

# Larenks kanserlerinde DNA ploidinin prognostik önemi

## The prognostic significance of DNA ploidy in laryngeal cancers

M. Timur AKÇAM,<sup>1</sup> Abdullah AKKAYA,<sup>1</sup> Salih DEVECİ,<sup>2</sup> Önder ÖNGÜRÜ,<sup>2</sup> Mustafa GEREK,<sup>1</sup> Yalçın ÖZKAPTAN<sup>1</sup>

**Amaç:** Yassı epitel hücreli larenks kanseri olan olgularda DNA ploidinin, tümöre ait özellikler ve histopatolojik parametreler ile ilişkisi ve prognoz üzerine etkisi araştırıldı.

**Hastalar ve Yöntemler:** Çalışmada yassı epitel hücreli kanser nedeniyle tedavi edilip izlenen 44 olgunun cerrahi kesitleri incelendi. Parafin bloklardan elde edilen nükleus süspansiyonlarında görüntü analizi tekniği ile DNA ploidi araştırması yapıldı. DNA ploidinin tümör yerleşimi, evre, diferansiyasyon, keratinizasyon, invazyon derinliği, lenfosit infiltrasyonu, perinöral invazyon, infiltrasyon türü, tümör nekrozu, beş yıllık sağkalım ve yaşam süresi ile ilişkisi değerlendirildi.

**Bulgular:** Olguların %65.9'unda anaploidi, %34.1'inde diploidi belirlendi. Tümör evresi, yerleşimi, diferansiyasyon, keratinizasyon, invazyon derinliği, invazyon türü, lenfosit infiltrasyonu, tümör nekrozu, perinöral invazyon ve lenf nodu tutulumu ile DNA ploidi arasında anlamlı ilişki görülmedi ( $p>0.05$ ). Diploid tümörlerde beş yıllık sağkalım ( $p=0.048$ ) ve genel sağkalım ( $\log \text{rank}=4.40$ ;  $p=0.036$ ) oranları anaploid tümörlere göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Perinöral invazyon varlığı ( $p=0.004$ ) ve invazyon derinliğinin 9 mm'nin üzerinde olması ( $p=0.045$ ) beş yıllık sağkalımı anlamlı düzeyde düşüren diğer faktörler olarak değerlendirildi. Cox regresyon analizi sonucunda DNA ploidi ( $p=0.042$ ) ve perinöral invazyonun ( $p=0.009$ ) sağkalımı etkileyen bağımsız prognostik faktörler oldukları görüldü.

**Sonuç:** Anaploidi varlığı, yassı epitel hücreli larenks kanserli olgularda prognozu olumsuz etkilemektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Anaploidi; karsinom, skuamöz hücreli/patoloji/genetik/radyoterapi; DNA, neoplazm/analiz; diploidi; baş-boyun neoplazmları/genetik; görüntü sitometrisi; larenjeal neoplazmlar/patoloji/genetik; lenfatik metastaz; neoplazm nüksü, lokal; ploidi; prognoz; sağkalım analizi.

**Objectives:** We assessed the relationship between DNA ploidy and histopathologic parameters and its effect on prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the larynx.

**Patients and Methods:** Surgical sections of 44 patients who were treated for squamous cell carcinoma of the larynx were studied. Image cytometry measurements were performed on nuclear suspensions derived from paraffin-embedded sections to determine DNA ploidy patterns. We investigated the relationship between the DNA ploidy status and localization, stage, differentiation, keratinization, depth of tumoral invasion, lymphocytic infiltration, perineural invasion, infiltration pattern, necrosis, and 5-year and overall survival rates.

**Results:** Aneuploidy and diploidy were diagnosed in 65.9% and 34.1%, respectively. No significant relationships were found between DNA ploidy and stage, localization, differentiation, keratinization, depth of invasion, infiltration pattern, lymphocytic infiltration, necrosis, perineural invasion, and lymph node metastasis ( $p>0.05$ ). The five-year ( $p=0.048$ ) and overall ( $\log \text{rank}=4.40$ ;  $p=0.036$ ) survival rates were significantly higher in diploid tumors. The presence of perineural invasion ( $p=0.004$ ) and depth of the invasion exceeding 9 millimeters ( $p=0.045$ ) were significant factors adversely influencing the five-year survival rate. The multivariate Cox regression analysis showed that the DNA ploidy status ( $p=0.042$ ) and the presence of perineural invasion ( $p=0.009$ ) were independent prognostic variables related to decreased survival.

**Conclusion:** Aneuploidy has an adverse effect on the prognosis in squamous cell carcinoma of the larynx.

**Key Words:** Aneuploidy; carcinoma, squamous cell/pathology/genetics/radiotherapy; DNA, neoplasm/analysis; diploidy; head and neck neoplasms/genetics; image cytometry; laryngeal neoplasms/pathology/genetics; lymphatic metastasis; neoplasm recurrence, local; ploidy; prognosis; survival analysis.

◆ Gülhane Askeri Tıp Fakültesi, <sup>1</sup>Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı; <sup>2</sup>Patoloji Anabilim Dalı, Ankara.  
◆ Dergiye geliş tarihi: 1 Temmuz 2002. Düzeltme isteği: 15 Ekim 2002. Yayın için kabul tarihi: 19 Kasım 2002.  
◆ İletişim adresi: Dr. M. Timur Akçam. GATA Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı, 06018 Etilik, Ankara.  
Tel: 0312 - 304 57 01 Faks: 0312 - 321 77 78  
e-posta: takcam@turk.net

◆ Departments of <sup>1</sup>Otolaryngology and <sup>2</sup>Pathology, Gulhane Military Medical Academy, Ankara - Turkey.  
◆ Received: July 1, 2002. Request for revision: October 15, 2002. Accepted for publication: November 19, 2002.  
◆ Correspondence: Dr. M. Timur Akçam. GATA Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, 06018 Etilik, Ankara, Turkey.  
Tel: +90 312 - 304 57 01 Fax: +90 312 - 321 77 78  
e-mail: takcam@turk.net

