



Laringeal skuamöz hücreli karsinomlarda lenfatik damar yoğunluğu ve mikrodamar yoğunluğunun değerlendirilmesi

The evaluation of lymphatic vessel density and microvessel density in laryngeal squamous cell carcinoma

Ganime Çoban ¹, Ebru Akay ², Kemal Deniz ³, İmdat Yüce ⁴, Süleyman Balkanlı ³

Öz

Amaç: Larinks karsinomlarında boyun lenf nodlarına metastaz, sağ kalımı önemli oranda azaltan bir etkidir. Bu çalışmanın amacı; larinksin skuamöz hücreli tümörlerinde tümör içi ve tümör dışı alanlarda lenfatik damar yoğunluğu ve mikrodamar yoğunluğunun lenf nodu metastazı ile ilişkisini ortaya koymaktır.

Yöntemler: Çalışmamızda 2000-2006 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı'nda larinks skuamöz hücreli karsinom tanısı almış 86 olgu incelemeye alındı. Tümör içi ve tümör dışı alanlarda immünohistokimyasal bir belirteç olan D2-40 ile lenfatik damar yoğunluğu ve CD34 ile mikrodamar damar yoğunluğu değerlendirildi. Sonuçlar tümör derecesi, tümör yerleşim yeri, lenf nodu metastazı ile karşılaştırıldı.

Bulgular: Olguların tümör içi ve tümör dışı lenfatik damar yoğunluğu sırası ile $8,93\pm 12,5$ ve $24,1\pm 20,1$ idi ($p=0,001$). Tümör içi mikrodamar yoğunluğu değeri $217,53\pm 89,8$ ve tümör dışı mikrodamar yoğunluğu değeri $330,43\pm 92,4$ olarak sayıldı ($p=0,001$). İyi diferansiye tümörlerde tümör içi lenfatik damar yoğunluğu değeri, iyi diferansiye olmayan tümörlere göre yüksekti, fakat anlamlı sonuç elde edilemedi ($p=0,100$). Kötü diferansiye tümörlerde tümör dışı mikrodamar yoğunluğu değeri anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,050$). Tümör içi mikrodamar yoğunluğu değeri lenf nodu metastazı olan tümörlerde anlamlı olarak düşüktü ($p=0,028$). Lenf nodu metastazı olan ve olmayan her iki grupta da tümör dışı lenfatik damar yoğunluğu değeri yüksekti, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi ($p=0,084$).

Sonuç: Bu çalışmada iyi diferansiye tümörlerde tümör içi mikrodamar yoğunluğu ve kötü diferansiye olgularda tümör dışı mikrodamar yoğunluğu daha yüksek idi. Lenfatik damar yoğunluğu değeri ile diferansiyasyon arasında bir ilişki saptanmadı. Metastaz yapmayan grupta tümör içi ve tümör dışı mikrodamar yoğunluğu değeri yüksek bulundu. Metastaz ile lenfatik damar yoğunluğu değeri arasında bir ilişki izlenmedi.

D2-40 ve CD34 'ün birlikte kullanımı ile lenfatik damar yoğunluğunun değerlendirilmesinin, metastazın erken belirlenmesinde daha önemli olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: D2-40, angiogenesis, CD34, larinks, skuamöz hücreli karsinom

Abstract

Aim: Metastasis to the cervical lymph nodes in laryngeal carcinomas is a factor reducing survival significantly. The present study aimed to reveal the association of lymph node metastasis with lymphatic vessel density and microvessel density in the intratumoral and extra-tumoral areas of laryngeal squamous cell carcinoma.

Methods: Eighty-six cases diagnosed with laryngeal squamous cell carcinoma in Pathology Department of Erciyes University Faculty of Medicine between 2000-2006 were included in the present study. Lymphatic vessel density and microvessel density were assessed with D2-40 which is an immunohistochemical marker in intratumoral and extra-tumoral areas and CD34, respectively. The results were compared with tumor grade, tumor localization, and lymph node metastasis.

Results: Intratumoral and extra tumoral lymphatic vessel density value were 8.93 ± 12.5 and 24.1 ± 20.1 , respectively ($p=0.001$). Mean intra tumoral microvessel density was calculated as 217.53 ± 89.8 while extra tumoral microvessel density was calculated as 330.43 ± 92.4 ($p=0.001$). Intratumoral lymphatic vessel density value was higher in the well-differentiated tumors compared to the poorly differentiated tumors but no significant result was obtained ($p=0.100$). Extra tumoral microvessel density value was found to be significantly higher in the poorly differentiated tumors ($p=0.05$). Intratumoral microvessel density value was significantly lower in tumors with lymph node metastasis ($p=0.028$). Extra-tumoral lymphatic vessel density value was higher in both groups with and without lymph node metastasis, however, no statistically significant result could be obtained ($p=0.084$).

Conclusion: In the present study, intratumoral microvessel density was higher in well differentiated tumors whereas extra tumoral microvessel density was determined to be higher in poorly differentiated cases. No significant association was noted between lymphatic vessel density and differentiation. Extra tumoral and intra tumoral microvessel density values were found to be higher in the group without metastasis. No association was detected between metastasis and lymphatic vessel density value.

We suggest that assessing lymphatic vessel density with the co-administration of D2-40 and CD34 may be more important for early detection of metastasis.

