift taraflı paralizisinde ise dispne meydana gelir (Snell, 2004).

2.3. LARINKS HİSTOLOJİSİ

Larinksin epitel, lokalizasyona göre çok katlı yassı epitel ile psödostratifye silyalı silindirik epitel arasında değişiklik gösterir. Epiglotun lingual (anterior) kısmı çok katlı yassı epitle döşeli iken laringeal (posterior) kısmının üst tarafında çok katlı yassı epitel, alt tarafında psödostratifye silyalı silindirik epitel izlenir (Mills et al., 2015), (Resim 1). Glottik bölgede vokal kordlar çok katlı yassı epitle döşelidir. Subglottik bölgede vokal kordların altına doğru psödostratifye epitele dönüşmektedir (Rosai and Ackerman, 2004). Sigara içmeyen erişkinlerin yaklaşık yarısında hem supraglottik hem de infraglottik bölgelerde silyalı epitel ile karışık skuamöz epitel izlenir. Sigara içenlerde ise larinksin silyalı solunum epiteli sıklıkla skuamöz epitele dönüşür (Mills et al., 2015).



Resim 1: Larinks histolojisi E: Epiglot, FC: Yalancı kord, V: Ventrikül, TC: Gerçek kord, CR: Krikoid (Mills et al., 2015)

Reinke boşluğu vokal kordların epiteli ile vokal ligamentler arasında yer alan, gerçek vokal kordun lamina propriasına karşılık gelen subepiteliyal bir boşluktur. Reinke boşluğu birkaç kapiller damar içerir ancak lenfatik bulunmaz. Reinke boşluğundaki damar yapısının sınırlı olmasından dolayı, gerçek vokal kord yerleşimli tümörler lokalize kalma eğilimindedir radyoterapi ve cerrahi tedaviye yanıt verirler (Mills et al., 2015). Ön komissür gerçek kordların aksine belirgin kapillerler, lenfatikler ve serömüsinöz glandlar içerir. Gerçek kordlarda serömüsinöz glandlar daha belirgindir. Epiglottisin elastik kıkırdağındaki fenestrasyonlar belirgin glandlarla doludur. Bu glandların tümü kıkırdağın içine penetre olur ve supraglottik karsinomun yayılımı için zemin hazırlar. Larinksin serömüsinöz glandlarında onkositik metaplazi sık ve yaşa bağlı görülen bir değişikliktir. Elli yaş üstündeki kişilerin %80'inde görülür (Sternberg, 1997). Gerçek vokal kordda, skuamöz epitel ile silyalı kolumnar epitel

arasında bir geçiş zonu bulunur. Bu zon 1-2 mm kalınlığındadır. Bu alanda kolumnar hücreler büyük oranda küçük bazaloid veya immatür skuamöz hücreler ile yer değiştirirler (Sternberg, 1997).

2.4. LARİNKS TÜMÖRLERİ

2.4.1. Epidemiyoloji

Larinks kanseri erkeklerde görülen kanserlerin %6,2'sini, kadınlardaki kanserlerin ise %1,4'ünü oluşturan, baş boyun bölgesinde en sık görülen kanserdir (Manjarrez et al., 2006, Siegel et al., 2017). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2017 yılı için tahmini yeni vaka sayısı 13,360 ve larinks kanserinden öleceği öngörülen muhtemel vaka sayısı yaklaşık 3600 kişidir (Siegel et al., 2017). Türkiye'ye bakıldığında bu oran erkeklerde %8,1, kadınlarda %0,4'tür (Gültekin and Boztaş, 2014). Larinks kanserlerinin %95'i skuamöz hücreli karsinomlardır ve büyük kısmı glottik alan yerleşimlidir (Kalfert et al., 2014, de Oliveira et al., 2006). Genellikle beşinci dekatta görülmesine rağmen daha genç hastalarda da görülebilir (Nachalon et al., 2017).

2.4.2. Etyoloji

Sigara ve alkol kullanımı larinks kanserlerinde en önemli risk faktörleridir (Sas-Korczynska et al., 2003). Sigara içimiyle birlikte larinks karsinomu riskinin on kat arttığı bilinmektedir (Tuyns et al., 1988). Mesleki olarak asbest, ağır metaller, kömür tozu ve talaş gibi maddelere maruz kalma larinks kanseri riskini arttırmaktadır (Koufman and Burke, 1997). Düşük sosyoekonomik durum, laringeal papillomatozis, gastroözafegial reflü ve aile öyküsü diğer etyolojik faktörler arasındadır (Gallus et al., 2003, Kumar et al., 2005). Laringeal SCC'lerde son zamanlarda HPV pozitifliği dikkati çekmektedir. Yapılan araştırmalara göre %75'lere varan HPV pozitifliği bildirilmiş yayınlar mevcuttur (Gheit et al., 2014, Kreimer et al., 2005, Gungor et al., 2007, Isayeva et al., 2012). HPV pozitifliği saptanan vakalarda ise HPV tip16 daha sıklıkla görülmekte ikinci sırada ise HPV tip18 gelmektedir. HPV larinks karsinomlarında karsinogenez ile biyolojik olarak ilişkili gözükmekte ve HPV'nin kanser hücre genomunda viral integrasyon ile p16 proteininde artmış ekspresyon kanıtları açıkça gösterilmektedir. HPV ilişkili kanserler sigara içmeyen genç hastalarda gelişmeye eğilimlidir (Chen et al., 2017b).

2.4.3. Patogenez

Larinksin skuamöz hücreli karsinomu invazyon yapmadan önce progresif, ilerleyici intraepitelyal lezyonlardan gelişir. Prekürsör lezyonlar endoskopi ile beyaz ya da kırmızı görülür ve klinik olarak lökoplaki ve eritroplaki ismini alır. İntraepitelyal displazi derecesi arttıkça invazyon gelişim riski artmaktadır (Blackwell et al., 1995, Gallo et al., 2001).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) günümüzde larinksin intraepitelyal neoplazisini derecelen iki kademeli sistemi kullanır ve bu lezyonları düşük dereceli displazi ve yüksek dereceli displazi olarak sınıflar. Yüksek dereceli displazi kategorisi karsinoma in situ alt grubunu içerir. Bu sınıflama larinksin kanser öncülü lezyonlarını yapısal ve sitolojik kriterler üzerinden tanımlar.

DSÖ'nün prekürsör lezyonların sınıflandırılmasında derecelendirme sistemi için kriterleri aşağıdaki gibi tanımlamıştır.

1) Düşük dereceli displazi: Önceki sınıflandırmadaki (DSÖ-2005) hafif displaziye kapsamaktadır. Skuamöz hiperplazi, epitelin alt 1/2'sinden azında bazal ve parabazal hücrelerin çoğalması ile epitelin üst kısmının maturasyonunun korunduğu morfolojik değişiklikler izlenir. Stratifikasyon korunmuştur. Sitolojik olarak minimal atipi, parabazal hücre sitoplazmalarında hafif artış, nükleuslarında genişleme ve intersellüler köprülerin kaybolması, nadiren bazal tabakaya yakın mitozlar, az sayıda diskeratotik hücre görülür.

2) Yüksek dereceli displazi: Önceki sınıflandırmadaki (DSÖ-2005) orta dereceli displazi, ağır displazi ve karsinoma in situyu kapsamaktadır. Premalign lezyondur. Hücrelerde görülen immatür epitelyal değişiklikler epitelin 1/2'sinden fazlasında izlenir. Anormal maturasyon, sıralanma artışı, polarite kaybı, retelerde düzensizlik görülür. Stromal değişiklik yoktur. Hücresel ve nükleer atipi, hücrelerin boyut ve şekil farklılıkları, hiperkromazi, nükleol belirginliği, nükleus/sitoplazma oranı artışı, suprabazal tabakanın üst kısmında artmış atipisiz/atipili mitozlar, diskeratotik ve apoptotik cisimcikler görülür.

Karsinoma in situ: Karsinoma ait tüm özellikleri taşıyan ancak invazyon yapmayan epiteldir. Epitelde komplet olarak stratifikasyon kaybı, ağır atipi, çok sayıda atipik mitoz izlenir. Mitozlar epitelin her tabakasında ve bir büyük büyütme alanında (BBA) beşten fazla sayıdadır. Anormal mitozlar sık izlenir. Diskeratotik hücreler bulunabilir (El-Naggar et al., 2017).

DSÖ şemasının yüksek dereceli displazi ile karsinoma in situ arasında ayırım yaptığı, buna karşın birçok diğer bölgede olduğu gibi bu iki durumun ayırımındaki belirgin zorluk ve benzer yapılar nedeniyle tek grup olarak değerlendirildikleri akılda tutulmalıdır (El-Naggar et al., 2017).

3) Skuamöz hücreli papillom ve skuamöz hücreli papillomatozis: Her iki lezyon benign ekzofitik, fibrovasküler kor içeren skuamöz epitelyal tümörlerdir. Genellikle HPV tip6 ve tip11 enfeksiyonu ile ilişkilidir. Daha az sıklıkla HPV tip6 ve tip11 enfeksiyonunun üzerine diğer HPV tipleri de (tip16, tip31, tip33, tip35, tip39 gibi) eklenebilir. Mikroskopik olarak skuamöz epitelle çevrili dallanan fibrovasküler kora sahip, sıklıkla epitelin alt yarısında parabazal hücre hiperplazisi ile üst epitelde koilositotik özelliklerin izlendiği lezyon görülür. Mitotik figürler bazal, orta tabakalarda görülebilir. Yüzeyde keratinizasyon minimaldir. Premalign özellikler nadirdir (El-Naggar et al., 2017).

2.4.4. Patolojik Özellikler

Makroskopik olarak larinksin skuamöz hücreli karsinomları çoğu kez ülserasyon ile birlikte hemen her zaman fungatif görünümlü, beyaz sarımsı, kahverenkli kitleler olarak izlenir. Lezyonlar nadir olarak düz görülür.

Mikroskopik olarak diferansiyasyon derecesi, hücresel pleomorfizm ve mitotik aktiviteye dayanarak iyi, orta ve az diferansiye olarak derecelendirilir (Chung et al., 1980). Tümöral hücreler değişen derecelerde intrasellüler ve ekstrasellüler keratin formasyonu gösteren infiltratif, düzensiz skuamöz hücre adalarından oluşur. Diferansiyasyon arttıkça periferde bazaloid hücreler, santralde ise geniş eozinofilik sitoplazmaya sahip skuamöz hücre adaları izlenir. Yaygın olarak nekrotik debriyle birlikte karışık bulunan ekstrasellüler keratin çoğu kez adaların ortasında saptanır. Tek hücre infiltrasyonu özellikle yüksek dereceli tümörlerde olabilir. Çevre stroma

genellikle stromal desmoplazi ile birlikte kronik inflamasyona sahiptir (Mills et al., 2015).

Laringeal skuamöz hücreli karsinomların immünohistokimyasal olarak spesifik bir belirleyicisi yoktur ve bu tümörler diğer bölgelerdeki skuamöz hücreli karsinomlara benzer şekilde immün antikorlar ile reaktiflik verirler (Mills et al., 2015). Yaygın olarak keratin immünreaktivitesi mevcuttur ancak eksprese olan keratin tipleri tümörden tümöre oldukça değişiklik gösterir (Mallofre et al., 1993).

Laringeal skuamöz hücreli karsinomların genetiği diğer baş boyun bölgesi skuamöz hücreli karsinomları ile genellikle aynıdır. Normal bir hücrenin invaziv kanser hücresine progresyonu için multipl genetik değişiklikler gereklidir (Makitie and Monni, 2009). 3p'de (FHIT içeren), 9p21'de (CDKN2A içeren) ve 17p13'deki (TP53 içeren) allel kayıpları, preneoplastik lezyonlar ve invaziv karsinomlu olguların %60-80'inde bulunan en erken karsinogenez olaylarıdır (Makitie and Monni, 2009, Loyo and Pai, 2008). Diğer sık görülen genetik değişiklikler 3p, 5p, 8q, 11q13'de (diğerleri arasında, CCND1 içeren) amplifikasyon ve artış ile 5q, 8p, 11q23-24, 13q ve 18q'da kayıptır. Olguların bir kısmı transforme edici büyüme faktörü alfa kuvvetle eksprese eder (TGF- α EGFR için bir ligandır). EGFR yolağındaki aktivasyon ile çok kötü prognoz birlikteliği izlenir (Chung et al., 2004). HPV ilişkili subgrup genetik olarak farklı gözükmemektedir. Genellikle immünohistokimyasal olarak p16'nın kuvvetli ekspresyonu mevcuttur. p53 gen mutasyonu genellikle yoktur (Makitie and Monni, 2009).

Skvamöz Hücreli Karsinomun Diğer Mikroskopik Varyantları

1) Verrüköz Karsinom: Ekzofitik, papiller çıkıntılara sahip, iteleyici tarzda yavaş büyüme paterni gösteren, metastaz yapmayan, iyi diferansiye skuamöz hücreli karsinom varyantıdır. Sigara ve alkol kullanımı ile ilişkilidir. HPV tip16 ve tip18 nadiren HPV tip6 ve tip11 olgularda saptanmıştır (Kasperbauer et al., 1993, Bradford et al., 1991). Baş boyunda oral kaviteden sonra en sık ikinci yerleşim yeri larinkstir (Koch et al., 2001). Laringeal karsinomların %1-4'ünü oluşturmaktadır (McCaffrey et al., 1998, Orvidas et al., 1998). En sık semptom ses kısıklığı olmakla birlikte hava yolu obstrüksiyonu, kilo kaybı, disfaji, boğaz ağrısı da görülebilir (McCaffrey et al.,

1998). Lezyonların boyutu değişkendir. Kalın papillalar vardır. İyi diferansiye, keratinizasyon gösteren ince fibrovasküler kora sahip skuamöz hücre adaları alttaki stromaya invajinasyon gösterir. Skuamöz epitel, sitolojik olarak malign epitel kriterlerini karşılamaz. Mitoz nadirdir. Bazal tabaka korunmuştur. Ayırıcı tanıda ekzofitik skuamöz hücreli karsinom, hibrid verrüköz karsinom, papiller skuamöz hücreli karsinom, keratinize skuamöz hücreli papillom, verruka vulgaris bulunmaktadır (Orvidas et al., 1998). Primer tedavisi cerrahidir (Hagen et al., 1993).

2) Bazaloid Skuamöz Hücreli Karsinom: Tipik in situ ve/veya invaziv skuamöz hücreli karsinom alanları ve küçük hücrelerden zengin adalar ile karakterize oldukça malign bir laringeal tümördür (Rosai and Ackerman, 2004). Bu hücrelerin hiperkromatik nükleusları, dar sitoplazması, küçük kistik alanları, nekrozu, belirgin hiyalinizasyonu ve periferik palizatlanması vardır (Wenig, 2017, Shah et al., 2014). Dil, farinks ve özafagusta daoluşan bu tümör farklı klinik gidişi olan adenoid kistik karsinomla karıştırılmamalıdır. Bu hastaların büyük kısmı sigara içmektedir. Davranışı oldukça agresiftir (Ereno et al., 2008).

3) Papiller Skuamöz Hücreli Karsinom: Ciddi displastik epitel, minimal veya hiç maturasyon göstermeyen immatür bazaloid hücrelerle çevrili ince fibrovasküler kor içeren papiller büyüme paterni ile karakterize tümördür (El-Naggar et al., 2017). Baş boyun bölgesinde nadir görülür. Yapılan bir çalışmada laringeal kanserlerin yaklaşık %0.05'inde görüldüğü söylenmektedir (El-Naggar et al., 2017). Yaşlı erkeklerde, altıncı ve yedinci dekatta sık görülür (Colby and Klein, 2011). Etyolojisinde sigara ve alkol bulunur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda HPV'nin etyolojide rol oynadığı tespit edilmiştir (El-Naggar et al., 2017). Lezyonlar laringeal papillom ve servikal displazilere benzediği için gelişimlerinde HPV'nin rol aldığı öne sürülmektedir (Suarez et al., 2000, Mehrad et al., 2013). Makroskopik olarak ekzofitik, polipoid, papiller yapılar yapan kitle şeklinde görülür (Wenig, 2002). Histolojik olarak bu tümörler epitelin tüm tabakalarını tutan sitolojik atipi ve çok sayıda mitotik figür ile karakterize, tam kat displazi gösteren, tüm katlarda maturasyon kaybının izlendiği neoplastik hücrelerden oluşur. Neoplastik hücreler ince vasküler kor etrafında dizilerek papiller büyüme paterni gösterirler (Thompson et al., 1999, El-Naggar et al., 2017). Nodal metastaz ve uzak metastaz çok nadir

görülür. Prognoz konvansiyonel skuamöz hücreli karsinomdan daha iyidir. HPV ile ilişkili orofaringeal papiller skuamöz hücreli karsinomlu hastalar HPV negatiflere göre daha iyi sağkalıma sahiptir (El-Naggar et al., 2017).

4) İğsi Hücreli Skuamöz Hücreli Karsinom (Sarkomatoid karsinom/karsinosarkom): Daha çok üst solunum yolu ve sindirim sistemini tutan özel tip bir neoplazmdir. Genellikle polipoid yapısı vardır (Viswanathan et al., 2010). Çoğu supraglottik bölgede yerleşir (Volker et al., 2007). Bifazik paterne sahiptir. İn situ ve/veya invaziv skuamöz hücreli komponent ile birlikte malign iğsi veya pleomorfik hücrelerin baskın olduğu mezenkimal komponentten oluşan ve nadir görülen skuamöz hücreli karsinom varyantıdır (Boamah and Ballard, 2012, El-Naggar et al., 2017). Laringeal karsinomların %1'inden azını oluşturur. Sigara ve alkol etyolojide yer alır. Bir kısmında radyasyon etkisi söz konusudur. Larinks ve hipofarinkste görülen tümörler özellikle HPV'den bağımsızdır. Hastalarda hava yolu obstrüksiyonu ve ses kısıklığı görülür. Makroskopik olarak hava yoluna protrüde polipoid kitle izlenir. Yüzeyi ülseredir (El-Naggar et al., 2017). Lenf nodu metastazı epitelyal, mezenkimal veya her iki komponentten kaynaklanabilir. %25 olguda lenf nodu metastazı görülür, ancak uzak metastaz %5-15 vakada gözükür (Thompson et al., 2002). Prognozu konvansiyonel skuamöz hücreli karsinoma benzer (El-Naggar et al., 2017).

5) Adenoskuamöz karsinom: Laringeal skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinomun ikisinin bir arada görülmesiyle oluşur. Yüzey epitelden kaynaklanır. Nadirdir. Sigara ve alkol etyolojide yer alır. HPV ile ilişkisi yoktur. Baş boyunda sıklıkla larinkste görülür. Skuamöz ve glandüler diferansiyasyon gösteren bifazik morfolojiye sahiptir. Displastik skuamöz epitelden köken alır. Ayırıcı tanıda mukoepidermoid karsinom, adenoid SCC, serömüsinöz glandlara invazyon yapan konvansiyonel SCC bulunur (El-Naggar et al., 2017). Konvansiyonel SCC'dan daha kötü prognozlu ve agresif seyirlidir (Masand et al., 2011, El-Naggar et al., 2017).

6) Lenfoepitelyal karsinom: Nonkeratinize nazofaringeal karsinoma benzer morfolojik özelliğe sahip skuamöz hücreli karsinomun indiferansiye alt tipidir. Sigara ve alkolle ilişkilidir. Nazofaringeal karsinom kadar, Epstein Barr Virusü

(EBV) ile güçlü ilişkisi olmasa da, etyolojide EBV yer alır. Sıklıkla larinkste görülür (El-Naggar et al., 2017).

2.4.5. Klinik

Laringeal skuamöz hücreli karsinomlar günümüzde Amerikan Kanser Komitesi Birliği (AJCC) evreleme sistemine göre tümörün glottis ile ilişkisine bağlı olarak alt gruplara ayrılır (Edge and Compton, 2010). Bu sınıflandırma büyük ölçüde laringoskopik incelemeye dayanır. Bilgisayarlı tomografi (BT) ve Magnetik rezonans (MR) görüntüleme yöntemlerinin kullanımı da sınıflamaya büyük ölçüde katkı sağlar (Gregoire et al., 2010). Bu gruplar glottik, supraglottik, infraglottik, transglottik olmak üzere dörde ayrılır (Rosai and Ackerman, 2004).

1) Glottik: Tüm olguların %60-65'ini oluşturur. Bu tümörler gerçek vokal kord ile en yaygın lokalizasyon olan anterior glottisin üçte bir alanında gelişir. Çevreleyen kıkırdak duvar ve lenfatik damarların azlığı nedeniyle uzun süre lokalize kalmaya eğilim gösterirler. Zamanla anterior komissürü aşarak karşı vokal korda, arkadan aritenoidlere, üstten supraglottik bölgeye, alttan subglottik alana ve önden tiroid kıkırdağı penetre ederek boynun ön kısmındaki yumuşak dokuların içine invaze olabilirler. Profilaktik lenf nodu diseksiyonu gerektirmezler. Erken olgular radyoterapi ile tedavi edilebilir (Pfister et al., 2006). Gerçek korda yerleşen küçük, yüzeysel invaziv SCC'ler kordektomi ile tedavi edilebilirken T2 glottik kanserler en iyi hemilarenjektomi ile tedavi edilmektedir (Pfister et al., 2006).

2) Supraglottik: Vakaların %30-35'ini oluştururlar. Bu tümörler yalancı kord, ventrikül, epiglotun laringeal veya lingual yüzeyinde görülür. Supraglottik tümörlerin 1/3'ü ventrikülden kaynaklanır. Bu tümörler preepiglottik alana doğru belirgin yayılma eğilimi gösterirken, orofarinks hiyoepiglottik ligamentin kalın olması nedeniyle korunmaktadır. Supraglottik tümörlerin sadece %1'i glottik bölgeyi invaze eder. Ses değişiklikleri geç dönemde ortaya çıktığı için bu tümörler ileri evrede bulgu verirler. Tümör hipofarenks veya aritenoide ulaştığında kulağa vuran ağrı tek bulgu olabilir (Sasaki and Jassin, 2001, Rosai and Ackerman, 2004).

Supraglottik bölgenin lenfatikleri yaygın olduğundan servikal lenf nodlarına erken okkult metastazlar yapabilirler (Sasaki and Jassin, 2001, Yilmaz et al., 1999). Lenf

nodu metastazı yaklaşık %40 olguda görülür. Supraglottik tümörler glottik olanlara göre daha kötü prognozlu ve histolojik olarak agresif seyirli tümörlerdir (Hirvikoski et al., 2002). Klinik olarak negatif lenf nodu olan hastaların %20-35'inde mikroskopik incelemede okkült metastazlar saptanır. Tedavi radyoterapi veya larenjektomidir (Pfister et al., 2006). Sınırları düzensiz, derin invazyon gösteren supraglottik tümörler daha fazla rekürrens riskine sahiptir. Bu nedenle adjuvan kemoterapiye gerek duyulur. Az diferansiye, kıkırdak invazyonu gösteren, ülseratif tümörlerde elektif boyun diseksiyonu uygulanmaktadır (Yılmaz et al., 1999).

3) İnfraglottik (subglottik) : Bu tümörlerin görülme oranı %5'in altındadır. Bu grupta 1 cm'den fazla subglottik yayılımı olan gerçek kordu tutan tümörlerin yanı sıra subglottik alana sınırlı tümörler de yer alır. Subglottik bölgeye tümüyle yerleşen tümörler oldukça nadirdir (Bahar et al., 2002). Krikoid kıkırdağa lateral yayılım görülür. Zayıf intertirokrikoid membranın aynı zamanda prelarineal duvar ve tiroid dokusunun invazyonu ile birlikte tümör ile destrükte olması sık görülür (Micheau et al., 1976). Trakeaya sık yayılım olması nedeniyle bu yapı olabildiğince distalden rezeke edilmelidir. Servikal lenf nodu metastazı vakaların %15-20 'sinde, paratrakeal lenf nodu metastazı %50'sinde vardır. Bu nedenle paratrakeal lenf nodlarını da içerecek şekilde radikal lenf nodu diseksiyonu yapılmalıdır (Rosai and Ackerman, 2004). Piriform sinüs veya postkrikoid alanlarda yerleşen tümörlerin faringeal kökenli olduğu kabul edilmektedir.

