

KLİNİK ARAŞTIRMA

Skumöz hücreli larenks kanserinde Ki-67 ve p53 ekspresyonu

Expression of Ki-67 and p53 in laryngeal squamous cell carcinomas

Dr. Çağlar ÇALLI,¹ Dr. Aylin ÇALLI,² Dr. Ercan PINAR,¹ Dr. Semih ÖNCEL,¹ Dr. Fırat DEMİRTAŞOĞLU¹

Amaç: Bu çalışmada, skuamöz hücreli larenks karsinomlarında p53 tümör baskılayıcı gen ve Ki-67 antijen ekspresyonunun diğer konvansiyonel prognostik parametrelerle ilişkisi değerlendirildi.

Hastalar ve Yöntemler: Skumöz hücreli larenks karsinomu tanılı 37 hastanın (34 erkek, 3 kadın; ort. yaş 57.2; dağılım 35-75) ameliyat örneklerinde Ki-67 ve p53 ekspresyonu araştırıldı. İmmünperoksidaz tekniği ve monoklonal antikorlar kullanılarak, hastalara ait rutin fikse frozen ve parafine gömülü doku kesitleri immünhistokimyasal analiz yöntemiyle değerlendirildi.

Bulgular: Histolojik derecelendirmede tümörler beş olguda iyi, 24 olguda orta, sekiz olguda ise kötü diferansiye olarak belirlendi. On olguda lenf nodu metastazı izlenirken, vasküler invazyon dokuz, sinir invazyonu 15 olguda görüldü. p53 pozitifliği 15 olguda (%40.5), Ki-67 ekspresyonu ise 31 olguda (%83.8) saptandı. Ki-67 ekspresyonu lenf nodu metastazı olanlarda daha yüksek oranda saptanırken, ilişki anlamlı bulunmadı. Ki-67 ve p53 ekspresyonu ile konvansiyonel prognostik faktörler arasındaki ilişki anlamlı bulunmadı (p>0.05).

Sonuç: Çalışma verileri p53 ve Ki-67'nin skuamöz hücreli larenks karsinomlarında prognostik parametrelerle ilişkisi olmadığını göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Karsinom, skuamöz hücreli; gen, p53; baş-boyun neoplazileri; immünhistokimya; Ki-67 antijen; larenks neoplazileri; tümör belirteci, biyolojik.

Objectives: The aim of this study was to investigate the expression of p53 tumor suppressor gene and Ki-67 antigen in laryngeal squamous cell carcinoma and its relation to conventional prognostic indicators.

Patients and Methods: p53 and Ki-67 expressions were evaluated in surgical specimens of 37 patients (34 males, 3 females; mean age 57.2 years; range 35 to 75 years) with squamous cell carcinoma of the larynx. Immunohistochemical studies were performed in routinely fixed and paraffin-embedded tissue sections using the immunoperoxidase technique and monoclonal antibodies.

Results: The tumors were well-, moderately, and poorly differentiated in 5, 24, and 8 patients, respectively. Ten patients had lymph node metastasis, nine patients had vascular invasion, and 15 patients had neural invasion. Ki-67 and p53 nuclear staining was detected in 31 (83.8%) and 15 (40.5%) tumors, respectively. The incidence of Ki-67 expression was higher in patients with lymph node metastasis, but this did not exhibit significance. Neither p53 nor Ki-67 immunopositivity was in significant association with conventional clinicopathological parameters (p>0.05).

Conclusion: These data indicate that p53 and Ki-67 are not correlated with conventional prognostic parameters in squamous cell carcinoma of the larynx.

Key Words: Carcinoma, squamous cell; genes, p53; head and neck neoplasms; immunohistochemistry; Ki-67 antigen; laryngeal neoplasms; tumor markers, biological.

* İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, ¹3. KBB Hastalıkları Kliniği, ²Patoloji Laboratuvarı (Departments of ¹3rd Otolaryngology and ²Pathology, İzmir Atatürk Training and Research Hospital), İzmir, Turkey.

* Dergiye geliş tarihi - 19 Nisan 2004 (Received - April 19, 2004). Düzeltme isteği - 21 Ağustos 2004 (Request for revision - August 21, 2004). Yayın için kabul tarihi - 16 Aralık 2004 (Accepted for publication - December 16, 2004).