Keywords: D2-40, angiogenesis, CD34, larynx, squamous cell carcinoma

¹ Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Fatih, İstanbul, Türkiye.

² Kayseri Eğitim Araştırma Hastanesi, Patoloji Bölümü, Kayseri, Türkiye.

³ Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye.

⁴ Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye.

Etik Kurul Onayı: Çalışma lokal etik komite tarafından onaylanmıştır.

Ethics Committee Approval: The study was approved by the local ethical authority.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Finansal Destek: Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (TST-08-619) desteklenmiştir.

Financial Disclosure: This study was supported by Erciyes University Scientific Research Projects Coordination Unit (TST-08-619).

Geliş Tarihi / Received: 03.04.2018

Kabul Tarihi / Accepted: 22.04.2018

Yayın Tarihi / Published: 20.07.2018

Sorumlu yazar / Corresponding author:

Ganime Çoban
Bezmialem Vakıf Üniversitesi. Patoloji Anabilim Dalı, Vatan Caddesi, Fatih, İstanbul 34093, Türkiye
E mail: drgcoban@hotmail.com
Tel:05322180249

Copyright © ACEM

Giriş

Larinks karsinomları, baş boyun bölgesinin en sık görülen neoplazmlarıdır [1]. Özellikle erkeklerde sık görülmektedir. En sık yerleşim yerleri glottik bölge olup, ikinci sırada supraglottik bölge gelmektedir. Skuamöz hücreli karsinomlar (SHK) larinksin en sık görülen malign tümörüdür [1]. SHK, diferansiyasyon derecesi, sellüler pleomorfizm ve mitotik aktivite temel alınarak iyi, orta ve kötü diferansiyasyon olmak üzere üç gruba ayrılır. Çoğu glottik karsinomlar, iyi-orta diferansiyasyonlu, özellikle subglottik alan olmak üzere diğer lokalizasyondakiler orta-kötü diferansiyasyonlu. Tümörün prognozunda klinik evre ve yerleşim yeri, büyüklüğü, lenf nodu tutulumu, Ki-67 proliferasyon indeksi, lenfovasküler ve perinöral invazyon, lenf nodunda ekstrakapsüler yayılım ve rezeksiyon sınırlarının durumu önemlidir [1, 2].

Larinks karsinomları en sık servikal bölge lenf nodlarına metastaz yapmaktadır. Son yıllarda tümör vaskülarizasyonu ve tümör progresyonu hakkında ilişkiyi gösteren çalışmalar vardır. Bilindiği gibi solid tümörlerin gelişimi ve metastaz yapmasında yeni damar oluşumu önemli rol oynar [3]. Kan damarları iki farklı süreç ile oluşur; bunlar vaskülogenez ve anjiogenezdir [4]. Anjiogenez, tümörlerin gelişimi, invazyonu, metastazı ve prognozu ile ilişkilidir [5-7]. Solid kanserlerin gelişiminde kan damarlarının yanı sıra lenf damarları da önemli role sahiptir [8]. Lenfanjiogenez tümörün lenf nodu metastazı yapıp yapmayacağı konusunda önemli bir göstergedir. Metastazların erken tanınabilmesi mikrodamar yoğunluğu (MDY) ve lenfatik damar yoğunluğunun (LDY) gösterilebilmesi ile mümkün olabilir [3, 5, 9]. Artmış MDY'nin meme kanserlerinde bağımsız prognostik belirleyici olduğu gösterilmiştir [10]. Histolojik kesitlerde lenfatik ve kan damarlarının tanınması çok önemlidir. Ancak lenfatik endotel hücrelerin Hematoksilin-Eozin (HE) ile boyalı rutin histolojik kesitlerde tanınması zor olmaktadır. Lenf damarlarını göstermede birçok immünohistokimyasal belirleyici bulunmaktadır. Bu antikorlar LYVE-1, Prox-1, podoplanin ve D2-40 olarak sıralanabilir [11, 12]. D2-40, 40kDa ağırlığında siyaloglikoprotein özelliğinde monoklonal bir antikordur [13]. Onkofetal membran antijeni olup, testiküler gonositlerin yüzey hücrelerinde, germ hücreli tümörlerde, lenfatik endotelde ve mezotel hücrelerinde bulunur [14]. D2-40, lenfatik endotel hücreleri göstermede oldukça duyarlı ve özgüdür [15-17]. D2-40 sitoplazmik boyanma paternine sahiptir. Lenfatik dokudan kaynaklanan tümörlerde ve lenf nodlarındaki tümör invazyonunu göstermede oldukça faydalıdır [18]. CD 34, yaklaşık 116 kDa ağırlığında tek zincir transmembran proteindir. Hematopoetik hücreler, dermis ve yumuşak dokudaki dendritik hücreler ve fibroblastik hücreler, endotel hücreleri, kemik iliğinin stromal hücrelerinin öncüllerinde reaksiyon gösterir [19]. D2-40 lenfatik endotel belirleyicisi ile CD34 gibi panendotelial bir belirleyicinin birlikte kullanımı lenf ve kan damarlarının ayırt edilmesinde önemli katkı sağlar. Literatürde çeşitli tümörlerde tümör içi (Tİ) ve tümör dışı (TD) alandaki lenfatik invazyon alanları karşılaştırılmış olup, prognozla ilişkisi değerlendirilmiştir [20-22].