Larenks kanserlerinin klinik seyrini hastaya, tümöre ve uygulanan tedavi yöntemine ait özellikler etkilemektedir. Uygulanacak tedavi yönteminin belirlenmesi ve prognoz tayini için genellikle TNM sınıflandırması kullanılmaktadır. Ayrıca, tümörün biyolojik davranışı sonucu oluşabilen metastaz ve rekürensler prognozu olumsuz etkileyebilmektedir. Son yıllarda tümör hücrelerinin DNA içeriğini ve hücre kinetiğini inceleyerek tümörün biyolojik davranışını ve prognozla ilişkisini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar önem kazanmıştır.<sup>[1-5]</sup>

Moleküler genetik alanında meydana gelen gelişmeler ışığında, bazı kanserlerdeki kritik erken basamağın "c-onc gen" olarak adlandırılan, belirli yapısal genlerin belirlenmesinde farklılıklar yaratan, kromozomal düzen değişikliklerinin olduğu kabul edilmektedir. Karyotipik anormallikler gözlenen kanserlerde, etkilenen kromozomlar sıklıkla metabolizma ve nükleik asit sentezini düzenleyen genleri içermektedir. Bu tür kromozomlardaki artış veya kayıplar bazı spesifik hücre ürünlerinin miktarında değişikliğe neden olmaktadır. Eğer bu ürünler hücre bölünmesi veya diferansiasyonunda önemli bir rol oynamaktaysa, meydana gelen hücreler proliferatif bir kazanç sağlayabilmektedir. Ayrıca, genetik düzenlemedeki değişiklikler hücrelerde kendiliğinden mutasyon oranını artırabilmekte ve çok daha hızlı ilerleme gösteren bir malign fenotip oluşumuna yol açmaktadır.<sup>[6]</sup> Kırk altı kromozomdan (23 çift) oluşan normal insan somatik hücreleri diploid, bu sayıdan daha fazla veya az kromozom içeren hücreler ise anaploid olarak tanımlanmaktadır. Kantitatif bir DNA analiz yöntemi olan DNA ploidiisi ise interfaz dönemindeki tümör hücrelerinin total DNA içeriğini gösterir. Bazı neoplazmlar için yararlı bir prognostik belirteç olarak kullanılabilir. Başarılı bir hücre bölünmesinde DNA sentezinin oluşabilmesi için bölünme öncesi zaman aralığına ihtiyaç vardır. G1 dönemi denilen bu zaman aralığında DNA içeriği diploiddir. DNA histogramında tek bir G1 piki oluşan tümörler diploid, ek bir G1 pikinin daha görüldüğü tümörler ise anaploid olarak sınıflandırılır. Birçok anaploid tümör sadece tek bir anaploid G1 piki içermesine rağmen, birden fazla bulunduğu şartlarda multidiploid olarak kabul edilir. Bu terimler kromozom sayısı ile eş anlamlı olmamakla birlikte, birçok olguda kromozom sayısı ile hücresel DNA içeriği arasında iyi bir korelasyon vardır.<sup>[6]</sup>

Anaploidi bazı benign durumlarda da bulunmakla birlikte sıklıkla malign hücrelerde görülmektedir. Hücrenin kromatin yapısındaki değişiklik DNA içeri-

ğinin ölçülmesiyle saptanabilir. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden biri olan görüntü analizi (statik sitometri), objektif olarak nükleer büyüklük ve şekil değişikliklerinin belirlenmesini sağlamaktadır.<sup>[3]</sup>

Bu çalışmada, larenks kanserlerinin DNA ploidiisi görüntü analizi yöntemiyle retrospektif olarak değerlendirildi; tanı aşamasında kullanılan preparatlar yeniden değerlendirilerek konvansiyonel histopatolojik parametreler incelendi ve DNA ploidiinin prognoz üzerindeki etkileri araştırıldı.

## HASTALAR VE YÖNTEMLER

Çalışmaya, 1987-1996 yılları arasında kliniğimizde yassı epitel hücreli larenks kanseri tanısı konularak tedavi ve takibi yapılan 44 olgu alındı. Olguların dosyaları retrospektif olarak incelenerek demografik özellikleri, tümör yerleşimi ve evresi, uygulanan tedavi yöntemleri ve sağkalım belirlendi. Olguların 29'unda N<sub>0</sub>, sekizinde N<sub>1</sub>, beşinde N<sub>2</sub>, birinde N<sub>3</sub> boyun vardı. Hiçbir olguda uzak metastaz yoktu. Yirmi sekiz olguda sadece cerrahi tedavi, 16'sında ise cerrahi tedavi ve radyoterapi uygulandı. Sadece cerrahi tedavi uygulanan hastaların sekizinde parsiyel larenjeal cerrahi, 20'sinde total larenjektomi; radyoterapi uygulanan hastaların tümüne total larenjektomi ameliyatı yapıldı. Endolarenjeal kordektomi ameliyatı yapılan iki olgu dışındaki tüm hastalara tek veya çift taraflı fonksiyonel ya da radikal boyun diseksiyonu ameliyatı yapıldı. Sadece radyoterapi uygulanan ve cerrahi sınır pozitifliği bulunan hastalar çalışma dışında bırakıldı.

Çalışma için, Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan olgulara ait parafin bloklarından hazırlanan kesitler incelendi. Olgulara ait hemotoksilen-eosin boyalı preparatlardan tümörü en iyi temsil edenler seçildi; bunların alındığı parafin bloklar morfometrik ölçüm için arşivden çıkarıldı. Bu preparatlardan 30 mikron kalınlığında alınan kesitler aşağıdaki işlemlerden geçirilerek nükleus süspansiyonu elde edildi.

