

## LARİNKS KANSERLERİNDE CD34 VE P53'ÜN KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ

### THE RELATIONSHIP OF CD34 AND P53 WITH CLINICOPATHOLOGIC PARAMETERS IN LARYNGEAL CANCER

**Dr. Adnan ÜNAL (\*), Dr. Müge ÖZCAN (\*), Dr. Levent ALBAYRAK (\*\*),  
Dr. Mehmet Ali ÇETİN (\*), Dr. Ümit TUNCEL (\*), Dr. Yıldırım NALÇA (\*)**

**ÖZET:** Günümüzde, tümörlerin klinik davranışı üzerinde etkileri olduğu ileri sürülen genetik ve immünolojik markerler larinks kanserli hastaların evrelendirilmesi veya tedavisinde göz önüne alınmamaktadır. Biz, immünohistokimyasal olarak CD34 ve p53'ü larinks kanserli 54 hastada çalıştık ve bunların lenf nodu metastazı, tümör rekürrensi, histopatolojik diferansiyasyon derecesi ve lenfoplazmositer inflamasyon ile ilişkilerini araştırdık. p53 hastaların %22.2'sinde pozitifken, CD34 %25.9'unda pozitifti. Hastaların 7.4'ünde hem CD34, hem de p53 pozitifti. Lenf nodu metastazı olan 10 hastanın hiçbirinde p53 ve/veya CD34 pozitif değildi. Bu hastaların 8'inde (%80), tümör çevresinde kuvvetli lenfoplazmositer inflamasyon bulunduğunu gözledik. Bu sonuçlara göre, eğer primer tümör CD34 ve p53 negatifse ve tümör çevresinde zayıf lenfoplazmositer reaksiyon varsa, lenfatik metastaz riskinin az olabileceğini öne sürebiliriz. p53'ün orta derecede veya kötü diferansiye tümörlerde daha yüksek oranda pozitif olduğunu tespit ettik, iki hasta dışında, CD34 ve/veya p53 pozitif olan bütün hastalarda (%90.2) tümöral inflamasyonun zayıf derecede pozitif olduğunu tespit ettik ( $p<0.01$ ). Rekürrensi olan sadece 2 hastamız (%3.7) vardı ve bunların ikisi de p53 ve CD34 negatifti. Nüks eden hasta sayısı az olduğu için istatistik test uygulanamadı.

**Anahtar Sözcükler:** CD34, p53, larinks neoplasmları, karsinoma

**SUMMARY:** Currently, the genetic and immunologic markers, which are suggested to have an influence on tumoural behaviour are not taken into consideration in staging and treatment of laryngeal carcinoma. We studied expression of CD34 and p53 immunohistochemically, and investigated their relation to nodal metastasis, tumoural recurrence, histopathological grading, and lymphoplasmocytic infiltration of the tumour on 54 patients with laryngeal carcinoma. p53 was positive in 22.2% of the patients while CD34 was positive in 25.9%. in 7.4% they were co-expressed. None of the 10 patients with nodal metastasis were positive for either p53 or CD34. We noted strong lymphoplasmocytic inflammation surrounding the tumour in 8 of these 10 patients (80%). We may suggest that if the primary tumour is p53 and CD34 negative, and there is a weak inflammatory reaction surrounding the tumour, lymphatic metastasis may be unlikely. it was noted that the p53 was positive in a higher proportion of the patients with moderately or poorly differentiated tumours. In all but two CD34 and/or p53 positive patients (90.9%), inflammation was weakly positive ( $p<0.01$ ). We had only 2 patients who recurred in the neck (3.7%). Both of these patients had p53 positive and CD34 negative tumours. Since the number of patients who recurred was small, statistical analysis could not be performed.

**Key Words:** CD34, p53, laryngeal neoplasms, carcinoma

### GİRİŞ

Larinks kanserleri tüm baş-boyun kanserlerinin 1/5'ini oluşturur ve bunların %90-95'i skuamöz hücreli karsinomdur. Larinks kanserlerinin tedavisi özellikle ilerlemiş vakalarda cerrahidir. Tedavinin başarı-

sı daha çok tümörün primer ve boyun bölgesindeki (lokoregionel) kontrolü ile ilgilidir. Uzak metastaz da özellikle ilerlemiş vakalarda tedavinin başarısızlığında önemli bir faktördür. Larinks kanserli hastaların prognozunun önceden tahmini, hem hastanın bilgilendirilmesi hem de tedavi planının belirlenmesi açısından büyük önem taşır. Baş boyun cerrahları TNM sistemini bu amaçla kullanmaktadırlar ancak evresi aynı olup, aynı tedavi uygulanan hastalarda prognoz farklı olabilmektedir. Bu hastalarda tümör büyüklüğü