Biz bu çalışmada, larinksin SHK'de, D2-40 ve CD34 kullanarak Tİ ve TD alanlarda lenfatik ve damar sayılarını değerlendirdik. Elde edilen sonuçlar ile tümör diferansiyasyonu, yerleşim yeri ve lenf nodu metastazı arasındaki ilişkiyi göstermeyi amaçladık.

Gereç ve yöntemler

Çalışmamızda, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı'nda larinks SKH tanısı almış 86 olgu retrospektif olarak değerlendirildi. Lokal etik kuruldan çalışma için onam alındı. Çalışma Helsinki Deklarasyonu Prensipleri'ne

uygun olarak yapıldı. Çalışmanın retrospektif yapısından dolayı hastalardan yazılı onam alınmadı.

Hastaların dosya kayıtlarından ve patoloji raporlarından yaş, cinsiyet, tümör yerleşim yeri, tümör çapı ve uygulanan tedaviler hakkında veriler toplandı.

Patolojik değerlendirme

HE boyamasında Tİ ve TD alanların en iyi görüldüğü bloklar saptandı. HE boyalı preparatlarda tümör histolojik tipi ve diferansiyasyonu değerlendirildi. Histolojik derece, tümör hücrelerinin pleomorfizm, keratin yapıp yapmaması, mitozun seyrek ya da sık olmasına göre iyi diferansiyasyonlu, orta derece diferansiyasyonlu ve kötü diferansiyasyonlu olmak üzere üç gruba ayrıldı. Hafif pleomorfizm, belirgin keratin varlığı, seyrek mitoz varlığı olan vakalar iyi diferansiyasyonlu, belirgin pleomorfizm, keratinin yokluğu ve sık mitoz içeren vakalar kötü diferansiyasyonlu olarak yorumlandı. İyi ve kötü diferansiyasyonlu arasında kalan vakalar orta derece diferansiyasyonlu olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal boyama için %10'luk formalin fiksasyonu sonrası hazırlanmış parafin gömülü dokulardan 3-5 mikronluk kesitler yapıldı. Primer antikorlar olarak D2-40 (Dako, Klon D2-40, 1/80 dilüsyonda) ve CD34 (Dako 1/200 dilüsyonda) kullanıldı. İmmünohistokimyasal boyamada streptavidin-biotin kiti kullanarak avidin-biotin peroksidaz metodu uygulandı. CD34 ve D2-40 için sitoplazmik boyanma dikkate alındı. Çalışmada Olympus mikroskop kullanılarak damar ve lenfatiklerin en yoğun olduğu 200 büyütmede 4 saha değerlendirildi. MDY'de, TD ve Tİ alanlarda CD34 pozitif boyanan damarlar, LYD için TD ve Tİ alanlarda D2-40 boyanan lenfatik kanallar sayıldı. Bu parametreler; tümörün yerleşim yeri, diferansiyasyonu ve lenf nodu metastazı ile ilişkileri karşılaştırıldı.

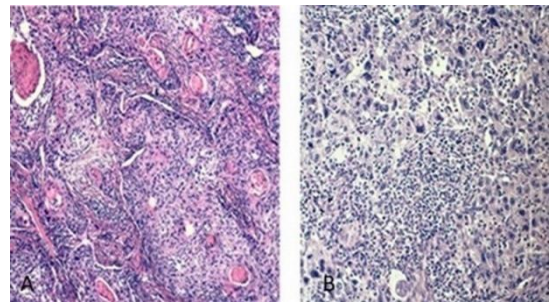
İstatistiksel analiz

Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodlar (Ortalama, standart sapma, ortanca, frekans, yüzde oran) kullanıldı. Bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde, karşılaştırmalarda ki kare testi, t testi ve varyans analizi kullanıldı. P değerinin 0,05 altındaki değerleri anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Çalışmada değerlendirmeye alınan 86 olgunun 85'i (%98,8) erkek, 1'i (%1,2) kadındı. Yaş ortalaması 60,1±9,8 yıl idi. Tümörler en sık glottik (%52,3) ve supraglottik (%39,5) yerleşimli idi. Histopatolojik incelemede olguların 33'ü (%38,4) iyi diferansiyasyonlu, 35'i (%40,7) orta diferansiyasyonlu, 18'i (%20,9) kötü diferansiyasyonlu olarak değerlendirildi (Resim 1). Ellibir olguda (%59,3) lenf nodu metastazı tespit edilemedi. Hastalara ait demografik veriler ve tümör özellikleri Tablo 1'de özetlendi (Tablo 1).

Resim 1: İyi diferansiyasyonlu skuamöz hücreli karsinom (A). Kötü diferansiyasyonlu skuamöz hücreli karsinom (B) (HEX200).



Olguların diferansiyasyonlarına göre metastaz oranları karşılaştırıldığında orta derece ve kötü diferansiyasyonlu tümörlerin metastaz oranının daha yüksek olduğu görülmüş olup, istatistiksel

olarak anlamlıydı ($p=0,03$). Tümörlerin yerleşim yerlerine göre metastaz oranları Tablo 2'de özetlendi.

Tablo 1: Demografik veriler ve tümör özellikleri.