4) Transglottik: Laringeal ventrikülü vertikal olarak çaprazlayan tümörler için kullanılır (Reidenbach, 1996). Lenf nodu tutulumu insidansı en yüksek olan bölgedir (%52). Bu tümörlere total larenjektomi ve ek olarak elektif lenf nodu diseksiyonu uygulanmalıdır (Robbins and Michaels, 1985).

Larinks tümörlerinin primer tümörün yerleşim yerine bakılmaksızın en sık metastaz yaptığı yerler bölgesel lenf nodları ve akciğerlerdir. Tiroid dokusu ve juguler ven tutulumu direkt yayılımının sonucudur. Juguler ven tutulumu sadece yoğun lenf nodu tutulumu varlığında görülür ve sistemik yayılım olasılığının yüksek olduğunu gösterir. Servikal lenf nodu metastazları ince iğne aspirasyon tekniği ile doğru tanı alır (Rosai and Ackerman, 2004).

2.4.6. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-WHO 2017) Sınıflaması

- 1) Malign epitelyal tümörler
 - a) Konvansiyonel skuamöz hücreli karsinom
 - b) Verrüköz skuamöz hücreli karsinom
 - c) Bazaloid skuamöz hücreli karsinom
 - d) Papiller skuamöz hücreli karsinom
 - e) Spindle hücreli skuamöz hücreli karsinom
 - f) Adenoskuamöz karsinom
 - g) Lenfoepitelyal karsinom
- 2) Prekürsör lezyonlar
 - a) Düşük dereceli displazi
 - b) Yüksek dereceli displazi
 - c) Skuamöz hücreli papillom
 - d) Skuamöz hücreli papillomatozis
- 3) Nöroendokrin tümörler
 - a) İyi diferansiye nöroendokrin karsinom
 - b) Orta diferansiye nöroendokrin karsinom
 - c) Az diferansiye nöroendokrin karsinom
 - Küçük hücreli nöroendokrin karsinom
 - Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
- 4) Tükruk bezi tipi tümörleri
 - a) Adenoid kistik karsinom
 - b) Pleomorfik adenom
 - c) Onkositik papiller kistadenom
- 5) Yumuşak doku tümörleri
 - a) Granüler hücreli tümörler
 - b) Liposarkom
 - c) İnflamatuvar miyofibroblastik tümör
- 6) Kartilaj tümörleri
 - a) Kondrom
 - b) Kondrosarkom
 - Kondrosarkom, grade 1

-Kondrosarkom, grade 2/3

7) Hematolenfoid Tümörler

2.4.7. TNM Klasifikasyonu

T: Primer tümör

Tx: Primer tümör değerlendirilemez

To: Primer tümöre ait kanıt yok

Tis: Karsinoma in situ

Supraglottis

pT1: Supraglottik bölgenin bir tarafına sınırlı tümör, normal vokal kord hareketleri

pT2: Tümör, larinks fiksasyonu olmaksızın, supraglottis veya glottis veya supraglottis dışı bir bölgeye (örneğin; dil tabanı, vallekula veya piriform sinüsün mediak duvarı) bitişik bir veya birden fazla komşu mukoza invazyonu

pT3: Tümör vokal kord fiksasyonu ile birlikte larinkse sınırlı ve/veya postkrikoid alan, preepiglottik boşluk, paraglottik boşluk, tiroid kıkırdak iç korteks invazyonu

pT4a: Tümör tiroid kıkırdak boyunca ve/veya larinks ötesindeki dokulara invaze, örneğin; trakea, dilin yüzeysel ve derin kasları (genioglossus, hyoglossus, palatoglossus), çizgili kaslar, tiroid, özefagus

pT4b: Tümör prevertebral boşluk veya mediastinal yapılar veya karotis artere invaze

Glottis

pT1: Normal vokal kord hareketleri ile birlikte tümör vokal kord(lara) sınırlı (anterior ve posterior komissürü içerebilir)

pT1a: Tümör bir vokal korda sınırlı

pT1b: Tümör her iki vokal kordu tutmuş

pT2: Tümör supraglottik ve/veya subglottise uzanıyor ve/veya vokal kord hareketleri bozulmuş

pT3: Tümör vokal kord fiksasyonu ile birlikte larinkse sınırlı ve/veya paraglottik boşluk tümör invazyonu ve/veya tiroid kıkırdak iç korteks tümör invazyonu

pT4a: Tümör tiroid kıkırdak dış korteks invazyonu ve/veya larinks ötesindeki dokulara invaze örneğin; trakea, dilin yüzeysel ve derin kasları (genioglossus, hyoglossus, palatoglossus), çizgili kaslar, tiroid, özefagus

pT4b: Tümör prevertebral boşluk veya mediastinal yapılar veya karotis artere invaze

Subglottis

pT1: Tümör subglottik alana sınırlı

pT2: Tümör vokal kord(lar)a uzanıyor, vokal kord hareketleri normal veya hasar görmüş

pT3: Tümör larinkse sınırlı, vokal kordlar fikse

pT4a: Tümör tiroid kıkırdak dış korteks invazyonu ve/veya larinks ötesindeki dokulara invaze örneğin; trakea, dilin yüzeysel ve derin kasları (genioglossus, hyoglossus, palatoglossus), çizgili kaslar, tiroid, özefagus

pT4b: Tümör prevertebral boşluk veya mediastinal yapılar veya karotis artere invaze

N-Bölgesel lenf nodları

NX: Bölgesel lenf nodu bilinmiyor

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1: İpsilateral bir lenf noduna metastaz, 3 cm veya daha küçük

N2a: İpsilateral bir lenf noduna metastaz, 3 cm 'den büyük fakat 6 cm ve daha küçük

N2b: İpsilateral çok sayıda lenf nodu metastazı, hepsi 6 cm ve daha küçük

N2c: Bilateral veya kontralateral lenf nodu metastazı, hepsi 6 cm ve daha küçük

N3: 6 cm 'den büyük lenf nodu metastazı

M- Uzak metastaz

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

Evreleme

Evre 0 Tis N0 M0

Evre 1 T1N0 M0

Evre 2 T2 N0 M0

Evre 3 T1 N1 M0

T2 N1 M0

T3 N0,N1 M0

Evre 4A T1,T2,T3N2M0

T4a N0, N1, N2 M0

Evre 4B T4b Herhangi bir N M0

Herhangi bir TN3M0

Evre4C Herhangi bir T Herhangi bir N M1

2.4.9. Tedavi ve Prognostik Faktörler

Larinks tümörlerinde tedavi hastanın yaşı, sosyal, mental, fizik durumu, lezyonun tipi, anatomik lokalizasyonu, tümör yayılımı, komşu yapıların infiltrasyonu, lenf nodu tutulumu ve uzak metastaz varlığına göre belirlenir (Marur and Forastiere, 2008). Erken lezyonlarda radyasyon tedavisi ile başarılı sonuçlar alınmaktadır (Mendenhall et al., 2001). Radyasyon tedavisinin başarılı olmadığı durumlarda cerrahi tedavi uygulanır. Gerçek kordun yüzeysel invaziv skuamöz hücreli karsinomları endoskopik veya laringofissür yolla kordektomiyle tedavi edilebilir. İleri evrelerde tedavi larenjektomidir (Arriagada et al., 1983).

Prognostik önemi olan faktörler ise şunlardır;

1) Klinik Evre: Sağkalımı belirleyen en önemli parametredir. Sağkalımda invazyon derinliği, bölgesel lenf nodu metastazı ve uzak metastazdan bağımsızdır.

2) Tümörün Yerleşim Yeri: Önemli prognostik faktördür. En iyi prognoz, glottik skuamöz hücreli karsinolarda görülürken, subglottik yerleşimli skuamöz hücreli karsinomlarda daha kötü prognoz görülür (El-Naggar et al., 2017). Glottik bölge tümörlerinde 5 yıllık sağkalım oranı %80, supraglottik %65, transglottik %50, subglottik %40'dır (Rosai and Ackerman, 2004). Ariepiglottik kıvrımlarda lokalize olanlar en kötü prognoza sahiptir.

3) Histolojik derece (Grade): Bu parametrenin tümörün klinik evresi ile ilişkili olmaksızın bağımsız bir prognostik belirleyici olduğu gösterilmiştir (Wiernik et al., 1991). Bazı araştırmacılar sağkalım ve grade arasında önemli bir ilişki bulurken bazıları ise sağkalımın grade ile ilişkili olmadığını savunmaktadır. Ancak histolojik derecelendirme (grade) sisteminin subjektif oluşu, objektif kriterlerin bulunmayışı problem oluşturmaktadır (El-Naggar et al., 2017).

4) Lenfovasküler ve Perinöral İnvazyon: Lenfatik damar veya kan damarı invazyonu lenf nodu ve/veya uzak organ metastaz riskini artırır. Vasküler invazyon sıklıkla agresif skuamöz hücreli karsinomlarda görülür. Rekürrens ve kötü sağkalıma sebep olur. Benzer bir şekilde perinöral invazyon da rekürrens, bölgesel lenf nodu metastazında artış ve sağkalım süresinde azalma ile ilişkilidir (Barnes, 2005).

5) Metastatik Lenf Nodunda Ekstrakapsüler Yayılım: Lenf nodu metastazı laringeal tümörlerde en istenmeyen prognostik faktördür(El-Naggar et al., 2017). Ekstrakapsüler yayılım prognostik olarak lokal rekürrens ve uzak metastaz gelişimi ile güçlü ilişkili olup sağkalımı azaltmaktadır (Ferlito et al., 2002).

6) Rezeksiyon Sınırları: Cerrahi sınırlarda tümörün görülmemesi rekürrens oranının azalması ve sağ kalım süresinin uzaması ile ilişkilidir (Barnes, 2005)

7) Tümör Boyutu: Büyük tümör boyutu lokal rekürrens artışı ile ilişkilidir (Small et al., 1992).

8) DNA Plöidi: Anaploid tümörler artmış rekürrens riski ile birliktelik gösterir (Westerbeek et al., 1993).

9) Konak Reaksiyonu: Tümör stromasında yüksek yoğunlukta S-100 protein pozitif boyanan Langerhans hücreleri varlığının olumlu prognostik bulgu olduğu ileri sürülmüştür (Nakashima et al., 1992).

10) Keratin Ekspresyonu: Tümörde eksprese edilen ve immünohistokimyasal olarak gösterilen keratin tipinin prognostik önemi olmadığı görülmektedir (Nakashima et al., 1992).

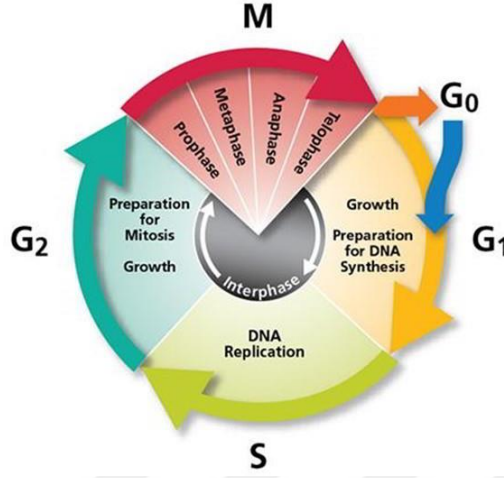
11) p53 Aşırı Ekspresyonu: Araştırmacılar tarafından desteklenmese de bu parametrenin bağımsız prognostik faktör olduğu ileri sürülmektedir (Friedman et al., 2001, Narayana et al., 1998).

12) Proliferasyon: İmmünohistokimyasal Ki67 ve proliferasyon hücre nükleer antijeninin varlığı (PCNA) skuamöz hücreli karsinomun diferansiyasyon derecesi ve lenf nodu metastazı arasında korelasyon vardır (Barnes, 2005).

2.5. HÜCRE SIKLUSU

Çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi biyokimyasal aktivitenin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü sürece hücre siklusu denir. Hücre siklusunun en temel fonksiyonu, kromozomda bulunan DNA'yı iki katına çıkararak genetik olarak birbiri ile aynı olan iki hücre oluşturmaktır. Bu siklus DNA sentezi (S fazı) ve hücre bölünmesi (M fazı) olmak üzere iki temel fazdan oluşur. Gerekli bölünme uyarısı öncesinde hücre dinlenme fazı olan G₀ fazında bekler. Hücre bölünme sinyali aldıktan sonra sinyal ileti kaskadı devreye girer ve hücre interfaz dönemine girer. İnterfaz G₁-S-G₂ dönemlerinden oluşur. Hücreler bölünme uyarısı aldıkları zaman G₀ fazından ayrılıp G₁ fazına ilerleyerek siklusun ilk fazına girmiş olurlar. Bölünmeye devam etmeyip G₁ fazından ayrılan hücreler ise diferansiye olmak üzere farklı bir yöne kayarlar. S evresinde hızlıca DNA replikasyonu olur. G₂ fazında bir önceki fazda replike olmuş DNA ve kromatinler kondanse olurlar ve paketlenirler. M fazı mitozla karşılık gelir ve hücre bölünmesi gerçekleşir. Profaz,

metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere dört evreden oluşur (Wiman and Zhivotovsky, 2017), (Şekil 2).

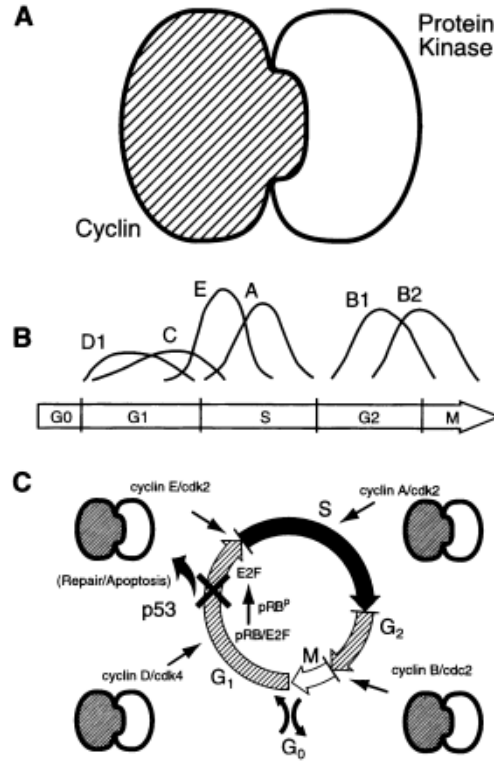


Şekil 2: Hücre siklusu (www.earthslab.com)

Hücre siklusunun farklı evreleri boyunca hücrelerin düzenli olarak ilerlemesi siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve bunların inhibitörleriyle yönetilir (Walworth, 2000). CDK'lar hücrelerin bir sonraki evreye geçebilmeleri için gerekli olan kritik hedef proteinlerini fosforilleyerek siklusu harekete geçirir. CDK'lar tüm hücre siklusu boyunca inaktif formda eksprese olurlar. Siklinler adı verilen protein ailesine bağlanarak fosforile olduktan sonra aktif forma geçerler.

SiklinD hücre siklusunda artan ilk siklin olup G1 fazının ortasında görülür ancak daha sonra S fazında saptanamaz. Hücre siklusunun G1 fazında SiklinD CDK4'e bağlanarak CDK4'ü aktive eder ve siklinD-CDK4 kompleksini oluşturur. Bu kompleks Retinoblastom (RB) proteinini fosforile ederek siklusta kritik rol oynar. RB fosforilasyonu siklus için moleküler bir AÇMA-KAPAMA düğmesidir (Sherr and McCormick, 2002). Hipofosforile durumda iken RB, transkripsiyon faktörü E2F ile sıkı bir inaktif kompleks oluşturarak hücre replikasyonunu önler. E2F bir transkripsiyon faktörü ailesidir. RB fosforilasyonu bu kompleksi ayrıştırır ve E2F'nin inhibitör transkripsiyonel etkinliği sona erer. RB'nin fosforilasyonu hücre siklusunun ilerlemesindeki ana engeli ortadan kaldırır ve hücre replikasyonunu uyarır. Dinlenme halindeki hücreler büyüme faktörleriyle uyarıldığında siklinD ve siklinE konsantrasyonları yükselerek G1/S noktasında siklinD-CDK4 ve siklinE-

CDK2 aktivasyonuna ve RB'nin fosforilasyonuna yol açar. Hiperfosforile RB kompleksten ayrılarak S fazına geçiş için gerekli olan E2F hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive eder (Kumar and Kumar, 2010). Hücre döngüsü uygun büyüme faktörlerin varlığında G1 kontrol noktasını geçer, S fazına girer ancak büyüme faktörlerinin yokluğunda hücre döngüsü durarak G0 fazına girer. Hücre döngüsünün G2 fazından M fazına geçişini kontrol eden bir sitoplazmik faktör varlığı saptanmış ve olgunlaşmayı ilerleten faktör (MPF) olarak adlandırılmıştır. Bu faktör yapı olarak siklinB ve CDK'dan oluşan bir dimerdir. SiklinB bir regülatör olup, CDK1 protein kinazın katalitik aktivitesi için gereklidir. MPF aktivitesi hücre döngüsünün devamı sırasında siklinB'nin periyodik olarak birikmesi ve yıkılması ile kontrol edilir. S fazında sentezi başlayan siklinB, döngünün S ve G2 fazı boyunca CDK1 ile kompleks oluşturur. SiklinB-CDK1 inaktivasyonu ile mitozdan çıkış gerçekleşerek hücreler G1 fazına dönebilir (Kumar and Kumar, 2010). Siklin-CDK komplekslerinin aktivitesi, CDK inhibitörleri ile sıkı bir şekilde kontrol edilir (Sherr and McCormick, 2002, Lowe and Sherr, 2003) (Şekil 3). p21, p27, p57 olmak üzere üç komponent vardır. p21'in transkripsiyonel aktivasyonu p53'ün kontrolü altındadır. p53 kanserlerde büyük bir kısmında mutasyona uğrayan bir tümör süpresör genidir. Hücre siklusunda p53'ün ana rolü hasara uğramış hücrelerin siklus içinde yavaşlatarak veya durmasını sağlayarak kontrol görevi yapar veya apoptoza gitmesini sağlar. CDK inhibitörlerinden olan INK4 ailesi üyelerinden insan INK4a/ARF lokusu, p16INK4a ve p14ARF olmak üzere iki proteini kodlar. p16INK4a, CDK4'e bağlanmak için siklinD ile yarışır ve siklinD/CDK4 kompleksinin inhibisyonunu sağlar ve böylece RB'nin fosforilleme yeteneğini inhibe ederek hücre siklusunun geç G1 fazında durmasına sebep olur. p16INK4a insan kanserlerinde sıklıkla hipermetilasyon ile inaktive olur ya da mutasyona uğrar (Krishnamurthy et al., 2006, Janzen et al., 2006).



Şekil 3: Hücre siklusu regülasyon proteinleri (Cocke and Wang, 1976)

2.6. p16 GENİ

p16 geni 9. kromozomda yerleşim göstererek CDK4 ve CDK6'yı inaktive eden tümör süpresör genidir (Ben-Dayan et al., 2017, Lopez et al., 2017, Silva et al., 2012). Hücre döngüsünde G1 progresyonunun kontrolünde etkili olan proteinlerde meydana gelen değişiklikler kanserlerin çoğunun oluşumuna neden olur (Silva et al., 2012). Bu kontrol mekanizmasında yer alan proteinlerin en önemlileri G1 fazında CDK aktivitesini kontrol eden p16 ve RB genleridir (McCluggage, 2007). p16, CDK4 ve CDK6'ya bağlanarak siklinD/CDK kompleksinin oluşumunu engeller ve G1-S interfazında RB aracılığıyla hücre siklusunda kontrolsüz çoğalmanın önüne geçmeye çalışır (Murphy et al., 2005, Lambert et al., 2006, Silva et al., 2012).

Hücre siklusunda fosforile olmayan RB'nin kilit rol üstlenmesi ile kontrolsüz proliferasyon engellenmektedir. Ancak RB geninde mutasyon, delesyon veya direkt inaktivasyon olursa siklus kontrolsüzce çoğalır. HPV ile enfekte olan hücreler bu

duruma sebep olan örneklerden biridir. HPV'nin E7 proteini RB proteinini fonksiyonel olarak inaktive eder ve sonuçta p16 proteini birikir. Normalde döngüde RB proteini p16 proteinin transkripsiyonunu inhibe etmekte görevlidir. (Meshman et al., 2017). p16 ve RB proteinleri negatif feedback mekanizması ile kontrol edilir (Li et al., 2008, Richmond-Sinclair et al., 2008). p16 geni kanserlerde mutasyon, delesyon ve hipermetilasyonla inaktifleşir (McCluggage, 2007, Lambert et al., 2006).

Yetişkinlerde normal proliferatif endometriyumda, meme duktus epitelinde, serviks tubal metaplazik epitelde, özofagus skuamöz epitelde, tükürük bezinde, pankreas langerhans hücrelerinde, testisin Sertoli ve Leydig hücrelerinde eksprese edilebilir (O'Neill and McCluggage, 2006, Dray et al., 2005).

2.7. Human Papillomavirus (HPV)

Human Papillomavirus, Papovaviridae ailesinden olan zarfsız, ikozahedral kapside sahip, sirküler çift sarmallı DNA virüsüdür (Munoz et al., 2003). Genomu ikozahedral protein kapsid ile çevrilidir. Kapsidi 72 adet kapsomerden ve %80 L1, %20 L2 proteininden oluşur (Kovanda et al., 2011, Kabsch and Alonso, 2002). HPV deride skuamöz epitel hücrelerini ve müköz membranları enfekte edip hücre nükleusunda çoğalır. HPV'nin hücreye girebilmesi için deri ve müköz membranlarda travma ile doku bütünlüğünün bozulmuş olması gerekir (Patterson et al., 2005). HPV'nin hücreyi enfekte edebilmesi için o hücrenin proliferasyon yeteneğinin olması gereklidir. Bu nedenle yassı epitelde proliferasyon potansiyeli olan bazal membrandaki bazal hücrelere tutunur (Kajitani et al., 2012). HPV genomu bazal hücrelerin nükleusunda epizomal halde bulunur ve "rolling circle" (yuvarlanan çember) replikasyon modeli ile çoğalır. HPV'nin şüana kadar bilinen 100'den fazla alt genotipi tanımlanmıştır. Alt sınıflama nükleotid zincirine göre yapılır. HPV virüsünü yeni bir virion türü olarak sınıflamak için L kapsid proteini dizisinin en az %10'unun farklılık göstermesi gerekir (Bernard et al., 2010). HPV genital enfeksiyonlarda sık olarak saptanan kanser yapma potansiyellerine göre alt tiplere ayrılır. Alt tiplerinden 6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 ve 89'un alt tipi CP6108 düşük riskli, 26, 53 muhtemel yüksek riskli, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 yüksek riskli kabul edilir (Dehn et al., 2007), (Tablo 1).

Tablo 1: Risklerine göre HPV tipleri

Risk sınıflaması	HPV tipleri
Yüksek risk	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82
Muhtemel yüksek risk	26, 53
Düşük risk	6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 ve 89

Her bir HPV tipi kendine özgü olan dokuların epitellerinde çoğalır (Doorbar, 2006). HPV hücreye girdikten sonra birkaç hafta ile yıllar arasında değişen sürede inkübasyon periyoduna sahiptir. Daha sonra replikasyon başlar. HPV enfeksiyonlarının çoğu asemptomatik ve geçicidir. Ancak yüksek riskli HPV ile enfekte hücrelerde zamanla kanser görülebilir.