(\* ) Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. KBB Kliniği - ANKARA

(\*\* ) Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü - ANKARA

ve yayılımı aynı olsa da, tümörün biyolojik ve immünolojik davranımı ile hastanın immünolojik durumu farklı olabilir. Son zamanlarda tümör immünolojisi ve biyolojisi üzerinde yapılan çalışmalarla, hastalığın bu boyutuna daha geniş bir çerçeveden bakılmaya çalışılmaktadır.

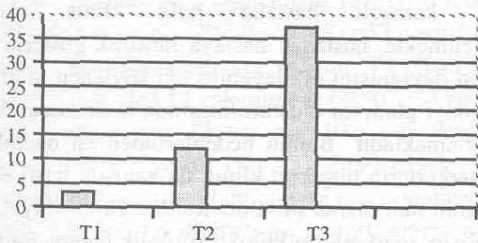
p53 tümör supresor gen mutasyonunun larinks karsinomu gelişiminde rol aldığı bilinmekte, ancak karsinogenezisteki rolü tam olarak açıklanamamaktadır (1, 16). p53 pozitifliği ile survi, histolojik diferansiyasyon ve nodal metastaz ilişkisi konusundaki çalışmalar değişik sonuçlar vermişlerdir (2-5, 7, 8, 11-14, 16, 18).

CD34 + hücreler granülosit-makrofaj progenitor hücrelerdir ve natural supresor aktiviteyi vardır, bu aktivite, immün fonksiyonun nonspesifik baskılanması şeklinde tanımlanabilir (21). CD34'ün lösemilerde prognostik önemi vardır, deri ve vasküler lezyonlarda da eksprese edilmektedir (16). Young ve ark. CD34'ün baş-boyun skuamöz hücreli karsinomlarında yüksek oranda eksprese edildiğini öne sürerken, laringeal karsinomlarda nadiren pozitif olduğunu ileri süren yazarlar da bulunmaktadır (16, 22). CD34 pozitifliği ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki hakkında yapılan araştırmaların sayısı azdır.

Çalışmamızda, skuamöz hücreli larinks karsinomu olan vakalarda CD34 ve p53 pozitifliği ile lenf nodu metastazı, nüks, tümörün histolojik diferansiyasyon derecesi ve tümörün lenfoplazmositer inflamasyonu arasındaki ilişkiyi inceledik.

## YÖNTEM VE GEREÇLER

Çalışmaya Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. KBB Kliniğinde 1995-1997 yılları arasında opere olan ve yeterli takibi olan 54 hasta alındı. Hastaların yaşları 39 ile 70 arasında değişiyordu ve ortalama yaş 56.6 idi. Hastalar preoperatif dönemde AJCC (1992)'ye göre evrelendirildiler. Hastaların evreleri Şekil 1'de görülmektedir.



Şekil 1: Çalışmaya alınan 54 hastanın evreleri.

Hastaların takip süreleri 1 yıl ile 3 yıl arasında değişiyordu ve ortalama takip süresi 18 ay idi. Hastalar evrelendirildikten sonra, lezyonlarının büyüklüğü ve yayılımına göre operasyonları planlandı. Hastalara frontolateral hemilarinjektomi, supraglottik horizontal larinjektomi veya total larinjektomi uygulandı. Boyunda palpable lenf nodu varsa veya NO boyunda elektif boyun diseksiyonu yapılması gerekiyorsa, boyun diseksiyonu ameliyata eklendi. Karşı boyuna, palpable lenf nodu varsa, operasyondan 5 hafta sonra boyun diseksiyonu uygulandı. Karşı boyun NOsa fakat elektif tedavi gerekiyorsa, bu bölgeye radyoterapi verildi. Postoperatif olarak hastalar düzenli olarak kontrollere çağrıldılar; bölgesel ve uzak metastaz açısından değerlendirildiler.