Parametre	Özellik	n
Yaş (yıl) ^β		60,1±9,8
Cinsiyet	Erkek/kadın	85/1
Tümör çapı (cm) ^β		3.1±1,3
Tümör dağılımı ^μ	Supraglottik	34 (39,5)
	Glottik	45 (52,3)
	Subglottik	7 (8,2)
Histopatoloji ^μ	İyi diferansiye	33(38,3)
	Orta diferansiye	35 (40,6)
	Kötü diferansiye	18 (20,9)
Lenf nodu metastazı ^μ	Var	35 (40,7)
	Yok	51 (59,3)

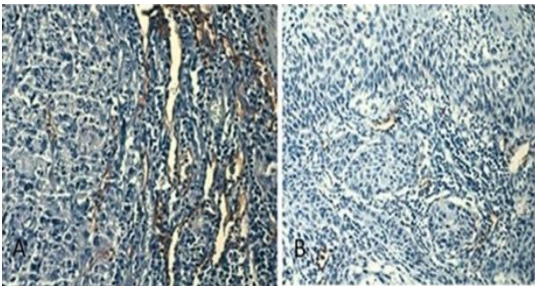
^β: ortalama standart sapma
^μ: n(%)

Tablo 2: Olguların yerleşim yerleri ve metastaz durumlarına göre dağılımları ($p=0,032$).

	Supra-glottik	Glottik	Sub-glottik	Toplam
Olgu Sayısı	34	45	7	86
Lenf nodu metastazı (+)	16 (%47,1)	15 (%33,3)	4 (%57,1)	35
Lenf nodu metastazı (-)	18 (%52,9)	30 (%66,7)	3 (%42,9)	51

Olguların Tİ ve TD lenfatik damar sayıları karşılaştırıldığında, Tİ LDY değeri ortalama $8,93\pm 12,5$ olup, TD LDY'nin ortalama değeri $24,1\pm 20,1$ idi ($P = 0,001$). Olguların diferansiyasyonu ile Tİ ve TD lenfatik damar sayıları arasında anlamlı bir sonuç elde edilemedi (Resim 2) ($p=0,996$).

Resim 2: Skumöz hücreli karsinomda D2 40 ile tümör çevresindeki (A) ve tümör içerisindeki (B) lenfatiklerde boyanma (X200).



Lenf nodu metastazı durumuna göre, Tİ ve TD alanların LDY ve MDY oranları Tablo 3'de özetlendi. Her iki grupta da TD LDY'nin fazla olduğu görüldü. Tİ ve TD LDY ile metastaz arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı ($p>0,05$).

Tümörlerin yerleşim yerlerine göre Tİ LDY karşılaştırıldığında, Tİ LDY'nin ortalama değerinin subglottik yerleşimli 7 olguda 6, glottik yerleşimli 45 olguda 4 ve supraglottik yerleşimli 34 olguda 5 olarak değerlendirildi. P değeri 0,281 olup yerleşim yerleri ve Tİ LDY arasında anlamlı bir sonuca varılamadı. Tümörlerin yerleşim yerlerine göre TD LDY karşılaştırıldığında supraglottik bölgede yerleşen 34 (%39,5) vakanın ortalama TD LDY değeri 21, glottik bölgedeki 45 vakanın (%52,3) 16 ve subglottik yerleşimli 7 vakanın (%8,1) 25'ti. Yerleşim yerleri ve TD LDY arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p = 0,168$).

Olguların Tİ ve TD MDY değerleri karşılaştırıldığında, Tİ alanlarda MDY değeri ortalama 217 ± 89 , TD alanlarda 330 ± 92 olarak değerlendirildi ($p= 0,001$). Olguların diferansiyasyonu ve TD MDY karşılaştırıldığında iyi diferansiye tümörlerde (33 vaka) $333,2\pm 78,9$, kötü diferansiye tümörlerde (18 vaka) $374,2\pm 80,1$ olarak değerlendirildi. Kötü diferansiye tümör ile iyi diferansiye tümörlerin TD MDY değerleri arasında anlamlı bir fark bulundu ($p=0,03$).

Tablo 3: Olguların lenf nodu metastaz durumuna göre tümör içi-tümör dışı lenfatik damar ve mikrodamar yoğunluğu

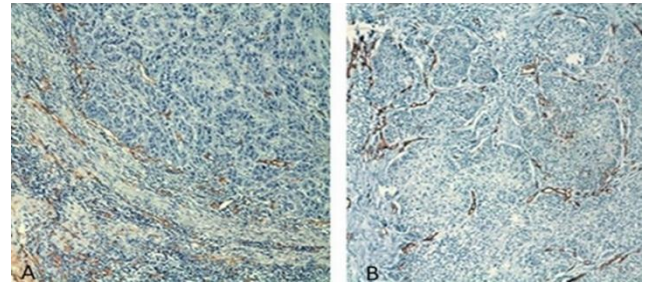
Parametre	Lenf nodu met(+)	Lenf nodu met (-)
Tİ LDY	10,28	23,85
TD LDY	8	24,78
Tİ MDY	191,97	235,07
TD MDY	307,10	346,07

Tİ: tümör içi, TD: tümör dışı, LDY: lenfatik damar yoğunluğu, MDY: mikrodamar yoğunluğu.