HPV ile ilişkili karsinomlar ve lezyonların moleküler analizlerinde bu virüslerin transformasyon aktiviteleriyle uyumlu farklılıklar görülür. Benign lezyonlar ve preneoplastik lezyonlarda HPV genomu epizomal yani entegre olmayan şekilde iken kanserlerde virüsün DNA'sı konak hücrenin DNA'sına entegredir (Kumar and Kumar, 2010). DNA entegrasyonunun malign transformasyonda önemli olduğunu düşündürmektedir. Virüsün genetik bilgileri transkripsiyonel olarak aktif DNA iplikçiklerinde kodlanır. Viral proteinleri kodlayan diziler tek bir DNA sarmalı üzerinde bulunmaktadır. Fonksiyonel olarak erken bölge (early; E), geç bölge (late; L) ve uzun kontrol bölgesi (long control region; LCR) olmak üzere üç bölgeye ayrılır. HPV genomik sekansı 8 adet ORF (open reading frame) bölgesi içerir. ORF bölgesinde virüs proteinleri kodlanır. ORF bölgesi E (erken) ve L (geç) olmak üzere ikiye ayrılır. E bölgesi E1, E2, E4, E5, E6, E7 proteinlerini, L bölgesi L1 ve L2 proteinlerini kodlayan ORF bölgelerini içerir (Kabsch and Alonso, 2002, Nowinska et al., 2017). Virüsün genleri enfeksiyon esnasında erken (E1, E2, E4, E5, E6, E7) ve geç (L1, L2) proteinleri sentezler. Erken ORF viral replikasyon, transkripsiyon işlevlerini kontrol ederek hücresel transformasyondan sorumlu proteinleri ve ayrıca onkogenlerle ilgili proteinleri kodlar. Geç ORF'ler ise virionun yapısal proteinleri olan L1 ve L2 proteinlerini kodlar. HPV genomunda kodlanmayan bölge olan, ORF

içermeyen uzun kontrol bölgesine (LCR) sahiptir. LCR bölgesinde virüs geninin replikasyon ve transkripsiyondan sorumlu düzenleyici elementleri bulunur. LCR aynı zamanda NCR (non-coding region) veya URR (upstream regulatory region) olarak bilinir. HPV'nin sadece bir sarmalı transkripsiyon edilir (Doorbar, 2006). Viral gen ekspresyonu ve replikasyon keratinositlerin diferansiyasyonu ile paralel olarak sıkı kontrol mekanizmasıyla kontrol edilir (Mui et al., 2017).

Viral Proteinler

HPV enfeksiyonlarında rol alan ORF'lerin fonksiyonlarına bakacak olursak kısaca aşağıdaki gibi özetleyebiliriz.

E1 proteini: Başlangıç proteini olup E2 proteini ile birlikte erken dönemde DNA replikasyonunu destekleyerek virüsün epizomal formunun devamını sağlar. Replikasyonda ATP'ye bağımlı helikaz fonksiyonu görür. Bu ATPaz/helikaz bölgesi E2 proteini ile etkileşir. Böylece DNA sentezi başlaması ve uzaması sağlanmış olur. E1 proteini konak hücrede bulunan replikasyon faktörlerinden bağımsızdır. E6 ve E7 proteinleri isereplikasyon faktörleriyle ilişkilidir (Bergvall et al., 2013, Schuck et al., 2013).

E2 proteini: Viral DNA'da majör transkripsiyon regülasyonunu sağlayan proteindir. DNA replikasyonunu başlatır ve replikasyonun devamlılığının stabil bir şekilde olmasını sağlar. Viral genomun epizomal devamlılığını, hücre genomuna bağlanmasını sağlar. Viral genom DNA'sının salınım ve onarımında önemlidir. Düşük konsantrasyonda erken gen ekspresyonunu artırırken, yüksek konsantrasyonlarda baskılayıcı etkisi bulunarak böylece viral genomun sayısını kontrol etmektedir. E2 indirekt olarak, viral onkogenler E6 ve E7 ekspresyonun aktivitesinin düzenlenmesinde rol alır. Viral hayat siklusunun geç safhasında LCR bölgesine E2 proteinlerinin bağlanması ile hücresel transkripsiyon faktörleri serbestleşerek E6 ile E7 proteinlerinin transkripsiyonu baskılanır (Nowinska et al., 2017, Ho et al., 2011, Demeret et al., 1997, Van Tine et al., 2004).

E4 proteini: DNA replikasyon siklusunun geç fazında görev alır. En önemli fonksiyonu keratinositlerde bulunan hücre iskeletinin ara filamanlarını yıkıma uğratmasıdır. Böylece virüs partikülleri rahatlıkla hücre dışına çıkabilmektedir

(McIntosh et al., 2010, Van Tine et al., 2004, Nowinska et al., 2017). E4 proteini hücre döngüsünü G2/M aşamasında durdurarak E7 aracılı hücre proliferasyonunu antogonize etmektedir (Nowinska et al., 2017)

E5 proteini: Viral yaşam döngüsünün geç fazında eksprese edilir. Endoplazmik retikulum membranında, golgi aparatında ve hücre membranında bulunarak EGFR gibi büyümeden sorumlu faktörlerin aktivasyonunu sağlayarak epitelin üst katmanlarında replikasyona uyumlu bir ortamın devamlılığına yol açar (Nowinska et al., 2017, Hellner and Munger, 2011). E5 proteini hücre transformasyonu, apoptozis olaylarında da görev alır. HPV transformasyonunda doğal ve kazanılmış immün cevapta değişikliğe neden olabilir (Paolini et al., 2017).

E6 proteini: HPV enfeksiyonu sırasında ilk eksprese edilen proteindir. Yüksek riskli HPV'lerde konak hücresinde nükleusta ve sitoplazmasında bulunarak çok sayıda hücre protein ile etkileşime girer. E6 proteininin en önemli görevi tümör baskılayıcı gen olan p53 geninin inaktivasyonuna neden olmasıdır. Yüksek riskli HPV'lerde E6 proteini, önce E6 ATP'ye bağlanır ve bu kompleks p53'le birleşir. Üçlü kompleks tümör baskılayıcı gen olan p53'ün parçalanmasını uyararak proteozomda yıkımını sağlar. Hücre proliferasyonu uyarılarak hücre döngüsü bozulur. Böylece hücrelerin genetik stabilitesinin korunmaması ve apoptozisin inhibe olması sonucunda hücrelerin transformasyon riski artarak onkogenezis uyarılmış olur. Ayrıca E6'nın bir diğer önemli görevi telomeraz aktivasyonu ile hücrelerin sürekli proliferasyonuna sebep olmaktır (Scheffner and Whitaker, 2003, Zhang and Tang, 2012).

E7 proteini: Büyük oranda nükleusta bulunur. E7 proteini DNA hasarına bağlı olarak hücre döngüsünün durdurulmasında görev alan RB proteinini bağlayarak hücre döngüsünü durdurur ve apoptozis indüklenmiş olur (Pagano et al., 1992, Dupuy et al., 1997, Nowinska et al., 2017). RB proteini hücre siklusunun G1'den S fazına geçişini inhibe eder ve aktivitesi fosforilasyon ile düzenlenir. HPV ile enfekte hücreler E7 proteinlerinin hipofosforile RB proteinlerine bağlanması sonucu RB proteini inaktif olarak hücre siklusu S fazına ilerler (Yim and Park, 2005). RB geni E2F transkripsiyon faktörlerine bağlanarak replikasyonda görev alan enzimlerin genlerinin aktivasyonunu baskılayarak tümör süpresyonu yapmaktadır. RB E7 ile

inaktive olduğunda p16'nın fazla ekspresyonuna yol açar. p16 CDK4/CDK6'ya bağlanarak hücre siklusunu yavaşlatan, RB'nin hipofosforilasyonuna yol açan, E2F'nin serbest kalmasını sağlayan ve G1 fazından S fazına geçişini sağlayan CDK inhibitörüdür. Böylece E2F aktif formda tutulur ve hücre siklusunun G1/S fazına geçiş indüklenir (Wang et al., 2004, Keating et al., 2001). E7 ayrıca CDK inhibitörleri olan p21 ve p27 bileşenlerini içeren proliferasyondan sorumlu diğer proteinlerle etkileşerek hücrelerin S fazında progresyonlarını arttırmaktadır. Yüksek riskli HPV CDK4/CDK6 inhibisyonu yaparak p16 proteini ile inaktif RB hücre ölümüne engel olmaktadır. Hücre içerisinde biriken p16'nın HPV ile ilişkili lezyon ve kanserlerde immünohistokimyasal olarak nükleer ve sitoplazmik boyanıp tanı aracı olarak kullanılması hedeflenmiş olup bu konuda araştırmalar sürmektedir (Stasikowska-Kanicka et al., 2011).

L1 proteini: Majör kapsid proteinidir. HPV'nin dış yüzeyi girintili çıkıntılı görünümüne sahiptir. HPV yüzey proteinlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur. Viral replikasyonun geç fazında sentezlenir ve immünojeniktir (Lee et al., 2014).

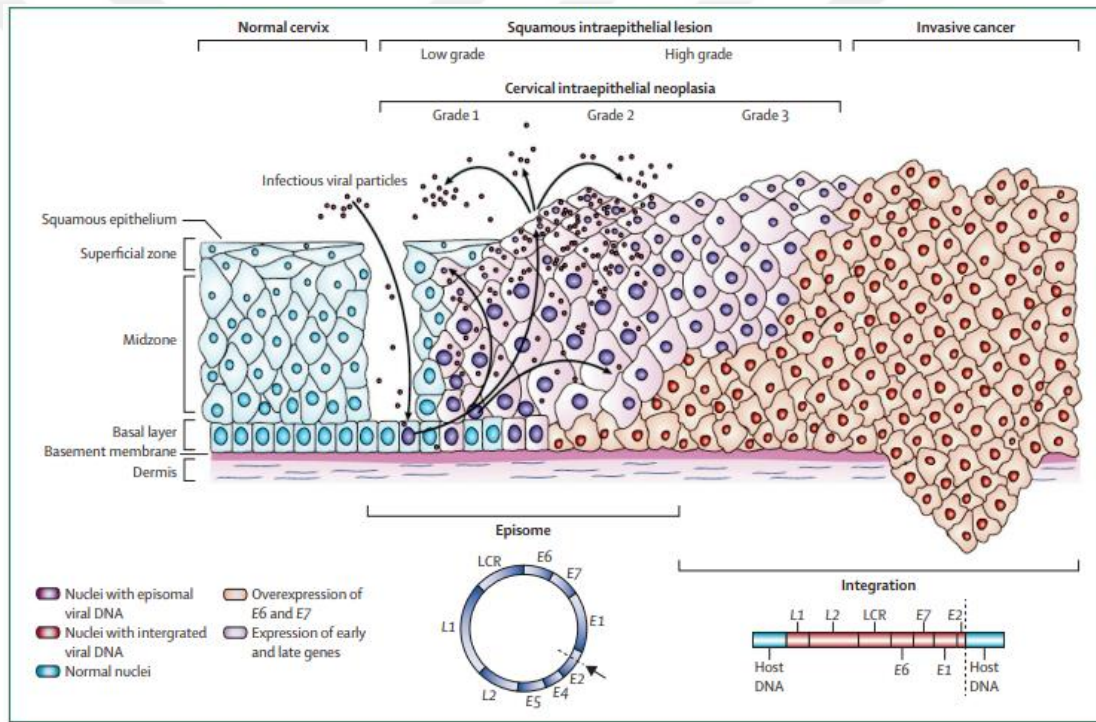
L2 proteini: Minör kapsid proteini olup viral DNA'nın çekirdeğe taşınmasında görev alır. L2 proteininin DNA'ya bağlanmasından ve enkapsidasyon olaylarından sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (Hebner and Laimins, 2006, Tumban et al., 2012).

HPV'nin Onkogenез Mekanizması

Çok katlı yassı epitelde bazal tabakadaki keratinositler human papillomavirüs ile enfeksiyona duyarlıdır. HPV bu bazal tabakada bulunan hücreleri enfekte eder. Replikasyon bazal tabakada bulunan keratinositlerde meydana gelir. Diğer tabakalardaki hücrelerde replikasyon görülmez. HPV ile enfekte hücrelerde HPV'nin sitopatik etkisinden dolayı nükleuslarında büyüme, düzensiz kromatin ağı, perinükleer halo, sitoplazmasında vakuolizasyon gibi değişiklikler görülür. Bu değişikliklerin tümüne koilositik değişiklikler adı verilir.

HPV bazal hücrelere girdikten sonra erken proteinler olan E1 ve E2 proteini eksprese eder. Virüs DNA'sı hücreye girdikten ve soyulduktan sonra hücre nükleusuna transportu gerçekleşir (McBride et al., 2006). Bu hücrelerde enfeksiyon süresince viral DNA 20-100 kopya sayısına ulaşır. Bazal hücreler bölündükçe HPV genomları

yeni hücelere geçer ve hücrelerin bazal membranını geçtikten sonra enfekte olan hücreler epitelin yüzeyine doğru ilerleyerek farklılaşma başlamaktadır. Nihayetinde geç genlerin aktive olmasıyla prodüktif enfeksiyon başlar. Virion suprabazal tabakadaki diferansiye hücrelerde meydana gelir. Yüksek düzeyde sentezlenen E1, E2, E4 ve E5 proteinleriyle viral genom sayısı artar. Viral genlerin ekspresyonuyla, genom replikasyonu belirgin şekilde hızlanır. Binlerce kopya olacak şekilde viral genom amplifikasyon olur. Epitelin üst tabakalarında L1 ve L2 geç viral proteinler sentezlenir. Hücre nükleusunda virüs partikülleriyle birleşir. Sonunda epidermisin yüzeyinden çok sayıda virüs ile yüklü keratinositlerin çevreye dökülmesiyle virüsler salınır (Zheng and Baker, 2006), (Şekil 4).

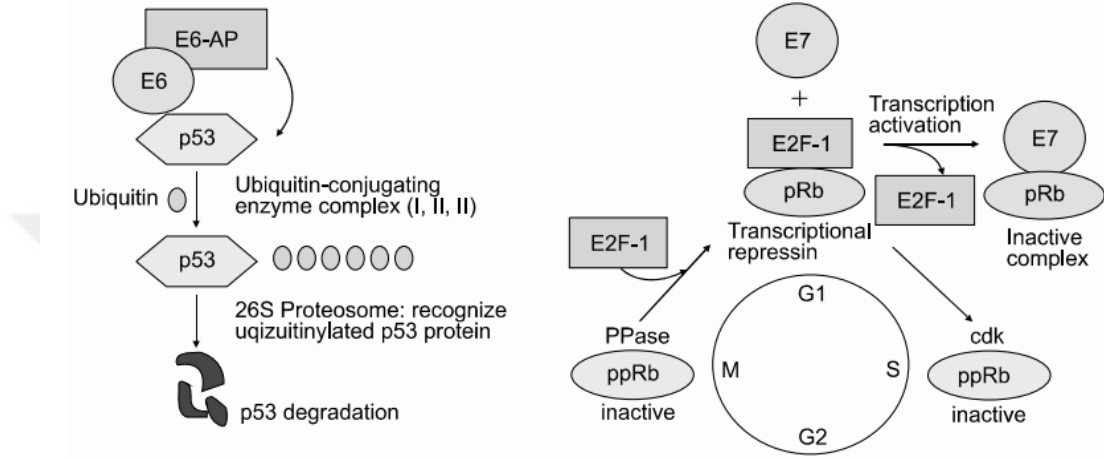


Şekil 4: Human Papillomavirus yaşam döngüsü ve genomunun organizasyonu (Crosbie et al., 2013)

HPV'nin onkogenез mekanizması replikasyon üzerinden olur. Enfekte hücrelerin transformasyonunda HPV'nin persistan hale gelmesi önemlidir. Persistan enfeksiyon ve takip eden karsinogenез durumunda epizomal halde bulunan viral genomun hücrenin kromozomuna entegre olduğu saptanmıştır. Viral DNA entegrasyon sürecinde sabit bir alanda kesintiye uğrar. Bu alan çoğunlukla virüsün DNA'sında E1 ve E2 proteinlerinin içindedir. Viral DNA'nın E2 alanı normalde E6 ve E7 viral

genlerinin transkripsiyonunu baskılar. Eğer kesintiye uğrarsa E6 ve E7 proteinleri aşırı eksprese olarak onkogenik özellik kazanır (Dehn et al., 2007). E6 ve E7 proteinleri HPV'nin temel onkogenleridir. E6 ve E7 genleri tümör süpresör genlerinin fonksiyonlarını baskılayarak onkogen özellik gösterirler. E6'nın primer rolü p53 ile ilişkilidir. p53 geni, hücrede meydana gelen DNA hasarlarını gidermek amacıyla hücre döngüsünü durdurur, DNA tamiri için gerekli olan onarımın yapılmasını sağlar, eğer DNA tamiri yapılamıyorsa ciddi kromozomal defektleri olan hücreleri apoptoza indükler. E6, p53'e, E7 RB proteinine bağlanarak bu proteinlerin degradasyonunu uyarır. E6, p53 genine etki ederek hasarlı kromozomlarda onarım yapılmadan hücrelerin bölünmesine, kromozomal olarak defektli hücrelerin oluşup birikmesine ve apoptotik etkinin ortadan kalkmasına neden olmaktadır. E6'nın apoptotik etkiyi ortadan kaldırması, telomeraz enzimini indükleyerek de gerçekleşmektedir. Telomeraz aktivitesi genellikle embriyonik hücrelerle sınırlı olup somatik hücrelerde bulunmamaktadır. Hücrede telomeraz olmadığında hücreler defalarca bölünür, yaşlanmaz ve sürekli proliferasyona uğrayarak kanser gelişimine gerçekleşir (Longworth and Laimins, 2004). Düşük riskli HPV'lerde E6 proteininin p53'e afinitesi düşüktür ve p53'e etki göstermez. Yüksek riskli HPV'lerden köken alan E6 proteinleri ubiquitin bağımlı proteoliz yoluyla degradasyonunu arttırarak p53'ü aktive eder (Munger and Howley, 2002). Düşük riskli HPV'lerdeki E7 proteininin ise RB'ye afinitesi daha düşüktür ve hücreleri transforme etme kapasiteleri daha zayıftır. Yüksek riskli HPV'lerde E7 proteinleri, RB gen ailesi üyeleriyle ilişkisinden ötürü hücrelerin farklılaşmasında rol oynamaktadır. RB proteini DNA hasarına bağılı olarak hücre döngüsünü durdurur ya da apoptozu indükler. Yüksek riskli HPV'lerde E7 proteini RB'ye güçlü bir şekilde bağlanarak E2F/RB kompleksini bozar ve RB degradasyonunu uyarır. HPV ile enfekte hücrelerde RB proteini inaktivasyonu sonucu hücre siklusu S fazına ilerler (Yim and Park, 2005). E7, p53'ün transkripsiyon aktivitesini bozabilir ve ayrıca p21'i inaktive edebilir. RB'un fonksiyonlarından biri de, E2F transkripsiyon faktörlerine bağlanarak replikasyonda görevli olan enzim genlerinin aktivasyonunu baskılamaktır. Bu RB geninin tümör baskılayıcı fonksiyonuyla ilişkilidir. E7 proteininin RB ile etkileşimi, büyüme faktörlerinden bağımsız olarak, RB ve transkripsiyon faktörlerinin E2F ailesi arasındaki ilişkiyi bozmaktadır. E7 aynı

zamanda CDK inhibitörleri p21 ve p27 bileşenlerini içeren hücre proliferasyonu ile ilgili diğer proteinlerle de etkileşmektedir. Yüksek riskli HPV’lerde p16 proteini ve E7 proteini ile inaktifleşen RB kompleksi hücre ölümüne engel olmaktadır. P16 ve inaktif RB geni sonucu CDK4/CDK6 inhibisyonu gerçekleşir. Sonuç olarak p53 ve RB kontrolünde bulunan hücre siklusundaki baskılayıcı yollar E6 ve E7 proteinlerinden dolayı engellenmiş olur (Munger and Howley, 2002).



Şekil 5: HPV'nin E6 ve E7 proteinleri ile p53 ve RB üzerine etkileri (Yim and Park, 2005)

Klinik Bulgular

HPV deri ve mukozalarda enfeksiyon meydana getirerek benign ve malign lezyonlara neden olur. Siğil en sık sebep olduğu klinik tablodur. Eller ve ayaklar olmak üzere keratinizasyon gösteren epitel dokusunun görüldüğü her yerde izlenebilir. Benign lezyonlar sıklıkla kendini sınırlandırır. Lezyonun görünümü ise etkilenen alana ve ilgili virüs tipine bağlı olarak farklılıklar gösterir. HPV tip6 ve tip11 sıklıkla papilloma neden olur. Düşük riskli HPV tipleri, kadın ve erkeklerde perianal bölge ya da dış genital bölgede kondiloma aküminata meydana getirir. En sık etken HPV tip6 ve HPV tip11'dir. Malign transformasyon çok nadirdir. Kırmızı-kahverengi pigmente sahip olana anogenital siğiller ise HPV tip16 veya HPV tip18 ile ilişkili bowenoid papüllozis açısından değerlendirilmelidir. Genital bölgedeki aktif HPV enfeksiyonları genellikle yüksek riskli HPV tipleriyle ilişkili olup vajina, vulva, penis, mesane, servikste intraepitelyal neoplaziye neden olabilir. İntraepitelyal

neoplazi malign transformasyon sonucunda karsinoma in situ ve invaziv karsinoma ilerleme gösterebilir.

İnsanda enfeksiyona sebep olan HPV tipleri ve sebep olduğu hastalıkların bir kısmı aşağıdaki gibidir.

Plantar siğil: 1, 2, 4, 63

Yaygın siğil: 1, 2, 3, 4, 7, 10, 26, 27, 28, 29, 41, 57, 65, 77

Flat siğil: 3, 10, 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76

Diğer deri lezyonları (epidermoid kist vs.): 6, 11, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 72, 73

Epidermodisplasia verruciformis: 2, 3, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50

Tekrarlayan respiratuvar papillomatozis: 6, 11

Fokal epitelyal hiperplazi (Heck hastalığı): 13, 32

Konjunktival papillom/karsinomlar: 6, 11, 16

Anogenital siğiller (kondiloma akuminata): 6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70

Servikal intraepitelyal neoplazi: 6, 11, 16, 18, 31, 34, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 66

Servikal skuamöz hücreli karsinom: 16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68, 70

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, 2017-40-02-010 nolu poje olarak Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiş olup Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay almıştır (Etik Kurul Karar No=71522473/050.01.04/120)

3.1. OLGULARIN SEÇİLMESİ

Çalışma Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2008-2017 yılları arasında Larinks Skuamöz Hücreli Karsinom tanısı almış 81 total/parsiyel larenjektomi ve unilateral/bilateral boyun diseksiyonu yapılmış olgular retrospektif olarak incelemeye alındı. Larenjektomi materyellerinin 73'ü total larenjektomi, 8'i parsiyel larenjektomi idi. Hastaların dosya kayıtlarından ve patoloji raporlarından yaş, cinsiyet, tümör yerleşim yeri, tümör çapı, metastatik lenf nodu sayısı, radyoterapi/kemoterapi tedavisi uygulanıp uygulanmadığı, yapılan cerrahi prosedür, nüks, sağkalımı hakkında veriler elde edildi.