Patoloji laboratuvarında parafin teknikle hazırlanan biyopsi örnekleri önce hematoksilen eozin ile boyanarak, ışık mikroskopunda değerlendirildi. Değerlendirmede tümörler iyi, orta ve az diferansiyasyonlu olarak gradelendirildi. İnflamasyon değerlendirilirken, tümör çevresindeki alanın %25'inden daha az alanda inflamasyon varsa inflamasyon negatif, alanın %25-50'sinde inflamasyon varsa zayıf pozitif (+), inflamasyon alanın %50'sinden daha geniş bir bölgede ise kuvvetli pozitif (++) kabul edildi. Hem wild hem de mutant formu içeren p53 (D07-DAKO) antikörünün kullanıldığı p53 immunohistokimyasal çalışmada, tümör hücrelerinin %50'sinden fazla boyanma pozitif kabul edilirken, CD34 (DAKO) histokimyasal çalışmada nükleer ve sitoplazmik boyanma pozitif kabul edildi.

İstatistik testi olarak exact test uygulandı. P değeri 0.05'ten küçükse, sonuç istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## SONUÇ

CD34 ve p53 pozitifliği göz önüne alındığında, hastaların evrelere göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Toplam
Sadece CD34 pozitif	0	4	6	10(14)*
Sadece p53 pozitif	0	6	2	8(12)*
CD34(+) ve p53(+)	0	0	4	4
CD34(-) ve p53(-)	4	2	26	32
<b>TOPLAM</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>38</b>	<b>54</b>

Tablo 1: CD34 ve p53 pozitifliği ile çalışmaya alınan hastaların evreleri.

\* Tümörlerin 4 tanesi hem CD34 hem de p53 pozitif olduğundan, CD34(+) toplam tümör sayısı 14, p53(+) toplam tümör sayısı 12'dir.

p53 pozitifliği 12 hastada (%22.2), CD34 pozitifliği ise 14 hastada (%25.9) gözlemlendi. Hem CD34 (+) hem de p53 (+) 4 hasta vardı (%7.4). Bu hastaların 4'ü de stage 3'tü (T3NO). Boyunda lenf nodu metastazı olan 10 hasta mevcuttu. Bunların 2 tanesi T2N1, 8 tanesi T3N1'diler. Boyunda patolojik olarak lenf nodu metastazı saptanan hastaların hiçbirinde CD34 ve/veya p53 pozitifliği saptanmadı. Ancak bu 10 hastanın 8'inde (%80) lenfoplazmositer tümöral inflamasyon kuvvetli pozitif (++).

CD34 ve p53 pozitifliği ile tümörü histolojik diferansiyonunun ilişkisi araştırıldığında, Tablo 2'deki sonuç ortaya çıktı.

	İYİ	ORTA	AZ	Toplam
Sadece CD34 pozitif	4(6)*	2(4)*	4	14
Sadece p53 pozitif	0(2)*	2(4)*	6	12
CD34(+) ve p53(+)	2	2	0	4
CD34(-) ve p53(-)	24	6	2	32
<b>TOPLAM</b>	30	12	12	54

**Tablo 2:** Histolojik diferansiyon ile CD34 ve p53 pozitifliğinin ilişkisi.

\*Parantez içindeki rakamlar toplam hasta sayılarını göstermektedir.

İyi diferansiye olan 30 hastanın 24'ü (%80) CD34(-) olan grupta yer almaktaydılar. Orta derecede diferansiye olan hastaların 4'ü (%33.3) CD34 (+) ve 4'ü de p53 (+)'ti (%33.3). Az diferansiye tümörü olan 12 hastanın ise 6'sı p53 (+) (%50), 4'ü de CD34 (+)'ti (%33.3). p53 pozitif olan 12 hastanın 10'u orta veya az derecede diferansiye idi (%83.3). Diferansiyasyon derecesi azaldıkça, p53 pozitiflik oranının arttığı dikkati çekti ancak sonuç istatistik olarak anlamlı bulunmadı. CD34 pozitifliği ile histolojik diferansiyasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilemedi.

Lenfoplazmositer inflamasyon gözönüne alındığında, bütün tümörlerde inflamasyon bulunduğu gözlemlendi. İnflamasyon, materyal metot bölümünde belirtildiği şekilde zayıf pozitif (+) ve kuvvetli pozitif olarak (++) derecelendirildi. 54 hastanın 38'inde inflamasyon zayıf pozitif (%70.4), 16'sında ise kuvvetli pozitif olarak tespit edildi (%29.6). İnflamasyon ve CD34 ile p53 pozitifliği göz önüne alındığında, Tablo 3'teki sonuca ulaşıldı.