Olguların diferansiyasyonları ve Tİ MDY karşılaştırıldığında, iyi diferansiye olgularda Tİ MDY değeri ortalama $243,6\pm 90,3$, orta derece diferansiye vakalarda $210,7\pm 81,4$ ve kötü diferansiye tümörlerde $183\pm 95,2$ olarak saptandı ($p= 0,058$) (Resim 3). Olguların lenf nodu metastaz durumuna göre MVD durumu Tablo 2'de özetlendi. Lenf nodu metastazı olmayan grupta Tİ ve TD MDY değeri daha yüksekti ($p = 0,058$).

D2-40 ile olguların 33'ünde (%38,4) tümör dokuda farklı oranlarda pozitif boyanma izlendi. 53 vakada (%61,6) boyanma izlenmedi. Olguların diferansiyasyonuna göre tümördeki boyanma oranları karşılaştırıldığında iyi diferansiye 33 olgunun 17'sinde, orta derece diferansiye 35 olgunun 9'unda ve kötü diferansiye 18 olgunun 7'sinde D2-40 ile boyanma görüldü ($p= 0,125$).

Resim 3: Kötü diferansiye skumöz hücreli karsinomda CD34 ile tümör çevresinde (A) ve tümör içerisinde (B) boyanan vasküler yapılar (X200).



Tartışma

Larinks karsinomları baş boyun bölgesinin en sık görülen neoplazmlarıdır. Erkeklerdeki tüm kanserlerin %2,2' si, kadınlarda %0,4' ünü oluşturur. Çoğu hasta 4.dekat veya daha ileri yaştadır, fakat daha genç yaşlarda da görülebilir. Sigara başlıca risk faktörüdür. Bazı ülkelerde kadınlarda sigara kullanımının artmasına bağlı olarak görülme sıklığı artmaktadır [1]. Diğer risk faktörleri arasında, sesin kötü kullanımı, keratosis [1], Human Papilloma Virüs [23], Epstein Barr Virüs [24] gibi viral nedenler, radyasyon [25], Bloom's sendromu [26], Li-Fraumeni sendromu[27], beslenme, gastroözefagial reflü ve asbest yer almaktadır. Sebze ve meyvelerde bulunan C vitamini, folat ve flavonoidler gibi antioksidanların larinks kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir [2].

Anjiyenez, tümörlerin gelişimi, invazyonu, metastazı ve prognozunda önemli role sahip temel mekanizmalardan biridir

[5-7].Larinks neoplazmları metastazlarını en sık servikal lenf nodlarına yapmaktadır. Genellikle lenf nodu metastazı primer tümör alanındaki lenfatik damar invazyonunun gerçekleşmesi ile başlamaktadır. Daha sonra kanser hücreleri lenfatik yol ile lenf nodlarına tümör embolisi olarak taşınırlar. Lenfanjiogenez tümörün lenf nodu metastazı yapıp yapmayacağı konusunda önemli bir göstergedir. Özellikle de Tİ lenfanjiogenezin tümörün prognozu ve metastaz yapmasında önemli olduğu bildirilmiştir [28-29].Çeşitli malignitelerde CD34 ve D2-40 birlikte kullanılarak, Tİ lenfatik ve damar sayıları, TD lenfatik ve damar sayılarının metastaz ile ilişkisi gösterilmiştir. Çalışmamızda lenf nodu metastazı olan ve olmayan her iki grupta da TD LDY, Tİ'den daha yüksekti.

Kolon kanserinde yapılan bir çalışmada, D2-40 ile HE boyamaya oranla lenfatik invazyon saptanmasında %19 oranında artış olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca kolorektal karsinomlarda Tİ lenfanjiogenezisin, lenfatik invazyon, lenf nodu ve karaciğer metastazı ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır [30]. Kolon adenokarsinomlarında yapılan bir başka çalışmada, Tİ alanda lenfatik kanallarda azalma görülmüştür. LDY ile klinikopatolojik parametreler arasında korelasyon izlenmemiştir [31].

Erken evre serviks skuamöz hücreli karsinomlarında Tİ'de normal servikal dokuya göre LDY'nin fazla olduğu, D2-40 ile reaksiyon veren Tİ'deki lenfatiklerin lümenlerinin kapalı tümör çevresindeki lenfatiklerinin lümenlerinin açık olduğu görüldü. Ayrıca tümör çevresindeki lenfatiklerin sayılarının artışı ile lenfatik invazyonun korele olduğu saptandı [32]. Çalışmamızda da, Tİ'deki çoğu lenfatik kanal kapalı olup yarık benzeri görünümde iken TD alandaki lenfatik kanallar daha büyük ve lümenlerinin açık olduğu izlendi. Tümör içindeki kanalların kapalı olmasında tümör dezmoplasisinin rolü olabilir.

Gastrik karsinomlarda D2-40 ve CD31 kullanılarak yapılan bir çalışmada LDY ve MDY oranları değerlendirilmiştir. TD LDY'nin Tİ LDY'ye göre yüksek olduğu ve lenf nodu metastazı ile direkt ilişkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca TD alandaki lenfatiklerin açık ve geniş lümenli olduğu görülmüştür [33]. Prostat adenokarsinomlarında D2-40 belirteci kullanılarak yapılan bir çalışmada, TD alanların TD alana göre daha fazla lenfatik içerdiği gösterilmiştir. TD lenfatik invazyonunun lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu ve Gleason grade yükseldikçe TD LVD' nin de yükseldiği saptanmıştır [34].