*Nükleus süspansiyonu preparatlarının hazırlanması:* Seçilen bloklardan alınan parafin kesitler tüplere konarak, tüp içine ksilol eklendi. Beş dakika süreyle çalkalan tüp, beş dakika hareketsiz bekletildi. Tüpün dip kısmına çöken dokuların üstünde kalan ksilol dökülerek, aynı işlem tekrar edildi. Tüpe %95'lik etil alkol konarak beş dakika çalkalandı, ardından tüp beş dakika hareketsiz bekletildi. Üstte kalan kısım dökülerek, aynı işlem %95'lik etil alkol ile iki kez daha yapıldıktan sonra %50'lik etil alkol ile tek-

rarlandı. Materyal, tamponlu fosfat solüsyonunda (PBS) 30 dakika bekletildi. Ardından, sıcaklığı 37° C olan etüvde 1 ml %0.5'lik pepsin solüsyonunda 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda dokunun tam parçalanması için solüsyon, en az 15 kez şırınga ile aspire edilerek tüpün içine püskürtüldü. Pepsinin aktivitesini durdurmak için 30 dakika sonra 1 ml PBS eklendi. Süspansiyonlar poly-L-lysine ile kaplanmış yapışkanlı lamalar kullanılarak sitospin ile beş dakika süresince (1000 devir/dakika) santrifüje edildi. Nükleus süspansiyonu yayıldıktan sonra üzerine %10'luk tamponlanmış formalin solüsyonu damlatıldı ve lamalar kurumaya bırakıldı. Hazırlanan nükleus süspansiyonu preparatları Feulgen-Schiff yöntemi ile boyandı.

*Sitometrik değerlendirme:* Tüm ölçümler Zeiss Axioskop ışık mikroskobu üzerine monte edilmiş üç çipli renkli Sony video kameradan alınan görüntüler üzerinde yapıldı. Ölçüm sırasında 63 büyütme 0.17 nümerik açıklığı olan apochromate (immersiyon) objektif kullanıldı. Ölçümler için IBM uyumlu bilgisayarda Windows NT 4.0 işletim sistemi üzerinde çalışan Autocyte QUIC DNA yazılımı kullanıldı. Görüntü analizi ekipmanının kalibrasyonu için sıçan hepatositleri (Roche®) kullanıldı. Çalışılacak alanın bir köşesinden başlanarak tüm tümör ve referans hücrelerinin nükleusları interaktif olarak seçildi ve her bir hücre için optik yoğunluk ve nükleer alan saptandı. İnternal referans olarak lenfositlerin nükleusları seçildi. En az 200 tümör ve 30 lenfosit nükleusu seçildikten sonra sayım işlemi bitirildi. Ezilmiş, parçalanmış veya üst üste binmiş hücreler çalışmaya alınmadı. Görüntü kaydetme işlemi bittikten sonra, olgulara ait görüntüler teker teker göz-

den geçirilerek nükleer membranında aşırı düzensizlik bulunan nükleuslar dejenere kabul edilerek ölçümden çıkarıldı. Daha sonra, internal kontrol için optik yoğunluklarının varyasyon katsayısı %8'den fazla olmayan lenfositler referans hücresi olarak kabul edilerek ploidi kalibrasyonu yapıldı. Referans hücrelerin DNA doruğunun, diploid tümör hücrelerinin doruğundan farklı olduğu durumlarda düzeltme faktörü hesaplandı. Düzeltme faktörünün hesaplanması için diploid alandaki tümör hücrelerinin ortalama DNA indeksi, referans hücrelerinin DNA indeksi ortalamasına bölündü. Sonuçta, olgular için DNA indeks grafikleri elde edildi ve DNA histogramlarını değerlendirmede kullanılan bir yöntem olan Auer sınıflandırmasına<sup>17</sup> göre yorumlanarak gruplara ayrıldı. Tip I histogramda diploid popülasyon gösterildi; diğer histogram tipleri anaploid popülasyonlar için kullanıldı (Şekil 1, 2).

Hastaların daha önce tanı aşamasında kullanılan patoloji preparatları yeniden incelenerek keratinizasyon, diferansiasyon, invazyon derinliği, invazyon türü, perinöral invazyon, lenfosit infiltrasyonu ve tümör nekrozu değerlendirildi.

Tüm analizler SPSS 10.0 (SPSS for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortalaması±standart sapma ya da %95 güven aralığı şeklinde verildi. Sürekli değişkenler için normallik testlerinden sonra, bağımsız grupların karşılaştırılması için t-testi kullanıldı. Nitelik değişkenler arası ilişkiler Pearson ki-kare testi, Fisher kesin ki-kare testi ve Kendall tau-b katsayıları ile araştırıldı. Sağkalım çözümlenmesi için Kaplan-Meier yöntemi kullanıldı. Sağkalım ile ilgili değişkenler arasındaki ilişkiler

TABLO I  
ANAPLOİD VE DİPLOİD TÜMÖRLERİN EVRE, TÜMÖR YERLEŞİMİ VE UYGULANAN TEDAVİ YÖNTEMLERİNE GÖRE DAĞILIMI

		Anaploid		Diploid		$\chi^2$	p
		Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde		
Evre	I, II	12	41.4	9	60.0	1.374	0.342
	III, IV	17	58.6	6	40.0		
Yerleşim	Supraglottik	13	44.8	8	53.3	1.709	0.426
	Glottik	13	44.8	7	46.7		
	Subglottik	3	10.3				
Tedavi	Cerrahi	17	58.6	11	73.3	0.925	0.510
	Cerrahi + radyoterapi	12	41.4	4	26.7		

