

## Larenksin skuamöz hücreli kanserlerinde vasküler endotelial büyüme faktörünün anjiyogenez ve p53 geni ile ilişkisi

The correlation of vascular endothelial growth factor with angiogenesis and p53 gene in laryngeal squamous cell carcinoma

Dr. Atılay YAYLACI,<sup>1</sup> Dr. Salih ÇAKIR,<sup>1</sup> Dr. Pembegül GÜNEŞ,<sup>2</sup> Dr. Adil Çınar AKKAYNAK,<sup>1</sup>  
Dr. Barış NAİBOĞLU,<sup>1</sup> Dr. Tanju GÖKÇEER<sup>1</sup>

**Amaç:** Anjiyogenez tümör büyümesi ve metastazındaki temel süreçlerden biridir. VEGF (Vascular endothelial growth factor), anjiyogenezin temel düzenleyicisidir ve baş-boyun skuamöz hücreli karsinomunun da içerisinde bulunduğu birçok malignitede saptanmıştır. Fakat, tümör anjiyogenezinde VEGF ekspresyonunun düzenlenmesi tam olarak aydınlatılamamıştır. Bir tümör-süpressör gen olan p53 geninin VEGF ekspresyonunun düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada, p53 geninin VEGF ekspresyonu üzerindeki etkisi incelendi.

**Hastalar ve Yöntemler:** 1999 ve 2002 yılları arasında, total veya parsiyel larenjektomi ameliyatı uygulanan hastalara ait klinik kayıtlar gözden geçirildi. Bunlardan larenks epidermoid karsinomu tanısı konmuş 27 hastanın (27 erkek; ort. yaş 55; dağılım 39-74) parafine batırılmış spesimenleri çalışmaya alındı. Örnek dokularda, VEGF ekspresyonu, p53 gen durumu ve mikrodamar yoğunluğu (MDY) immünohistokimyasal yöntemle incelendi. Değişkenler istatistiksel olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Vascular endothelial growth factor pozitifliği 11 tümörde (%40.7) ve p53 mutasyonları 16 tümörde (%60) saptandı. P53 mutasyonları ile VEGF ekspresyon derecesi arasında bir ilişki bulunamadı ( $p>0.05$ ). İstatistiksel olarak tümör vaskülarizasyonu ile VEGF protein ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki vardı ( $p<0.05$ ). Vascular endothelial growth factor negatif tümörlerde bir mikroskopik alana düşen mikrodamar sayısı ( $29.6\pm 6.6$ ), VEGF pozitif olanlara ( $40.8\pm 15.2$ ) kıyasla daha düşüktü. Ayrıca p53 ve VEGF ekspresyon derecesi ve mikrodamar yoğunluğu ile T evresi, N evresi, tümör yerleşimi ve histolojik evre arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gözlenmedi ( $p>0.05$ ).

**Sonuç:** Vascular endothelial growth factor pozitif tümörlerde MDY'nin yüksek olması larenks karsinomu anjiyogenezinde VEGF'nin önemini ortaya koymaktadır. Fakat sonuçlarımız, p53 geninin VEGF ekspresyonunu değiştirerek anjiyogenez düzenlediği hipotezini desteklemektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Skuamöz hücreli karsinom/genetik/metabolizma; DNA mutasyon analizi; vasküler endotel/metabolizma/patoloji; p53 geni; büyüme madde/genetik/metabolizma; baş boyun tümörleri/genetik/metabolizma/patoloji; immünohistokimya.

**Objectives:** Angiogenesis is a fundamental process in tumour growth and metastasis. VEGF (Vascular endothelial growth factor) is a key regulator of angiogenesis and it has been identified in a wide variety of malignancies, including head and neck squamous cell carcinoma. However, the regulation of VEGF expression in tumour angiogenesis is not well defined. The tumour-suppressor gene p53 has been thought to regulate VEGF. In this study, we examined the role of p53 gene on VEGF expression.

**Patients and Methods:** Clinical records of patients' who underwent total or partial laryngectomy between 1999-2002 years were reviewed. Of these, all paraffin-embedded specimens of 27 patients (27 males; mean age 55 years; range 39 to 74 years) with diagnosis of larynx epidermoid carcinoma were immunostained to evaluate VEGF expression, p53 gene status and microvessel density (MVD). Variables were statistically examined.

**Results:** Vascular endothelial growth factor positive staining was detected in 11 (40.7%) and p53 mutations were identified in 16 (60%) of 27 tumours. No association was detected between p53 mutations and VEGF expression level ( $p>0.05$ ). Statistical analysis gave a clear correlation between the tumour vascularity and the VEGF protein expression ( $p<0.05$ ). Vascular endothelial growth factor negative tumours showed a lower mean number of microvessels per microscopic field ( $29.6\pm 6.6$ ) than VEGF positive tumours ( $40.8\pm 15.2$ ). P53 and VEGF expression levels and MVD did not correlate with the T-stage, N-status, tumour localization and histological grading ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:** The higher microvessel density in VEGF positive tumours supports the importance of VEGF for tumour angiogenesis in laryngeal carcinoma. However, our result does not support the hypothesis of a p53 regulation on the angiogenic process through a VEGF up-regulation.