	Sadece p53 pozitif	Sadece p53 pozitif	CD34(+) ve p53(+)	CD34(-) ve p53(-)	Toplam
İnflamasyon (+)	10(14)*	6(10)*	4	18	38
İnflamasyon (++)	0	2	0	14	16

**Tablo 3:** Lenfoplazmositer inflamasyon ile CD34 ve p53 pozitifliğinin ilişkisi.

\*Parantez içindeki rakamlar toplam sayıları göstermektedir.

İnflamasyonun kuvvetli pozitif olduğu 16 hastanın 14'ünde CD34 ve p53'ün negatif olduğu gözlemlendi (%87.5). CD34 ve/veya p53 pozitifliği göz önüne alındığında, p53 pozitif olan 2 hasta hariç, 20 hastada (%90.9) inflamasyon zayıf pozitif. CD34 pozitif olan hiçbir hastada inflamasyon kuvvetli pozitif değildi. Tabloya exact testi uygulandığında, sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu ortaya çıktı ( $p < 0.01$ ).

54 hastadan sadece 2 tanesinde boyunda nüks saptandı. Bu hastaların ikisi de CD34 negatif ve p53 pozitifler. Her iki hastanın da tümörleri orta derecede diferansiye idi ve tümör etrafında iki hastada da zayıf lenfoplazmositer inflamasyon vardı. Nüks eden hastalarda p53 pozitifliği ve inflamasyonun zayıf pozitif oluşu dikkat çekiciydi ama nüks eden hasta sayısı sadece 2 olduğundan, istatistik test yapılamadı.

## TARTIŞMA

Son yıllarda moleküler biyoloji ve özellikle tümör immünolojisi hakkında artan bilgilerin ışığında, kanser daha iyi anlaşılmasına başlanmıştır. Vücudun değişik bölgelerindeki kanserlerde olduğu gibi, baş-boyun bölgesinin skuamöz hücreli karsinomlarında da gen mutasyonları ve bazı immünolojik markerların önemi olduğu vurgulanmaktadır. Ancak, larinks kanserli hastalar hala klinik olarak evrenlenmekte, hastadan hastaya farklılık gösterip tümörün davranışını etkileyebileceği söylenen markerler tedavi planının oluşturulmasında aktif olarak kullanılmamaktadır. Bunun nedenlerinden en önemlisi, bu markerların tümörün klinik davranışını nasıl etkilediğinin tam olarak bilinmemesidir. Tümör biyolojisi gelişip, markerların klinikopatolojik parametrelerle ilişkileri tam olarak ortaya konabilirse, gelecekte la-

rinks kanserli hastaların tedavisinde, hastaya özel, yeni tedavi protokolleri geliştirilmesi gündeme gelebilir.

p53, tümör suprese edici bir genidir. Larinksteki karsinogenezin birçok genetik bozukluğun birikimiyle oluştuğu ve özellikle hücre siklusunu düzenleyen genlerin etkilendiği öne sürülmektedir (9, 10). p53 geni, hücre siklusunun G1 fazında görev alır. Genotoksik bir olay meydana geldiğinde, p53 geni bir kaskadı başlatarak, hücre siklusunu G1 fazında durdurur. DNA hasarı düzeltilemezse, p53 programlanmış hücre ölümünü başlatır. p53 ile regüle edilen bu yollar gen mutasyonlarıyla ya da viral veya selüler proteinlerin bağlanmasıyla, karsinogenezin erken safhalarında inhibe edilebilmektedir. Artmış hücre proliferasyonu da ek genetik lezyonların oluşmasına neden olabilmekte, ve onkojenik bir potansiyel taşımaktadır (10). p53 genindeki bozukluğun özellikle geç malign transformasyondan gerçek maligniteye geçişte rol oynadığı ileri sürülmektedir (9). Laringeal karsinom göz önüne alındığında, Sauter ve Uhlman laringeal displaziden karsinoma geçişin p53 pozitif olan vakalarda daha sıklıkla görüldüğünü öne sürmekte, Pignataro ve ark. bunu desteklememekte (10,15,20).