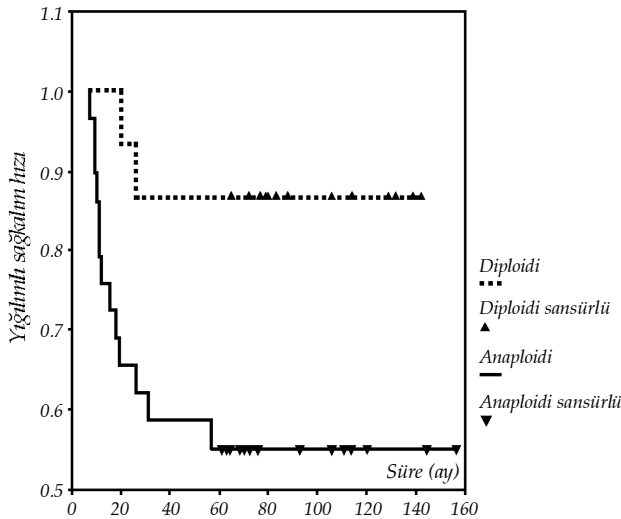


TABLO II  
DNA PLOİDİNİN TÜMÖR HİSTOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİ İLE İLİŞKİSİ

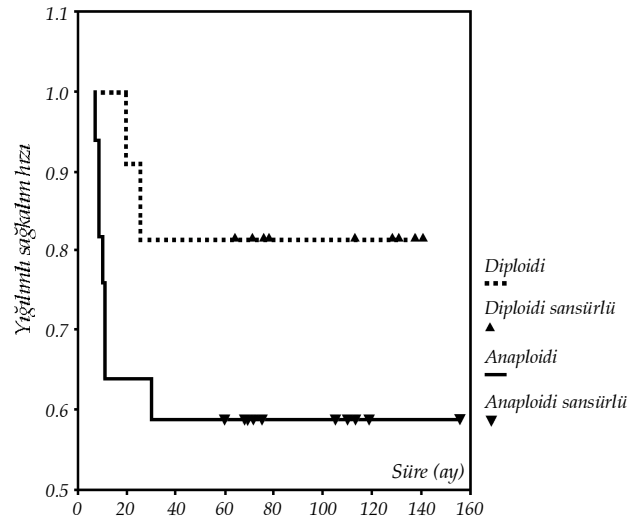
		Anaploid		Diploid		$\chi^2$	p
		Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde		
Diferansiasyon	İyi	4	13.8	6	40.0	4.123	0.127
	Orta	19	65.5	6	40.0		
	Az	6	20.7	3	20		
Keratinizasyon	Nonkeratinize	9	31.0	3	20.0	0.607	0.500
	Keratinize	20	69.0	12	80.0		
İnvazyon derinliği	<9 mm	11	37.9	6	31.3	0.090	1.000
	>9 mm	18	62.1	10	66.7		
İnfiltrasyon türü	İnfiltratif	22	75.9	9	60.0	1.332	0.514
	İtici	4	13.8	4	26.7		
	Mikst	3	10.3	2	13.3		
Lenfosit infiltrasyonu	İyi	12	41.4	10	66.7	4.380	0.112
	Orta	13	44.8	2	13.3		
	Kötü	4	13.8	3	20.0		
Perinöral invazyon	Var	15	51.7	6	40.0	0.545	0.535
	Yok	14	48.3	9	60.0		
Tümör nekrozu	Var	5	17.2	3	80.0	0.051	1.000
	Yok	25	82.8	12	20.0		

ransiye tümörlerin %32'sinde, az derecede diferansiye tümörlerin %66.7'sinde lenfadenopati saptanırken iyi derecede diferansiye tümörlerde lenfadenopati görülmedi. Perinöral invazyon bulunan tümörlerin %52.4'ünde, bulunmayanların %13.1'ünde lenfadenopati saptandı. Lenfadenopati görülme oranı

nın, perinöral invazyon bulunan ( $\chi^2=7.830$ ,  $p=0.009$ ) ve az derecede diferansiye olan ( $\chi^2=9.705$ ,  $p=0.008$ ) tümörlerde anlamlı olarak daha fazla olduğu belirlendi. İnvazyon derinliği ( $\chi^2=0.004$ ,  $p=1.000$ ), invazyon türü ( $\chi^2=0.328$ ,  $p=0.849$ ), lenfosit infiltrasyonu ( $\chi^2=0.619$ ,  $p=0.734$ ) ve tümör nekrozu ( $\chi^2=1.490$ ,



Şekil 3 - Anaploid ve diploid tümörlü olgularda yığılımlı sağkalım eğrileri.



Şekil 4 - Sadece cerrahi tedavi uygulanan olgularda DNA ploidiye göre yığılımlı sağkalım eğrileri.

p=0.242) ile lenfadenopati varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı.

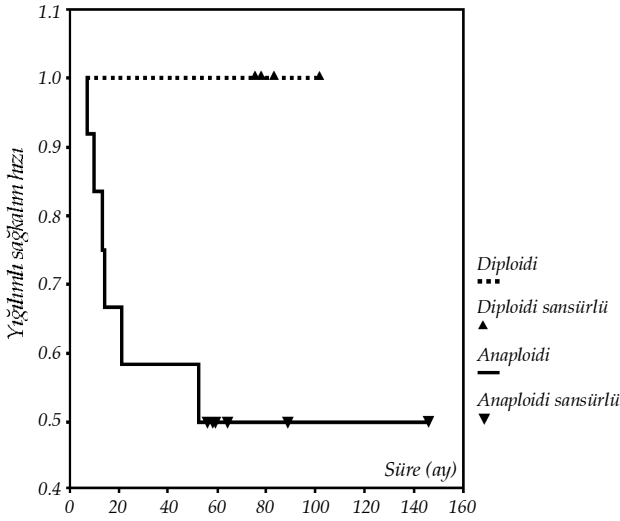
Beş yıllık sağkalım oranının, tümörlerin DNA ploidi özelliğine göre ve diğer histopatolojik özelliklerine göre dağılımı Tablo III'te sunuldu. Diploid tümörlerde beş yıllık sağkalım oranı anlamlı derecede daha yüksek bulundu ( $\chi^2=4.364$ , p=0.048). Perinöral invazyon varlığı ( $\chi^2=9.501$ , p=0.004) ve invazyon derinliğinin 9 mm'nin üzerinde olması ( $\chi^2=5.216$ , p=0.045), beş yıllık sağkalımı anlamlı olarak azaltan diğer faktörler olarak değerlendirildi.

