

NAZOFARENGEAL KARSİNOMLARDA bcl-2 ve c-erbB2 EKSPRESİYONU:

Prognostik Önemleri ve Klinikopatolojik Parametrelerle İlişkileri

bcl-2 AND c-erb-B2 EXPRESSIONS IN NASOPHARYNGEAL CARCINOMAS

Aspects of prognostic significance and correlations with clinico-pathological parameters

Dr. M. Umut AKYOL (*), Dr. Gülen AKYOL (**), Dr. Gökhan GEDİKOĞLU (***),
Dr. Şefik HOŞAL (*), Dr. Nazmi HOŞAL (*), Dr. Şevket RUACAN (***)

ÖZET: Çalışmamızın amacı nazofarinks kanserinde c-erbB2 ve bcl-2 ekspresyonlarını tespit ederek bu sonuçların prognostik önemlerini ve klinik, patolojik, moleküler ve proliferatif belirleyiciler ile karşılaştırarak saptamaktır. Bu amaçla 35 indifferansiye nazofarinks kanserli vakanın patolojik arşiv materyali üzerinde immünohistokimyasal yöntemler ile çalışılmıştır, c-erbB2 ekspresyonu hiçbir vakada saptanamaz iken Bcl-2 ekspresyonu yüksek oranda(%71) pozitif saptanmıştır. Araştırılan parametreler ile prognoz arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. Anlamlı korelasyon gösteren tek beraberlik MDR-I geni ve bcl-2 geni ekspresyonları arasında tespit edilmiştir ($p > 0.05$).

Anahtar Sözcükler: Nazofarinks kanseri, prognostik faktörler, bcl-2, erbB2, immünohistokimya, onkogen.

SUMMARY: The aims of our study were to determine c-erb-B2 and bcl-2 expressions in nasopharyngeal carcinomas and to investigate their values as prognostic indicators in correlation with survival, size, regional and distant metastasis of the disease, the presence of cranial nerve palsies, histopathology, as well as p53 expression, Ki-67 and PCNA indexes, EBV (LMP) and MDR-I gene expressions. Immunohistochemical staining for bcl-2 and c-erb-B2 was performed on archival material from 35 indifferantiated NPC. C-erb-B2 was not expressed in any of the tumors, whereas high bcl-2 expression was detected (71%). No significant relation were found among these parameters and prognosis. In the univariant analysis the only significant correlation was found between the presence of MDR-I gene and bcl-2 overexpression ($p > 0.05$).

Key Words: Nazopharyngeal carcinoma, prognosis, bcl-2, c-erb-B2, immunohistochemistry, oncogenes.

GİRİŞ

Nazofarengeal karsinoma (NFK) Asya'nın bir bölümü ve daha az oranda Kuzey Afrika'da başta gelen ölüm nedenlerindedir. Etyopatogenezinde Epstein-Barr virüs (EBV), genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerin kombine etkilerinden söz edilmektedir (3). EBV'e ait DNA, RNA veya gen ürünlerinin tüm tümör hücrelerinde saptanabildiği bildirilmektedir (9). Ancak EBV, tümörün başlangıcı için gerekliyse de tam anlamıyla neoplazinin gelişebilmesi, sellüler genlerin etkilerine ihtiyaç gösterir (13).

Son yıllarda tümörlerin differansiasyonları, biyolojik davranışları ile onkogenler arasındaki etkileşimler üzerinde durulmaktadır ki, bu ilişkilerden prognostik belirleyici olarak yararlanmak mümkündür. C-erb-B2'nin aşırı ekspresyonu meme kanserlerinde kötü prognoz belirleyicisi olarak kullanılmaktadır (4). Henüz tam bilinmeyen bazı mekanizmalarla apoptozisi engelleyen bcl-2"aşırı ekspresyonu" ise özellikle bazı lenfoid malignitelerde bildirilmektedir (5, 7).

Bu çalışmamızda biz, NFK'larında c-erb-B2 ve bcl-2 varlığını araştırdık. Ayrıca vakalarımıza ait diğer klinik ve patolojik parametrelerle-yaşam süreleri, TNM sınıflandırması ve hastalığın evresi, kranial sinir paralizi varlığı, histopatolojik özellikleri, p53 ekspresyonu, Ki-67 ve PCNA indeksleri, EBV'e ait latent membran protein (LMP) varlığı, multi-drug resistance (MDR-I) gen ekspresyonu ve bu onkogenlerin korelasyonları olup olmadığına baktık.

YÖNTEM VE GEREÇ

Çalışma 1979-1993 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB bölümüne başvurmuş ve NFK tanısı almış 35 hastada yapılmıştır. Vakaların 26'sı erkek 9'u kadın olup yaş ortalaması 35'dir. Tüm hastalarda ortalama izlenme süresi 66 aydır. Histopatolojik tanı hepsinde aynı olup dünya sağlık örgütünün (DSÖ) sınıflamasına göre indifferansiye karsinomdur (11). Evreleme AJC (American Joint Committee) sistemine göre yapılmıştır (1).