Hastaların tümör içeren lam ve blokları patoloji arşivinden elde edildi. Hemotoksilen-eozin preparatlar incelenerek histopatolojik parametreler ve lenf nodu diseksiyon materyellerinde metastatik lenf nodu varlığı açısından tekrardan değerlendirildi. Tümörün histolojik derecesi DSÖ'nün 2017 sınıflamasına göre yapıldı. Histolojik derece (grade) tümör hücrelerinin pleomorfizmi, hücrel diferansiyasyonu, keratinizasyon mevcudiyeti ve mitotik aktiviteye göre değerlendirildi. İyi diferansiye, orta derecede diferansiye, az diferansiye olarak üç gruba ayrıldı. Belirgin keratinizasyon, seyrek mitoz, hafif derecede nükleer pleomorfizm, hücreler arası köprüleşmeler gösteren hücrelerin oluşturduğu skuamöz adalardan oluşan tümörler iyi diferansiye, nükleer pleomorfizmi biraz daha belirgin, daha fazla mitoz, anormal mitoz, daha az keratinize hücrelerden oluşan tümör orta derecede diferansiye, belirgin pleomorfizm, sık mitoz izlenen, minimal ya da hiç keratinizasyon görülmeyen hücrelerden oluşan tümörler az diferansiye olarak kabul edildi. Evreleme Amerikan Kanser Birliği'nin (AJCC/UICC) önerdiği sisteme göre yapıldı.

3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA

- %10'luk tamponlanmış nötral formalin fiksasyonu sonrası rutin takip ile hazırlanmış parafine gömülü bloklardan 4 mikronluk kesitler (Leica RM 2145 mikrotom cihazı ile) poly-lysine ile kaplı lamlara alındı.
- Kesitler 70 derecede etüvde (Mommert etüv cihazı) 1 saat bekletildi.
- Etüvden alınan lamlar Bond-maX (Leica Microsystems) otomatik immunohistokimya cihazında Bond Polymer Refine Detection Kits (Leica, DS9800) kullanılarak devamında aşağıdaki işlemler uygulanmak üzere cihaza konuldu.
- Kesitlere deparafinizasyon (Bond Dewax Solution, Leica Microsystems) yapıldı.
- Kesitler sırasıyla %99, %96 ve %70' lik alkollerden beşer dakika geçirilerek rehidrate edildi.
- Kesitler yıkandı (Bond Wash Solution, Leica Microsystems).
- Antijenik maskelenme giderildi (Bond Epitop Retrieval Solution, Leica Microsystems).
- Kesitler yıkandı (Bond Wash Solution, Leica Microsystems).
- Spesifik olmayan boyanmaları ve zemin boyanmasını önlemek amacıyla endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük hidrojen peroksit ile 15 dakika bloke edildi (Peroxide Block, Leica Microsystems).
- Kesitler yıkandı (Bond Wash Solution, Leica Microsystems)
- Preparatlardaki dokuların üzerine primer p16 antikorları (DB Biotech Rabbit Clonal Antibody Klon: R19-D) uygulandı.
- Kesitler yıkandı (Bond Wash Solution, Leica Microsystems).
- 10 dakika biotinlenmiş sekonder antikor uygulandı (Post Primary, Leica Microsystems).
- Kesitler yıkandı (Bond Wash Solution, Leica Microsystems).
- Polymer (Leica Microsystems).
- Kesitler yıkandı (Bond Wash Solution, Leica Microsystems).
- Kesitler distile su ile yıkandı.

- Renk reaksiyonu için DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) kromojen (Mixed DAB Refine, Leica Microsystems) uygulandı.
- Kesitler distile su ile yıkandı.
- Daha sonra zıt boyanma sağlamak için Mayer's Hematoksilende 1 dakika bekletildi.
- Kesitler distile su ile yıkandı.
- Kesitler yıkandı (Bond Wash Solution, Leica Microsystems).
- Kesitler distile su ile yıkandı.
- Boyalı preparatlar su bazlı kapama jeli kullanılarak lamel ile kapatıldı.
- Boyalı preperatlar ışık mikroskobunda (Nikon Eclipse e80) 4, 10, 20 ve 40'lık büyütmelemlerde incelenerek tümör hücrelerinin boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu değerlendirilerek skorlandı.
- Pozitif kontrol için önceden pozitifliği bilinen serviks skuamöz hücreli karsinomuna sahip tümör doku örneği kullanıldı.

3.3. REAL TIME PCR İLE HPV DNA VARLIĞININ SAPTANMASI

Real time PCR ile HPV DNA varlığının saptanmasında uygulanan prosedürün basamakları aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

Deparafinizasyon Aşamaları

- Çalışmada laringeal skuamöz hücreli karsinom tanısı almış parafine gömülü bloklar seçildi.
- Her bir parafin blok için bir mikrosantrifüj tüpü hazırlandı. Blokların üzerindeki numaralar tüplere yazıldı.
- Çalışılacak olan banko %10'luk çamaşır suyu ile silinerek, çalışma ortamına uygun koşullar oluşturuldu.
- En fazla 6 adet 10 mikronluk kesit 1,5 ml'lik ependorf tüpe kondu.
- Üzerine 1 ml ksilen eklendi ve 10 saniye vortekslendi.
- En yüksek hızda 3 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant pallete dokunulmadan dikkatlice pipet yardımı ile atıldı.
- 1 ml %96-%100 etanol eklendi ve 10 saniye vortekslendi.
- En yüksek hızda 3 dakika santrifüj edildi.

- Süpernatant pallete dokunulmadan dikkatlice pipet yardımı ile atıldı.
- Tüplerin kapakları açıldı ve 37 °C'de 10 dakika bekletildi.

DNA İzolasyonu

- DNA izolasyonu QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany) kullanılarak üretici firmanın önerilerine göre aşağıdaki gibi yapıldı.
- Örnek üzerine 180 µl Buffer ATL eklendi.
- 25 µl Proteinase K eklendi ve vortekslendi.
- 56 °C'de doku tamamen lize olana kadar inkübe edildi.
- Örnek 90 °C'de 1 saat inkübe edildi.
- Tüp kapaklarının iç tarafındaki damlaları tüpün içine almak için kısaca santrifüj edildi.
- 200 µl Buffer AL eklendi. 200 µl %96- %100'lük etanol eklendi. 10 saniye vortekslendi. Kısaca santrifüj edildi.
- Tüplerin içindeki karışım QIAamp MinElute spin kolona aktarıldı. Tüplerin kapağı kapandıktan sonra 6000 g hızda 2 dakika santrifüj edildi. Spin kolonun yerleştiği tüp atıldı. QIAamp MinElute spin kolon temiz 2 ml' lik toplama tüpüne yerleştirildi.
- QIAamp MinElute spin kolon dikkatlice açıldı ve tüplerin içine 500 µl Buffer AW1 eklendi. Tüplerin kapağı kapandıktan sonra 6000 g hızda 2 dakika santrifüj edildi. Spin kolonun yerleştiği tüp atıldı. QIAamp MinElute spin kolon temiz 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi.
- QIAamp MinElute spin kolon dikkatlice açıldı ve kolon üzerine 500 µl Buffer AW2 eklendi. Tüplerin kapağı kapandıktan sonra 6000 g hızda 2 dakika santrifüj edildi. Spin kolonun yerleştiği tüp atıldı. QIAamp MinElute spin kolon temiz 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi.
- 20000 g hızda 4 dakika santrifüj edildi. QIAamp MinElute spin kolonun yerleştiği tüp atıldı. QIAamp MinElute spin kolon 2 ml' lik ependorf tüplere yerleştirildi.
- QIAamp MinElute spin kolon dikkatlice açıldı ve 30-60 µl Buffer ATE kolonun tam ortasına gelecek şekilde aktarıldı. Kolonun kapağı kapatıldı. 3

dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 20000 g hızda 2 dakika kadar santrifüj edildi.

İzolasyon işleminden sonra hazırlanan DNA örnekleri nanodrop ile değerlendirildi. Ekstraksiyon ürünü olan DNA çalışılncaya kadar -20°C’de saklandı.

Real Time PCR aşaması

HPV tespiti ve tiplendirilmesi HPV Genotypes 14 Real-TM Quant (Nuclear Laser Medicine, İtaly) kiti ile HPV’nin 14 yüksek risk (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ve 68) ve 5 düşük risk (6, 11, 42, 43, 44) HPV tipini saptayabilen multipleks real time amplifikasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Kitin içeriğinde her bir hasta için üç ya da dörderli gruplar halinde bir araya getirilmiş forward ve reverse primerleri içeren karışımlar ile PCR buffer, FRT (floresan boya karışımı), Hot Start DNA Polimeraz enzimi, Negatif kontrol ve her bir tipten 1.000 GE/ml içeren standartlar bulunmaktadır.

Tablo 2: Kullanılan primer grupları

Primer grupları	
1. Grup	Tip 16 – 18 – 31 ve internal kontrol
2. Grup	Tip 39 – 45 – 59 ve internal kontrol
3. Grup	Tip 33 – 35 – 56 ve 68
4. Grup	Tip 51 – 52 – 58 ve 66

- Her bir klinik numune için birer adet, negatif kontrol için bir ve standart için bir adet dördü PCR stripleri hazırlandı.
- 600 µl PCR-buffer-FRT karışımının içine 60 µl Hot Start DNA Polimeraz eklendi ve vortekslendi.
- Her bir örnek için striplerin ilk sırasına 10 µl 1. grup primer karışımından; ikinci sırasına 10 µl 2. grup, üçüncü sırasına 10 µl 3. grup; dördüncü sırasına 10 µl 4. grup primer karışımından eklendi.
- Her bir stripin üzerine 5 µl PCR-buffer-FRT ve Hot Start DNA Polimeraz içeren karışımdan eklendi.
- Son olarak 4’lü PCR striplerine klinik numunelerden ekstrakte edilen DNA’lardan 10’ar µl eklendi.

- Son 2 stripten birine 10’ar µl negatif kontrol, birine 10’ar µl standart konuldu.
- Striplerin kapakları kapatılarak Rotor Gene (Qiagen, Almanya) cihazına yerleştirilerek tabloda gösterilen PCR protokolü uygulandı.

Tablo 3: PCR protokolünün gerçekleştirildiği sıcaklık, süre ve döngü sayıları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
1	95	15 dk	1
2	95	5 s	5
	60	20 s	
	72	15 s	
3	95	5 s	40
	60	20 s (<i>Floresan sinyalin saptanması</i>)	
	72	15 s	

Çalışma sonunda elde edilen veriler tip 16, 39, 33 ve 58 için FAM boyası ile işaretli 495 nm absorbans kanalında; tip 31, 45, 35 ve 52 için HEX boyası ile işaretli 535 nm absorbans kanalında; tip 18, 59, 68 ve 66 için ROX boyası ile işaretli 575 nm absorbans kanalında; tip 56, 51 ve internal kontroller için Cy5 boyası ile işaretli 650 nm absorbans kanalında okundu. Her bir örnek için 33’ün altında elde edilecek cycle threshold (Ct) pozitif olarak değerlendirildi.

Uygulanan bu protokolle 81 vakanın 43’ünde internal kontrol çalışması üzerine, internal kontrolün çalışmadığı 38 vakada Test-it HPV Screening Kit ile çalışmaya devam edildi.

Test-it HPV Screening Kit ile yapılan çalışma basamakları aşağıdaki sıra ile yapıldı.

- Parafin bloklar seçildi.
- Her bir parafin blok için bir mikrosantrifüj tüpü hazırlandı. Blokların üzerindeki numaralar tüplere yazıldı.
- Her bir örnek, steril bistüri ile steril bir petri üzerinde traşlandı. Traşlanma, bütün yüzeyden alınacak şekilde yapıldı.

- Her bir yeni örneğe geçildiğinde eldiven değiştirildi.
- Çalışmanın tamamı biyogüvenlik kabininin (CLASS 2) içinde yapıldı.
- Parafin blokların DNA izolasyonu için Zymo Research Quick DNA Mini Prep Class Kit (U.S.) kullanıldı.

Kitin manuelindeki parafin bloğa gömülü dokular (FFPE) protokolü uygulandı. Protokolün aşamaları aşağıdaki gibidir.

- Mikrosantrifüj tüpü içerisine traşlanıp konulan parafin blok örneklerinin her birinin üzerine 750 µl ksilen konuldu. Vortex yapıldı ve bir saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 12 000 g'de bir dakika santrifüj edildi. Örnekten ksilen uzaklaştırıldı.
- Tekrar her bir örneğin üzerine 750 µl ksilen ilave edildi.
- 12 000 g'de bir dakika santrifüj edildi. Örneklerden ksilen uzaklaştırıldı.
- Steril 50'lik falcon içerisine %100'lük etanol konuldu. Bu etanolden örneklerin üzerine 1 mL eklendi. Kısa bir vortex yapıldı ve 5 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra 12 000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Supernatant atıldı.
- Steril 50'lik falcon içerisine %95'lik etanol hazırlandı. Bu etanolden örneklerin üzerine 1 mL eklendi. Kısa bir vortex yapıldı ve 5 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra 12 000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Supernatant atıldı.
- Steril 50'lik falcon içerisine %75'lik alkol hazırlandı. Bu etanolden örneklerin üzerine 1 mL eklendi. Kısa bir vortex yapıldı ve 5 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra 12 000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Supernatant atıldı.
- Örneklerin üzerine 1 mL distile su konuldu. Vortex yapıldı ve 5 dk oda ısısında inkübasyon yapıldı.
- 12 000 g'de 1 dk santrifüj edildi ve örneklerden su uzaklaştırıldı.

DNA İzolasyonu

- Deparafinize edilen örneklerden bir miktar alınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
- 95 µl su, 95 µl mavi buffer, 40 µl de proteinaz K eklendi.
- Örnekler 56 °C ve 400 rpm'de ısı bloğunda bir gece bekletildi.
- Tamamen eriyen dokuların her birinin üzerine 400 µL genomic binding buffer eklendi. 15 saniye vortex yapıldı.
- Kitin içerisinden çıkan kolonlar ve tüpler iç içe konularak hazırlandı. Numaralandırma işlemi yapıldı. Vorteks yapılan bütün örnek kolona aktarıldı. 12 000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Alttaki tüp atıldı. Kolon yeni bir tüpe yerleştirildi.
- Kolonun üzerine 400 µl DNA prewash buffer eklendi. 12 000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Alttaki tüp atıldı. Kolon yeni bir tüpe yerleştirildi.
- Kolonun üzerine 700 µl G-DNA wash buffer eklendi. 12 000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Alttaki tüp atıldı. Kolon yeni bir tüpe yerleştirildi.
- Kolonun üzerine 200 µl G-DNA wash buffer eklendi. 12 000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Alttaki tüp atıldı. Kolon yeni bir tüpe yerleştirildi.
- Kolon streil bir mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Numaralandırma işlemi yapıldı. Üzerine 30 µl DNA elüsyon buffer konuldu. 5 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı. 12 000 g'de 1 dk santrifüj edilir.
- Mikrosantrifüj tüpünün içinde DNA elde edilmiş oldu.

DNA Konsantrasyon Ölçümü

Elde edilen DNA konsantrasyonu Spektra Max cihazında ölçüldü.

PCR Çalışması

Spektra Max cihazında ölçülen DNA'lar 50-150 nanogram olacak şekilde sulandırıldı. Parafin blok örneklerinin deparafinizasyon aşamasında kullanılan gerek ksilen gerekse alkol PCR'da inhibisyona neden olacağından internal kontrolü çalışmayan örneklere daha fazla dilüsyon serileri uygulandı ve PCR'a konuldu.

HPV taranması için Test-it HPV Screening Kit kullanıldı. Kit, SybrGreen tabanlı Real Time PCR kitidir. Analizler Amplification Curve ve Melting Curve Analiz seçilerek yapıldı.

Kit içeriği:

Mix 1 HPV varlığını saptayan mix

Mix 2 ise DNA varlığını kontrol eden internal kontrol.

Pozitif Kontrol

Negatif Kontrol (Su)

PCR hazırlığı

ROTOR gene Real-Time PCR cihazının 0,2'lik PCR tüpleri örnek sayısı ve +2 (biri pozitif kontrol için, diğeri de negatif kontrol için) olacak şekilde soğuk bloğun üzerine yerleştirildi.

Aynı şekilde bir set internal kontrol için hazırlandı.

İlk sete 20 µL mix1 den dağıtıldı. Üzerine 5 µL DNA konuldu.

İkinci sete de 20 µL mix2 den dağıtıldı. Üzerine 5 µL DNA konuldu.

+2 fazla hazırlanan mix örneklerinin üzerine kitin içinden çıkan pozitif ve negatif kontrolden 5'er µL eklendi.

Aşağıda belirtildiği gibi termal protokol uygulandı.

Tablo 4: PCR protokolünün gerçekleştirildiği sıcaklık, süre ve döngü sayıları

Deney Protokolü

- Optics Settings: "Intercalating Dyes" Signal Quality: "Normal Quality"

Program Bilgisi	Değer
Adı	"Hold"
Siklus	--
Hedef Sıcaklık(°C)	95
Inkübasyon Süresi(sn)	900

Program Bilgisi	Değer		
Adı	"3-Step Amplification"		
Siklus	10		
Sıcaklık Hedefi	Segment1	Segment2	Segment3
Hedef Sıcaklık(°C)	95	45	72
Inkübasyon Süresi(sn)	30	30	60
Data Elde Etme	Yok	Yok	Var

Program Bilgisi	Değer		
Adı	"3-Step Amplification"		
Siklus	31		
Sıcaklık Hedefi	Segment1	Segment2	Segment3
Hedef Sıcaklık(°C)	95	53	72
Inkübasyon Süresi(sn)	30	30	60
Data Elde Etme	Yok	Yok	Var

Program Bilgisi	Değer
Adı	Hold
Hedef Sıcaklık(°C)	60
Inkübasyon Süresi(sn)	60

Program Bilgisi	Değer	
Adı	"High Resoulution Melting"	
Siklus	--	
Sıcaklık Hedefi	Başlangıç Adımı	Bitiş Adım
Hedef Sıcaklık(°C)	65	95
Data Elde Etme	Var	Var

Program Bilgisi	Değer
Rising degree each step	0.1
Waiting time for premelt for first step	90 sec.
Waiting Time for each step afterwise	5 sec.
Fluorescence Acquiring	"Acquire-Melt A"
Gain Optimization	Optimize gain before melt on all tubes
The gain giving the highest fluorescence less than	95

Test-IT HPV Screening Kit, insan genomuna entegre olan HPV virüsünün varlığını saptamak amacıyla kullanılan bir kittir. Kitin hedeflediği iki bölge bulunmaktadır. L1 bölgesi, günümüze kadar tanımlanmış tüm HPV tiplerinde korunmuş olarak bulunan bir bölgedir. Kit içeriğindeki Mix-1 bu bölgenin saptanmasına yönelik primer setleri içermektedir. Diğer bölge ise, DNA izolasyonunun başarılı bir şekilde yapıldığının kontrol edilmesi amacıyla koyulmuş, insan genomunda, X kromozomu üzerinde ve tüm insanlarda ortak olarak bulunan bir bölgedir. Mix-2 ise, bu bölgenin saptanmasına yönelik primer setleri içerir. Mix-1 ve Mix-2, içerisindeki primer setleri dışında, PCR reaksiyonunda gerekli dNTP, PCR buffer, SYBR Green ve çeşitli PCR standartları bulunmaktadır.

Kitte ayrıca, sentetik genler ve insan DNA'sı içeren pozitif kontrol örneği ve negatif kontrol olarak kullanılan nükleaz içermeyen su bulunmaktadır. Her çalışmada, pozitif ve negatif kontrol kullanılarak, çalışma kontrol edilmektedir.

Kit, Real Time PCR yöntemiyle çalışmaktadır. PCR ürünlerinin saptanması, amplifiye edilen bölgelerin SYBR Green boyası ile işaretlenmesiyle, Real Time PCR cihazları kullanılarak yapılmaktadır. Elde edilen dataların analizi, "Amplification Curve" ve "Melting Curve" Analizleri yapılarak yapılmaktadır. Bu çalışmamızda, Real Time PCR Analizörü olarak Rotor Gene Q kullanıldı.

Örneklerin analizi

Rotor Gene Q'nun software programından analiz sekmesi seçildi, cycling green seçeneği işaretlenerek her bir örnek ve kontrol için amplifikasyon eğrileri ve melting curve eğrileri incelendi. Her örnek grubu ile koyulan negatif kontrol reaksiyonunun verdiği amplifikasyon eğrisi, alt taban olarak kabul edildi. Her bir örnek, öncelikle internal kontrol eğrilerine göre değerlendirilerek, DNA izolasyonunun başarılı bir şekilde yapıldığı kontrol edildi. Sonrasında, HPV ile ilgili eğriler incelenerek, örneklerdeki HPV varlığı kontrol edildi.

Parafine gömülü olan örneklerde, DNA eldesinin zorluğu sık karşılaşılan bir durum olduğu için, internal kontrol reaksiyonu iyi çalışmayan, yani, internal kontrol eğrisi iyi olmayan örnekler için tekrar izolasyon yapılarak ve farklı dilüsyonlarda DNA kullanılarak, tekrar PCR yapıldı.

Optimizasyon sırasında cycle sayısı 31'den 40'a kadar arttırıldı.

3.4. p16 EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRMESİ

p16 boyamasının immünohistokimyasal değerlendirmesi literatür bilgisi dahilinde yapıldı.

Tümör hücrelerinin %25'inden azında nükleer ve sitoplazmik boyanma: Skor 0

Tümör hücrelerinin %25-%50 arası nükleer ve sitoplazmik boyanma: Skor 1

Tümör hücrelerinin %50-%75 arası nükleer ve sitoplazmik boyanma: Skor2

Tümör hücrelerinin %75'inden fazlasında nükleer ve sitoplazmik boyanma: Skor 3 olarak kategorize edildi. Skor 3 örnekler pozitif olarak kabul edildi.

3.5. İSTATİSTİK

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, oran, minimum, maksimum) yanı sıra normal dağılım göstermeyen verilerin iki grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen üç ve üzeri grupların karşılaştırmalarında ise Kruskal Wallis test ve ikili karşılaştırmalarında Mann Whitney U Test kullanıldı. Nitel verilerin karşılaştırılmasında ise Pearson Ki-Kare testi, Fisher-Freeman-Halton testi ve Fisher's Exact test kullanıldı. Anlamlılık en az $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Genel Bulgular

Çalışmaya 2008-2017 tarihleri arasında Sakarya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na gelen toplam 81 olgu alındı. Hastaların üçü (%3,7) kadın, 78'i (%96,3) erkek idi (Tablo 5).

Olguların yaşları 35 ile 89 arasında değişmekte olup, ortalama yaş $62,21 \pm 9,99$ yıldır (Tablo 5).

Olguların üçü (%3,7) sigara/alkol kullanmazken, 78'i (%96,3) sigara/alkol kullanıcısıydı (Tablo 5).

RT/KT tedavisi alan hasta sayısı 12 idi (%14,8), (Tablo 5).

Tablo 5: Tanımlayıcı Özelliklerin Dağılımı

		n (%)
Yaş (yıl)	<i>Min-Mak (Medyan)</i>	35-89 (61)
	<i>Ort±Ss</i>	62,21±9,99
Cinsiyet	Kadın	3 (3,7)
	Erkek	78 (96,3)
Sigara/alkol kullanımı	Yok	4 (4,9)
	Var	77 (95,1)
KT/RT alma durumu	Yok	69 (85,2)
	Var	12 (14,8)

Tümörlerin en büyük çapları 1,5-6 cm arasında değişmekte olup, ortalama çap $3,26 \pm 0,88$ cm idi (Tablo 6).

Tümör, olguların 28'inde (%34,6) supraglottik, 18'inde (%22,2) glottik, üçünde (%3,7) subglottik, 32'sinde (%39,5) transglottik yerleşimlidir (Tablo 6).

Histolojik olarak olguların 27'si (%33,3) iyi diferansiye, 44'ü (%54,3) orta diferansiye, 10'u (%12,3) az diferansiye olarak saptandı (Tablo 6).

AJCC TNM evreleme sistemine göre olguların sekizi (%9,9) Evre 1, 13'ü (%16) Evre 2, 25'i (%30,9) Evre 3, 35'i (%43,2) Evre 4 olarak değerlendirildi (Tablo 6).