Kaplan-Meier sağkalım analizi yapıldığında, yığılımlı sağkalım oranı anaploid tümörlerde 57. ayda %55, diploid tümörlerde 65. ayda %86 olarak saptandı (Şekil 3). Ortalama sağkalım süresi anaploid tümörlerde 94.72 ay (dağılım 69.38-120.07 ay), diploid tümörlerde 126.13 ay (dağılım 105.65-146.61 ay) bulundu. Bu iki grubun sağkalım süreleri karşılaştırıldığında, aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı ol-

duğu görüldü (Log rank=4.40; p=0.036). Cerrahi uygulanan anaploid olgularda yedinci ayda %94.12 olan sağkalım olasılığının 31. ayda %58.82'ye düştüğü; buna karşılık diploid olgularda sağkalım olasılığının 20. ayda %90.91 ve 26. ayda %81.82 olduğu görüldü. Sadece cerrahi tedavi uygulanan olgularda ortalama sağkalım süreleri ise anaploidi grubu için 97.53 ay (dağılım 63.66-131.40 ay), diploidi grubu için 120.36 ay (dağılım 93.23-147.50 ay) bulundu (Şekil 4). Cerrahi tedavi ve radyoterapinin birlikte uygulandığı anaploid olgularda 12. ayda %91.67 olan sağkalım olasılığının 57. ayda %50'ye düştüğü gözlemlendi. Anaploid olgularda ortalama sağkalım süresi 84.75 ay (50.13-119.37 ay) bulundu. Diploid olguların tümünün sansürlenmiş olması nedeniyle sağkalım olasılığı hesaplanamadı (Şekil 5). Uygulanan tedavi yöntemleri ile birlikte tabakalandırılarak yapılan sağkalım analizinde, diploid ve anaploid tümörlerde sağkalım süreleri arasında anlamlı farklılık bulundu (Log rank=4.21; p=0.040).

TABLO III  
DNA PLOİDİ VE TÜMÖR HİSTOPATOLOJİK ÖZELLİKLERİ İLE 5 YILLIK SAĞKALIM ARASINDAKİ İLİŞKİ

		5 yıllık sağkalım			
		Sayı	Yüzde	$\chi^2$	p
DNA ploidi	Diploidi	13	86.7	4.364	0.048
	Anaploidi	16	55.2		
Diferansiasyon	İyi	8	80.0	5.547	0.062
	Orta	18	72.0		
	Az	3	33.3		
Keratinizasyon	Keratinize	20	62.5	0.607	0.500
	Non-keratinize	9	75.0		
İnvazyon derinliği	<9 mm	14	87.5	5.216	0.045
	>9 mm	15	53.6		
İnvazyon türü	İnfiltratif	19	61.3	2.032	0.362
	İtici	7	87.5		
	Mikst	3	60.0		
Lenfosit infiltrasyonu	İyi	14	63.6	0.149	0.928
	Orta	10	66.7		
	Kötü	5	71.4		
Perinöral invazyon	Var	9	42.9	9.501	0.004
	Yok	20	87.0		
Tümör nekrozu	Var	5	62.5	0.051	1.000
	Yok	24	66.7		



Şekil 5 - Cerrahi ve radyoterapinin uygulandığı olgularda DNA ploidiye göre yığılımlı sağkalım eğrileri.

Cox regresyon analizi sonucunda sağkalım ile diğer değişkenler arasındaki ilişki anlamlı bulundu ( $\chi^2=8.867$ ;  $p=0.003$ ). Regresyon modeline katılan değişkenlerden DNA ploidi ( $p=0.042$ ) ve perinöral invazyonun ( $p=0.009$ ) bağımsız prognostik faktörler olduğu görüldü.

## TARTIŞMA

Larenks kanserlerinde DNA ploidi incelemesi, diğer organ tümörlerine paralel olarak 1980'li yıllarda yoğunlaşmaya başlamıştır. DNA içeriğinin niceliksel analizi flow sitometri ve görüntü analizi yöntemleri ile yapılabilmektedir. Flow sitometri tekniği ile 20.000-30.000 gibi çok sayıda hücrenin analizi kısa sürede yapılabilirken, görüntü analizi tekniğinde çok daha kısıtlı sayıda (150-200) hücre analiz edilmektedir. Görüntü analizi yönteminde hücrelerin patoloj tarafından seçilerek belirlenmesi, nekrotik ve tümör olmayan hücrelerin inceleme dışında bırakılmasını sağlamaktadır.<sup>[3,8]</sup> Her iki yöntem de baş ve boyun bölgesi yassı epitel hücreli karsinomalarında DNA ploidi hakkında birbirine yakın doğrulukta sonuç vermekle birlikte, flow sitometri tekniğinde normal hücreler ender olarak anaploidiyi maskeleyebilmektedir.<sup>[3]</sup>

Yassı epitel hücreli larenks kanserlerinde anaploidi oranı çeşitli çalışmalarda %25-66 arasında değişmektedir.<sup>[2,9,10]</sup> Çalışmamızda larenks yassı epitel hücreli kanserlerinde %65.9 oranında anaploidi saptanmıştır. Supraglottik tümörlerin %61.9'unda, glottik tümörlerin ise %65'inde anaploidi görülmeyle birlikte, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Subglottik tümörlerin tümünde anaploidi saptanmış; ancak olgu sayısı yetersiz olduğundan değerlendirme dışı bırakılmıştır. Danic ve ark.<sup>[2]</sup> ile Cooke ve ark.,<sup>[11]</sup> supraglottik tümörlerde anaploidi oranını daha yüksek bulurlarken; Toffoli ve ark.<sup>[12]</sup> supraglottik tümörler ve glottik tümörler arasında anaploidi oranı bakımından anlamlı bir farklılık görmemişlerdir. Tümör yerleşimi ile DNA ploidi arasındaki ilişki belirsizliğini halen sürdürmektedir.