**Key Words:** Carcinoma, squamous cell/genetics/metabolism; DNA mutational analysis; endothelium, vascular/metabolism/pathology; genes, p53/genetics; growth substances/genetics/metabolism; head and neck neoplasms/genetics/metabolism/pathology; immunohistochemistry.

◆ Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi '2. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Kliniği, 'Patoloji Kliniği (Departments of 'Otolaryngology 2nd and 'Pathology Haydarpaşa Numune Training and Research Hospital) İstanbul, Turkey.

◆ Dergiye geliş tarihi - 10 Kasım 2004 (Received - November 10, 2004). Düzeltme isteği - 11 Mart 2005 (Request for revision - March 11, 2005). Yayın için kabul tarihi - 30 Mart 2005 (Accepted for publication - March 30, 2005).

◆ İletişim adresi (Correspondence): Dr. Atılay Yaylacı. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Kulak Burun Boğaz ve Baş-Boyun Cerrahisi Kliniği, 34668 İstanbul, Turkey. Tel: +90 216 - 414 45 02 Faks (Fax): +90 216 - 336 05 65 e-posta (e-mail): dratilay@yahoo.com

Solid tümörlerdeki büyüme ve metastaz yapma, yeni kan damarı oluşumuna bağlıdır. Anjiyogenez yoğunluğunun birçok insan tümöründe arttığı gösterilmiştir. Anjiyogenez, invazyon ve metastaz potansiyeliyle ilişki göstermektedir. Tümör vaskularizasyonunun gerçekleşmesi tümör hücrelerinden, makrofajlardan ve ekstrasellüler matriksten salınan birçok anjiyogenik peptidlerle gerçekleşir. Bunlar arasında en önemlisi VEGF (vascular endothelial growth factor)'dür. Artmış VEGF ekspresyonu baş-boyun skuamöz hücreli karsinomunun da içerisinde bulunduğu çeşitli insan tümörlerinde gösterilmiştir.<sup>[1]</sup>

Diğer yandan, p53 tümör süpressör genindeki değişikliklerin, baş-boyun skuamöz hücreli karsinomlarındaki en sık genetik değişiklik olduğu bilinmektedir. Nükleer bir fosfoprotein kodlayan p53 tümör süpressör geni hücrel diferansiyasyon, hücre siklusu düzenlenmesi, kontrolsüz hücre proliferasyonunun baskılanması ve tümör gelişmesiyle ilişkilidir. P53, malignensi ve tümör progresyonunun bir belirteçidir. Bazı çalışmalar bu gendeki mutasyonların VEGF ekspresyonuyla düzenlenen anjiyogenezle bağlantılı olduğunu göstermektedir.<sup>[1]</sup>

Vascular endothelial growth factor'ün anjiyogenez ve p53 mutasyonları ile ilişkisi baş-boyun onkolojisinde çok fazla çalışılmamıştır. Bu çalışmada, larenksin skuamöz hücreli karsinomunda VEGF ekspresyonunun mikrodamar yoğunluğu ve p53 mutasyonları ile ilişkisi araştırıldı.

## HASTALAR VE YÖNTEMLER

1999 ve 2002 yılları arasında, total veya parsiyel larenjektomi ameliyatı uygulanan hastalara ait klinik veri kayıtları gözden geçirildi. Bunlardan larenks epidermoid karsinomu tanısı konmuş 27 hastanın (27 erkek; ort. yaş 55; dağılım 39-74) parafine batırılmış spesimenleri çalışmaya alındı. Olguların 11'i (%40.7) supraglottik, 16'sı (%59.3) transglottik yerleşimliydi. Hastalar, AJCC (American Joint Committee on Cancer Staging) tarafından yayınlanan sistem (Mayıs 2002) ile evrelendirildi. Olguların %7'si evre 1; %19'u evre 2; %44'ü evre 3 ve %30'u evre 4 olarak değerlendirildi.

### İmmünohistokimyasal boyama yöntemi

Tüm olguların hematoksilen eozin (HE) boyası ile hazırlanmış kesitleri incelenerek invazyon alanı ve tümör üzerindeki yüzey epiteli içeren kesitlerin parafin blokları saptandı. Seçilen bloklardan kesitler alınarak streptavidin-biyotin kompleks prosedürü-

le boyama yapıldı. Primer antikor olarak, VEGF için Mouse Monoclonal Antibody Ab-7 Clone VG1 (Neomarkers®), CD34 için Mouse Monoclonal Antibody Ab-1 Clone QBEnd/10 (Neomarkers®) ve p53 için Mouse Monoclonal Antibody Ab-5 Clone DO-7 (Neomarkers®) kullanıldı. Kontrol olarak VEGF boyamasında hemanjiosarkom dokusu ve CD34 için tonsil dokusu kullanıldı. Tüm değerlendirmeler ışık mikroskopunda gerçekleştirildi.

### İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler GraphPad Prisma V.3 paket programıyla yapıldı. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerin (ortalama, standart sapma) yanı sıra gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal Wallis testi, ikili grupların karşılaştırmasında Mann-Whitney U-testi, nitel verilerin karşılaştırmalarında ki-kare gerçeklik testi kullanıldı. Sonuçlar, anlamlılık p<0.05 düzeyinde değerlendirildi.

### Vascular endothelial growth factor protein ekspresyonunun değerlendirilmesi

Vascular endothelial growth factor proteini ekspresyonu hem boyanma yoğunluğu hem de pozitif hücre yüzdesi sayılarak değerlendirildi. Boyanma yoksa "0", boyanma yoğunluğu zayıf ise "1", orta ise "2" ve şiddetli ise "3" değeri verilerek skorlandı. Boyanan hücre yoksa "0", boyanan hücre oranı %0-25 arasında ise "1", %25-50 arasında ise "2" ve %50'nin üstünde ise "3" değer verilerek skorlandı. Bir kesitte saptanan boyanma yoğunluğu değeri (A) ve boyanma yüzdesi değeri (B) toplanarak VEGF boyanma indeksi (VBİ: A+B) hesaplandı. Bir spesimenin VBİ'si 3 ve 3'ün üzerinde ise VEGF (+), 3'ün altındaki değerler VEGF (-) olarak değerlendirildi.<sup>[2]</sup>

### P53 Protein ekspresyonunun değerlendirilmesi

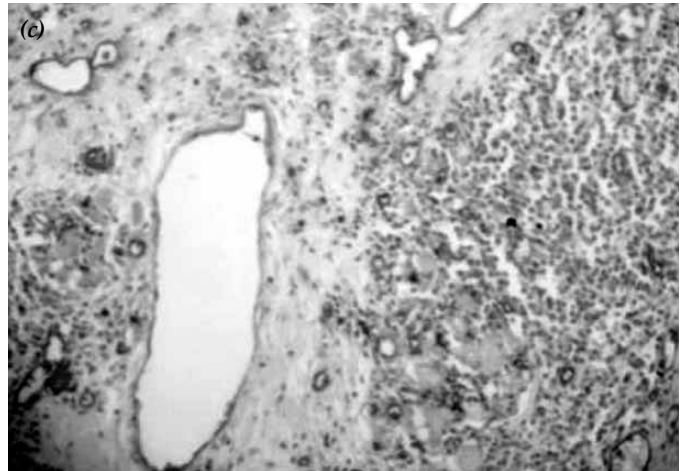
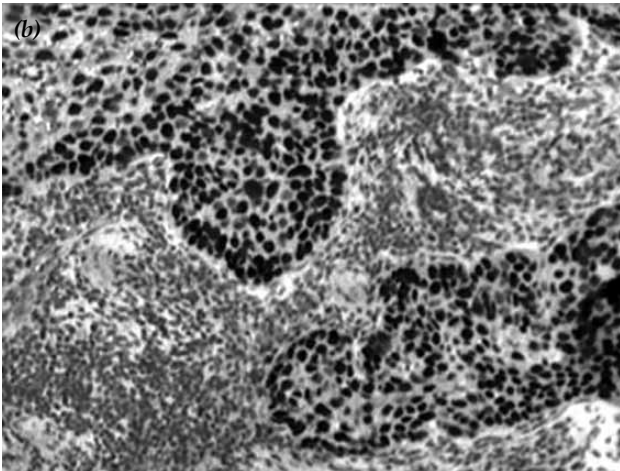
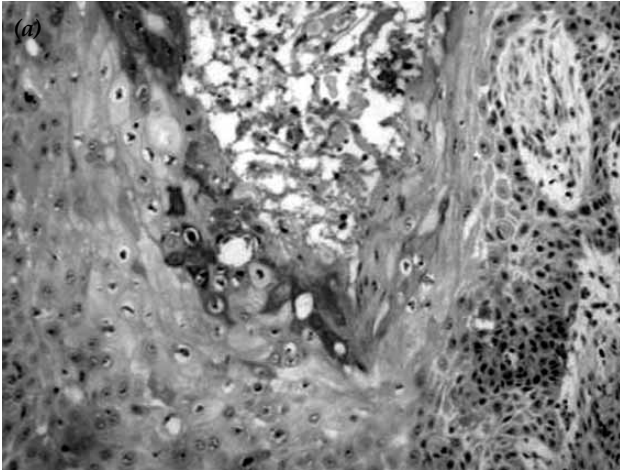
Normal p53 proteini çok kısa bir yarılanma ömrüne sahiptir (6-20 dakika) ve normalde hücre içerisinde konvansiyonel immünohistokimyasal yöntemlerle saptanabilecek miktarlarda bulunmaz. Fakat bu gende oluşan birçok mutasyon, p53 proteininin yarılanma ömrünü altı saate kadar uzatan değişiklikler yaratır ve immünohistokimyasal olarak gösterilmesini olanaklı kılar. Dolayısıyla, p53 proteininin immünohistokimyasal yöntemle saptanması genel olarak p53 mutasyonunu gösterdiği düşünülmektedir.<sup>[3]</sup>

P53 pozitifliği, nükleer boyanmanın tüm tümör parenkimi içindeki oranları belirlenerek kaydedildi.