Hastalara ait materyaller %10'luk formalinde fikse edilmiş ve parafine gömülmüştür. HE ile boyalı kesitler gözden geçirildikten sonra seçilen bloklardan immün boyama yapıldı. Deparafinizasyonu takiben

(*) HÜTF KBB Anabilim Dalı
(**) GÜTF Patoloji Anabilim Dalı
(***) HÜTF Patoloji Anabilim Dalı ANKARA

dokular ksilol ve dereceli alkollerden geçirildi, bcl-2 için kesitler "Antigen Retrieval Citrate" (Biogenex) solüsyonunda mikrodalga fırında 10 dk bekletildi. Endojen peroksit ve protein blokajlarını takiben primer antikorlar uygulandı. C-erb B2 (CB11- Biogenex) ve bcl-2 (Biogenex) oda sıcaklığında 2 saat uygulandı. Diğer aşamalarda üçlü yöntem olan "streptavidin biyotin peroksidad" (multilink-Biogenex) kullanıldı. Görüntüleme peroksidadla işaretlenmiş 3,3'-diaminobenzidin tetrahidrokloridle yapıldı. Zemin boyamasında Mayer hematoksilen kullanıldı.

Meme kanseri kesitleri CB11 için, lenf nodu ise bcl-2 için pozitif kontrol olarak boyandı. Negatif kontrol boyamada primer antikorlar dışında tüm aşamalar aynen uygulandı. CB11 için membranöz, bcl-2 için hem sitoplazmik hem membranöz boyanma dikate alındı. Pozitif hücrelerin oranı yan kantitatif olarak 4 grupta sınıflandı: 0-boyamada yok, 1+-%1-33 hücre (+), 2+-%34-66 hücre (+), 3+-%67-100 hücre (+). Tablo 1

Tablo 1: Bel-2 pozitivitesi gösteren hücrelerin semi-kantitatif sınıflandırılması

Bel - 2 pozitivitesi	vaka (n)
0	10
1+	5
2+	7
3+	13
Total	35

Aynı vakalara ait arşiv materyallerinde değişik ekiplerce daha önce çalışılan P53, Ki67, PCNA, LMP ve MDR-1 sonuçları bölümümüzde yapılan tez çalışmalarından alındı (6, 8).

Dr. Genç ve arkadaşları (6) immünohistokimyasal olarak 35 spesmenin 25'inde fare anti-p53 antikorunu (Zymed) ile p53 geni varlığını göstermişler ve anti-PCNA PC10 IgG antikorunu (Zymed) anti Ki67 JgG antikorunu (Zymed) kullanarak çekirdekleri boyayan hücrelerin sayısını yüzde olarak hesaplayarak proliferatif indeks (PI) saptamışlardır. Kullanımda kolaylık olması açısından PI'ler %50'nin üzerinde olanlar ve %50'nin altında olanlar olmak üzere iki gruba ayrılmışlardır.

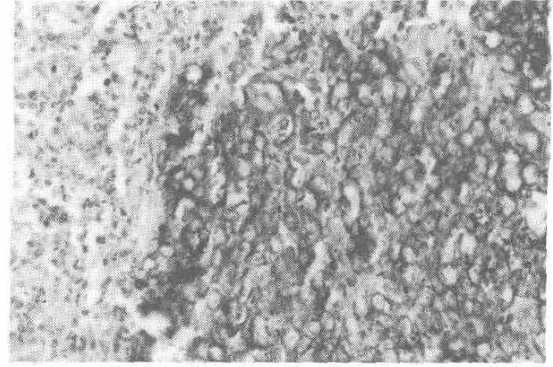
Dr. Kanbur (8) ise 31 spesman üzerindeki immünohistokimyasal çalışmada fare Anti Latent Membran protein (LMP) (DAKO) ile 7 hastada EBV varlığını ve fare anti-P-Glycoprotein (Novocastro) ile 14 hastada MDR-1 geni varlığını göstermiştir.

İstatistiksel analiz "SPSS for Windows" bilgisayar programı ile yapıldı.

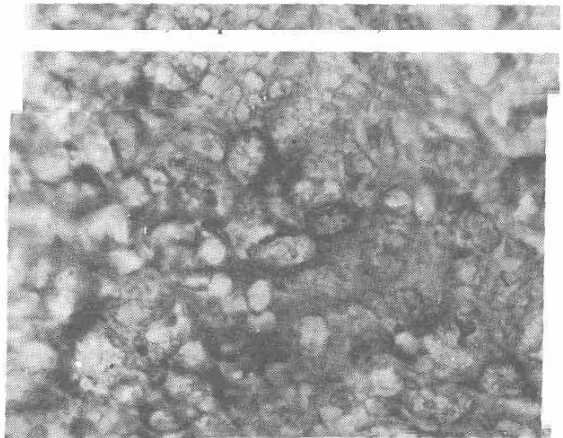
BULGULAR

Tüm hastaların İndifferansiye karsinom histolojisi gösterdikleri belirlendi. Bir hasta evre 1 (%2.9), 3 hasta evre 2 (%8.6), 6 hasta evre 3 (%17.1) ve 25 hasta evre 4 (%71.4) idi. Uzak metastaz 11 hastada (%31.4) saptandı.