* İletişim adresi (Correspondence): Dr. Çağlar Çallı. Ankara Cad., No: 137/31, 35030 Bornova, İzmir, Turkey. Tel: +90 232 - 343 66 19 Faks (Fax): +90 232 - 243 48 48 e-posta (e-mail): caglarcalli@hotmail.com

* 27. Türk Ulusal Otorinolarenoloji ve Baş-Boyun Cerrahisi Kongresi'nde sözel bildiri olarak sunulmuştur, 4-9 Ekim 2003, Antalya. (Presented at the 27th National Congress of Turkish Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, October 4-9, 2003, Antalya, Turkey).

Larenks karsinomları baş-boyun kanserlerinin en sık rastlanılan tipidir ve tüm kanserlerin yaklaşık %2'sini oluşturur.^[1] Benzer klinik ve histomorfolojik görünümüne rağmen farklı klinik gidiş gösteren larenks karsinomlarının sözkonusu olması nedeniyle, prognostik faktör olarak kabul edilen TNM (tümör, nod, metastaz) sınıflaması ve histolojik derecelendirme gibi faktörlerin günümüzde prognoz belirlemede yetersiz kaldığı düşünülmektedir.^[2] Moleküler biyolojide hızlı gelişime paralel olarak sellüler onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunun ve proliferasyon belirleyicilerinin larenks karsinomlarında karsinogenez ve prognoza etkilerini araştıran çalışmalar hızla artmaktadır.^[3]

Tümör baskılayıcı gen olan p53'ün skuamöz hücreli baş-boyun kanserlerinin patogeneğinde çok önemli rolü olduğu ve olguların yaklaşık %60'ında anormal p53 akümüasyonu belirtilmektedir.^[4] P53 tümör baskılayıcı geni 17. kromozomun kısa kolunda yerleşimlidir, p53 gen ürününün intrasellüler yoğunluğu düşük ve yarı ömrü kısa olduğu için normal hücrelerde göstermek güçtür.^[5] Olağanüstü koşullarda p53 konsantrasyonu yükselir, hücrede proliferasyon durur ve hücre S fazına giremez, G1 fazında durur ya da apoptozis sonucu yok olur. P53 geni aynı zamanda genetik stabiliteyi de sağlar. P53 protein fonksiyonunun mutasyona bağlı olarak bozulduğu durumlarda hücrede büyüme ve çoğalmaya ait baskı ortadan kalkar, malignite görülme olasılığı artar.^[6,7] P53 gen ürününü intrasellüler yoğunluğu düşük ve yarı ömrü çok kısa olduğu için normal hücrelerde göstermek güçtür; p53 geni inaktive olduğunda hücrede transformasyona ve tümör gelişimine neden olarak bir onkogen gibi davranır. Mutasyona uğrayan gen ürününün yarı ömrü çok daha uzun olduğundan immünohistokimyasal olarak göstermek mümkün olmaktadır. Mutasyona bağlı normal p53 gen aktivitesinin kaybına larenks karsinomlarında sık rastlanılır.^[4,5]

Hücre proliferasyon belirteci olarak görev gören ve nonhiston tipte nükleer bir protein olan Ki-67, hücre siklusunun G1, S, G2 ve M fazlarında ekspres olurken, G0 fazında saptanmaz. Bu nedenle, neoplastik ve normal dokularda proliferen hücre fraksiyonunu göstermek amacıyla Ki-67 nükleer proteini ile reaksiyona giren parafine gömülü dokularda çalışan monoklonal antikor, MIB-1, kullanılmaktadır.^[8] Pek çok neoplazmda, MIB-1/Ki-67 ile ifade edilen proliferasyon indeksi bağımsız prognostik öneme sahiptir.^[9,10] Larenks karsinomlarında

da; son yıllarda yapılan çalışmalarda Ki-67 proliferasyon indeksi ile survi arasında belirgin ilişki olduğu belirtilmektedir.^[11,12] Birçok çalışmada ise survi ile ilişkisinin olmadığına işaret edilmektedir.^[13,14]

Çalışmamızda larenks karsinom olgularının parafin bloklarından elde ettiğimiz kesitlerde; immünohistokimyasal olarak p53 tümör supresör gen varlığının ve Ki-67 proliferatif aktivitesinin diğer konvansiyonel prognostik parametrelerle ilişkisini araştırdık.