Değerlendirme yarı-kantitatif yöntemle yapıldı. Nükleusların hiç boyanmadığı olgularda p53 (-) kabul edildi. Nükleusların %10'un altında boyanma gösterenler (+) hafif, %10 ile %50 arası (++) orta ve %50'nin üzerinde boyanma olanlar (+++) şiddetli olarak değerlendirildi.

#### Mikrodamar yoğunluğunun değerlendirilmesi

Mikrodamar yoğunluğu, endotel hücrelerinin immünohistokimyasal yöntemle CD34 (endotel hücre işaretleyicisi) antikorunu kullanılarak incelendi. Her olgu için, tümör içerisindeki stromada vasküler açıdan zengin olduğu belirlenen üç farklı alanda (x4 objektif, x10 oküler, 0.152 mm<sup>2</sup>) mikrodamar sayımı yapıldı. Üç farklı alandaki (x400) MDY hesaplanarak bu değerlerin ortalaması alındı.<sup>[4]</sup>



**Şekil 1** - Larenksin skuamöz hücreli karsinomu olgusunda; (a) İmmünohistokimyasal olarak VEGF ekspresyonunun histopatolojik görünümü. Boyanma ağırlıklı olarak hücre sitoplazmasında görülmektedir. (immünohistokimya x 200). (b) Tümör hücrelerinde tipik p53 immünohistokimya boyanması. Tümör hücre nükleusları p53 proteini ile kahverengi boyanmıştır (immünohistokimya x 200). (c) Malign epitelyal adalar arasında mikrovasküler yapıların endotel hücreleri anti-CD34 proteini ile kahverengi boyanmıştır (immünohistokimya x 100).

## BULGULAR

### Vascular endothelial growth factor immün boyaması

Vascular endothelial growth factor boyanması tümör stromasından çok fokal tümöral bölgelerde yoğunlaşmaktaydı. Boyanma reaksiyonu ağırlıklı olarak her tümör hücresinin sitoplazmasında gözlemlendi (Şekil 1a). Olguların %40.7'si (n=11) VEGF (+) olarak ve %59.3'ü (n=16) VEGF (-) olarak hesaplandı. Vascular endothelial growth factor pozitifliği ile klinikopatolojik parametreler (T ve N evresi dağılımları, tümörün yeri ve histolojik evre) arasında istatistiksel farklılık gözlenmedi (p>0.05).

### P53 İmmün boyaması

P53 immün boyaması hücrelerin nükleuslarında gözlemlendi (Şekil 1b). Olgular p53'ün immünohistokimyasal boyanmasına göre 4 grup altında toplandı. Negatif olgular %40 oranında (n=11), "+" olgular %30 (n=8), "++" olgular %15 (n=4) ve "+++" olgular %15 (n=4) oranında saptandı. P53 ekspresyonu pozitif olan olguların toplam oranı %60 (n=16) olarak hesaplandı. P53 gen durumuyla VEGF ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktu (p>0.05) (Tablo I). Ayrıca p53 ekspresyonu ile klinikopatolojik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar gözlenmedi (p>0.05).

### Mikrodamar yoğunluğu

CD34 antikoruyla kan damarlarının endotel hücrelerinde yoğun bir boyama gözlemlendi (Şekil 1c). Or-

**TABLO I**  
OLGULARIN P53 POZİTİFLİKLERİNE GÖRE VEGF DEĞERLERİ

		VEGF (-)		VEGF (+)		
		n	%	n	%	
P53	(-)	8	50	3	27.3	$\chi^2:3.46$ $p>0.05$
	(+)	4	25	4	36.4	
	(++)	3	18.8	1	9.1	
	(+++)	1	6.3	3	27.3	

VEGF: Vascular endothelial growth factor.

talama MDY 34.2±12.0 olarak bulundu. (en az 15.3 ve en fazla 71.3) VEGF pozitifliğinde MDY ortalamasının istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü ( $t=-2.61$ ,  $p<0.05$ ) (Tablo II) (Şekil 2). P53 pozitifliği artışına göre MDY’de de artış görülmesine karşın bu iki parametre arasında istatistiksel bir anlamlılık gözlenmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo III) (Şekil 3). Mikrodamar yoğunluğu ile klinikopatolojik parametreler arasında istatistiksel olarak bir ilişki yoktu ( $p>0.05$ ).