Primer tümör boyutunun ve evresinin anaploidi ile yakından ilişkili değişkenler olduğu, evre III ve IV larenks kanserlerinde anaploidinin anlamlı olarak daha fazla görüldüğü bildirilmiştir.<sup>[4]</sup> Çalışmamızda da evre III ve IV olgularda anaploidi daha sık gözlenmesine rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı yönde bulunmamıştır.

DNA ploidiinin prognoza olan etkisi meme, over, mesane, akciğer kanserleri gibi bazı solid tümörlerde iyi bilinmesine rağmen larenks kanserlerinde henüz tam olarak netlik kazanmamıştır.<sup>[6]</sup> Anaploidi, radyoterapi ile tedavi edilen T1 glottik tümörlerde, tedavi sonrası nüks görülen tümörlerde %80, nüks gözlenmeyen tümörlerde ise %38 oranlarında bildirilmiştir.<sup>[13]</sup> Walter ve ark.<sup>[5]</sup> DNA ploidi ile radyoterapiye duyarlılık ilişkisinde, radyoterapiye dirençli olan tümörlerin tümünün anaploid, duyarlı olan tümörlerin ise büyük ölçüde diploid olduğunu bildirmişlerdir. Kaplan ve ark.<sup>[14]</sup> 46 baş-boyun yassı epitel hücreli karsinomda yaptıkları çalışmada, DNA anaploidisini tümör boyutu ile ilişkili bulmuşlar ve prognostik önem taşıdığını belirtmişlerdir. Rua ve ark.<sup>[10]</sup>  $N_0$  ve  $N_1$  tümörleri birlikte değerlendirdiklerinde diploid ve diploid olmayan tümörlerin sağkalım bakımından farklılık göstermediğini; ancak sadece  $N_0$  tümörler değerlendirildiğinde anaploidinin prognozu azalttığını belirtmişlerdir. Danic ve ark.<sup>[2]</sup> larenks kanserlerinde DNA ploidi ile sağkalım arasındaki ilişkiyi tek değişkenli istatistiksel analizlerde anlamlı bulmuşlar; çok değişkenli istatistiksel analizlerde anlamlı ilişki gözlememişlerdir. Cooke ve ark.<sup>[11]</sup> anaploid ve diploid tümörlerin sağkalım oranları arasında anlamlı bir farklılık belirleyememişlerdir. Goldsmith ve ark.<sup>[15]</sup> anaploid tümörlerde prognozun daha iyi olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda DNA ploidi, larenjeal kanserli olgularda beş yıllık sağkalım ve yığılımlı sağkalım süresi bakımından anlamlı bir faktör olarak görülmüştür.

Hücrel diferansiyasyonun azlığı bazı çalışmalar-da kötü prognozla ilişkili bulunurken,<sup>[16,17]</sup> bazı çalış-malarda ilişkili bulunmamıştır.<sup>[1,18]</sup> Bryne ve ark.<sup>[19]</sup> tümörün genel histolojik diferansiyasyonundan çok, t ü m ö r-normal doku sınırındaki diferansiyasyonun prognoz ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir. Ç a l ı ş m a m ı z d a , t ü m ö r diferansiyasyonu azaldıkça beş yıllık sağkalım oranının azaldığı gözlenmiş; ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşma-mıştır. İyi derecede diferansiye tümör belirlenen 10 hastanın dördünde (%40), orta derecede diferansiye tümörlü 25 hastanın 19'unda (%76), az derecede di-feransiye tümörlü dokuz hastanın altısında (%67) anaploidi saptanmıştır. Az sayıda olgunun değer-lendirildiği benzer bir çalışmada ise anaploidi iyi derecede diferansiye tümörlerin %57'sinde, orta de-recede diferansiye tümörlerin %18'inde, az derecede diferansiye tümörlerin %25'inde saptanmıştır.<sup>[3]</sup> Bazı tümörlerde iyi diferansiyasyon bulunması halinde daha çok diploidi, az diferansiyasyon olması halinde ise anaploidi bulunduğu ve tümör diploidisinin, di-feransiyasyonun belirlenmesi için kullanılan nükleer derecelendirme sistemine bir alternatif olabileceği bildirilmiştir.<sup>[6]</sup> Ancak, çalışmamızda tümör diferan-siyasyonu ile DNA ploidi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bu nedenle, larenks kanserlerinde DNA ploidi çalışmasının, hücre diferansiyasyonunu belirlemeye yönelik nükleer derecelendirme sistemi-ne alternatif olamayacağı görüşündeyiz.

Çalışmamızda, larenks kanserlerinde boyunda lenf nodu tutulumu ile tümörün DNA ploidi ara-sında bir ilişki kurulamamıştır. Bu sonuç, Myers ve ark.nın<sup>[4]</sup> 91 hastada bildirdikleri sonuçlarla uyum göstermektedir. Lenf nodu tutulumunu, az derecede diferansiye ve perinöral invazyon bulunan tümör-lerde belirgin olarak daha fazla oranda saptadık.

Eksizyon sınırına daha yakın ve normal dokuya yıldız şeklinde infiltrasyon yapan tümörlerde yük-sek oranda nüks ve daha kötü prognoz bildirilmiştir.<sup>[20]</sup> Çalışmamız sonucunda ise invazyon türü ile DNA ploidi, beş yıllık sağkalım ve lenf nodu metas-tazı arasında bir ilişki kurulamamıştır.

İnvazyon derinliği, çeşitli baş ve boyun bölgesi tümörlerinde boyun lenf nodu metastazı olasılığının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.<sup>[21-24]</sup> Yılmaz ve ark.<sup>[24]</sup> larenks kanserli 93 olguda, invazyon derin-liğinin 3.25 mm veya daha üzerinde olduğu olgular-da servikal lenf nodu metastazını anlamlı derecede daha fazla bulmuşlardır. Çalışmamızda invazyon

derinliği ile lenf nodu metastazı arasında ilişki kuru-lamamasına karşın, bu sonuç, yapılan diğer çalış-malardan farklı olarak, 9 mm'den az ve çok invazyon derinliği bulunan hasta gruplarının karşılaştırılmış olmasından kaynaklanmış olabilir. İnvazyon derin-liği 5 mm'den az olan hasta sayısındaki yetersizlik, istatistiksel bir karşılaştırma yapabilmek için 9 mm'den az invazyon derinliği bulunan hastaların tek bir grup olarak değerlendirilmesini zorunlu kıl-mıştır. İnvazyon derinliği ile DNA ploidi arasında da ilişki saptanmamıştır.