Bizim çalışmamızda metastazı olan ve olmayan her iki grupta da TD MDY, Tİ MDY'den istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazladır. Tİ ve TD MDY, metastaz olan grupta metastaz olmayan gruba göre düşük olarak bulunmuştur. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlıdır. Veriler literatür ile korele değildir.

Larinkste D2-40 ile yapılan 40 vakalık bir çalışmada, TD D2-40 pozitif lenfatik damarların normal mukozadan daha fazla sayıda olduğu saptandı. Metastaz olan grupta metastaz olmayana göre TD lenfatik sayısı daha fazlaydı. TD LDY'nin tümör progresyonu ve invazyonunda önemli olduğu görüldü [35]. Endometriyum adenokarsinomlarında CD31 ve D2-40 ile yapılan bir çalışmada lenfatik invazyonunun kan damarı invazyonundan daha fazla olduğu gösterilmiştir. Ancak kan damarı invazyonunun, prognozda daha önemli olduğu bildirilmiştir [36].

Larinksin lenfatik sistemi bölgelere göre farklılık göstermektedir. Supraglottik bölge en fazla lenfatik sisteme sahip olup, lenf nodu metastazı en sık bu bölge tümörlerinde görülmektedir [37]. Çalışmamızda lenf nodu metastazı olan 35 vakanın %45,7'si supraglottik, %42,9'u glottik ve %11,4'ü subglottik yerleşimliydi. Tİ ve TD LDY en yüksek subglottik, en düşük glottik bölge tümörlerinde izlendi. Tİ damar sayıları supraglottik bölgede yüksek saptandı. TD damar sayısı en

yüksek subglottik en düşük glottik bölgede görüldü. Glottik bölge lenfatik sistemin çok az olduğu bölge olmasına rağmen çalışmamızda glottik bölgede yerleşen tümörlerde metastaz oranı yüksek bulundu. Bu tümörlerin ileri evre tümörler olduğunu düşünmekteyiz. Supraglottik bölge yerleşimli tümörlerde metastaz oranı yüksek olup literatür ile uyumludur.

Larinks karsinomlarında yerleşim yerleri ve lenf nodu metastazları arasında yapılan bir çalışmada supraglottik bölge yerleşimli tümörlerde glottik bölge yerleşimli tümörlere göre lenf nodu metastaz oranı daha yüksek olarak bulundu [38]. Larinksin supraglottik skuamöz hücreli karsinomlarında yapılmış 108 vakalık bir çalışmada damar yoğunluğu ve lenf nodu arasında korelasyon izlenmedi. Klinikopatolojik parametreler ve yaşam oranı ile MDY arasında ilişki saptanmadı [39].

Çalışmamızda, Tİ MDY iyi diferansiye tümörlerde, TD MDY orta derece ve kötü diferansiye tümörlerde yüksek saptandı. Diferansiyasyon kötüleştikçe TD damar sayısı artmaktaydı.

Kyzas ve arkadaşları, baş boyun bölgesindeki SHK' de CD105 ile yaptıkları bir çalışmada yüksek MDY'nin kötü dereceli tümör ile ilişkili olduğunu saptamışlardı [40].Çalışmamızda tümör diferansiyasyonu ile TD veTİ lenfatik sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilemedi. Tümör derecesi ile Tİ ve TD lenfatik sayılarının karşılaştırıldığı bir çalışmada ise, tümör derecesi ile LDY arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı [41].Dil skuamöz hücreli karsinomlarında yapılan bir başka çalışmada ise yaşam süreleri ile LDY arasında ilişki saptanmadı [42].

D2-40 lenfatik endotelial bir belirleyici olmasına rağmen, çalışmamızda tümöral dokuda ve kıkırdak dokusunda D2-40 ile değişen oranlarda boyanma görüldü. Tümör boyanması ile diferansiyasyon karşılaştırıldığında iyi diferansiye olguların %51,5'u, orta derece diferansiye tümörlerin %27,3'ü, kötü diferansiye tümörlerin %21,2'sinde boyanma izlendi. İstatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilemedi, ancak iyi diferansiye tümörlerde daha yüksek oranda pozitif boyanma saptandı.

Literatürde kondroid neoplazmlar ve kordoma ayrımında D2-40 kullanılarak yapılmış çalışma mevcuttur. Enkondromların %100'ünde, grade 1 ve 2 kondrosarkomların %94'ünde pozitif boyanma izlenirken kordomalarda boyanma görülmemiştir [43].

D2-40, malign mezotelyoma ve adenokarsinom ayrımında da faydalıdır. D2-40 mezotelyomalarda pozitif reaksiyon vermektedir. Ancak benign mezotelyal proliferasyon ve malign mezotelyoma ayrımında yarar sağlamamaktadır [18]. Ayrıca epiteloid mezotelyomaların tanısında en özgül ve duyarlı belirleyicilerden biridir [44,45]. Vasküler tümör tiplerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, Kaposi sarkomu, kaposiform hemanjiendotelialyoma, hobnail hemanjiyomada D2-40 salınımının yüksek olduğu görülmüştü [46].Shotaro Iwakiri ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada küçük hücre dışı akciğer karsinomlarında ve lenfatik endotel hücrelerinde D2-40 ile pozitif boyanma görülmüştür. Skumöz hücreli karsinomlarda adenokarsinoma göre daha yüksek oranda boyanma izlenmiştir. Ayrıca artmış LDY'nin kötü prognozla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [47].