### TARTIŞMA

Tümör progresyonunun biyolojik davranışı anjiyogenezle yakından ilişkilidir. Dr. Folkman<sup>[5]</sup> “tümör büyümesi anjiyogeneze bağlıdır” fikrini ortaya atmıştır. Yani tümör hücrelerindeki artış tümörü saran kapiller oluşumundaki artışla beraberdir. Gerek primer gerekse metastatik kanserler, besin sağlanması ve artık maddelerin temizlenmesi için gereken kan damarları olmaksızın 1-2 mm çaptan daha büyük bir hacme ulaşamayacaktır.<sup>[6]</sup> Kimyasal olarak karsinogenezin indüklendiği hayvan deneylerinde elde edilen bilgiler ışığında, tümör progresyonunun, bir grup anjiyogenik stimülatör ve inhibitörlerin devre-

**TABLO II**

OLGULARIN VEGF EKSPRESYONUNA GÖRE MDY DEĞERLERİ

	VEGF (-)	VEGF (+)	MW	$p$
MDY	29.6±6.6	40.8±15.2	42	<0.05

VEGF: Vascular endothelial growth factor; MDY: Mikrodamar yoğunluğu; MW: Mann-Whitney U-testi.

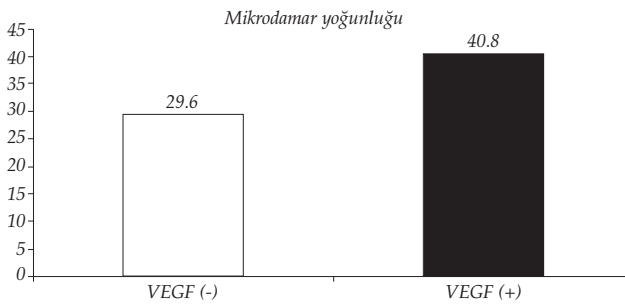
**TABLO III**  
P53 EKSPRESYONU İLE MDY İLİŞKİSİ

P53	Sayı	MDY
(-)	11	29.0±6.8
(+)	8	32.4±5.9
(++)	4	40.1±18.5
(+++)	4	46.3±18.2
KW		2.5
$p$		>0.05

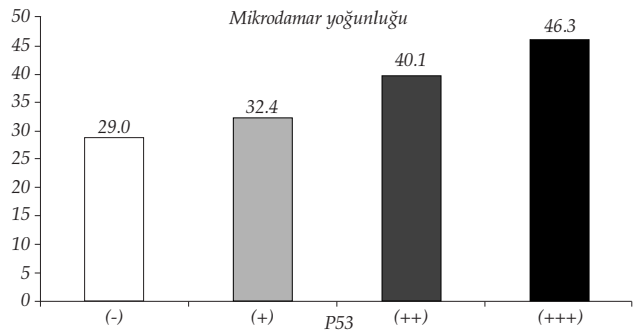
MDY: Mikrodamar yoğunluğu; KW: Kruskal Wallis testi.

ye girmesiyle “prevasküler faz”dan “anjiyogenik faz”a dönüşüne bağlı olduğu saptanmıştır.<sup>[7]</sup>

Vascular endothelial growth factor, glikoprotein yapıda bir endotel hücre büyüme faktörüdür.<sup>[8,9]</sup> Etkisini spesifik olarak endotel hücrelerinde gerçekleştirdiğinden, anjiyogenezde rol oynayan en önemli anjiyogenik peptid olarak kabul edilir.<sup>[10]</sup> İnsan VEGF geni kromozom 6p21.3’te bulunmaktadır.<sup>[11]</sup> Bir genin alternatif bölünmesiyle altı adet VEGF izoformu meydana gelir. Bunlar 121, 145, 165, 183, 189 ve 206 aminoasitten oluşan formlardır ve en çok VEGF 165 ekspresyonu gerçekleşir.<sup>[8,12]</sup> Vascular endothelial growth factor, üç adet tirozin kinaz reseptörüne bağlanır: Flt-1 (VEGFR-1), KDR/Flk-1 (VEGFR-2) ve Flt-4 (VEGFR-3).<sup>[13]</sup> VEGFR-2 endotel