HASTALAR VE YÖNTEMLER

Çalışmaya, Aralık 2001-Haziran 2003 tarihleri arasında İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi 3. Kulak Burun Boğaz Kliniği'nde ameliyat edilen ve larenks skuamöz hücreli karsinom tanısı alan 37 hasta (34 erkek, 3 kadın; ort. yaş 57.2; dağılım 35-75) alındı. Olguların frozen ve rutin olarak fikse edilmiş parafin bloklarından elde edilen kesitleri yaş, cins, tümör çapı, histolojik grade, stage, lenfositik infiltrasyon, mitoz gibi çeşitli prognostik parametreler ışığında yeniden incelendi.

İmmünohistokimyasal değerlendirmede; tüm boyamalar için %10'luk tamponlanmış formalinde tespit edilmiş ve parafine gömülmüş frozen ve parafine gömülmüş dokulardan, 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak hazırlandı. Otuz yedi olguya ait tümöral dokulardan seçilen örneklerle immünohistokimyasal olarak streptavidin-biotin-peroxidase tekniği ile Ki-67 (Neomarker, hazır dilüe) ve p53 (Dako, hazır dilüe) boyaması yapıldı. Boyamaların güvenilirliği açısından kontrol dokularda da nükleer koyu kahverengi boyanma pozitif sayıldı. P53 için + (%5-10), ++ (%11-50), +++ (%51-100) olarak derecelendirilip, nükleer boyanma gösteren tüm olgular (+) olarak yorumlandı. İstatistiksel değerlendirmede; %5'in üzerindeki boyanma pozitif, %5'in altındaki boyanma negatif olarak gruplandırıldı. Ki-67 değerlendirmesinde ise %10'un üzerindeki boyanma pozitif olarak kabul edildi. P53 ve Ki-67 boyaları ile tümör çapı, lenf nodu tutulumu, vasküler invazyon, sinir invazyonu, enflamatuvar yanıt varlığı, mitoz ve diferansiyasyon arasındaki ilişkinin araştırılmasında Ki-Kare (Chi-Square) testi, p53 ve Ki-67'ye göre yaş ortalamalarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U-Test kullanıldı. Vasküler invazyon, sinir invazyonu, enflamatuvar yanıt, lenf nodu tutulumu ve tümör çapı değişkenlerinin hepsinin birlikte p53 ve Ki-67 üzerine etkisi Univariate Analysis of Variance ile araştırıldı. Tüm bu analizler SPSS 11.0 for Windows istatistik paket prog-

TABLO I
Ki-67 VE P53 (+) OLAN OLGULARIN PROGNOTİK FAKTÖRLERE GÖRE
TÜM OLGULARLA KARŞILAŞTIRILMASI

	Tüm olgular (37 olgu)	Ki-67 (31 olgu)	p53 (15 olgu)
Diferansiyasyon			
İyi	5	5	2
Orta	24	19	11
Kötü	8	7	2
Vasküler invazyon	9	8	2
Nöral invazyon	15	11	6
Lenf nodu metastazı	10	10	6

ramunda %95 güvenle yapıldı. İstatistiksel olarak $p \geq 0.05$ anlamsız; $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