p53 mutasyonu, larinks kanserlerinde görülen mutasyonlardan birisidir. Literatürde p53 pozitifliği oranı %33.3 ile %77 arasında rapor edilmiştir (1, 4, 7, 11, 12, 14, 17). Bizim çalışmamızda ise p53, larinks kanserli vakaların %22.2'sinde pozitif bulunmuştur. Bunun nedeni teknik artefaktların yanı sıra, p53 üretimini ortadan kaldıran delesyonlar ya da nokta mutasyonlarının, proteinin ölçülebilir düzeye erişmesini engellemesi de olabilir.

p53 mutasyonunun tümörün diferansiyasyon derecesi ile ilişkisini araştırdığımızda, tümör diferansiyasyonu azaldıkça, p53 pozitifliğinin arttığını tespit ettik. Bu sonuç, tümörün p53 ekspresyonu ve diferansiyasyon derecesi arasında ilişki bulamayan bazı yazarların sonuçları ile çelişmektedir (3). İyi diferansiyasyon 30 vakanın sadece 2'sinde (%6.7) p53 pozitif iken, orta derecede diferansiyasyon 12 vakanın 4'ü (%33.3) ve az diferansiyasyon 12 vakanın 6'sı (%50) p53 pozitif. p53 pozitif olan 12 vakanın 10'u orta derecede veya az diferansiyasyon idi (%83.3). İstatistiksel olarak bu sonuçlar anlamlı bulunmadı. Hasta popülasyonumuzun %55'inin iyi diferansiyasyon tümörü olmasının ve iyi diferansiyasyon tümörlerde p53 pozitifliğine daha az

rastlanmasının da düşük p53 pozitifliği oranımızda rol oynadığını düşünmekteyiz. Anwar ve arkadaşları da p53 pozitif olan hastalarının %71'inin orta veya az derecede diferansiyasyon tümörleri olduğunu tespit etmişler, ancak sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (1).

Natural supresor olan CD34 pozitif hücrelerin lösemilerde prognostik önemi vardır. Deri ve vasküler lezyonlarda da eksprese edilebilmektedirler (16). Bu hücrelerin soft agarda granülosit ve monositlerden oluşan koloniler halinde büyüyebildikleri gösterilmiştir (22). Bu natural supresor hücrelerin, supresyonu nitrik oksit ve transforming growth faktör-beta salgılayarak oluşturdukları öne sürülmektedir (22). Spafford ve ark. CD34 pozitif hücrelerin larinks kanserlerinde nadiren görüldüğünü bildirmekteyse de, Young ve ark. baş-boyun kanserlerinde %65 gibi yüksek bir oranda görüldüğünü öne sürmektedirler (16, 22). Young ve ark. baş-boyun skuamöz hücreli karsinomlarında tümör rekürrensi veya hastalık nedeniyle ölüm görülen vakalarda, primer tümörde CD34 pozitif hücrelerin daha fazla olduğunu göstermişlerdir (22). Bu çalışmada yazarlar düşük oranda CD34 pozitif hücre içeren kanserlerin %39'unda rekürrens görüldüğünü, ancak yüksek oranda CD34 pozitif hücre içeren vakalarda, bu oranın %100 olduğunu ileri sürmektedirler. Bu çalışmada, baş-boyun kanserleri bir bütün olarak ele alınmış, larinks kanserleri ayrı olarak ele alınmamıştır.

Biz çalışmamızda, 14 hastada (%25.9) hastada CD34 pozitifliği tespit ettik. Tümörün histolojik diferansiyasyon derecesi ile CD34 pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki saptayamadık. Dört hastada CD34 pozitifliğini p53 pozitifliği ile birlikte tespit ettik (%7.4).

Tümördeki lenfoplazmositer inflamasyon göz önüne alındığında, CD34 + olan hiçbir hastada kuvvetli iltihabi reaksiyon görülmedi ( $p < 0.01$ ). CD34 'ün supresor bir hücre olduğu ve bu yüzden iltihabi reaksiyonun baskılandığı sonucuna varılabilir. p53 göz önüne alındığında ise, 2 hasta hariç, p53 + olan hiçbir hastada şiddetli iltihabi reaksiyona rastlanmadı. Bu sonuç da istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0.01$ ).