**Şekil 2 - Vascular endothelial growth factor (VEGF) ekspresyonu ile mikrodamar yoğunluğu ilişkisi.**



**Şekil 3 - P53 ekspresyonu ile mikrodamar yoğunluğu ilişkisi.**

hücre mitogenezini, kemotaksisi ve şekil değişikliklerini gerçekleştiren asıl reseptördür.<sup>[14]</sup> Vascular endothelial growth factor, küçük kan damarlarının geçirgenliğini artırarak plazma proteinlerinin damar dışına çıkmasını sağlar ve ekstrasellüler bir matriks meydana getirir. Oluşan bu ortam endotel ve stromal hücrelerin migrasyonuna yol açar. Böylece VEGF dengeli bir anjiyogenez için gerekli ortamı oluşturur.<sup>[15]</sup> Normal anjiyogenezde olduğu gibi tümör anjiyogenezini de ağırlıklı olarak VEGF tarafından gerçekleştirilmektedir.<sup>[16]</sup> Birçok tümör hücresi in vitro olarak VEGF salgılar. İn situ hibridizasyon yöntemiyle akciğer, meme, gastrointestinal sistem, böbrek, idrar kesesi, over, intrakranyal tümörler gibi birçok insan tümörlerinde VEGF mRNA oldukça yüksek oranda bulunmuştur.<sup>[17]</sup>

Vascular endothelial growth factor ekspresyonunun düzenlenmesiyle ilgili çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Hipoksinin VEGF ekspresyonunu indükleyen bir faktör olduğu düşünülmektedir. Bu önemli anjiyogenik faktörün düzenlenmesinde farklı mekanizmalar da olabilir. Düşük dereceli astrositomunun, malign glioblastomaya ilerlemesi p53 mutant hücrelerin klonal yayılmasını içermektedir. Bu tümörlerin yüksek dereceli maligniteye ilerlemesi sırasında neovaskülarizasyonun da arttığı gözlenmiştir.<sup>[18]</sup> Bu bulgular p53 geni ile VEGF üretimi arasında bir ilişki olabileceği fikrini akla getirmiştir. Son zamanlarda yapılan in vitro çalışmalar da p53 geninin, VEGF ekspresyonunda rol oynayabileceğini göstermektedir. Kieser ve ark.<sup>[19]</sup> VEGF mRNA'sını ve proteinini indükleyen aktive protein kinaz C'nin, güçlü bir şekilde "mutant p53" ile sinerjizm gösterdiğini

öne sürmüşlerdir. Mukhopadhyay ve ark.<sup>[20]</sup> ise p53'ün endojen VEGF-mRNA seviyesini baskıladığını fakat aynı etkiyi "mutant p53"ün gerçekleştirmediğini bulmuşlardır. Bu araştırmalar bizi, VEGF ile p53 gen durumu arasında belirgin bir ilişki olup olmadığını araştırmaya yöneltti.

İmmünohistokimyasal yöntemle olgularımızın %40.7'sinde sitoplazmik pozitif VEGF ekspresyonu saptandı. Çeşitli benzer çalışmalarda VEGF pozitiflik oranları Tablo IV'de sunulmuştur.<sup>[1,18,21-25]</sup> P53 ekspresyon oranı ise %60 olarak bulundu ve bu sonuç literatürdeki birçok çalışmayla paralellik göstermektedir.<sup>[1,3,26-31]</sup> İncelememiz sonucu, p53 gen durumu ve VEGF ekspresyonu arasında bir ilişki saptanmadı. Maeda ve ark.<sup>[18]</sup> da oral skuamöz hücreli kansinomlar üzerinde yaptıkları benzer araştırmada bu iki parametre arasında ilişki bulamazken; Riedel ve ark.<sup>[1]</sup> baş-boyun skuamöz hücreli kanserleri üzerinde yaptıkları çalışmada VEGF pozitif tümörlerde artmış p53 mutasyonları saptamış ve p53 gen değişikliklerinin tümör hücrelerindeki VEGF salınımını üzerinde etkisi olduğunu söylemişlerdir.

Anjiyogenezin tümör büyümesinde ve metastazındaki öneminden dolayı birçok tümörde anjiyogenezle ilgili faktörler yoğun olarak araştırılmaktadır. Günümüzde mikrodamarların sayısı, en sık kullanılan neoanjiyogenez parametresidir. Endotel hücrelerine karşı monoklonal antikör (anti-CD34) kullanarak yaptığımız incelemede ortalama MDY'yi 34.2±12.0 olarak bulduk. Literatürdeki birçok çalışmada, baş-boyun skuamöz hücreli kanserlerinde VEGF ekspresyon artışı ile MDY'nin arttığı gözlen-

TABLO IV  
GEÇMİŞ YILLARA AİT BAZI ÇALIŞMALARDAKİ VEGF POZİTİFLİKLERİ

Yazar	Hasta	Tümör bölgesi	Yöntem	VEGF pozitifliği (%)
Riedel ve ark. <sup>[1]</sup>	33	Baş-boyun	IHC	55
Maeda ve ark. <sup>[18]</sup>	45	Oral kavite	IHC	42
Salven ve ark. <sup>[21]</sup>	156	Baş-boyun	IHC	31
Eisma ve ark. <sup>[22]</sup>	63	Baş-boyun	IHC	100
Mineta ve ark. <sup>[23]</sup>	60	Baş-boyun	Western blot	43
			RT-PCR	37
			IHC	58
Neuchrist ve ark. <sup>[24]</sup>	53	Larenks	IHC	79
Burian ve ark. <sup>[25]</sup>	41	Larenks	IHC	79