Tablo 6: Patolojik parametreler

		n (%)
Lokalizasyon	Supraglottik	26 (32,1)
	Glottik	19 (23,5)
	Subglottik	4 (4,9)
	Transglottik	32 (39,5)
Tümör çapı	<i>Min-Mak</i>	1,5-6 (3)
	<i>(Medyan)</i>	
	<i>Ort±Ss</i>	3,26±0,88
Histolojik derece	Az	10 (12,3)
	Orta	44 (54,3)
	İyi	27 (33,3)
Patolojik Evre	Evre 1	8 (9,9)
	Evre 2	13 (16,0)
	Evre 3	25 (30,9)
	Evre 4	35 (43,2)
Lenf nodu metastazı	Yok	50 (61,7)
	Var	31 (38,3)
Lenfovasküler invazyon	Yok	64 (79,0)
	Var	17 (21,0)
Perinöral invazyon	Yok	67 (82,7)
	Var	14 (17,3)
Kıkırdak invazyonu	Yok	31 (38,3)
	Var	50 (61,7)
Larinks dışı yumuşak doku invazyonu	Yok	57 (70,4)
	Var	24 (29,6)
Cerrahi sınır durumu	Negatif	73 (90,1)
	Pozitif	8 (9,9)

Olguların 64'ünde (%79) lenfovasküler invazyon izlenmezken, 17'sinde (%21) lenfovasküler invazyon saptandı (Tablo 6).

Olguların 67'sinde (%82,7) perinöral invazyon mevcut değilken, 14'ünde (%17,3) perinöral invazyon görüldü (Tablo 6).

Kıkırdak doku invazyonu 50 olguda (%61,7) izlendi (Tablo 6).

Larinks dışı yumuşak doku invazyonu olguların 24'ünde (%29,6) saptandı (Tablo 6).

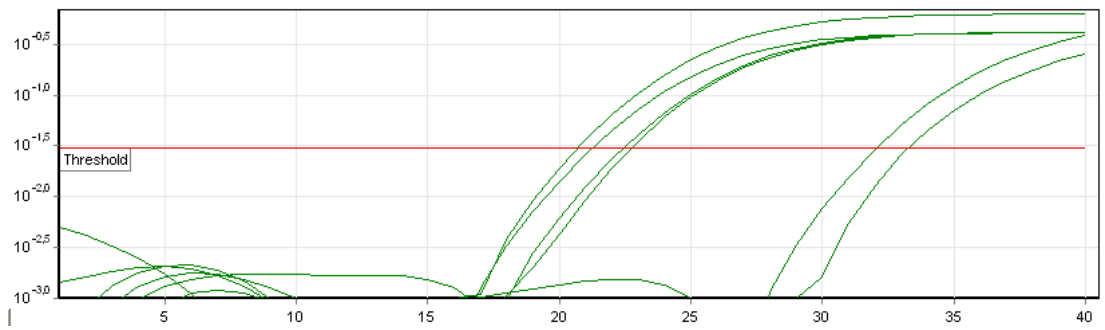
Olguların 31'inde (%38,3) lenf nodu metastazı mevcuttu (Tablo 6).

Olguların 73'ünde (%90,1) cerrahi sınırdaki tümör yokken, sekizinde (%9,9) cerrahi sınırdaki tümör mevcuttu (Tablo 6).

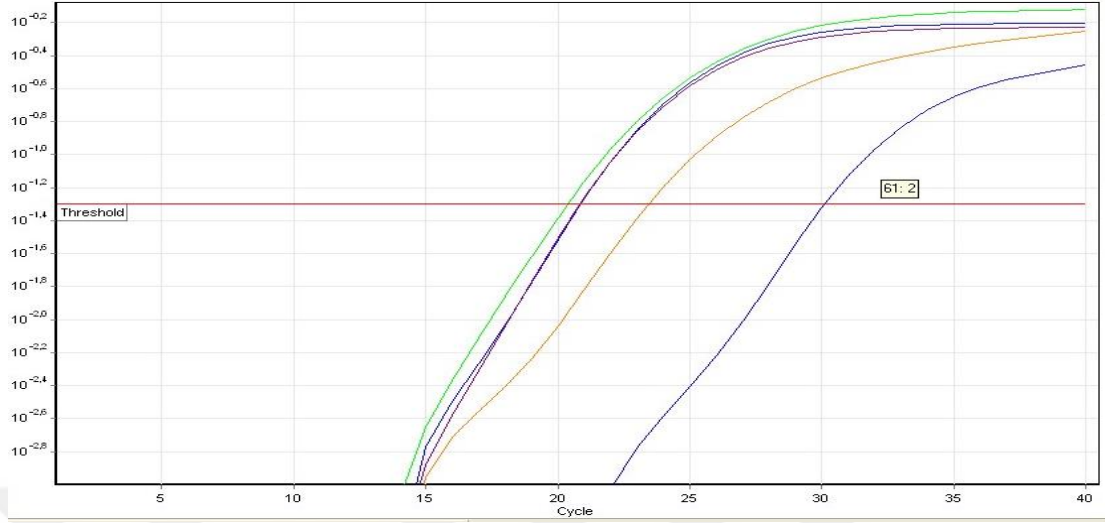
Real Time PCR ile HPV Değerlendirmesi

HPV, olguların ikisinde (%2,5) izlenirken, 79'unda (%97,5) saptanmadı. Olgulardan biri HPV tip16,33 (Şekil 6), diğeri HPV tip18 pozitif idi (Şekil 7).

Şekil 6: HPV tip16,33 pozitif olgunun amplifikasyon eğrisi

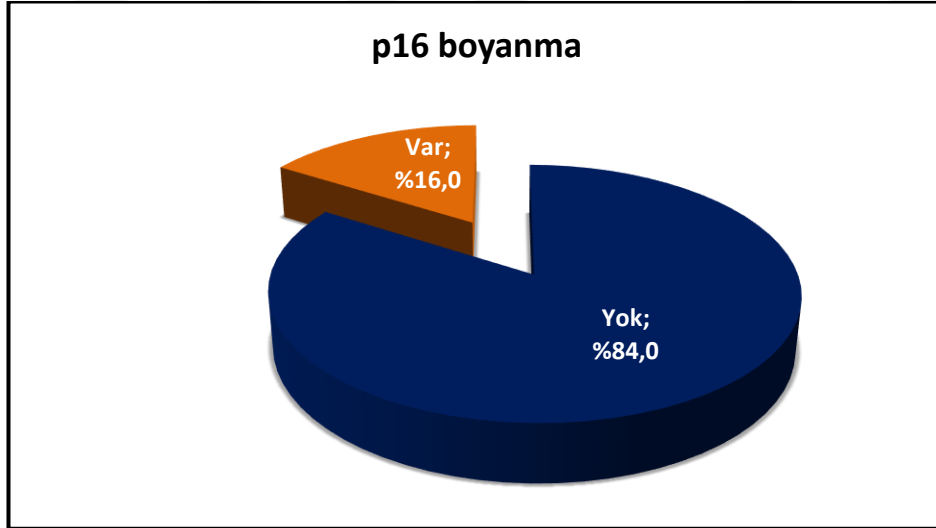


Şekil 7: HPV tip18 pozitif olgunun amplifikasyon eğrisi



p16 Ekspresyonu İle İlgili Bulgular

İmmünohistokimyasal olarak p16 ile, olguların 57'si (%70,4) Skor 0, yedisi (%8,6) Skor 1, dördü (%4,9) Skor 2 idi. Pozitif olarak kabul edilen Skor 3 vaka sayısı 13 idi (%16,0), (Şekil 8).



Şekil 8: p16 boyanma oranları dağılımı

p16 pozitif 13 olgunun tamamında (%100) sigara kullanımı mevcut iken p16 negatif 65 (%95,6) olguda sigara kullanımı mevcut idi. p16 ile sigara kullanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 7), ($p > 0.05$)

Tablo 7: Sigara/alkol kullanımına göre p16 ile boyanma oranları

		Sigara/alkol kullanımı		Toplam	
		Yok	Var		
p16	Negatif	Sayı	3	65	68
		Yüzde (%)	4,4%	95,6%	100,0%
	Pozitif	Sayı	0	13	13
		Yüzde (%)	0,0%	100,0%	100,0%
Toplam	Sayı	3	78	81	
	Yüzde (%)	3,7%	96,3%	100,0%	

p16 pozitif olguların beşi (%6,2) supraglottik, üçü (%3,7) glottik, biri (%1,2) subglottik, dördü (%4,9) transglottik yerleşimlidir. p16 negatif olguların 23'ü (%28,4) supraglottik, 15'i (%18,5) glottik, ikisi (%2,5) subglottik, 28'i (%34,6) transglottik yerleşimlidir. p16 ile tümör lokalizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 8), ($p>0.05$).

Tablo 8: Farklı lokalizasyonlardaki tümörlerde p16 ekspresyonu

		Tümör Lokalizasyonu				Toplam	
		Supraglottik	Glottik	Subglottik	Transglottik		
p16	Negatif	Sayı	23	15	2	28	67
		Yüzde (%)	28,4%	18,5%	2,5%	34,6%	84,0%
	Pozitif	Sayı	5	3	1	4	13
		Yüzde (%)	6,2%	3,7%	1,2%	4,9%	16,0%
Toplam	Sayı	28	18	3	32	81	
	Yüzde (%)	34,6%	22,2%	3,7%	39,5%	100,0%	

p16 pozitif olguların üçü (%23,1) iyi diferansiye (grade 1), yedisi (%53,8) orta derecede diferansiye (grade 2), üçü (%23,1) az diferansiye idi (grade 3). p16 negatif olguların ise 24'ü (%35,3) iyi diferansiye (grade 1), 37'si (%54,4) orta derecede

diferansiye, 7'si (%10,3) az diferansiye idi (grade 3). p16 ile histolojik grade arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (Tablo 9), (p>0.05).

Tablo 9: Histolojik derecelerine göre tümörlerde p16 ekspresyonu

		Histolojik grade			Toplam	
		Az	Orta	İyi		
p16	Negatif	Sayı	7	37	24	68
		Yüzde (%)	10,3%	54,4%	35,3%	100,0%
	Pozitif	Sayı	3	7	3	13
		Yüzde (%)	23,1%	53,8%	23,1%	100,0%
Toplam	Sayı	10	44	27	81	
	Yüzde (%)	12,3%	54,3%	33,3%	100,0%	

p16 pozitif 13 olgunun beşinde (%38,5) lenfovasküler invazyon izlendi. p16 negatif 12 (%17,6) olguda lenfovasküler invazyon görüldü. p16 ile lenfovasküler invazyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 10), (p>0.05).

Tablo 10: Lenfovasküler invazyon varlığına göre tümörlerde p16 ekspresyonu

		Lenfovasküler invazyon		Toplam	
		Yok	Var		
p16	Negatif	Sayı	56	12	68
		Yüzde (%)	82,4%	17,6%	100,0%
	Pozitif	Sayı	8	5	13
		Yüzde (%)	61,5%	38,5%	100,0%
Toplam	Sayı	64	17	81	
	Yüzde (%)	79,0%	21,0%	100,0%	

p16 pozitif 13 olgunun dördünde (%30,8) perinöral invazyon izlendi. p16 negatif 10 (%14,7) olguda perinöral invazyon mevcut idi. p16 ile perinöral invazyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 11), (p>0.05).

Tablo 11: Perinöral invazyon varlığına göre tümörlerde p16 ekspresyonu

		Perinöral invazyon		Toplam	
		Yok	Var		
p16	Negatif	Sayı	58	10	68
		Yüzde (%)	85,3%	14,7%	100,0%
	Pozitif	Sayı	9	4	13
		Yüzde (%)	69,2%	30,8%	100,0%
Toplam	Sayı	67	14	81	
	Yüzde (%)	82,7%	17,3%	100,0%	

p16 pozitif 13 olgunun altısında (%46,2) kıkırdak invazyonu görüldü. p16 negatif 68 olgunun 44'ünde (%64,7) kıkırdak invazyonu mevcut idi. p16 ile kıkırdak invazyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 12), ($p>0.05$).

Tablo 12: Kıkırdak invazyonu varlığına göre tümörlerde p16 ekspresyonu

		Kıkırdak İnvazyonu		Toplam	
		Yok	Var		
p16	Negatif	Sayı	24	44	68
		Yüzde (%)	35,3%	64,7%	100,0%
	Pozitif	Sayı	7	6	13
		Yüzde (%)	53,8%	46,2%	100,0%
Toplam	Sayı	31	50	81	
	Yüzde (%)	38,3%	61,7%	100,0%	

p16 pozitif 13 olgunun beşinde (%38,5) larinks dışı yumuşak doku invazyonu mevcut idi. p16 negatif 19 (% 27,9) olguda larinks dışı yumuşak doku invazyonu izlendi. p16 ile larinks dışı yayılım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 13) ($p>0.05$).

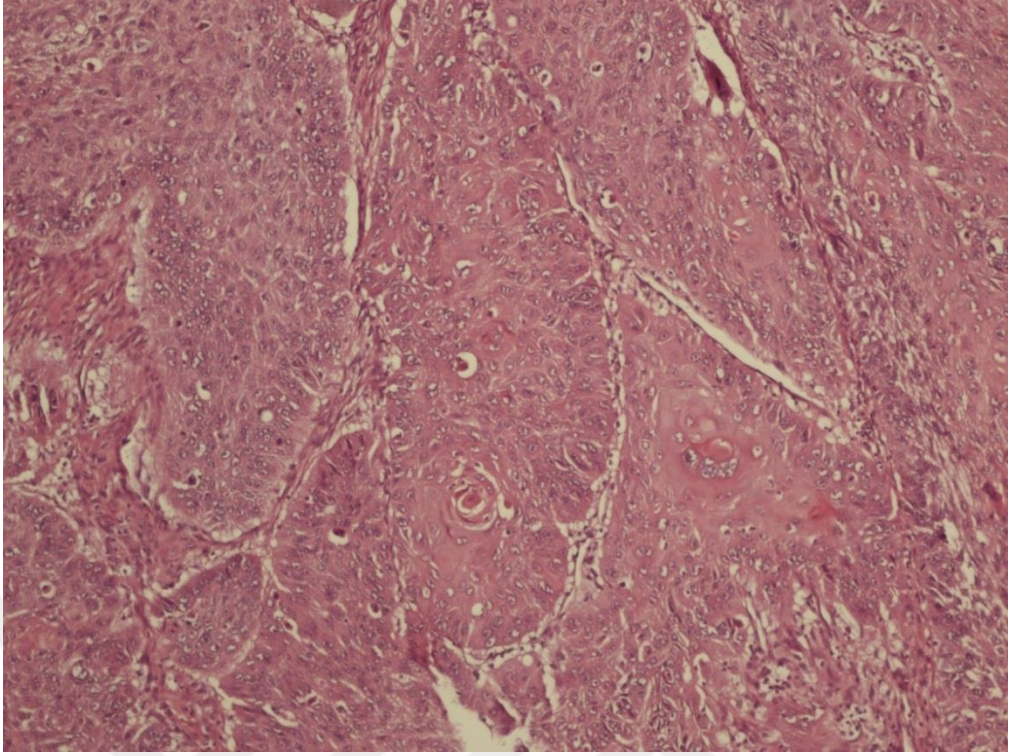
Tablo 13: Larinks dışı yumuşak doku invazyon varlığına göre tümörlerde p16 ekspresyonu

		Larinks dışı yumuşak doku invazyonu		Toplam	
		Yok	Var		
p16	Negatif	Sayı	49	19	68
		Yüzde (%)	72,1%	27,9%	100,0%
	Pozitif	Sayı	8	5	13
		Yüzde (%)	61,5%	38,5%	100,0%
Toplam	Sayı	57	24	81	
	Yüzde (%)	70,4%	29,6%	100,0%	

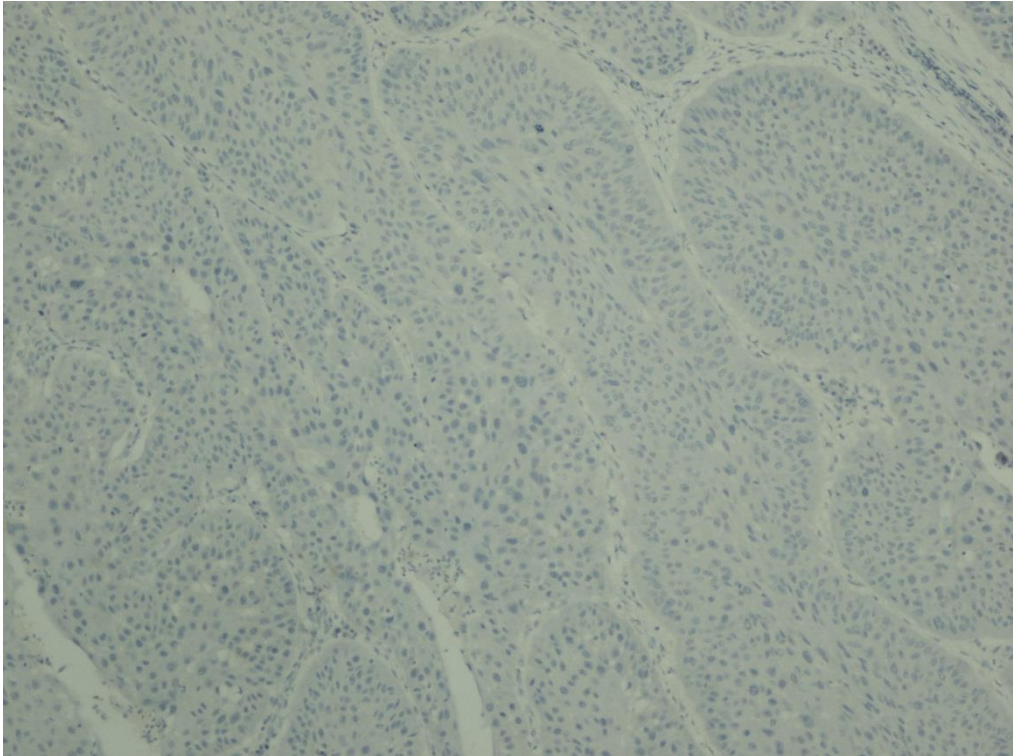
p16 pozitif olguların yedisinde (%53,8) lenf nodu metastazı mevcuttu. p16 negatif 24 (%35,3) olguda lenf nodu metastazı saptandı. p16 ile lenf nodu metastazı varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (Tablo 14),($p>0.05$).

Tablo 14: Lenf nodu metastazının varlığına göre tümörlerde p16 ekspresyonu

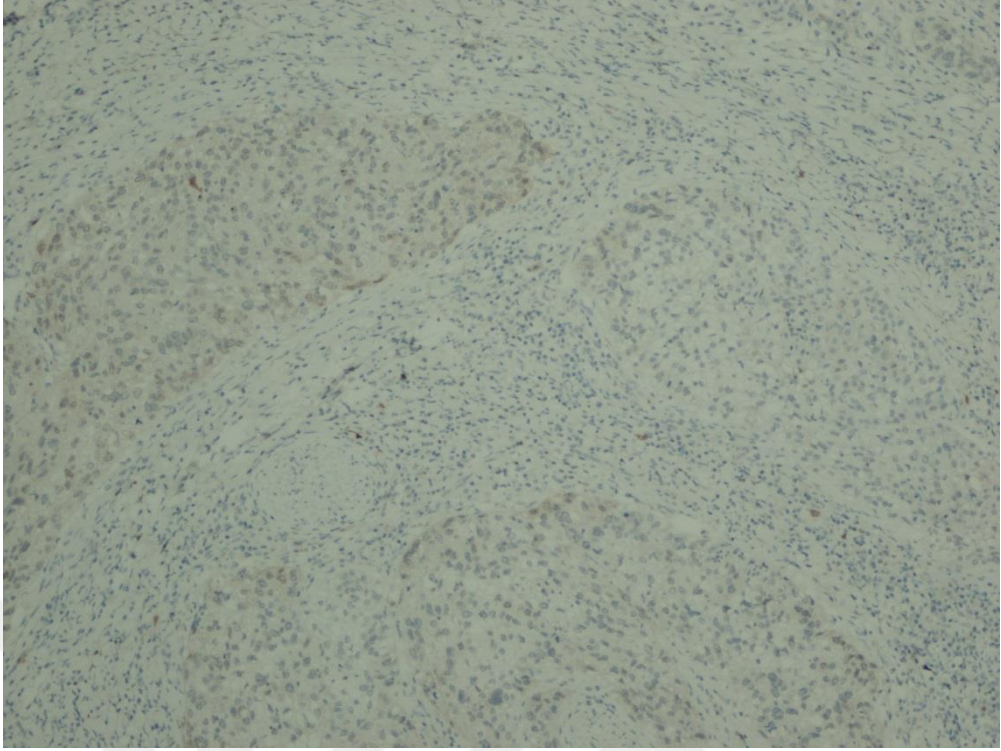
		Lenf nodu metastazı		Toplam	
		Yok	Var		
P16	Negatif	Sayı	44	24	68
		Yüzde (%)	64,7%	35,3%	100,0%
	Pozitif	Sayı	6	7	13
		Yüzde (%)	46,2%	53,8%	100,0%
Toplam	Sayı	50	31	81	
	Yüzde (%)	61,7%	38,3%	100,0%	



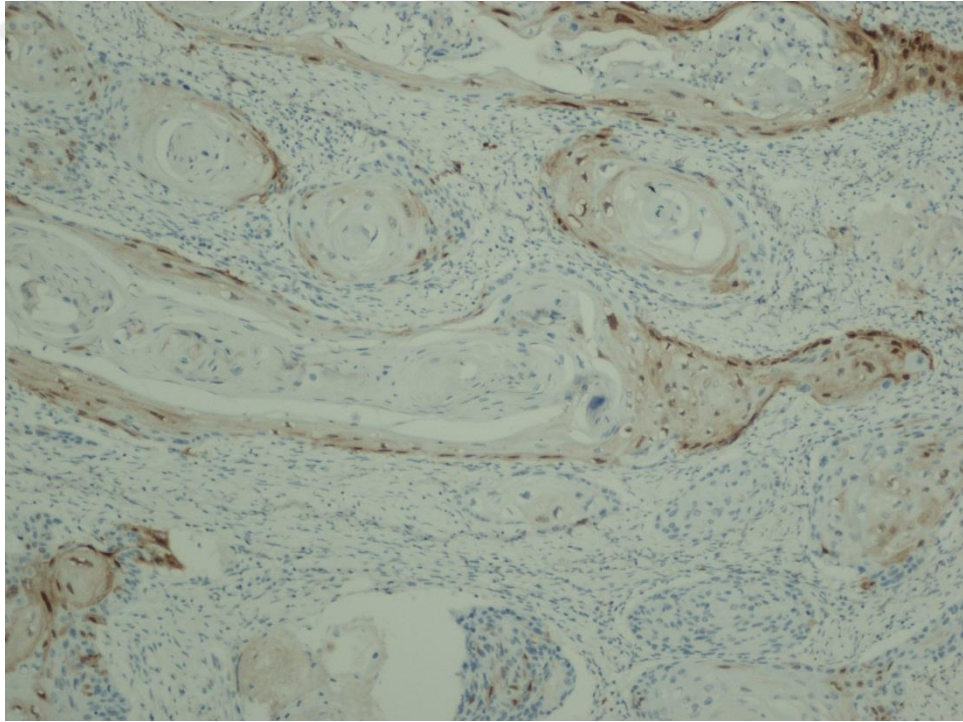
Resim 2: İyi diferansiye skuamöz hücreli karsinom (Hemotoksilen Eozin, X100)