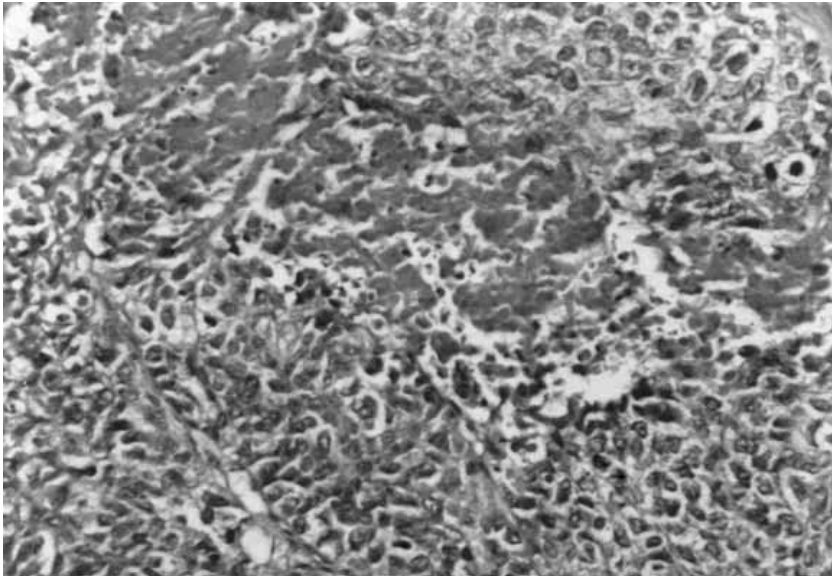
BULGULAR

Larenks skuamöz hücreli karsinom nedeniyle cerrahi tedavi uygulanan 37 hastanın histolojik derecelendirmesinde beş olgu iyi, 24 olgu orta, sekiz olgu ise kötü differansiye olarak belirlendi. On olguda lenf nodu metastazı izlenirken, vasküler invazyon dokuz, sinir invazyonu 15, enflamatuvar yanıt ise 30 olguda mevcuttu (Tablo I). Histopatolojik kesitler 10 büyük büyütme alanında (10 BBA) 20 ve üzeri mitoz kriter alınarak incelendiğinde 20'sinde yüksek mitoz oranı saptandı (Şekil 1). On beş olguda (%40.5) p53 pozitifliği (Şekil 2), 31 olguda ise (%83.8) Ki-67 ekspresyonu (Şekil 3) saptandı (Tablo I). P53 protein ekspresyonu ile klinikopatolojik para-

metreler arasındaki anlamlı değildi. Ki-67 proliferasyon indeksi ile özellikle lenf nodu metastaz varlığı arasında oransal bir ilişki olmasına rağmen bu ilişki anlamlı bulunmadı. Diğer klinikopatolojik parametrelerin Ki-67 ile yapılan korelasyon analizlerinde de anlamlı bir sonuç çıkmadı ($p > 0.05$).

TARTIŞMA

Günümüzde klasik klinikopatolojik kriterler ile bir tümörü tanımlamak bu tümörün biyolojik davranışını ve prognozunu belirlemede yetersiz kalmaktadır. Aynı evredeki ve klinik özellikleri ortak olan larenks skuamöz hücreli karsinomlu olguların yaşam süreleri arasında farklılıklar olmaktadır.^[2] Bu farklılığın önceden saptanması başka ek prognostik parametrelerin kullanılması ile mümkündür. Bu amaçla prognostik değerinin yüksek olduğu bilinen



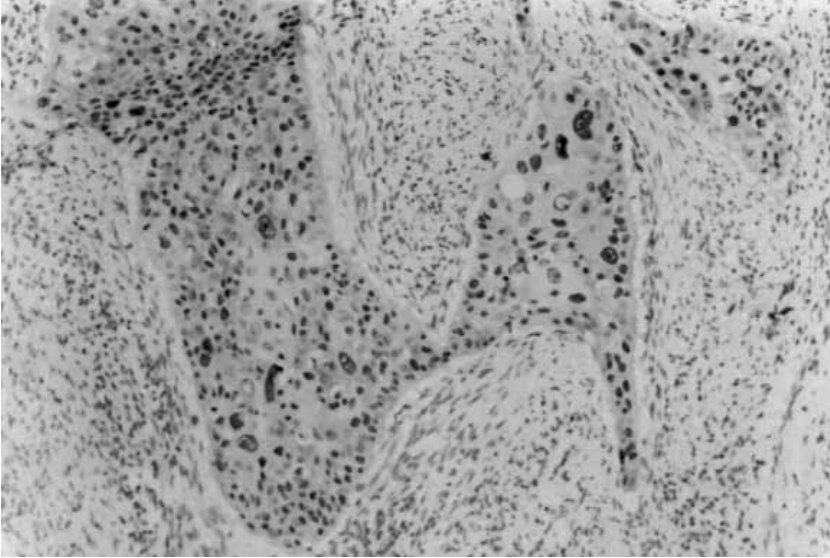
Şekil 1 - Kötü differansiye skuamöz hücreli karsinomda mitoz.

linik faktörlere ve histolojik dereceye ek olarak tümörün proliferatif aktivitesini değerlendirmek, olguların prognozunun belirlenmesinde ve uygun tedavinin saptanmasında yönlendirici olmaktadır. Bu nedenle son yıllarda larenks karsinomlarında prognostik faktör arayışı içinde birçok tümör supresör gen, onkogen, ve proliferasyon hız belirleyicilerle ilgili çalışmalar sürmektedir.^[3]