Perinöral invazyon, yassı epitel hücreli karsi-nomda lokal nüksü ve bölgesel lenf nodu metastazı sıklığını artıran, sağkalımı azaltan bir faktör olarak kabul edilmektedir.<sup>[25-29]</sup> Perinöral invazyon varlığın-da tedavinin radikal olması, radyoterapi ve kemote-rapinin cerrahi tedaviye eklenmesi gerektiği ileri sü-rülmektedir.<sup>[30]</sup> İleri evre tümörlerde perinöral invaz-yon artış göstermekte ve perinöral invazyon bulu-nan tümörlerde lenf nodu metastazı görülme olasılı-ğı artmaktadır. Perinöral invazyon ile DNA ploidi arasında ise bir ilişki saptanmamıştır. Histopatolojik incelemede perinöral invazyon saptanan hastaların boyun lenf nodu metastazı açısından daha dikkatli değerlendirilmesi gerektiğini düşünüyoruz.

Günümüzde moleküler biyoloji ve immünhisto-kimya alanlarındaki gelişmeler ışığında, DNA plo-idinin yanı sıra p53, Ki67, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) gibi tümörün biyolojik özelliklerine dayanan prognostik faktör arayışları hız kazanmış-tır.<sup>[31-40]</sup> Larenks kanserlerinde yüksek p53 oranları bildirilmiştir.<sup>[32,33]</sup> Basut ve ark.<sup>[34]</sup> p53 geni ile tümör evresi, diferansiyasyonu, servikal lenf nodu varlığı arasında bir ilişki bulunmadığını belirtmişlerdir. Spafford ve ark.<sup>[35]</sup> p53 varlığının, geç evre tümörler-de metastaz durumuna bakmaksızın kötü prognoz-la birliktelik gösterdiğini; Ki67'nin ise larenks kan-serlerinde prognostik değerinin olmadığını bildir-mişlerdir. Yüksek PCNA indeksinin lenf nodu me-tastazı ve kötü prognozla ilişki gösterdiği belirtil-miştir.<sup>[36,37]</sup> Saraç ve ark.<sup>[38]</sup> PCNA indeksinin tümör proliferasyonunu, gizli lenf nodu metastazını ve prognozu tahmin etmede tümör derecesinden çok daha önemli bir değişken olduğunu; bu nedenle la-renjeal karsinomada uygulanacak tedaviyi belirle-mede ve prognozun değerlendirilmesinde kullanıla-bileceğini ileri sürmüşlerdir. Liu ve ark.<sup>[39]</sup> hastalısız sağkalım ve toplam sağkalım süreleri ile PCNA ve Ki67 arasında ters ilişki bulunduğunu göstermişler-dir. Golusinski ve ark.<sup>[40]</sup> larenjeal kanserli hastalarda



DNA ploidinin onkoprotein p53 ve Ki67 ile anlamlı ilişkide olduğunu, PCNA ile anlamlı ilişki göstermediğini belirterek, PCNA'nın proliferasyon gösteren hücrelerin değerlendirilmesinde yararının olmadığını savunmuşlar; hastalığın biyolojisinin değerlendirilmesinde yararlanılabilecek testler olarak DNA ploidi, Ki67 ve p53'ü göstermişlerdir.

İncelenen faktörler regresyon analizi ile değerlendirildiğinde, DNA ploidi ve perinöral invazyonun prognoz bakımından bağımsız faktörler oldukları saptanmıştır. Bu çalışmada DNA ploidinin larenks kanserlerinde önemli bir prognostik faktör olduğu bulunmasına karşın, yapılan diğer çalışmalarda farklı sonuçların elde edilmiş olması kesin bir hüküm ileri sürmeyi engellemektedir. Bu konuda daha kesin görüşler, ancak tümörlerin yerleşim yerleri, evreleri, lenfadenopati varlığı, uygulanan tedavi yöntemleri gibi noktaların standart hale getirildiği büyük hasta gruplarıyla yapılacak çalışmalarla ortaya konabilecektir.