Bizim çalışmamızda vakaların yeterli klinik verileri temin edilemediğinden D2-40 ve CD34 ile saptanan Tİ ve TD LDY ve MDY değerlerinin prognozla ilişkisi çalışılmadı.

Sonuç olarak, bu çalışmada larinks karsinomlarında D2-40 ile Tİ ve TD lenfatikler değerlendirildi ve tümör dışında daha çok lenfatik bulunduğu saptandı; fakat metastaz ile ilişkisi bulunamadı. Metastaz yapmayan grupta Tİ ve TD'de LDY daha fazla izlendi. TD ve Tİ alandaki LDY ve MDY difeansiyasyon, lenf nodu metastazı, yerleşim yeri ve tümör boyanmasının durumuna göre karşılaştırıldı. LDY ve MDY'nin larinks

kanserlerinde diferansiyasyon ve lenf nodu metastaz ile ilişkisi saptanamadı. Lenf nodu metastazlarının erken değerlendirilmesi, tedavinin belirlenmesinde ve prognozda önemlidir. LDY ve MDY'nin metastaz ile ilişkisini değerlendirmek için, daha fazla çalışma ile desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Teşekkür

Bu çalışma TST-08-619 no'lu proje olarak Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Referanslar

- Rosai J. *Ackerman's Surgical Pathology* (9 ed). China, Elsevier, 2004; pp. 341-7.
- Barnes L, Evson JW, Reichart P, Sidransky D. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours* Lyon, IARC, 2005;108-39.
- [Pietruszewska W, Kobos J, Grycznski M. Microvessel density and endothelial area in assessment of angiogenesis in patients with laryngeal cancer]. *Otolaryngol Pol*. 2003;57:5-15.
- Heymach JV. Angiogenesis and antiangiogenic approaches to sarcomas. *Curr Opin Oncol*. 2001;13:261-9.
- Li J, Tang L, Ren Z, Pan Z. Distribution and prognostic significance of microvessel density in supraglottic laryngeal squamous cell carcinomas. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 2004;18:513-5.
- Sion-Vardy N, Fliss DM, Prinsloo I, Shoham-Vardi I, Benharroch D. Neoangiogenesis in squamous cell carcinoma of the larynx-biological and prognostic associations. *Pathol Res Pract*. 2001;197:1-5.
- Pietruszewska W, Niewiadomska H, Kobos J, Jozefowicz-Korczynska M, Gryczynski M. Significance of angiogenesis in laryngeal cancer. *Otolaryngol Pol*. 2000;31:167-70.
- Yan Gao, Wei-Xia Zhong, Dian-Bin Mu, Yuan YP, Zhang YH, Yu JM, et al. Distributions of Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Gastrointestinal Intramucosal Tumors. *Ann Surg Oncol*. 2008;15:1117-23.
- William WL Choi, Melinda M Lewis, Diane Lawson, Yin-Goen Q, Birdsong GG, Cotsonis GA, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol*. 2005;18:143-52.
- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis –correlation in invasive breast cancer. *N Engl J Med*. 1991;324:1-8.
- Koskinen WJ, Bono P, Leivo I, Vaheri A, Aaltonen LM, Joensuu H. Lymphatic vessel density in vocal cord carcinomas assessed with LYVE-1 receptor expression. *Radiother Oncol*. 2005;77:172-5.
- Fernandez MI, Bolenz C, Trojan L, Steidler A, Weiss C, Alken P et al. Prognostic implications of lymphangiogenesis in muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol*. 2008;53:571-8.
- Gomaa AHA, Yaar M, Bhawan J. Cutaneous immunoreactivity of D2-40 antibody beyond the lymphatics. *Am J Dermatopathol*. 2007;29:18-21.
- Chu AY, Litzky LA, Pasha TL, Acs G, Zhang PJ. Utility of D2-40, a novel mesothelial marker, in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Mod Pathol*. 2005;18:105-10.
- Ge Yan, Xiao-Yan Zhou, San-Jun Cai, Zhang GH, Peng JJ, Du X. Lymphangiogenic and angiogenic microvessel density in human primary sporadic colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2008;14:101-7.
- Longatto Filho A, Oliveira TG, Pinheiro C, de Carvalho MB, Curioni OA, Mercante AM, et al. How useful is the assessment of lymphatic vascular density in oral carcinoma prognosis? *World J Surg Oncol*. 2007;5:140.
- Arnaout-Alkarain A, Kahn HJ, Narod SA, Sun PA, Marks AN. Significance of lymph vessel invasion identified by the endothelial lymphatic marker D2-40 in node negative breast cancer. *Mod Pathol*. 2007;20:183-91.
- Mimura T, Ito A, Sakuma T, Ohbayashi C, Yoshimura M, Tsubota N, et al. Novel Marker D2-40, Combined With Calretinin, CEA, and TTF-1. *Cancer*. 2007;109:933-98.
- Joensuu H. Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Ann Oncol*. 2006;17:280-6.
- Ito M, Moriya T, Ishida T, Usami S, Kasajima A, Sasano H, et al. Significance of pathological evaluation for lymphatic vessel invasion in invasive breast cancer. *Breast Cancer*. 2007;14:381-7.
- Saad RS, Kordunsky L, Liu YL, Denning KL, Kandil HA, Silverman JF. Lymphatic microvessel density as prognostic marker in colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2006;19:1317-23.
- El-Gohary YM, Metwally G, Saad RS, Robinson MJ, Mesko T, Poppiti RJ. Prognostic significance of intratumoral and peritumoral lymphatic density and blood vessel density in invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2008;129:578-86.
- Hobbs CG, Birchall MA. Human papillomavirus infection in the etiology of laryngeal carcinoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;12:88-92.
- Goldenberg D, Benoit NE, Begum S, Westra WH, Cohen Y, Koch WM, et al. Epstein-Barr virus in head and neck cancer assessed by quantitative polymerase chain reaction. *Laryngoscope*. 2004;114:1027-31.
- Rabbett WF. Juvenile laryngeal papillomatosis. The relation of irradiation to malignant degeneration in this disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1965;74:1149-63.
- Berkower AS, Biller HF. Head and neck cancer associated with Bloom's syndrome. *Laryngoscope*. 1988;98:746-8.
- Potzsch C, Voigtlander T, Lubbert M. p53 Germline mutation in a patient with Li- Fraumeni Syndrome and three metachronous malignancies. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2002;128:456-60.
- Xuan M, Fang YR, Wato M, Hata S, Tanaka A. Immunohistochemical colocalization of lymphatics and blood vessels in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 2005;34: 334-9.
- Kyzas PA, Stefanou D, Agnantis NJ. COX-2 expression correlates with VEGF-C and lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2005;18:153-60.
- Saad RS, Kordunsky L, Liu YL, Denning KL, Kandil HA, Silverman JF. Lymphatic microvessel density as prognostic marker in colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2006;19:1317-23.
- Naik VR, Jaafar H, Seng CE. Lymphatic channel density in colorectal adenocarcinoma. *Indian J Pathol Microbiol*. 2010;53:12-4.
- Gombos Z, Xu X, Chu CS, Zhang P, Acs G. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res*. 2005;11:8364-71.
- Coşkun U, Akyürek N, Dursun A, Yamaç D. Peritumoral lymphatic microvessel density associated with tumor progression and poor prognosis in gastric carcinoma. *J Surg Res*. 2009;3:1-6.
- Roma AA, Magi-Galluzzi C, Kral MA, Jin TT, Klein E A, Zhou M. Peritumoral lymphatic invasion is associated with regional lymph node metastases in prostate adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2006;19:392-8.
- Huangfu H, Kong W, Gong S, Wang B, Zhang C. Study on relationship between intratumoral lymphangiogenesis of laryngeal squamous cell carcinoma and lymphatic metastasis. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2008;22:385-8.
- Mannelqvist M, Stefansson I, Salvesson HB, Akslen LA. Importance of tumour cell invasion in blood and lymphatic vasculature among patients with endometrial carcinoma. *Histopathology*. 2009;54:174-83.
- Sternberg SS. *Histology for Pathologists*. In: Mills SE, Fecher ER. *Larynx and Pharynx*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997; pp. 391-403.
- Tomik J, Skladzien J, Modrzejewski M. Evaluation of cervical lymph node metastasis of 1400 patients with cancer of the larynx. *Auris Nasus Larynx*. 2001;28:233-40.
- Rodrigo JP, Cabanillas R, Chiara MD, Garcia Pedrero J, Astudillo a, Suarez Nieto C. Prognostic significance of angiogenesis in surgically treated supraglottic squamous cell carcinomas of the larynx. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2009;60: 272-7.