Boyunda lenf nodu metastazı ile p53 ilişkisini araştıran bazı araştırmacılar, değişik sonuçlar elde etmişlerdir. Pruneri, p53 ve bcl-2'nin birlikte ekspresyonunun lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğunu, ancak tek başına p53 pozitifliğinin anlamlı olmadığını

nı rapor etmiştir (11). Diğer bazı yazarlar, p53 ile boyun metastazı arasında ilişki olmadığını rapor etmişlerdir (12, 18, 19). CD34 ile lenfatik metastaz arasındaki ilişkiyi ayrıntılı olarak inceleyen bir yayına literatürde rastlanmamıştır. Young ve ark. CD34 pozitif olan grupta nüksü daha fazla tespit etmişler, ancak hastaların boyun evrelerini belirtmemişlerdir (22).

Çalışmamızda, lenf nodu metastazı olan 10 hastanın hiçbirinde p53 ve/veya CD34 pozitifliğine rastlanmamıştır. Lenf nodu metastazı olan 10 vakanın 8'inde (%80), kuvvetli pozitif lenfoplazmositer inflamasyona rastlanmıştır. Şiddetli iltihabi reaksiyonun lenf nodu metastazı lehine olduğunu ileri süren yayınlarla bizim bulgularımız uyumludur (6, 18). İnflamasyon olduğunda, lenfatik kanalların genişlediği ve proliferasyon olduğuna ileri sürülmektedir. Ülserasyon ve infeksiyon olan üst solunum yolu ve sindirim sistemi tümörlerinde, lenfatik yayılım olabileceğinden söz edilmektedir (6). Bu sonuçlara dayanılarak, CD34 ve p53'ün negatif olduğu durumlarda, primer tümör etrafında zayıf inflamasyon varsa, lenfatik metastaz riskinin az olacağı ileri sürülebilir. Ancak bu konuda daha fazla hasta üzerinde yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmaya alınan hastalarımızdan sadece 2 tanesinde nüks görüldü (%3.7). Bu hastaların ikisinin de tümörleri CD34 pozitif ve p53 negatifti. Bazı yazarlar, p53'ün yüksek oranda eksprese edilmesinin surviyi azalttığını bildirmişlerdir (2.5.8.16). Hirvikoski, p53 pozitifliğinin surviyi iyi yönde etkilediğini bildirmiştir (4). Bazı yazarlarsa, p53 pozitifliğinin survi ile ilişkisi olmadığını ileri sürmüşlerdir (3, 12, 14). CD34 pozitif olan tümörlerde rekürrens arttığı bir çalışmada bildirilmiştir (22). Çalışmamızda nüksü olan hasta sayısı az olduğundan, bu konuda görüş bildiremiyoruz.

**Yazışma Adresi:** Dr. Adnan ÜNAL  
Şehit Adem Yavuz Sokak.  
No: 7/11  
Kızılay / ANKARA

## KAYNAKLAR

1. ANWAR K, NAKAKUKI K, IMAI H, NAIKI H, INUZUKA M.: Over-expression of p53 protein in human laryngeal carcinoma. *Int. J. Cancer*, 53: 952-956, 1993.
2. BRADFORD CR, ZHU S, POQRE J, FISHER SG, BEALS TF, THORAVAL D, HANASH SM, CAREY TE, WOLF GT.: p53 mutation as a prognostic marker in advanced laryngeal carcinoma. Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Cooperative Study Group. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg*, 123 (6): 605 - 609, 1997.
3. DURSUN G, SAK SD, AKYOL G, DURSUN A, EREKUL S, DEMIRELLER A, AKINER M.: Over-expression of p53 in laryngeal carcinoma : Clinicopathological implications. *Ear Nose Throat J*, 74 (9): 645-648, 1995.
4. HIRVIKOSKI P, KUMPULAINEN E, VIRTANIE-MI J, JOHANSSON R, HAAPASALO H, MARIN S, HALONEN P, HELIN H, RAITIOLA H, PUKANDER J, KELLOKUMPU-LEHTINEN P, KOSMA VM.: p53 expression and cell proliferation as prognostic factors in laryngeal squamous cell carcinoma. *J. Clin. Oncol*, 15 (9): 3111 -3120, 1997.
5. JIN YT, KAYSER S, KEMP BL.: The prognostic significance of the biomarkers p21WAF1/CIP1, p53, and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 82 (11), 2159 - 2165, 1998.
6. KOWALSKI LP, MEDINA JE: Nodal metastasis: predictive factors. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 31 (4): 621 - 637, 1998.
7. NADAL A, CAMPO E, PINTO J, MALLOFRE C, PALACIN A, ARIAS C, TRASERRA J, CARDESA A.: p53 expression in normal, dysplastic and neoplastic laryngeal epithelium. Absence of correlation with prognostic factors. *J. Pathol*, 175 (2): 181-188, 1995.
8. NARAYANA A, VAUGHAN AT, GUNARATNE S, KATHURIYA S, WALTER SA, REDDY SP. : Is p53 an independent factor in patients with laryngeal carcinoma. *Cancer*, 82 (2): 286 - 291, 1998.
9. PETRUZZELLI GJ, BENEFIELD J, YONG S.: Mechanism of lymph node metastasis: current concepts. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 31 (4): 585-599, 1998.