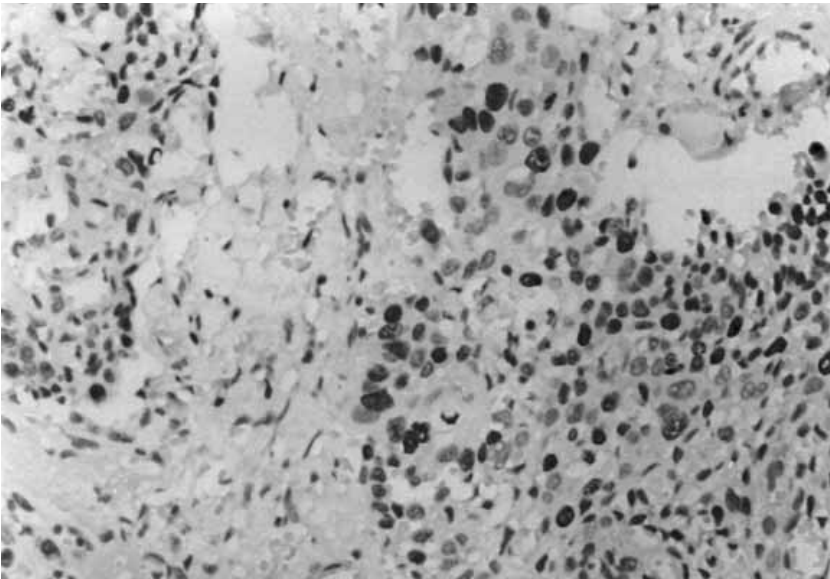
Son yıllarda p53 gen değişikliklerinin değerlendirilmesi baş-boyun kanserlerinde özellikle de larenks kanserlerinde hız kazanmıştır.^[11-14] Bizim çalışmamızda da p53 ekspresyonu Sittel ve ark.nın^[14] 47, Lera ve ark.nın^[12] 57 larenks karsinomlu olguda yaptıkları çalışmalardaki oranlara benzer şekilde %40.5

olarak bulundu. Dolcetti ve ark.^[15] ile Kazkayası ve ark.nın^[16] çalışmalarında lenf nodu metastazı ile p53 overekspresyonu arasındaki ilişkinin anlamlı olduğu belirtilmektedir. Fakat bizim çalışmamızda diğer birçok çalışmada olduğu gibi p53 ekspresyonu ile konvansiyonel prognostik parametreler (yaş, tümör çapı, histolojik differansiyasyon, lenf nodu metastazı, mitoz) arasında anlamlı ilişki saptanmadı.^[4,12,14,17-19]

Ki-67, G0 hariç hücre siklusunun tüm fazlarında (G1, S, G2, M) ekspresyonu yapılan bir nükleer proliferasyon antigenidir.^[9] Bu nedenle Ki-67, hücre proliferasyon aktivitesini değerlendirmede yararlı bir biyolojik belirleyici olarak kabul edilir ve tümör dokularının belli evrelerdeki davranışı hakkında bilgi verir.



Şekil 2 - Larenks skuamöz hücreli karsinomda yoğun p53 pozitifliği.



Şekil 3 -Yüksek Ki-67 proliferasyon indeksi.

Son yıllarda baş-boyun kanserlerinde proliferasyon oranını tanımlamak için MIB-1 monoklonal antikoru kullanılmaktadır.^[10,13,14,17,20-22] Ki-67 ekspresyonunun yaşam süresi ile ilişkili olduğunu belirten az sayıda araştırma olmasına rağmen çoğu çalışmada ilişkili olmadığı vurgulanmaktadır.^[10,13,20,21] Welkoborsky ve ark.nın^[22] yaptıkları 40 olguluk çalışmada yüksek Ki-67 indeksinin saptandığı tümörlerin rekürrens gösterdiğine işaret edilmekte ve Ki-67 proliferasyon indeksi ile yaşam süresinin ilişkili olduğu belirtilmektedir.

Lera ve ark.nın^[12] yaptıkları larenks karsinomlu 57 olguluk çalışmada Ki-67 ekspresyonu ile tümörün patolojik özellikleri arasında ilişki olmadığına işaret edilmektedir. Bizim çalışmamızda da Lera ve ark.nın^[12] ve diğer araştırmacıların bulgularına benzer şekilde prognostik patolojik kriterlerle Ki-67 indeksi arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.^[21,22]

Sonuç olarak, çalışmamızın darlığı ve olgularımızın heterojenitesi Ki-67 indeksi ve p53 tümör süpresör geninin larenks karsinomlarında prognostik önemini tam olarak belirtmemizi engelledi. Ancak daha geniş çalışmalarda, prospektif ve immunohistokimyasal yöntemlerin standardizasyonu ile yapılmış çalışmalarla kesin sonuçlara ulaşılabileceğine inanıyor ve bulgularımızı bu çalışmalardan birinin ilk verileri olarak değerlendiriyoruz.