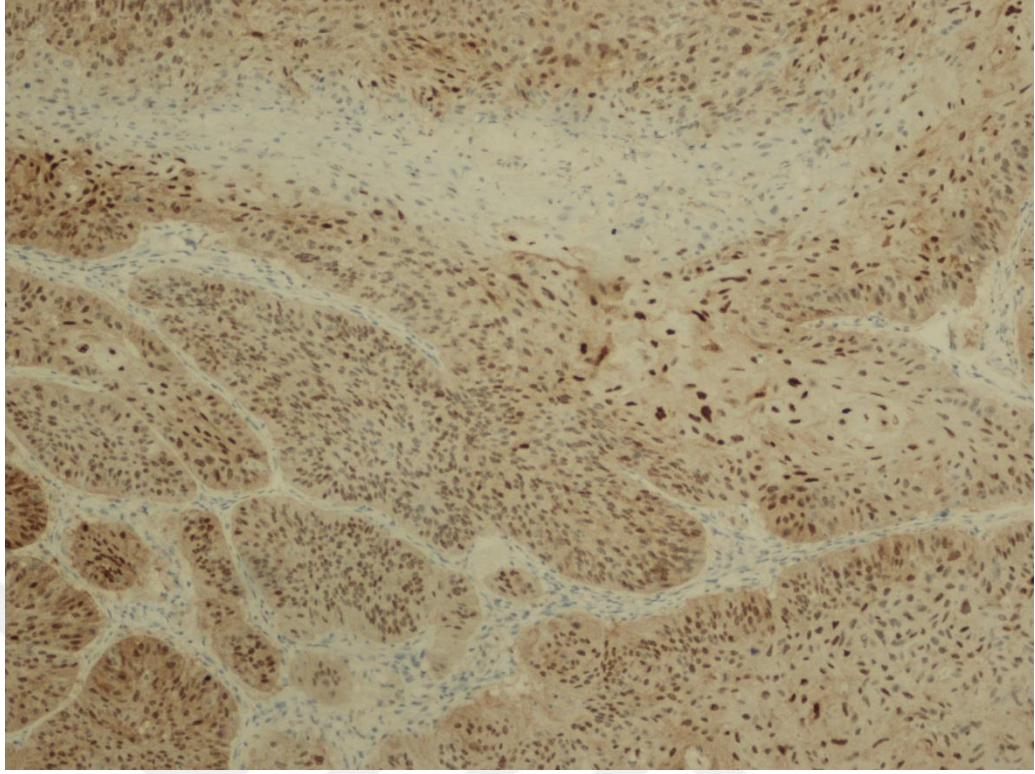
Resim 3: İyi diferansiye SCC'de p16 negatifliği, skor 0 (immünperoksidaz, X100)



Resim 4: Orta derece diferansiye SCC'de p16 ile tümör hücrelerinin %10'unda yamalı orta şiddette boyanma, skor 1 (immünperoksidaz, X100)



Resim 5: İyi diferansiye SCC'de p16 ile tümör hücrelerinin %10'unda yamalı orta şiddette boyanma, skor 2 (immünperoksidaz, X100)



Resim 6: İyi diferansiye SCC'de p16 ile sitoplazmik ve nükleer skor 3 boyanma (immünperoksidaz, X100)

5. TARTIŞMA

Türkiye’de en sık görülen baş boyun tümörü larinks karsinomudur. Laringeal tümörlerin yaklaşık %95’ini skuamöz hücreli karsinomlar oluşturur (Ferlay et al., 2010). Larinks kanseri erkeklerde çok daha sık görülür (El-Naggar et al., 2017). Tümör lokalizasyonu önemli bir prognostik faktör olup ülkelere göre farklılık gözlenmektedir. Fransa, İspanya, İtalya, Finlandiya gibi supraglottik bölgede sık yerleşirken, bazı ülkelerde (Amerika, Kanada, İngiltere, İsveç gibi) glottik bölgede daha sık yerleşim göstermektedir. Tümör gelişiminde başlıca risk faktörleri sigara ve alkol kullanımıdır (El-Naggar et al., 2017). Genellikle beşinci dekatta görülür (Nachalon et al., 2017).

Bizim çalışmamızda 81 olgunun 78’i (%96,3) erkek olup, ortalama görülme yaşı 62,2±9,98’dir. Tümör, vakaların büyük çoğunluğunda transglottik bölgede yerleşmişti. Supraglottik bölge ikinci sıklıkta yerleşim yeri idi. Hastaların %95’i sigara kullanıcısıydı.

Geçtiğimiz 30 yılda özellikle gelişmiş ülkelerde toplum bilinçlenmesi ile sigara tüketiminin azalması sonucu skuamöz hücreli baş ve boyun tümörlerinin genel insidansında bir düşüş gözlenmektedir. Ancak bu düşüşle beraber HPV enfeksiyonuna bağlı özellikle SCC’lerde epidemik bir artış söz konusudur (Stasikowska-Kanicka et al., 2011). Son zamanlarda yapılan araştırmalarda baş ve boyun tümörlerinin yaklaşık %15-30’unun HPV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Stasikowska-Kanicka et al., 2011). Yüksek riskli HPV’nin etyolojik rolü özellikle orofaringeal kanserlerde tanımlanmış ancak malign transformasyona nasıl yol açtığı henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Stasikowska-Kanicka et al., 2011). Tütüne bağlı tümörlerin aksine yüksek riskli HPV’nin neden olduğu hastalar genç, tütün ve alkol kullanmayan kişilerdir (Gillison, 2004, Klussmann et al., 2003, Chen et al., 2017b). Özellikle servikal kanserde malign transformasyonu tetiklediği düşünülünce, HPV’nin bu hastalarda etyolojide suçlanması, en muhtemel sebep olarak görülmüştür (Stasikowska-Kanicka et al., 2011).

HPV ile ilişkili baş boyun tümörleri ayrı bir klinik ve biyolojik antitedir (Gillison et al., 2000). Bu tümörlerin kemoradyasyon tedavisine daha iyi yanıt vermesi, tespit edilebilmelerinin önemini ortaya koymuştur (Fakhry et al., 2008). HPV orofaringeal SCC'lerin büyük bir kısmında etken ve prognostik öneme sahipken, nonorofaringeal SCC'lerdeki rolü net değildir (Chernock et al., 2013, Anantharaman et al., 2017). Orofarinks dışı baş boyun bölgesinden, özellikle larinksten kaynaklanan kanserlerde, HPV'nin etyolojideki rolü ve tedavi seçeneklerini belirlemek için çok sayıda araştırma yapılmıştır (Meshman et al., 2017). Yüksek riskli HPV ile ilişkili tümörlerin tespitinde rutin patoloji laboratuvarlarında kolaylıkla kullanılacak bir belirteç bulunması ve laringeal maligniteye yol açtığına kanıtlanması durumunda, profilaktik HPV aşlarının uygulanması, spesifik tedavi seçenekleri ve hastanın yaşam kalitesinin iyileştirilmesi bakımından önemli olacaktır (Mendelsohn et al., 2010).

Yüksek riskli HPV tipleri, mukozal epitelyal hücrelerin genomunda DNA'ya entegre olarak E6 ve E7 viral onkoprotein overekspresyonuna neden olur. E6 ve E7 onkoproteinleri p53 degradasyonu yaparak apoptozisi bloke eder ve tümör süpröser gen olan RB genini inaktive eder. RB baskılanması sonucu p16 protein aşırı ekspresyonu ile malign transformasyon gelişimi tetiklenmiş olur (Vairaktaris et al., 2007). Yüksek riskli HPV tiplerinin genital bölge ve baş boyun bölgesi tümörleri ile yakın ilişkisi, viral onkogenezin mekanizmalarını çözmek ve kanserin erken tanısında tarama yöntemleri geliştirmek bakımından ilgi çekicidir. Son yıllarda özellikle serviks kanserlerinde önemli yol katedilmiştir. Walboomers ve ark. dünya genelinde 932 servikal kanserli vakada (International Biological Study on Cervical Cancer) moleküler tekniklerle %99,7 oranında HPV DNA varlığını göstermiştir (Walboomers et al., 1999). Ayrıca servikal ve orofaringeal SCC'lerde p16 aşırı ekspresyonu, p16 proteininin HPV'nin biyobelirteci olduğunu göstermiştir (Klussmann et al., 2003, Ukpo et al., 2011, Ang et al., 2010). Ancak laringeal SCC'lerde etyolojide HPV'nin rolü net olmadığı gibi p16 ekspresyonuna ait bilgiler ve prognostik veriler de sınırlıdır (Chernock et al., 2013, Meshman et al., 2017).

Anantharaman ve ark. üç merkezli olarak yürüttükleri çalışmada, laringeal SCC'lerde farklı ülkelerden gelen örneklerde farklı oranlarda HPV DNA varlığına rastlamış

olup, Brezilya'dan alınan örneklerde HPV DNA'ya rastlamazken (%0), ABD'de %2,8, Avrupa'da %5,2 oranında HPV DNA pozitifliği bulmuşlardır (Anantharaman et al., 2017). Lewis ve ark. yaptıkları çalışmada 31 laringeal SCC'li olgunun ikisinde (%6,5), Schlecht ve ark. 27 olgunun dördünde (%15), Chernock ve ark. ise 76 olgunun 13'ünde (%17) HPV DNA saptamışlardır (Lewis et al., 2012, Schlecht et al., 2011, Chernock et al., 2013). Bu çalışmaların aksine, Duray ve ark. ise 59 laringeal SCC'a sahip hastanın 44'ünde, %75 gibi yüksek bir oranda HPV DNA pozitifliği tespit etmişlerdir (Duray et al., 2011). Literatürde çok merkezli ve farklı toplumlarda yapılan bu çalışmalar göstermiştir ki, laringeal SCC'lerde HPV DNA, çok geniş spektrumda görülmektedir. Bu kadar değişken ve tutarsız sonuçlarla karşılaşılmasının çeşitli nedenleri olabilir. Çalışma için kaliteli örnek alımı çok önemlidir. İyi alınamamış, az hücre içeren örnekler, ekstraksiyon sırasında DNA kaybı, PCR'ı engelleyen inhibitör proteinlerin varlığı, çalışılan yöntemlerin duyarlılıklarındaki farklılık gibi çeşitli faktörler sonuçları etkileyebilir. Real time PCR HPV tespitinde en spesifik ve sensitif yöntemdir (Erkul et al., 2017). Real time PCR ile virüs, malign transformasyona başlamadan önce, hücre içinde bulunduğu andan itibaren saptanabilmektedir. İn situ hibridizasyon ve E6/E7 mRNA ile konak genomuna entegre olan virüs hücreleri saptanmakta olup PCR DNA testine göre daha az sensitif yöntemlerdir (Combes and Franceschi, 2014). Ayrıca üzerinde çalışılan popülasyonun farklı demografik özelliklere sahip olması da bir sebep olabilir.

Ülkemizde bu alanda 2007 ve 2017 yılları arasında yapılan iki çalışma mevcuttur. 2007 yılında Güngör ve ark. laringeal SCC'lu 95 olgunun yedisinde (%7,3), 2017 yılında Erkul ve ark. 73 olgunun 19'unda (%26) Real Time PCR ile HPV DNA pozitifliği saptamışlardır (Gungor et al., 2007, Erkul et al., 2017). Bizim çalışmamızda bu iki çalışmadan daha düşük oranda HPV pozitifliği olması, HPV'nin farklı yerleşim yerlerinde farklı dağılım gösterebilme ihtimali olabilir.

Retrospektif çalışmalar, HPV DNA saptanması için parafine gömülü doku örneklerini (FFPE) kullanma eğilimindedir, ancak bu yöntemin DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağlanması ve PCR inhibitörlerinin varlığı gibi çeşitli kusurları vardır (Ren et al., 2000). Moleküler olarak PCR ile HPV tespitinin, FFPE örneklerde DNA fragmentasyonu nedeniyle yetersiz performans gösterdiği bilinmektedir (Baay et al.,

1996). Numunelerden yüksek miktarlarda amplifiye edilebilir DNA ekstrakte etmek için deney protokollerinde Proteinaz K'nın konsantrasyonunu değiştirmek, inkübasyon sıcaklığını veya sindirim süresini değiştirmek gibi modifikasyonlar gerçekleştirilmektedir. Ayrıca her örneğin konuğu formalin konsantrasyonu ve fiksasyon süresi, uzun süreli formole maruziyet, FFPE dokuları için farklılık gösterir. Ek olarak, DNA'nın kalitesini etkileyebilecek, moleküler yapısını bozabilecek sıcaklık, ışığa maruz kalma, tamponlanmış veya tamponlanmamış formalin kullanımı her olgu için farklılık oluşturarak DNA ekstraksiyonunu zorlaştırır (Huhns et al., 2017).

Real time PCR yöntemiyle HPV varlığını çalıştığımız laringeal SCC'li 81 olguda pozitif vaka sayımız ikidir (%2,5). Çalışmamızda da DNA eldesinde bahsedilen sebeplerden ötürü zorluklar yaşandı ve birkaç defa çalışılan örneklerimiz oldu. Tüm örneklerde DNA izolasyonu saptayabildik, fakat sadece iki olguda HPV tespit edebildik. Bunun nedeni ise, çalıştığımız popülasyonun cinsel yaşam tarzı ve demografik özelliklerinin farklılığından ötürü, larinks kanseri etyolojisinde HPV'nin sınırlı rolü olabilir.

Çalışmamızda saptanan HPV tipleri yüksek riskli olup olgulardan birinde HPV tip16 ve tip33 beraber bulunurken, diğer olguda da HPV tip18 mevcuttu.

Anantharaman ve ark.'nın çalışmasında HPV DNA pozitif vakaların %92'sinde ajan, HPV tip16 idi. Ayrıca HPV tip16 pozitifliğinde orofaringeal skuamöz hücreli karsinomlarda kıtalar arası dramatik bir fark vardı (Amerika Birleşik Devletleri %59,3, Brezilya %4,1, Avrupa %31,1). Buna bağlı olarak HPV aşısı profilaksisinin en fazla ABD'de gerekli olduğunu öne sürmüşlerdir (Anantharaman et al., 2017).

p16 geni 9p21 nolu kromozomda kodlanan, hücre siklusu regülasyonunda ana fonksiyonu proliferasyon, diferansiyasyon, apoptozis ve yaşlanma olan tümör baskılayıcı gendir (Lukas et al., 1999, Clasen et al., 1998). p16 siklin bağımlı kinazlara bağlanarak spesifik siklin protein kinaz inaktivasyonu ile hücre siklusunun hızını azaltan inhibitör proteindir (Meshman et al., 2017, Chernock et al., 2013, Quelle et al., 1995, Takeuchi et al., 1995). Bu mekanizma RB aracılığıyla G1-S interfazında kontrolsüz hücre çoğalmalarının önüne geçer (Sano et al., 1998, Poznic,

2009). p16 aşırı ekspresyon değişimi birçok kanserde ortak mekanizma olarak kabul edilir (Lukas et al., 1999). p16 geninde oluşan delesyon, mutasyon veya metilasyon sonucunda akut lenfoblastik lösemi, melanom, pankreas, özafagus, akciğer, mesane, serviks, baş ve boyun SCC gibi birçok malign tümör gelişimi gözlenmektedir (Smith et al., 2010, Takeuchi et al., 1995, Sano et al., 1998, Takeuchi et al., 2003, Rother and Jones, 2009, Macgregor-Das and Iacobuzio-Donahue, 2013, Salam et al., 2009, Ye et al., 2009, Koscielny et al., 2007). p16 genindeki ekspresyon farklılıklarının prognostik önemi tartışmalıdır. Akciğerin küçük hücreli dışı karsinomu, malign melanom, nazofaringeal karsinom, hepatosellüler karsinom, kolorektal karsinomda p16 ekspresyon kaybı kötü prognozla ilişkili iken, prostat kanseri ve nöroblastomda p16 aşırı ekspresyonu olan hastalarda yaşam süresinin kısaldığı raporlanmıştır (Weinberger et al., 2004, Yanagawa et al., 2002, Omura-Minamisawa et al., 2001).

Yapılan çalışmalarda, yüksek riskli HPV tiplerinin aktif replikasyonu ile p16'nın aşırı ekspresyonu arasında kuvvetli bir ilişki saptanmış olup, p16 ekspresyonunun HPV varlığının tespitinde sensitif ve spesifik olduğu ileri sürülmüştür (Smeets et al., 2007, Schache et al., 2011, Rietbergen et al., 2013, Jordan et al., 2012). p16 pozitifliği ve HPV varlığı orofaringeal SCC'lerde kanıtlanmış olup, tanısal olarak rutin olarak kullanılmaktadır (Kim et al., 2007, Klussmann et al., 2003). Ancak orofarinks dışı tümörlerin prognozunda ise, p16 aşırı ekspresyonunun etkileri yeterince değerlendirilmemiştir. Özellikle laringeal SCC'lerde p16 ekspresyonuna ait bilgiler ve bu ekspresyonun prognostik rolü hakkındaki çalışmalar sınırlıdır (Chernock et al., 2013, Meshman et al., 2017).

Mendelsohn ve ark., baş boyun SCC'lerinde yaptıkları çalışmada, HPV pozitifliği ve p16 ekspresyonu arasında yüksek korelasyon saptamış, p16 ve HPV'nin birbirleri yerine kullanılabileceğini önermiş, p16 ve HPV pozitif tümörlerin, aynı klinik gidiş, histopatolojik özellik ve tümör evresine sahip olduklarını iddia etmişlerdir. Araştırmacılar HPV ve p16 pozitifliğini, sıklıkla az diferansiye ve bazaloid tümörlerde saptamışlardır (Mendelsohn et al., 2010).

Gröbe ve ark., oral karsinomlu 187 olgunun 13'ünde PCR ile HPV DNA pozitifliği tespit etmişlerdir. Bu vakaların 12'si HPV tip16 olup, araştırmacılar p16 aşırı ekspresyonu ile anlamlı korelasyon saptamışlardır (Grobe et al., 2013).

Chernock ve ark., 76 laringeal SCC vakasının 21'inde p16 pozitifliği ve p16 pozitif tümörlerin 13'ünde PCR ile HPV pozitifliği saptamışlardır. Bu 13 vakanın dördünde HPV tip16, altısında HPV tip16 ile beraber HPV tip31 ve HPV tip53, iki olguda HPV tip31 ve bir olguda HPV tip53 pozitifliği bulmuşlardır (Chernock et al., 2013).

Ülkemizde Erkul ve ark. yapmış olduğu çalışmada, HPV DNA pozitifliği ve klinikopatolojik özellikler ile, HPV pozitifliği arasında anlamlı korelasyon bulunamamıştır (Erkul et al., 2017). İmmünohistokimyasal olarak p16'yı değerlendirdiklerinde ise 73 hastanın sadece dördünde pozitiflik mevcut olup, p16 boyanan hastaların her biri HPV tip16 pozitifdir (Erkul et al., 2017). Anantharaman ve ark. da larinks kanserlerinde yapmış oldukları çalışmada HPV tip16 dışındaki onkojenik HPV tiplerinin p16 eksprese etmediğini göstermişler ve p16'nın, HPV DNA yerine kullanılmaması gerektiğini öne sürmüşlerdir (Anantharaman et al., 2017).

Bizim çalışmamızda p16, olguların 13'ünde pozitif olup bunlardan birinde HPV pozitifliği saptandı. Alt tiplene yapıldığında bu vakada, HPV tip16 ve tip33 mevcuttu. HPV pozitif vaka sayısının azlığı nedeniyle HPV ve p16 arasındaki ilişki sağlıklı değerlendirilemedi. Ancak yine de, HPV ile ilişkili tümörlerin saptanmasında birçok yöntem olmasına rağmen, pratik kullanılabilirlik ve düşük maliyet imkanı sağlayan, immünohistokimyasal yöntemle p16 pozitifliğinin belirlenmesinin, yararlı bir yöntem olup olmadığının saptanabilmesi için, PCR ile HPV tip tayini ve immünohistokimyasal olarak p16 boyanmasının karşılaştırmalı analizlerini ortaya koyacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülebilirse de çalışmamızda HPV negatif 12 olguda istatistiksel olarak da p16 pozitifliğinin olması, p16 ekspresyonunun HPV varlığı için spesifik ve sensitif bir belirteç olamayacağı kanısını güçlendirmektedir.

Ayrıca p16 aşırı ekspresyonu, HPV olmaksızın bazı leiomyosarkomlar, ovarin seröz karsinomları, akciğerin küçük hücreli karsinomu, özafagus karsinomlarında görülebilir (Zhao et al., 2016). Bixofis ve ark. orofaringeal skuamöz hücreli karsinomlu hastaların parafin bloklarından yaptıkları immünohistokimyasal boyamada, olguların %86'sında p16 pozitifliği saptamış olup, bu hastaların tamamının sigara içicisi olduğunu rapor etmişler ve bu nedenle p16 pozitifliğinin

sigaradan kaynaklandığını öne sürmüşlerdir (Bixofis et al., 2014). Koscielny ve ark. ise, p16 gen inaktivasyonu ile baş ve boyun kanserinin kötü prognozu arasında anlamlı ilişki olduğunu iddia etmişlerdir (Koscielny et al., 2007). Bizim çalışmamızda da p16'nın pozitif olduğu tüm hastalar sigara içicisi idiler. p16 pozitif tüm vakaların sigara kullanan hastalar olması dikkat çekicidir. Sigara, laringeal karsinogenezde HPV olmaksızın, p16 geninde somatik kromozomal mutasyona neden olarak aşırı eksprese olmuş olabilir.

Larinks kanserinde hastanın yaşı, cinsiyeti, tümörün yerleşim yeri, evresi, metastatik lenf nodu varlığı bilinen prognostik faktörlerdir (Teppo et al., 2003). p16 ekspresyonuna ait bilgiler ve prognostik rolü hakkındaki çalışmalar ise sınırlıdır (Chernock et al., 2013, Meshman et al., 2017). Kalfert ve ark. p16 ile grade, evre ve servikal lenf nodu metastazı arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulamamışlardır (Kalfert et al., 2014). Ancak yapılan bir çalışmada p16 ekspresyonu ve ileri T evresi arasında önemli ilişki bulunmuştur (Yuen et al., 2002).

Çalışmamızda p16 pozitif olgularda tümör çapı, histolojik derece, evre, lenf nodu metastazı, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, kıkırdak invazyonu ve larinks dışı yumuşak doku invazyonu arasında anlamlı ilişki izlenmedi.

6. SONUÇLAR

1) Gelişmiş ülkelerde sigara kullanımının azalmasıyla birlikte düşüşe geçen baş boyun tümörleri insidansında, HPV enfeksiyonu ile bağlantılı olguların ortaya konması, bu tümörlerle HPV ilişkisini kanıtlayacak çalışmaları gündeme taşımış, bu doğrultuda larinks karsinomu ve HPV arasındaki ilişki çalışmamızın temelini oluşturmuştur.

2) Laringeal karsinomlarda HPV DNA varlığı ile ilgili çalışmalarda elde edilen pozitif sonuçlar, %0-%75 arasında değişen geniş bir yelpazeye sahip olup, çalışmamızda bu oranın %2.5 olarak saptanması, yöresel larinks karsinomu etyolojisinde, HPV etkisinin düşük olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

3) HPV DNA pozitif, larinks karsinomu sıklığında, çalışma sonuçları arasındaki geniş spektrum, etkenin epidemiyolojik dağılımı ve HPV'ye maruz kalmaya yol açacak yaşam ve cinsel hayat farklılıklarının önemini ortaya koymaktadır.

4) Çalışmamız, yüksek riskli HPV tipleri olan HPV Tip 16, 18 ve 33'ün larinks karsinomu etyolojisinde rol alabilme olasılıklarını gündeme taşımaktadır.

5) 9p21 nolu kromozomda kodlanan ve hücre siklusu regülasyonunda ana fonksiyonu proliferasyon, diferansiyasyon, apoptozis ve yaşlanma olan tümör baskılayıcı bir gen olan p16 geni, bazı çalışmalarda HPV pozitifliğinin spesifik ve sensitif bir markerı olarak öne sürülmesine karşın, çalışmamızın da ortaya koyduğu üzere 13 adet, p16 pozitif olgunun 12'sinin aynı zamanda HPV negatif olması, p16 ekspresyonunun HPV varlığı için spesifik ve sensitif bir belirteç olamayacağı şeklinde değerlendirilebilir.