10. PIGNATARO L, CAPAACIO P, PRUNERI G, CARBONI N, BUFFA R, NERI A, OTTAVIANI A.:The predictive value of p53, MDM-2, cyclin D1 and Ki67 in progression from low grade dysplasia towards carcinoma of larynx. *The Journal of Laryngology and Otology*, 112: 455 - 459, 1998.
11. PRUNERI G, PIGNATARO L, CARBONI N, RONCHETTI D, CESANA BM, OTTAVIANI A, NERI A, BUFFA R.: Clinical relevance of p53 and bcl-2 protein over-expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, 73 (9): 263-268,1998.
12. RESNICK JM, UHLMAN D, NIEHANS GA, GAPPANY M, ADAMS G, KNAPP D, JASZEZ W.:Cervical lymph node status and survival in laryngeal carcinoma: prognostic factors. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol*, 104 (9Pt1): 685 - 694, 1995.
13. ROWLEY H, ROLAND NJ, HELUWELL TR, CASLIN A, KINSELLA AR, JONES AS.: p53 protein expression in tumours from head and neck subsites, larynx and hypopharynx, and differences in relationship to survival. *Clin. Otolaryngol*, 23 (1): 57 - 62, 1998.
14. SALAM MA, CROCKER J, MORRIS A.: Over-expression of tumour suppressor gene p53 in laryngeal squamous cell carcinomas and its prognostic significance. *Clin. Otolaryngol*, 20 (1): 49-52, 1995.
15. SAUTER ER, CLEVELAND D, TROCK B. RIDGE JA, KLEIN - SZANTO JP.: p53 is over-expressed in 50 per cent of pre-invasive lesions of head and neck epithelium. *Carcinogenesis*, 15 (10): 2269-2274, 1994.
16. SPAFFORD MF, KOEPPE J, PAN Z, ARCHER PG, MEYERS AD, FRANTLIN WA.: Correlation of tumour markers p53, bcl-2, CD34 CD44H, CD44v6, and Ki67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg*, 112; 627-632, 1996.
17. SUJKOWSKA R, GRANKA A, BURDUK D.: Immunoultrastructural localisation of p53 protein in patients with laryngeal carcinoma. *Neoplasma*, 45(2): 113-116, 1998.
18. TAKE RP, BAATENBURG DE JONG RJ, SCHUURING E, HERMANS J, VIS AA, LITVINOV SV VAN KRIEKEN JH.: Markers for assessment of nodal metastasis in laryngeal carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg*, 123(4): 412-419, 1997.
39. TAN LK, OGDEN GR.: p53 over - expression in laryngeal carcinoma is not predictive of response to radiotherapy. *Oral Oncol*, 33 (3): 177- 181, 1997.
20. UHLMAN DL, ADAMS G, KNAPP D, AEPPLI DM, NIEHANS G.: Immunohistochemical staining for markers of future neoplastic progression in the larynx. *Cancer Research*, 56; 2199-2205, 1996.
21. YOUNG MRI, WRIGHT MA, LOZANO Y, MATTHEWS JP, BENEFIELD J, PRECHEL MM.: Mechanisms of immune suppression in patients with Head and Neck Cancer: Influence on the immune infiltrate of the cancer. *Int J Cancer*, 67: 333-338, 1996.
22. YOUNG MRI, WRIGHT MA, LOZANO Y, PRECHEL MM, BENEFIELD J, LENONETTI JP, COLLINS SL, PETRUZZELLI GJ.:Increased recurrence and metastasis in patients whose primary Head and Neck Squamous celli carcinomas secreted granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and contained CD34+natural suppressor cells. *Int. J Cancer*, 74: 69-74, 1997.