KAYNAKLAR

1. Batsakis JG. Tumors of head and neck: Clinical and pathological considerations. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1979. p. 574.
2. Goldsmith MM, Pillsbury HC. Pathologic and cytometric indicators of biologic behaviour in laryngeal cancer. In: Silver CE, editor. Laryngeal cancer. 1st ed. New York: Thieme Medical Publishers; 1991. p. 27-32.
3. Greenman J, Homer JJ, Stafford ND. Markers in cancer of the larynx and pharynx. Clin Otolaryngol 2000;25:9-18.
4. Maestro R, Dolcetti R, Gasparotto D, Doglioni C, Pelucchi S, Barzan L, et al. High frequency of p53 gene alterations associated with protein overexpression in human squamous cell carcinoma of the larynx. Oncogene 1992;7:1159-66.
5. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. Nature 1991;351:453-6.
6. Birrell GW, Ramsay JR. Induction of p53 protein by gamma radiation in lymphocyte lines from breast cancer and ataxia telangiectasia patients. Br J Cancer 1995;72:1096-101.
7. Xia F, Wang X, Wang YH, Tsang NM, Yandell DW, Kelsey KT, et al. Altered p53 status correlates with differences in sensitivity to radiation-induced mutation and apoptosis in two closely related human lym-

8. phoblast lines. Cancer Res 1995;55:12-5.
8. Söylemezoğlu F, Ayhan A. Tümör prognozunda hücre proliferasyonunun morfolojik ve immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi. Patoloji Bülteni 1995;12:66-9.
9. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. Semin Cancer Biol 1990;1:199-206.
10. Masuda M, Iki M, Takano Y, Asakura T, Noguchi S, Ikeda I, et al. Prognostic significance of Ki-67 labeling index in urothelial tumors of the renal pelvis and ureter. J Urol 1996;155:1877-80; discussion 1880-1.
11. Lavertu P, Adelstein DJ, Myles J, Secic M. P53 and Ki-67 as outcome predictors for advanced squamous cell cancers of the head and neck treated with chemoradiotherapy. Laryngoscope 2001;111(11 Pt 1):1878-92.
12. Lera J, Lara PC, Perez S, Cabrera JL, Santana C. Tumor proliferation, p53 expression, and apoptosis in laryngeal carcinoma: relation to the results of radiotherapy. Cancer 1998;83:2493-501.
13. Hirvikoski P, Kumpulainen E, Virtaniemi J, Johansson R, Haapasalo H, Marin S, et al. p53 expression and cell proliferation as prognostic factors in laryngeal squamous cell carcinoma. J Clin Oncol 1997;15:3111-20.
14. Sittel C, Eckel HE, Damm M, von Pritzbuer E, Kvasnicka HM. Ki-67 (MIB1), p53, and Lewis-X (LeuM1) as prognostic factors of recurrence in T1 and T2 laryngeal carcinoma. Laryngoscope 2000;110:1012-7.
15. 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.
16. Kazkayasi M, Hucumenoglu S, Siriner GI, Hucumenoglu M. Over-expression of p53 and c-erbB-2 oncoproteins in laryngeal carcinoma. Eur Arch Otorhinolaryngol 2001;258:329-35.
17. Nadal A, Campo E, Pinto J, Mallofre C, Palacin A, Arias C, et al. p53 expression in normal, dysplastic, and neoplastic laryngeal epithelium. Absence of a correlation with prognostic factors. J Pathol 1995;175:181-8.
18. Klatka J. Prognostic value of the expression of p53 and bcl-2 in patients with laryngeal carcinoma. Eur Arch Otorhinolaryngol 2001;258:537-41.
19. Salam MA, Crocker J, Morris A. Over-expression of tumour suppressor gene p53 in laryngeal squamous cell carcinomas and its prognostic significance. Clin Otolaryngol 1995; 20:49-52.
20. Nylander K, Nilsson P, Mehle C, Roos G. p53 mutations, protein expression and cell proliferation in squamous cell carcinomas of the head and neck. Br J Cancer 1995;71:826-30.
21. Roland NJ, Caslin AW, Bowie GL, Jones AS. Has the cellular proliferation marker Ki67 any clinical relevance in squamous cell carcinoma of the head and neck? Clin Otolaryngol 1994;19:13-8.
22. Welkoborsky HJ, Hinni M, Dienes HP, Mann WJ. Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading, and proliferation markers. Ann Otol Rhinol Laryngol 1995;104:503-10.