6) Çalışmaya alınan olgularda, tümör blokları p16 pozitif tüm hastaların, sigara içicisi olması, sigaranın laringeal karsinogenezde somatik kromozomal mutasyona neden olarak, p16 geninde aşırı ekspresyona yol açmış olabileceği şeklinde değerlendirilebilir.

7) Farklı organ tümörlerinin bazısında kötü prognostik faktör olarak öne sürülen p16 ekspresyonu, klinikopatolojik diğer prognostik faktörlerle istatistiki olarak anlamlı

bir ilişkisi saptanmadığından, tek başına bir prognostik faktör olarak değerlendirilmesi sağlıklı değildir.

8) HPV ve p16 ile larinks kanserli hastaların tümör dokusu bloklarından yapılan çalışmaların, sonuçları arasındaki belirgin farklılık, yöntem ve demografik farklılığın da hesaba katılmasını gerekli kılmakla birlikte, sağlıklı ve aynı zamanda kolay ve tedaviyi kolaylaştırıcı bir tanıya ulaşmak için, bu konuda daha iyi bir standardizasyonla daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.



7. ÖZET

LARİNGEAL KARSİNOMLARDA HUMAN PAPİLLOMAVİRUS SAPTANMASI VE P16 POZİTİFLİĞİNİN PROGNOSTİK KLİNİK VE HİSTOPATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ

GİRİŞ VE AMAÇ: Laringeal kanserler en sık görülen altıncı kanser olup, tüm kanserlerin %3'ünü oluşturmaktadır. Diğer bir baş ve boyun bölgesi kanserleri olan orofaringeal karsinomda Human Papillomavirus'un etyolojideki rolü ile, p16 proteininin aşırı ekspresyonu gösterilmiş olmasına rağmen, laringeal kanserlerde HPV'nin ve p16'nın biyobelirteç rolünü açıklamaya yönelik yeterli çalışma mevcut değildir. Bu çalışmada laringeal skuamöz hücreli karsinomda HPV varlığı ve HPV indikatörü olarak kabul edilen p16 proteini ekspresyonunun, klinik ve patolojik parametrelerle ilişkisi araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM: Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Sakarya Eğitim Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarı'nda 2008-2017 yılları arasında laringeal skuamöz hücreli karsinom tanısı almış total ve parsiyel larenjektomili 81 olguda retrospektif olarak histopatolojik veriler tekrar değerlendirildi. Tümörlü dokuların parafin kesitlerinde RT-PCR ile HPV DNA varlığı analiz edildi ve HPV DNA izole edilen olgularda HPV tip tayini yapıldı. Tüm olgularda immünohistokimyasal olarak p16 proteini ekspresyonunun histopatolojik parametrelerle istatistiksel ilişkisi değerlendirildi.

BULGULAR: Çalışmaya alınan 81 olgunun ikisinde (%2,5) HPV DNA ve 13'ünde (%16) p16 pozitifliği saptandı. HPV DNA saptanan iki olgunun birinde HPV tip16,33 diğerinde ise HPV tip18 tespit edildi. p16 ekspresyonu, HPV DNA saptanan iki olgudan birinde mevcuttu. p16 pozitifliği ile yaş, tümör çapı, histolojik grade, tümör evresi, lenf nodu metastazı, lenfovasküler invazyon, kıkırdak invazyonu, cerrahi sınır pozitifliği, sigara kullanımı, kemoterapi/radyoterapi alma durumu, HPV varlığı, nüks ve mortalite gibi parametreler arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0.05$). HPV DNA varlığı iki olguya sınırlı olduğundan HPV ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki istatistiki olarak değerlendirilemedi.

SONUÇ: Çalışmamız, laringeal skuamöz hücreli karsinomda HPV'nin etyolojik ve prognostik rolünü kanıtlamaya yönelik istatistiki olarak anlamlı bir sonuç ortaya koymadı. Çalışmamızda elde edilen bulgular, laringeal SCC'da HPV testi ve p16 ekspresyonu değerlendirmesinin rutin olarak kullanılmasını destekler nitelikte değildir. Bu konuda daha kapsamlı çalışmaların yapılması gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Human Papillomavirüs, larinks, p16



8. SUMMARY

DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS AND THE RELATIONSHIP BETWEEN P16 POSITIVITY WITH PROGNOSTIC CLINICAL AND HISTOPATHOLOGICAL PARAMETERS IN LARYNGEAL CARCINOMA

INTRODUCTION AND PURPOSE: Laryngeal cancer is the sixth most common cancer, accounting for 3% of all cancers. Despite the role of Human Papillomavirus in the etiology of oropharyngeal carcinoma and overexpression of the p16 protein has been shown, there is no adequate study to explain the role of HPV and p16 as biomarkers in laryngeal cancers. In this study, we investigated the presence of HPV and the expression of p16 protein, which is considered as an HPV indicator, in clinical and pathological parameters in laryngeal squamous cell carcinoma.

MATERIALS AND METHODS: Histopathological data were evaluated retrospectively in 81 cases of total and partial laryngectomies diagnosed as laryngeal squamous cell carcinoma between 2008-2017 in Sakarya University Medical Faculty Sakarya Training and Research Hospital Pathology Laboratory. HPV DNA was analyzed by RT-PCR in paraffin sections of the tumor tissues and HPV DNA was detected in cases of isolated HPV DNA. Immunohistochemically, p16 protein expression was evaluated statistically by histopathological parameters in all cases.

FINDINGS: HPV DNA in two (2.5%) and p16 positivity in 13 (16%) cases were detected in 81 cases studied. HPV type 16 and HPV type 18 were detected in one of the two cases in which HPV DNA was detected. p16 expression was present in one of two cases that detected HPV DNA. p16 positivity was not correlated with age, tumor size, histologic grade, tumor stage, lymph node metastasis, lymphovascular invasion, cartilage invasion, surgical margin positivity, smoking status, chemotherapy/radiotherapy status, HPV, recurrence and mortality ($p>0.05$). The relationship between HPV and clinicopathologic parameters could not be evaluated statistically because the presence of HPV DNA was limited to two cases.

RESULTS: Our study did not show statistically significant results for proving the etiologic and prognostic role of HPV in laryngeal squamous cell carcinoma. Findings

in our study do not support the routine use of HPV testing and p16 expression assessment in laryngeal SCC. More extensive work is needed in this regard.

Key words: Human Papillomavirus, larynx, p16



ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı soyadı: Hülya Yeni Bayraktar

Doğum yeri ve tarihi: Adapazarı, 08/04/1988

Uyruğu: TC

İletişim adresi: hulyayeni@hotmail.com

Yabancı dili: İngilizce

Eğitimi

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakóltesi, Patoloji Anabilim Dalı 2013-2018

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakóltesi 2007-2013

KAYNAKLAR

- ANANTHARAMAN, D., ABEDI-ARDEKANI, B., BEACHLER, D. C., GHEIT, T., OLSHAN, A. F., WISNIEWSKI, K., WUNSCH-FILHO, V., TOPORCOV, T. N., TAJARA, E. H., LEVI, J. E., MOYSES, R. A., BOCCIA, S., CADONI, G., RINDI, G., AHRENS, W., MERLETTI, F., CONWAY, D. I., WRIGHT, S., CARREIRA, C., RENARD, H., CHOPARD, P., MCKAY-CHOPIN, S., SCELO, G., TOMMASINO, M., BRENNAN, P. & D'SOUZA, G. 2017. Geographic heterogeneity in the prevalence of human papillomavirus in head and neck cancer. *Int J Cancer*, 140, 1968-1975.
- ANG, K. K., HARRIS, J., WHEELER, R., WEBER, R., ROSENTHAL, D. I., NGUYEN-TAN, P. F., WESTRA, W. H., CHUNG, C. H., JORDAN, R. C., LU, C., KIM, H., AXELROD, R., SILVERMAN, C. C., REDMOND, K. P. & GILLISON, M. L. 2010. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 363, 24-35.
- ARRIAGADA, R., ESCHWEGE, F., CACHIN, Y. & RICHARD, J. M. 1983. The value of combining radiotherapy with surgery in the treatment of hypopharyngeal and laryngeal cancers. *Cancer*, 51, 1819-25.
- BAAY, M. F., QUINT, W. G., KOUDSTAAL, J., HOLLEMA, H., DUK, J. M., BURGER, M. P., STOLZ, E. & HERBRINK, P. 1996. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol*, 34, 745-7.
- BAHAR, G., NAGERIS, B. I., SPITZER, T., POPOVTZER, A., MHARSHAK, G. & FEINMESSER, R. 2002. [Subglottic carcinoma]. *Harefuah*, 141, 914-8, 929.
- BARNES, L. 2005. *Pathology and genetics of head and neck tumours*, Lyon, IARC Press.
- BEN-DAYAN, M. M., OW, T. J., BELBIN, T. J., WETZLER, J., SMITH, R. V., CHILDS, G., DIERGAARDE, B., HAYES, D. N., GRANDIS, J. R., PRYSTOWSKY, M. B. & SCHLECHT, N. F. 2017. Nonpromoter methylation of the CDKN2A gene with active transcription is associated with improved locoregional control in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Med*, 6, 397-407.
- BERGVALL, M., MELENDY, T. & ARCHAMBAULT, J. 2013. The E1 proteins. *Virology*, 445, 35-56.
- BERNARD, H. U., BURK, R. D., CHEN, Z., VAN DOORSLAER, K., ZUR HAUSEN, H. & DE VILLIERS, E. M. 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401, 70-9.
- BIXOFIS, R. B., SASSI, L. M., PATUSSI, C., JUNG, J. E., IOSHII, S. O. & SCHUSSEL, J. L. 2014. Significance of p16 positive expression in oropharyngeal cancers. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15, 10289-92.
- BLACKWELL, K. E., FU, Y. S. & CALCATERRA, T. C. 1995. Laryngeal dysplasia. A clinicopathologic study. *Cancer*, 75, 457-63.
- BOAMAH, H. & BALLARD, B. 2012. A case report of spindle cell (sarcomatoid) carcinoma of the larynx. *Case Rep Med*, 2012, 370204.

- BRADFORD, C. R., ZACKS, S. E., ANDROPHY, E. J., GREGOIRE, L., LANCASTER, W. D. & CAREY, T. E. 1991. Human papillomavirus DNA sequences in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 104, 303-10.
- CHEN, W. C., CHUANG, H. C., LIN, Y. T., HUANG, C. C. & CHIEN, C. Y. 2017a. Clinical impact of human papillomavirus in laryngeal squamous cell carcinoma: a retrospective study. *PeerJ*, 5, e3395.
- CHEN, X., GAO, L., STURGIS, E. M., LIANG, Z., ZHU, Y., XIA, X., ZHU, X., CHEN, X., LI, G. & GAO, Z. 2017b. HPV16 DNA and integration in normal and malignant epithelium: implications for the etiology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Ann Oncol*, 28, 1105-1110.
- CHERNOCK, R. D., WANG, X., GAO, G., LEWIS, J. S., JR., ZHANG, Q., THORSTAD, W. L. & EL-MOFTY, S. K. 2013. Detection and significance of human papillomavirus, CDKN2A(p16) and CDKN1A(p21) expression in squamous cell carcinoma of the larynx. *Mod Pathol*, 26, 223-31.
- CHUNG, C. H., PARKER, J. S., KARACA, G., WU, J., FUNKHOUSER, W. K., MOORE, D., BUTTERFOSS, D., XIANG, D., ZANATION, A., YIN, X., SHOCKLEY, W. W., WEISSLER, M. C., DRESSLER, L. G., SHORES, C. G., YARBROUGH, W. G. & PEROU, C. M. 2004. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell*, 5, 489-500.
- CHUNG, C. K., STRYKER, J. A., ABT, A. B., CUNNINGHAM, D. E., STRAUSS, M. & CONNOR, G. H. 1980. Histologic grading in the clinical evaluation of laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol*, 106, 623-4.
- CLASEN, S., SCHULZ, W. A., GERHARZ, C. D., GRIMM, M. O., CHRISTOPH, F. & SCHMITZ-DRAGER, B. J. 1998. Frequent and heterogeneous expression of cyclin-dependent kinase inhibitor WAF1/p21 protein and mRNA in urothelial carcinoma. *Br J Cancer*, 77, 515-21.
- COCKE, E. W., JR. & WANG, C. C. 1976. Cancer of the larynx: selecting optimum treatment. *CA Cancer J Clin*, 26, 194-200.
- COLBY, C. & KLEIN, A. M. 2011. Papillary squamous cell carcinoma of the larynx. *Ear Nose Throat J*, 90, E13-5.
- COMBES, J. D. & FRANCESCHI, S. 2014. Role of human papillomavirus in non-opharyngeal head and neck cancers. *Oral Oncol*, 50, 370-9.
- CROSBIE, E. J., EINSTEIN, M. H., FRANCESCHI, S. & KITCHENER, H. C. 2013. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*, 382, 889-99.
- DE OLIVEIRA, D. E., BACCHI, M. M., MACARENCO, R. S., TAGLIARINI, J. V., CORDEIRO, R. C. & BACCHI, C. E. 2006. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection, p53 expression, and cellular proliferation in laryngeal carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 126, 284-93.
- DEHN, D., TORKKO, K. C. & SHROYER, K. R. 2007. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer*, 111, 1-14.
- DEMERET, C., DESAINTE, C., YANIV, M. & THIERRY, F. 1997. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J Virol*, 71, 9343-9.
- DOORBAR, J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, 110, 525-41.

- DRAY, M., RUSSELL, P., DALRYMPLE, C., WALLMAN, N., ANGUS, G., LEONG, A., CARTER, J. & CHEERALA, B. 2005. p16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *Pathology*, 37, 112-24.
- DUPUY, C., BUZONI-GATEL, D., TOUZE, A., LE CANN, P., BOUT, D. & COURSAGET, P. 1997. Cell mediated immunity induced in mice by HPV 16 L1 virus-like particles. *Microb Pathog*, 22, 219-25.
- DURAY, A., DESCAMPS, G., ARAFA, M., DECAESTECKER, C., REMMELINK, M., SIRTAINÉ, N., ERNOUX-NEUFCEUR, P., MUTIJIMA, E., SOMJA, J., DEPUYDT, C. E., DELVENNE, P. & SAUSSEZ, S. 2011. High incidence of high-risk HPV in benign and malignant lesions of the larynx. *Int J Oncol*, 39, 51-9.
- EDGE, S. B. & COMPTON, C. C. 2010. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, 17, 1471-4.
- EL-NAGGAR, A. K., CHAN, J. K., GRANDIS, J. R., TAKATA, T. & SLOOTWEG, P. J. 2017. WHO Classification of Head and Neck. 348.
- ERENO, C., GAAFAR, A., GARMENDIA, M., ETXEZARRAGA, C., BILBAO, F. J. & LOPEZ, J. I. 2008. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck: a clinicopathological and follow-up study of 40 cases and review of the literature. *Head Neck Pathol*, 2, 83-91.
- ERKUL, E., YILMAZ, I., NARLI, G., BABAYIGIT, M. A., GUNGOR, A. & DEMIREL, D. 2017. The presence and prognostic significance of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 274, 2921-2926.
- FAKHRY, C., WESTRA, W. H., LI, S., CMELAK, A., RIDGE, J. A., PINTO, H., FORASTIERE, A. & GILLISON, M. L. 2008. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*, 100, 261-9.
- FERLAY, J., SHIN, H. R., BRAY, F., FORMAN, D., MATHERS, C. & PARKIN, D. M. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127, 2893-917.
- FERLITO, A., RINALDO, A., DEVANEY, K. O., MACLENNAN, K., MYERS, J. N., PETRUZZELLI, G. J., SHAHA, A. R., GENDEN, E. M., JOHNSON, J. T., DE CARVALHO, M. B. & MYERS, E. N. 2002. Prognostic significance of microscopic and macroscopic extracapsular spread from metastatic tumor in the cervical lymph nodes. *Oral Oncol*, 38, 747-51.
- FRIEDMAN, M., LIM, J. W., MANDERS, E., SCHAFFNER, A. D., KIRSHENBAUM, G. L., TANYERI, H. M., CALDARELLI, D. D. & COON, J. S. 2001. Prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 23, 280-5.
- GALLO, A., DE VINCENTIIS, M., DELLA ROCCA, C., MOI, R., SIMONELLI, M., MINNI, A. & SHAHA, A. R. 2001. Evolution of precancerous laryngeal lesions: a clinicopathologic study with long-term follow-up on 259 patients. *Head Neck*, 23, 42-7.
- GALLUS, S., BOSETTI, C., FRANCESCHI, S., LEVI, F., NEGRI, E. & LA VECCHIA, C. 2003. Laryngeal cancer in women: tobacco, alcohol,

- nutritional, and hormonal factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12, 514-7.
- GHEIT, T., ABEDI-ARDEKANI, B., CARREIRA, C., MISSAD, C. G., TOMMASINO, M. & TORRENTE, M. C. 2014. Comprehensive analysis of HPV expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Med Virol*, 86, 642-6.
- GILLISON, M. L. 2004. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin Oncol*, 31, 744-54.
- GILLISON, M. L., KOCH, W. M., CAPONE, R. B., SPAFFORD, M., WESTRA, W. H., WU, L., ZAHURAK, M. L., DANIEL, R. W., VIGLIONE, M., SYMER, D. E., SHAH, K. V. & SIDRANSKY, D. 2000. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 92, 709-20.
- GREGOIRE, V., LEFEBVRE, J. L., LICITRA, L., FELIP, E. & GROUP, E.-E.-E. G. W. 2010. Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHSN-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 21 Suppl 5, v184-6.
- GROBE, A., HANKEN, H., KLUWE, L., SCHOLLCHEN, M., TRIBIUS, S., POHLENZ, P., CLAUDITZ, T., GROB, T., SIMON, R., SAUTER, G., HEILAND, M. & BLESSMANN, M. 2013. Immunohistochemical analysis of p16 expression, HPV infection and its prognostic utility in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 42, 676-81.
- GUNGOR, A., CINCIK, H., BALOGLU, H., CEKIN, E., DOGRU, S. & DURSUN, E. 2007. Human papilloma virus prevalence in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol*, 121, 772-4.
- GÜLTEKİN, M. & BOZTAŞ, G. 2014. Türkiye kanser istatistikleri. *Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu*, 43.
- HAGEN, P., LYONS, G. D. & HAINDEL, C. 1993. Verrucous carcinoma of the larynx: role of human papillomavirus, radiation, and surgery. *Laryngoscope*, 103, 253-7.
- HEBNER, C. M. & LAIMINS, L. A. 2006. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*, 16, 83-97.
- HELLNER, K. & MUNGER, K. 2011. Human papillomaviruses as therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol*, 29, 1785-94.
- HIRVIKOSKI, P., VIRTANIEMI, J., KUMPULAINEN, E., JOHANSSON, R. & KOSMA, V. M. 2002. Supraglottic and glottic carcinomas. clinically and biologically distinct entities? *Eur J Cancer*, 38, 1717-23.
- HO, C. M., LEE, B. H., CHANG, S. F., CHIEN, T. Y., HUANG, S. H., YAN, C. C. & CHENG, W. F. 2011. Integration of human papillomavirus correlates with high levels of viral oncogene transcripts in cervical carcinogenesis. *Virus Res*, 161, 124-30.
- HUHNS, M., ERBERSDOBLER, A., OBLIERS, A. & ROPENACK, P. 2017. Identification of HPV Types and Mycobacterium Tuberculosis Complex in Historical Long-Term Preserved Formalin Fixed Tissues in Different Human Organs. *PLoS One*, 12, e0170353.

- ISAYEVA, T., LI, Y., MASWAHU, D. & BRANDWEIN-GENSLER, M. 2012. Human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol*, 6 Suppl 1, S104-20.
- JANZEN, V., FORKERT, R., FLEMING, H. E., SAITO, Y., WARING, M. T., DOMBKOWSKI, D. M., CHENG, T., DEPINHO, R. A., SHARPLESS, N. E. & SCADDEN, D. T. 2006. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*, 443, 421-6.
- JORDAN, R. C., LINGEN, M. W., PEREZ-ORDONEZ, B., HE, X., PICKARD, R., KOLUDER, M., JIANG, B., WAKELY, P., XIAO, W. & GILLISON, M. L. 2012. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am J Surg Pathol*, 36, 945-54.
- KABSCH, K. & ALONSO, A. 2002. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol*, 76, 12162-72.
- KAJITANI, N., SATSUKA, A., KAWATE, A. & SAKAI, H. 2012. Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Front Microbiol*, 3, 152.
- KALFERT, D., CELAKOVSKY, P., LACO, J. & LUDVIKOVA, M. 2014. The role of protein p16(INK4a) in glottic laryngeal squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 20, 909-15.
- KASPERBAUER, J. L., O'HALLORAN, G. L., ESPY, M. J., SMITH, T. F. & LEWIS, J. E. 1993. Polymerase chain reaction (PCR) identification of human papillomavirus (HPV) DNA in verrucous carcinoma of the larynx. *Laryngoscope*, 103, 416-20.
- KEATING, J. T., INCE, T. & CRUM, C. P. 2001. Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Adv Anat Pathol*, 8, 83-92.
- KIM, S. H., KOO, B. S., KANG, S., PARK, K., KIM, H., LEE, K. R., LEE, M. J., KIM, J. M., CHOI, E. C. & CHO, N. H. 2007. HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation. *Int J Cancer*, 120, 1418-25.
- KLUSSMANN, J. P., GULTEKIN, E., WEISSENBORN, S. J., WIELAND, U., DRIES, V., DIENES, H. P., ECKEL, H. E., PFISTER, H. J. & FUCHS, P. G. 2003. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol*, 162, 747-53.
- KOCH, B. B., TRASK, D. K., HOFFMAN, H. T., KARNELL, L. H., ROBINSON, R. A., ZHEN, W., MENCK, H. R., COMMISSION ON CANCER, A. C. O. S. & AMERICAN CANCER, S. 2001. National survey of head and neck verrucous carcinoma: patterns of presentation, care, and outcome. *Cancer*, 92, 110-20.
- KOSCIELNY, S., DAHSE, R., ERNST, G. & VON EGGELING, F. 2007. The prognostic relevance of p16 inactivation in head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 69, 30-6.
- KOUFMAN, J. A. & BURKE, A. J. 1997. The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am*, 30, 1-19.
- KOVANDA, A., KOCJAN, B. J., POTOČNIK, M. & POLJAK, M. 2011. Characterization of a novel cutaneous human papillomavirus genotype HPV-125. *PLoS One*, 6, e22414.