#### KAYNAKLAR

- Burgio DL, Jacobs JR, Maciorowski Z, Alonso MM, Pietraszkiewicz H, Ensley JF. DNA ploidy of primary and metastatic squamous cell head and neck cancers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;118:185-7.
- Danic D, Milicic D, Prgommet D, Leovic D. Prognostic factors in carcinoma of the larynx: relevance of DNA ploidy, S-fractions and localization of the tumour. *J Laryngol Otol* 1999;113:538-41.
- Gandour-Edwards RF, Donald PJ, Yu TL, Howard RR, Teplitz RL. DNA content of head and neck squamous carcinoma by flow and image cytometry. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:294-7.
- Myers EN, Sampedro A, Alvarez C, Martinez J, Suarez C, Alonso-Guervos M, et al. Cell proliferation activity and kinetic profile in the prognosis and therapeutic management of carcinoma of the pharynx and larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;121:476-81.
- Walter MA, Peters GE, Peiper SC. Predicting radioresistance in early glottic squamous cell carcinoma by DNA content. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991;100:523-6.
- Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW. Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumours. *J Clin Pathol* 1984;37:961-74.
- Auer GU, Caspersson TO, Wallgren AS. DNA content and survival in mammary carcinoma. *Anal Quant Cytol* 1980;2:161-5.
- Milroy CM, Ferlito A, Devaney KO, Rinaldo A. Role of DNA measurements of head and neck tumors. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:801-4.
- Feinmesser R, Freeman JL, Noyek A. Flow cytometric analysis of DNA content in laryngeal cancer. *J Laryngol Otol* 1990;104:485-7.
- Rua S, Comino A, Fruttero A, Cera G, Semeria C, Lanzillotta L, et al. Relationship between histologic features, DNA flow cytometry, and clinical behavior of squamous cell carcinomas of the larynx. *Cancer* 1991; 67:141-9.
- Cooke LD, Cooke TG, Forster G, Helliwell TR, Stell PM. Cellular DNA content and prognosis in surgically treated squamous carcinoma of the larynx. *Br J Cancer* 1991;63:1018-20.
- Toffoli G, Franchin G, Barzan L, Cernigoi C, Carbone A, Sulfarò S, et al. Brief report: prognostic importance of cellular DNA content in T1-2N0 laryngeal squamous cell carcinomas treated with radiotherapy. *Laryngoscope* 1995;105:649-52.
- Westerbeek HA, Mooi WJ, Hilgers FJ, Baris G, Begg AC, Balm AJ. Ploidy status and the response of T1 glottic carcinoma to radiotherapy. *Clin Otolaryngol* 1993;18:98-101.
- Kaplan AS, Caldarelli DD, Chacho MS, Bruce DR, Hutchinson J, Conway S, et al. Retrospective DNA analysis of head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1986;112:1159-62.
- Goldsmith MM, Cresson DS, Postma DS, Askin FB, Pillsbury HC. Significance of ploidy in laryngeal cancer. *Am J Surg* 1986;152:396-402.
- Stell PM. Prognostic factors in laryngeal carcinoma. *Clin Otolaryngol* 1988;13:399-409.
- Davis RK. Prognostic variables in head and neck cancer. Tumor site, stage, nodal status, differentiation, and immune status. *Otolaryngol Clin North Am* 1985;18:411-9.
- Rudoltz MS, Benammar A, Mohiuddin M. Prognostic factors for local control and survival in T1 squamous cell carcinoma of the glottis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;26:767-72.
- Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 1992;166:375-81.
- Kirita T, Okabe S, Izumo T, Sugimura M. Risk factors for the postoperative local recurrence of tongue carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 1994;52:149-54.
- Fukano H, Matsuura H, Hasegawa Y, Nakamura S. Depth of invasion as a predictive factor for cervical lymph node metastasis in tongue carcinoma. *Head Neck* 1997;19:205-10.
- Onerci M, Yilmaz T, Gedikoglu G. Tumor thickness as a predictor of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the lower lip. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122:139-42.
- Sarioglu T, Yilmaz T, Sungur A, Gursel B. The effect of lymphocytic infiltration on clinical survival in cancer of the tongue. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1994;251:366-9.
- Yilmaz T, Hosal S, Gedikoglu G, Turan E, Ayas K. Prognostic significance of depth of invasion in cancer of the larynx. *Laryngoscope* 1998;108:764-8.
- Byers RM, O'Brien J, Waxler J. The therapeutic and prognostic implications of nerve invasion in cancer of the lower lip. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1978;4:215-7.
- Cottel WI. Perineural invasion by squamous-cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol* 1982;8:589-600.
- Frierson HF Jr, Cooper PH. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the lower lip. *Hum Pathol* 1986; 17:346-54.
- Goepfert H, Dichtel WJ, Medina JE, Lindberg RD,

- Luna MD. Perineural invasion in squamous cell skin carcinoma of the head and neck. *Am J Surg* 1984; 148:542-7.
29. Soo KC, Carter RL, O'Brien CJ, Barr L, Bliss JM, Shaw HJ. Prognostic implications of perineural spread in squamous carcinomas of the head and neck. *Laryngoscope* 1986;96:1145-8.
30. Kaya S, Ataman M, Sennaroğlu L, Gököz A. Baş boyun kanserlerinde perinöral invazyonun prognoza etkileri. *Turkish J Cancer* 1992;22:21-4.
31. Erdamar B, Suoglu Y, Kiyak E. Current trends and future prospects in biological markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. [Article in Turkish] *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg* 2002;9:301-3.
32. Anwar K, Nakakuki K, Imai H, Naiki H, Inuzuka M. Over-expression of p53 protein in human laryngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1993;53:952-6.
33. Boag G, Lee CS, Charalambous D, Rode J. p53 expression in laryngeal carcinoma. *Pathology* 1993;25:394-7.
34. Basut O, Erisen L, Coskun H, Erturk A, Tezel I. The relationship between mutant p53 and clinicopathologic parameters in squamous cell carcinoma of the head and neck. [Article in Turkish] *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg* 2000;7:42-5.
35. Spafford MF, Koeppe J, Pan Z, Archer PG, Meyers AD, Franklin WA. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;122: 627-32.
36. Sapçı T, Filizel F, Şensu S, Karavuş A, Karavuş M, Ertek S, ve ark. Larenksin skuamoz hücreli karsinomlarında "proliferating cell nuclear antigen" in prognostik önemi. *KBB Baş Boyun Cerrahisi Dergisi* 1995; 3:173-81.
37. Dobros W, Rys J, Niezabitowski A, Olszewski E. The prognostic value of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the advanced cancer of larynx. *Auris Nasus Larynx* 1998;25:295-301.
38. Sarac S, Ayhan A, Hosal AS, Kaya S. Prognostic significance of PCNA expression in laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;124:1321-4.
39. Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Chatelain B, Remacle M, et al. Prognostic value of cell proliferation markers, tumour suppressor proteins and cell adhesion molecules in primary squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx [Published online: 24 July 2002]. *Eur Arch Otorhinolaryngol* DOI 10.1007/s00405-002-0512-8. Available from: URL: <http://link.springer.de/link/service/journals/00405/contents/tfirst.htm>.
40. Golusinski W, Olofsson J, Szmeja Z, Biczysko W, Krygier-Stojalowska A, Kulczynski B. A comprehensive analysis of selected diagnostic methods with respect to their usefulness in evaluating the biology of neoplastic cells in patients with laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999;256:306-11.