VEGF: Vascular endothelial growth factor; IHC: İmmünohistokimyal yöntem; RT-PCR: Reverse transcription-polymerase chain reaction.

miştir.<sup>[1,25,32]</sup> Çalışmamızda da VEGF pozitifliğinde MDY ortalamasının istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı ( $p < 0.05$ ). Bu sonuç, VEGF'nin tümör anjiyogenezinde önemli bir anjiyogenik faktör olduğunu desteklemiştir. Araştırmamızda p53 pozitifliği artışına göre MDY'de artış görülmesine karşın, bu iki parametre arasında istatistiksel bir anlamlılık gözlenmemiştir ( $p > 0.05$ ). Hücümenoğlu ve ark.<sup>[33]</sup> da MDY ile p53 ekspresyonu arasında bir ilişki saptayamazken, Gasparini ve ark.<sup>[32]</sup> MDY'nin p53 ekspresyonu ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

Baş-boyun skuamöz hücreli kanserleri üzerinde yapılan çalışmalarda VEGF ekspresyon derecesi, p53 gen değişiklikleri ve mikrodamar yoğunluğu ile temel klinikopatolojik parametreler (T evresi, nodal tutulum, metastaz, histolojik evre, tümör yeri) arasında belirgin bir ilişki bulunamamıştır.<sup>[1,18,21,22,24,25,33-35]</sup> Çalışmamızda da bu parametreler arasında ilişki saptanmadı. Salven ve ark.<sup>[21]</sup> VEGF pozitifliğini hem normal dokuda, hem hiperplastik skuamöz epitelde hem de kanseröz dokuda saptamışlardır. Bu bulgular ışığında VEGF ekspresyonunun invaziv veya agressif tümör tespiti için veya klinikopatolojik parametreler açısından bir kriter olamayacağını, çünkü VEGF'nin normal, hiperplastik ve displastik lezyonlarda da ekspresyon edildiğini söylemişlerdir. Bazı çalışmalarda ise VEGF ekspresyonu lenf nodu metastazı ile ilişki bulunmuş ve bu durumun tümör anjiyogenezini artırdığını, dolayısıyla kan dolaşımına giren tümör hücre sayısının arttığını, bunun da metastazı indirekt olarak hızlandırdığı iddia edilmiştir.<sup>[23,24]</sup> Nodal metastazda en önemli faktörün lenfatik drenaj yolları olması dolayısıyla, larenksin supraglottik, glottik ve subglottik bölgelerdeki lenfatik drenajın farklılıklar göstermesinin bu çelişkili bulguların nedeni olduğunu düşünmekteyiz. P53 ekspresyonu ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmalarda, displastik lezyonlardan invaziv kanserlere uzanan basamaklarda p53 ekspresyonunun artması, p53 aşırı ekspresyonunun larengeal kanserlerin erken bulgularından biri olduğunu göstermektedir.<sup>[3,30]</sup> Bu nedenle p53 gen değişiklikleriyle ileri tümör evresi arasında belirgin ilişki olmadığı görülmüştür.<sup>[32,36]</sup> Gasparini ve ark.<sup>[32]</sup> MDY ile lokorejyonel ve uzak metastazlar arasında yakın ilişki saptamış ve bu sonuçtan yola çıkarak MDY'nin, rutinde immünohistokimyasal olarak kantitatif ölçümüyle solid tümörlerde prognoz tayini yapılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Çalışmamız sonucunda, skuamöz hücreli larenks kanseri örneklerinde p53 ve VEGF ekspresyonları sırasıyla %60 ve %40 olarak bulundu. Vascular endothelial growth factor pozitif örneklerde anlamlı derecede artmış MDY saptandı. P53 gen mutasyonlarında artış ile MDY'de artış olduğu görüldü. Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı olmadığı için p53 mutasyonlarının VEGF salınımının düzenlenmesinde etkisinin olup olmadığı belirlenemedi.

Anjiyogenezin inhibisyonu, yeni antineoplastik tedavilerin gelişmesine yol açan en önemli umut verici stratejilerden biri olarak kabul edilmektedir. Yapılan araştırmalarda anjiyogenez inhibitörlerinin metastazı engellediği ve deneysel tümörü küçültüp, etkin olmayan bir mikrotümöre dönüştürdüğü gözlenmiştir.<sup>[37]</sup> Vascular endothelial growth factor tümör anjiyogenezinde rol oynayan önemli bir anjiyogenik faktördür ve VEGF sinyal sistemi tümör anjiyogenezinin ve metastazın engellenmesi için uygun bir hedefdir. Fakat, VEGF salınımının düzenlenmesiyle p53 gen durumu arasında bir ilişkinin varlığını göstermek için daha geniş çalışmalar gerekmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Riedel F, Gotte K, Schwalb J, Schafer C, Hormann K. Vascular endothelial growth factor expression correlates with p53 mutation and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Acta Otolaryngol* 2000;120:105-11.
2. Shibusu T, Shijubo N, Abe S. Tumor angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in stage I lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 1998;4:1483-7.
3. Poljak M, Gale N, Kambic V, Ferluga D, Fischinger J. Overexpression of p53 protein in benign and malignant laryngeal epithelial lesions. *Anticancer Res* 1996; 16:1947-51.
4. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1-8.
5. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res* 1986;46:467-73.
6. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6.
7. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64.
8. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996;32:2413-22.
9. Conn G, Soderman DD, Schaeffer MT, Wile M, Hatcher VB, Thomas KA. Purification of a glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:1323-7.
10. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial

- growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-39.
11. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996; 93:1493-5.
  12. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 5):853-65.
  13. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-8.
  14. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994;269:26988-95.
  15. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22.
  16. Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res* 1986;46:5629-32.
  17. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999; 77:527-43.
  18. Maeda T, Matsumura S, Hiranuma H, Jikko A, Furukawa S, Ishida T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumour progression and p53 gene status. *J Clin Pathol* 1998;51:771-5.
  19. Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marme D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994;9:963-9.
  20. Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP. Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 1995;55:6161-5.
  21. Salven P, Heikkilä P, Anttonen A, Kajanti M, Joensuu H. Vascular endothelial growth factor in squamous cell head and neck carcinoma: expression and prognostic significance. *Mod Pathol* 1997;10:1128-33.
  22. Eisma RJ, Spiro JD, Kreutzer DL. Vascular endothelial growth factor expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg* 1997;174:513-7.
  23. Mineta H, Miura K, Ogino T, Takebayashi S, Misawa K, Ueda Y, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck squamous cell carcinomas. *Br J Cancer* 2000;83:775-81.
  24. Neuchrist C, Quint C, Pammer A, Burian M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density in squamous cell carcinomas of the larynx: an immunohistochemical study. *Acta Otolaryngol* 1999; 119:732-8.
  25. Burian M, Quint C, Neuchrist C. Angiogenic factors in laryngeal carcinomas: do they have prognostic relevance? *Acta Otolaryngol* 1999;119:289-92.
  26. Ünal A, Özcan M, Albayrak L, Çetin MA, Tuncel Ü, Nalça Y. Larinks kanserlerinde CD34 ve p53'ün klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi. *KBB ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi* 1999;7:104-9.
  27. Gorgoulis V, Rassidakis G, Karameris A, Giatromanolaki A, Barbatis C, Kittas C. Expression of p53 protein in laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia: possible correlation with human papillomavirus infection and clinicopathological findings. *Virchows Arch* 1994;425:481-9.
  28. Caruso ML, Valentini AM. Localization of p53 protein and human papillomavirus in laryngeal squamous lesions. *Anticancer Res* 1997;17:4671-5.
  29. Kropveld A, Slootweg PJ, Blankenstein MA, Terhaard CH, Hordijk GJ. Ki-67 and p53 in T2 laryngeal cancer. *Laryngoscope* 1998;108:1548-52.
  30. Field JK, Pavelic ZP, Spandidos DA, Stambrook PJ, Jones AS, Gluckman JL. The role of the p53 tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 119:1118-22.
  31. Dolcetti R, Doglioni C, Maestro R, Gasparotto D, Barzan L, Pastore A, et al. p53 over-expression is an early event in the development of human squamous-cell carcinoma of the larynx: genetic and prognostic implications. *Int J Cancer* 1992;52:178-82.
  32. Gasparini G, Weidner N, Maluta S, Pozza F, Boracchi P, Mezzetti M, et al. Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55:739-44.
  33. Hücümenoğlu S, Özağar A, Hücümenoğlu M, Erdem G, Şiriner Gİ. Larenks kanserlerinde anjiyogenezin p53, histolojik evre ve nodal metastaz ile korelasyonu. *KBB ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi* 2000;8:129-34.
  34. Kaiser TN, Spector GJ. Tumours of the larynx and laryngopharynx. In: Ballenger JJ, editor. *Diseases of the nose, throat, ear, head and neck*. Pennsylvania: Lea and Febiger, Malvern; 1991. p. 682-746.
  35. Leedy DA, Trune DR, Kronz JD, Weidner N, Cohen JL. Tumor angiogenesis, the p53 antigen, and cervical metastasis in squamous carcinoma of the tongue. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;111:417-22.
  36. Narayana A, Vaughan AT, Gunaratne S, Kathuria S, Walter SA, Reddy SP. Is p53 an independent prognostic factor in patients with laryngeal carcinoma? *Cancer* 1998;82:286-91.
  37. Augustin HG. Antiangiogenic tumour therapy: will it work? *Trends Pharmacol Sci* 1998;19:216-22.