- KREIMER, A. R., CLIFFORD, G. M., BOYLE, P. & FRANCESCHI, S. 2005. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14, 467-75.
- KRISHNAMURTHY, J., RAMSEY, M. R., LIGON, K. L., TORRICE, C., KOH, A., BONNER-WEIR, S. & SHARPLESS, N. E. 2006. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*, 443, 453-7.
- KUMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N., ROBBINS, S. L. & COTRAN, R. S. R. P. B. O. D. 2005. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*, Philadelphia, Pa. ; [London], Elsevier Saunders.
- KUMAR, V. & KUMAR, V. 2010. *Robbins and Cotran's pathologic basis of disease*, Philadelphia, Pa. ; London, Saunders.
- LAMBERT, A. P., ANSCHAU, F. & SCHMITT, V. M. 2006. p16INK4A expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Exp Mol Pathol*, 80, 192-6.
- LEE, S. J., LEE, A. W., KANG, C. S., PARK, J. S., PARK, D. C., KI, E. Y., LEE, K. H., YOON, J. H., HUR, S. Y. & KIM, T. J. 2014. Clinicopathological implications of human papilloma virus (HPV) L1 capsid protein immunoreactivity in HPV16-positive cervical cytology. *Int J Med Sci*, 11, 80-6.
- LEWIS, J. S., JR., UKPO, O. C., MA, X. J., FLANAGAN, J. J., LUO, Y., THORSTAD, W. L. & CHERNOCK, R. D. 2012. Transcriptionally-active high-risk human papillomavirus is rare in oral cavity and laryngeal/hypopharyngeal squamous cell carcinomas--a tissue microarray study utilizing E6/E7 mRNA in situ hybridization. *Histopathology*, 60, 982-91.
- LI, A. F., LI, A. C., TSAY, S. H., LI, W. Y., LIANG, W. Y. & CHEN, J. Y. 2008. Alterations in the p16INK4a/cyclin D1/RB pathway in gastrointestinal tract endocrine tumors. *Am J Clin Pathol*, 130, 535-42.
- LONGWORTH, M. S. & LAIMINS, L. A. 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68, 362-72.
- LOPEZ, F., SAMPEDRO, T., LLORENTE, J. L., HERMSEN, M. & ALVAREZ-MARCOS, C. 2017. Alterations of p14 ARF , p15 INK4b , and p16 INK4a Genes in Primary Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 23, 63-71.
- LOWE, S. W. & SHERR, C. J. 2003. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev*, 13, 77-83.
- LOYO, M. & PAI, S. I. 2008. The molecular genetics of laryngeal cancer. *Otolaryngol Clin North Am*, 41, 657-72, v.
- LUKAS, J., SORENSEN, C. S., LUKAS, C., SANTONI-RUGIU, E. & BARTEK, J. 1999. p16INK4a, but not constitutively active pRb, can impose a sustained G1 arrest: molecular mechanisms and implications for oncogenesis. *Oncogene*, 18, 3930-5.
- MACGREGOR-DAS, A. M. & IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. 2013. Molecular pathways in pancreatic carcinogenesis. *J Surg Oncol*, 107, 8-14.
- MAKITIE, A. A. & MONNI, O. 2009. Molecular profiling of laryngeal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 9, 1251-60.

- MALLOFRE, C., CARDESA, A., CAMPO, E., CONDOM, E., PALACIN, A., GARIN-CHESA, P. & TRASERRA, J. 1993. Expression of cytokeratins in squamous cell carcinomas of the larynx: immunohistochemical analysis and correlation with prognostic factors. *Pathol Res Pract*, 189, 275-82.
- MANJARREZ, M. E., OCADIZ, R., VALLE, L., PACHECO, C., MARROQUIN, A., DE LA TORRE, C., SELMAN, M. & GARIGLIO, P. 2006. Detection of human papillomavirus and relevant tumor suppressors and oncoproteins in laryngeal tumors. *Clin Cancer Res*, 12, 6946-51.
- MARUR, S. & FORASTIERE, A. A. 2008. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc*, 83, 489-501.
- MASAND, R. P., EL-MOFTY, S. K., MA, X. J., LUO, Y., FLANAGAN, J. J. & LEWIS, J. S., JR. 2011. Adenosquamous carcinoma of the head and neck: relationship to human papillomavirus and review of the literature. *Head Neck Pathol*, 5, 108-16.
- MCBRIDE, A. A., OLIVEIRA, J. G. & MCPHILLIPS, M. G. 2006. Partitioning viral genomes in mitosis: same idea, different targets. *Cell Cycle*, 5, 1499-502.
- MCCAFFREY, T. V., WITTE, M. & FERGUSON, M. T. 1998. Verrucous carcinoma of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 107, 391-5.
- MCCLUGGAGE, W. G. 2007. Immunohistochemistry as a diagnostic aid in cervical pathology. *Pathology*, 39, 97-111.
- MCINTOSH, P. B., LASKEY, P., SULLIVAN, K., DAVY, C., WANG, Q., JACKSON, D. J., GRIFFIN, H. M. & DOORBAR, J. 2010. E1--E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *J Cell Sci*, 123, 2810-22.
- MEHRAD, M., CARPENTER, D. H., CHERNOCK, R. D., WANG, H., MA, X. J., LUO, Y., LUO, J., LEWIS, J. S., JR. & EL-MOFTY, S. K. 2013. Papillary squamous cell carcinoma of the head and neck: clinicopathologic and molecular features with special reference to human papillomavirus. *Am J Surg Pathol*, 37, 1349-56.
- MENDELSON, A. H., LAI, C. K., SHINTAKU, I. P., ELASHOFF, D. A., DUBINETT, S. M., ABEMAYOR, E. & ST JOHN, M. A. 2010. Histopathologic findings of HPV and p16 positive HNSCC. *Laryngoscope*, 120, 1788-94.
- MENDENHALL, W. M., AMDUR, R. J., MORRIS, C. G. & HINERMAN, R. W. 2001. T1-T2N0 squamous cell carcinoma of the glottic larynx treated with radiation therapy. *J Clin Oncol*, 19, 4029-36.
- MESHMAN, J., WANG, P. C., CHIN, R., JOHN, M. S., ABEMAYOR, E., BHUTA, S. & CHEN, A. M. 2017. Prognostic significance of p16 in squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Am J Otolaryngol*, 38, 31-37.
- MICHEAU, C., LUBOINSKI, B., SANCHO, H. & CACHIN, Y. 1976. Modes of invasion of cancer of the larynx. A statistical, histological, and radioclinical analysis of 120 cases. *Cancer*, 38, 346-60.
- MILLS, S. E. 2012. *Histology for pathologists*, Philadelphia, Pa. ; London, Lippincott Williams & Wilkins.
- MILLS, S. E. E., GREENSON, J. K. E., HORNICK, J. L. E., LONGACRE, T. A. E., REUTER, V. E. E. & STERNBERG, S. S. D. S. P. 2015. *Sternberg's diagnostic surgical pathology*.

- MOORE, K. L., DALLEY, A. F., II & AGUR, A. M. R. 2014. *Clinically oriented anatomy*, Philadelphia, Pa. ; London, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins.
- MUI, U. N., HALEY, C. T. & TYRING, S. K. 2017. Viral Oncology: Molecular Biology and Pathogenesis. *J Clin Med*, 6.
- MUNGER, K. & HOWLEY, P. M. 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*, 89, 213-28.
- MUNOZ, N., BOSCH, F. X., DE SANJOSE, S., HERRERO, R., CASTELLSAGUE, X., SHAH, K. V., SNIJDERS, P. J., MEIJER, C. J. & INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER MULTICENTER CERVICAL CANCER STUDY, G. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348, 518-27.
- MURPHY, N., RING, M., HEFFRON, C. C., KING, B., KILLALEA, A. G., HUGHES, C., MARTIN, C. M., MCGUINNESS, E., SHEILS, O. & O'LEARY, J. J. 2005. p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 58, 525-34.
- NACHALON, Y., COHEN, O., ALKAN, U., SHVERO, J. & POPOVTZER, A. 2017. Characteristics and outcome of laryngeal squamous cell carcinoma in young adults. *Oncol Lett*, 13, 1393-1397.
- NAKASHIMA, T., YANO, G., HAYASHI, I. & KATSUTA, Y. 1992. Epithelial membrane antigen and S-100 protein-labeled cells in primary and metastatic laryngeal carcinomas. *Head Neck*, 14, 445-51.
- NARAYANA, A., VAUGHAN, A. T., GUNARATNE, S., KATHURIA, S., WALTER, S. A. & REDDY, S. P. 1998. Is p53 an independent prognostic factor in patients with laryngeal carcinoma? *Cancer*, 82, 286-91.
- NOWINSKA, K., CIESIELSKA, U., PODHORSKA-OKOLOW, M. & DZIEGIEL, P. 2017. The role of human papillomavirus in oncogenic transformation and its contribution to the etiology of precancerous lesions and cancer of the larynx: A review. *Adv Clin Exp Med*, 26, 539-547.
- O'NEILL, C. J. & MCCLUGGAGE, W. G. 2006. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol*, 13, 8-15.
- OMURA-MINAMISAWA, M., DICCIANNI, M. B., CHANG, R. C., BATOVA, A., BRIDGEMAN, L. J., SCHIFF, J., COHN, S. L., LONDON, W. B. & YU, A. L. 2001. p16/p14(ARF) cell cycle regulatory pathways in primary neuroblastoma: p16 expression is associated with advanced stage disease. *Clin Cancer Res*, 7, 3481-90.
- ORVIDAS, L. J., OLSEN, K. D., LEWIS, J. E. & SUMAN, V. J. 1998. Verrucous carcinoma of the larynx: a review of 53 patients. *Head Neck*, 20, 197-203.
- PAGANO, M., DURST, M., JOSWIG, S., DRAETTA, G. & JANSEN-DURR, P. 1992. Binding of the human E2F transcription factor to the retinoblastoma protein but not to cyclin A is abolished in HPV-16-immortalized cells. *Oncogene*, 7, 1681-6.
- PAOLINI, F., CURZIO, G., CORDEIRO, M. N., MASSA, S., MARIANI, L., PIMPINELLI, F., DE FREITAS, A. C., FRANCONI, R. & VENUTI, A. 2017. HPV 16 E5 oncoprotein is expressed in early stage carcinogenesis and can be a target of immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother*, 13, 291-297.

- PATTERSON, N. A., SMITH, J. L. & OZBUN, M. A. 2005. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes does not require heparan sulfate. *J Virol*, 79, 6838-47.
- PFISTER, D. G., LAURIE, S. A., WEINSTEIN, G. S., MENDENHALL, W. M., ADELSTEIN, D. J., ANG, K. K., CLAYMAN, G. L., FISHER, S. G., FORASTIERE, A. A., HARRISON, L. B., LEFEBVRE, J. L., LEUPOLD, N., LIST, M. A., O'MALLEY, B. O., PATEL, S., POSNER, M. R., SCHWARTZ, M. A. & WOLF, G. T. 2006. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *J Clin Oncol*, 24, 3693-704.
- POZNIC, M. 2009. Retinoblastoma protein: a central processing unit. *J Biosci*, 34, 305-12.
- QUELLE, D. E., ASHMUN, R. A., HANNON, G. J., REHBERGER, P. A., TRONO, D., RICHTER, K. H., WALKER, C., BEACH, D., SHERR, C. J. & SERRANO, M. 1995. Cloning and characterization of murine p16INK4a and p15INK4b genes. *Oncogene*, 11, 635-45.
- REIDENBACH, M. M. 1996. The paraglottic space and transglottic cancer: anatomical considerations. *Clin Anat*, 9, 244-51.
- REN, Z. P., SALLSTROM, J., SUNDSTROM, C., NISTER, M. & OLSSON, Y. 2000. Recovering DNA and optimizing PCR conditions from microdissected formalin-fixed and paraffin-embedded materials. *Pathobiology*, 68, 215-7.
- RICHMOND-SINCLAIR, N. M., LEE, E., CUMMINGS, M. C., WILLIAMSON, R., MULLER, K., GREEN, A. C., HAYWARD, N. K. & WHITEMAN, D. C. 2008. Histologic and epidemiologic correlates of P-MAPK, Brn-2, pRb, p53, and p16 immunostaining in cutaneous melanomas. *Melanoma Res*, 18, 336-45.
- RIETBERGEN, M. M., LEEMANS, C. R., BLOEMENA, E., HEIDEMAN, D. A., BRAAKHUIS, B. J., HESSELINK, A. T., WITTE, B. I., BAATENBURG DE JONG, R. J., MEIJER, C. J., SNIJDERS, P. J. & BRAKENHOFF, R. H. 2013. Increasing prevalence rates of HPV attributable oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands as assessed by a validated test algorithm. *Int J Cancer*, 132, 1565-71.
- ROBBINS, K. T. & MICHAELS, L. 1985. Feasibility of subtotal laryngectomy based on whole-organ examination. *Arch Otolaryngol*, 111, 356-60.
- ROSAI, J. & ACKERMAN, L. V. 2004. *Rosai and Ackerman's surgical pathology*, Edinburgh, Mosby.
- ROTHER, J. & JONES, D. 2009. Molecular markers of tumor progression in melanoma. *Curr Genomics*, 10, 231-9.
- SADLER, T. W. & LANGMAN, J. 2004. *Langman's medical embryology*, Philadelphia ; London, Lippincott Williams & Wilkins.
- SALAM, I., HUSSAIN, S., MIR, M. M., DAR, N. A., ABDULLAH, S., SIDDIQI, M. A., LONE, R. A., ZARGAR, S. A., SHARMA, S., HEDAU, S., BASIR, S. F., BHARTI, A. C. & DAS, B. C. 2009. Aberrant promoter methylation and reduced expression of p16 gene in esophageal squamous cell carcinoma from Kashmir valley: a high-risk area. *Mol Cell Biochem*, 332, 51-8.
- SANO, T., OYAMA, T., KASHIWABARA, K., FUKUDA, T. & NAKAJIMA, T. 1998. Expression status of p16 protein is associated with human

- papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol*, 153, 1741-8.
- SAS-KORCZYNSKA, B., KORZENIOWSKI, S. & SKOLYSZEWSKI, J. 2003. Cancer of the larynx in females. *Cancer Radiother*, 7, 380-5.
- SASAKI, C. T. & JASSIN, B. 2001. Cancer of the pharynx and larynx. *Am J Med*, 111 Suppl 8A, 118S-123S.
- SCHACHE, A. G., LILOGLOU, T., RISK, J. M., FILIA, A., JONES, T. M., SHEARD, J., WOOLGAR, J. A., HELLIWELL, T. R., TRIANTAFYLLOU, A., ROBINSON, M., SLOAN, P., HARVEY-WOODWORTH, C., SISSON, D. & SHAW, R. J. 2011. Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity, and prognostic discrimination. *Clin Cancer Res*, 17, 6262-71.
- SCHEFFNER, M. & WHITAKER, N. J. 2003. Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system. *Semin Cancer Biol*, 13, 59-67.
- SCHLECHT, N. F., BRANDWEIN-GENSLER, M., NUOVO, G. J., LI, M., DUNNE, A., KAWACHI, N., SMITH, R. V., BURK, R. D. & PRYSTOWSKY, M. B. 2011. A comparison of clinically utilized human papillomavirus detection methods in head and neck cancer. *Mod Pathol*, 24, 1295-305.
- SCHUCK, S., RUSE, C. & STENLUND, A. 2013. CK2 phosphorylation inactivates DNA binding by the papillomavirus E1 and E2 proteins. *J Virol*, 87, 7668-79.
- SHAH, A. A., JEFFUS, S. K. & STELOW, E. B. 2014. Squamous cell carcinoma variants of the upper aerodigestive tract: a comprehensive review with a focus on genetic alterations. *Arch Pathol Lab Med*, 138, 731-44.
- SHERR, C. J. & MCCORMICK, F. 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2, 103-12.
- SIEGEL, R. L., MILLER, K. D. & JEMAL, A. 2017. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*, 67, 7-30.
- SILVA, S. D., NONOGAKI, S., SOARES, F. A. & KOWALSKI, L. P. 2012. p16 (INK4a) has clinicopathological and prognostic impact on oropharynx and larynx squamous cell carcinoma. *Braz J Med Biol Res*, 45, 1327-33.
- SMALL, W., JR., MITTAL, B. B., BRAND, W. N., SHETTY, R. M., RADEMAKER, A. W., BECK, G. G. & HOOVER, S. V. 1992. Results of radiation therapy in early glottic carcinoma: multivariate analysis of prognostic and radiation therapy variables. *Radiology*, 183, 789-94.
- SMEETS, S. J., HESSELINK, A. T., SPEEL, E. J., HAESEVOETS, A., SNIJDERS, P. J., PAWLITA, M., MEIJER, C. J., BRAAKHUIS, B. J., LEEMANS, C. R. & BRAKENHOFF, R. H. 2007. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer*, 121, 2465-72.
- SMITH, E. M., RUBENSTEIN, L. M., HOFFMAN, H., HAUGEN, T. H. & TUREK, L. P. 2010. Human papillomavirus, p16 and p53 expression associated with survival of head and neck cancer. *Infect Agent Cancer*, 5, 4.
- SNELL, R. S. 2004. *Clinical anatomy : an illustrated review with questions and explanations*, Philadelphia, [Pa.] ; London, Lippincott Williams & Wilkins.
- STASIKOWSKA-KANICKA, O., WAGROWSKA-DANILEWICZ, M. & DANILEWICZ, M. 2011. Effect of human papillomavirus on cell cycle-

- related proteins p16INK4A, p21waf1/cip1, p53 and cyclin D1 in sinonasal inverted papilloma and laryngeal carcinoma. An in situ hybridization study. *Folia Histochem Cytobiol*, 49, 34-40.
- STERNBERG, S. S. 1997. *Histology for pathologists*, Philadelphia, Lippincott-Raven.
- SUAREZ, P. A., ADLER-STORTHZ, K., LUNA, M. A., EL-NAGGAR, A. K., ABDUL-KARIM, F. W. & BATSAKIS, J. G. 2000. Papillary squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract: a clinicopathologic and molecular study. *Head Neck*, 22, 360-8.
- TAKEUCHI, S., BARTRAM, C. R., SERIU, T., MILLER, C. W., TOBLER, A., JANSSEN, J. W., REITER, A., LUDWIG, W. D., ZIMMERMANN, M., SCHWALLER, J. & ET AL. 1995. Analysis of a family of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15/MTS2/INK4B, p16/MTS1/INK4A, and p18 genes in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood*, 86, 755-60.
- TAKEUCHI, S., SERIU, T., VAN DONGEN, J. J., SZCZEPANSKI, T., TSUKASAKI, K., TAKEUCHI, N., FERMIN, A. C., SEO, H., BARTRAM, C. R. & KOEFFLER, H. P. 2003. Allelotype analysis in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*, 22, 6970-6.
- TEPPO, H., SOINI, Y., MELKKO, J., KOIVUNEN, P. & ALHO, O. P. 2003. Prognostic factors in laryngeal carcinoma: the role of apoptosis, p53, proliferation (Ki-67) and angiogenesis. *APMIS*, 111, 451-7.
- THOMPSON, L. D., WENIG, B. M., HEFFNER, D. K. & GNEPP, D. R. 1999. Exophytic and papillary squamous cell carcinomas of the larynx: A clinicopathologic series of 104 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 120, 718-24.
- THOMPSON, L. D., WIENEKE, J. A., MIETTINEN, M. & HEFFNER, D. K. 2002. Spindle cell (sarcomatoid) carcinomas of the larynx: a clinicopathologic study of 187 cases. *Am J Surg Pathol*, 26, 153-70.
- TUMBAN, E., PEABODY, J., TYLER, M., PEABODY, D. S. & CHACKERIAN, B. 2012. VLPs displaying a single L2 epitope induce broadly cross-neutralizing antibodies against human papillomavirus. *PLoS One*, 7, e49751.
- TUYNS, A. J., ESTEVE, J., RAYMOND, L., BERRINO, F., BENHAMOU, E., BLANCHET, F., BOFFETTA, P., CROSIGNANI, P., DEL MORAL, A., LEHMANN, W. & ET AL. 1988. Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer*, 41, 483-91.
- UKPO, O. C., FLANAGAN, J. J., MA, X. J., LUO, Y., THORSTAD, W. L. & LEWIS, J. S., JR. 2011. High-risk human papillomavirus E6/E7 mRNA detection by a novel in situ hybridization assay strongly correlates with p16 expression and patient outcomes in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 35, 1343-50.
- VAIRAKTARIS, E., YAPIJAKIS, C., PSYRRI, A., SPYRIDONIDOU, S., YANNOPOULOS, A., LAZARIS, A., VASSILIOU, S., FEREKIDIS, E., VYLLIOTIS, A., NKENKE, E. & PATSOURIS, E. 2007. Loss of tumour suppressor p16 expression in initial stages of oral oncogenesis. *Anticancer Res*, 27, 979-84.

- VAN TINE, B. A., DAO, L. D., WU, S. Y., SONBUCHNER, T. M., LIN, B. Y., ZOU, N., CHIANG, C. M., BROKER, T. R. & CHOW, L. T. 2004. Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4030-5.
- VISWANATHAN, S., RAHMAN, K., PALLAVI, S., SACHIN, J., PATIL, A., CHATURVEDI, P., D'CRUZ, A., AGARWAL, J. & KANE, S. V. 2010. Sarcomatoid (spindle cell) carcinoma of the head and neck mucosal region: a clinicopathologic review of 103 cases from a tertiary referral cancer centre. *Head Neck Pathol*, 4, 265-75.
- VOLKER, H. U., SCHEICH, M., HOLLER, S., STROBEL, P., HAGEN, R., MULLER-HERMELINK, H. K. & ECK, M. 2007. Differential diagnosis of laryngeal spindle cell carcinoma and inflammatory myofibroblastic tumor--report of two cases with similar morphology. *Diagn Pathol*, 2, 1.
- WALBOOMERS, J. M., JACOBS, M. V., MANOS, M. M., BOSCH, F. X., KUMMER, J. A., SHAH, K. V., SNIJDERS, P. J., PETO, J., MEIJER, C. J. & MUNOZ, N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189, 12-9.
- WALWORTH, N. C. 2000. Cell-cycle checkpoint kinases: checking in on the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 697-704.
- WANG, J. L., ZHENG, B. Y., LI, X. D., ANGSTROM, T., LINDSTROM, M. S. & WALLIN, K. L. 2004. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res*, 10, 2407-14.
- WEINBERGER, P. M., YU, Z., HAFFTY, B. G., KOWALSKI, D., HARIGOPAL, M., SASAKI, C., RIMM, D. L. & PSYRRI, A. 2004. Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer. *Clin Cancer Res*, 10, 5684-91.
- WENIG, B. M. 2002. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: precursors and problematic variants. *Mod Pathol*, 15, 229-54.
- WENIG, B. M. 2017. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: dysplasia and select variants. *Mod Pathol*, 30, S112-S118.
- WESTERBEEK, H. A., MOOI, W. J., HILGERS, F. J., BARIS, G., BEGG, A. C. & BALM, A. J. 1993. Ploidy status and the response of T1 glottic carcinoma to radiotherapy. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 18, 98-101.
- WIERNIK, G., MILLARD, P. R. & HAYBITTLE, J. L. 1991. 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*, 19, 411-7.
- WIMAN, K. G. & ZHIVOTOVSKY, B. 2017. Understanding cell cycle and cell death regulation provides novel weapons against human diseases. *J Intern Med*, 281, 483-495.
- YANAGAWA, N., TAMURA, G., OIZUMI, H., TAKAHASHI, N., SHIMAZAKI, Y. & MOTOYAMA, T. 2002. Frequent epigenetic silencing of the p16 gene in non-small cell lung cancers of tobacco smokers. *Jpn J Cancer Res*, 93, 1107-13.
- YE, Y., WANG, D., SU, C., RONG, T. & GUO, A. 2009. Combined detection of p53, p16, Rb, and EGFR mutations in lung cancer by suspension microarray. *Genet Mol Res*, 8, 1509-18.

- YILMAZ, T., HOSAL, A. S., GEDIKOGLU, G. & KAYA, S. 1999. Prognostic significance of histopathological parameters in cancer of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 256, 139-44.
- YIM, E. K. & PARK, J. S. 2005. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat*, 37, 319-24.
- YUEN, P. W., MAN, M., LAM, K. Y. & KWONG, Y. L. 2002. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol*, 55, 58-60.
- ZHANG, E. Y. & TANG, X. D. 2012. Human papillomavirus type 16/18 oncoproteins: potential therapeutic targets in non-smoking associated lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13, 5363-9.
- ZHAO, R., CHOI, B. Y., LEE, M. H., BODE, A. M. & DONG, Z. 2016. Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16(INK4a)) in Cancer. *EBioMedicine*, 8, 30-39.
- ZHENG, Z. M. & BAKER, C. C. 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*, 11, 2286-302.