40. Kyzas PA, Stefanou D, Agnantis NJ. COX-2 expression correlates with VEGF-C and lymph node metastases in patients with head and neck squamous celi carcinoma. *Mod Pathol.* 2005;18:153-60.
41. Franchi A, Gallo O, Massi D, Baroni G, Santucci M. Tumor Lymphangiogenesis in Head and Neck Squamous Celi Carcinoma. *Cancer.* 2004;101:973-8.
42. Seppälä M, Pohjola K, Laranne J, Rautiainen M, Huhtala H, Renkonen R, et al. High relative density of lymphatic vessels predict poor survival in tongue squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2016;273:4515-24.
43. Huse JT, Pasha TL, Zhang PJ. D2-40 functions as an effective chondroid marker distinguishing true chondroid tumors from chordoma. *Acta Neuropathol* 2007;113:87-94.
44. Chu AY, Litzky LA, Pasha TL, Acs G, Zhang PJ. Utility of D2-40, a novel mesothelial marker, in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Mod Pathol* 2005;18:105-10.
45. Ordonez NG. D2-40 and podoplanin are highly specific and sensitive immunohistochemical markers of epithelioid malignant mesothelioma. *Hum Pathol.* 2005;36:372-80.
46. Hansen T, Katenkamp K, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Katenkamp D. D2-40 labeling in lymphangiomyoma/lymphangiomyomatosis of soft tissue: further evidence of lymphangiogenic tumor histogenesis. *Virchows Arch.* 2007;450:449-53.
47. Iwakiri S, Nagai S, Katakura H, Takenaka K, Date H, Wada H, et al. D2-40 Positive Lymphatic Vessel Density Is a Poor Prognostic Factor in Squamous Cell Carcinoma Of the Lung. *Ann Surg Oncol* 2009;16:1678-85.