Hiç bir materyalde CB11 ile boyanma görülmedi. Yirmibeş hastada (%71) bcl-2 ekspresyonu izlendi (Tablo). Belirgin "bal peteği" şeklinde membra-noz boyanma patterni mevcuttu (Şekil 1-2). Sonuçlar diğer parametrelerle ilişki açısından istatistiksel olarak analiz edildi. (Tablo 2) Ancak tek anlamlı korelasyon bcl-2 ekspresyonu ile MDR-1 geni varlığı arasında saptandı (Kruskal-Wallis $p < 0.05$).



Şekil 1: (DAB x 200) andifferansiye NFK'da membranöz bal peteği görünümünde boyanma. Çevre az sayıda pozitif boyanmış lenfosit leniyor (bcl-2, Biogenex, streptavidin-biotin)



Şekil 2: (DAB x 400) Yüzey epitelinin infiltrate eden, pozitif boyanmış tümör adası izleniyor (bcl-2, Biogenex, streptavidin-biotin)

Tablo 2: İmmünohistokimyasal yöntemler ile çalışılan hüresel belirleyiciler (marker) ve pozitiflik yüzdeleri

İmmünohistokimyasal Belirleyiciler (Marker)	+	-	n (Total)
bcl-2	25	10	35
c-erb-B2	0	35	35
p53	25	10	35
Ki67	15 (Pİ %50 ve üzeri)	19 (Pİ %50'den az)	34
PCNA	3 (Pİ %50 ve üzeri)	28 (Pİ %50'din az)	31
LMP	7	24	31
MDR-1	14	17	31

TARTIŞMA

Moleküler tekniklerdeki son gelişmeler onkogenlerin saptanabilmesi ve tümörlerin biyolojik davranışlarının belirlenmesine katkıda bulunmuştur.

C-erb-B1, c-erb-B2 ve c-erb-B3 aynı onkogen ailesinden olup normal hücre büyümesinde ve differansiasyonunda görevlidirler. Neoplastik transformasyon etkisini ise epidermal growth factor (EGF) reseptörleri üzerinden gösterir (4). Mutant reseptörlerin hücreye devamlı mitojenik uyarı yolladığı, ya da mutasyondan daha sık olarak, bu protoonkogenlerin düzenleyici fonksiyonlarının bozulmasının büyüme faktörü reseptörlerinin aşırı ekspresyonu ile sonuçlandığı ileri sürülmektedir (4). C-erb-B1'nin normal formu ile EGF reseptör geni ekspresyonu akciğerin skuamöz hücreli kanserinde, daha az oranda da mesane, gastrointestinal tüp kanserleri ve astrositomlarda bildirilmiştir. C-erb-B2 (c-neu) ekspresyonu ise meme, over, akciğer, mide ve tükürük bezi tümörlerinde saptanmıştır. Bu onkoproteinlerin ekspresyonlarının kötü prognoz göstergesi olduğu belirlenmiştir. Roychowdhury ve arkadaşlarının(2) yaptığı çalışmada NFK'larında kuvvetli c-erb-B2 ekspresyonu bulmuşlar ve agresiv davranışla korelasyonunu vurgulamışlardır. Biz c-erb B2 ile hiç pozitiflik saptamadık ki, bu durum ülkemizde görülen NFK vakalarının farklı patogeneze bağlı olabilir. EBV hastalarımızın %22.4'sinde immünohistokimyasal olarak saptanmıştır (10). Bu oran olasılıkla daha hassas metodla çalışıldığında daha yüksek olacaktır.

Hücre proliferasyonunun regülasyonunda onkogenler ve kanser baskılayıcı genlerden başka apoptozis ile ilişkili, kanser gelişiminde etkili olduğu bilinen genlerde vardır. Bu gruptan olan bel-2 henüz mekanizması tam bilinmeyen bir yolla apoptozisi engeller.

Bir mitonkondrial membran proteini olan bcl-2 sıklıkla bir çok lenfoid malignitede saptanabildiği gibi reaktif germinal merkezlerle neoplastik germinal merkezlerin birbirinden ayrılmasına yardımcı olur (5, 12). Olasılıkla hücrenin yaşam süresini uzatarak mutasyonlara açık olmasını sağlar. Hücre büyümesini indükleyen c-myc ileri derecede aktifleştğinde uygun ve yeterli ortam yoksa apoptozis devreye girer ancak aynı hücrelerde bcl-2 aşırı ekspresyonu varsa apoptozis engellenir (5).

Birçok tümörde bcl-2 ekspresyonu nün iyi prognoz göstergesi olduğu bildirilmiştir (2). Hatta B hücreli lenfomalarda düşük evreden daha yüksek evreye ilerlemede bcl-2 ekspresyonu kaybı olduğu gözlenmiştir (12).

Bizim vakalarımızın %71'inde bcl-2 ekspresyonu saptandı ancak hastaların yaşam süreleri ile bir ilişki gösterilemedi. Tüm tümörler yüksek gradeli anaplastik tipteydi ki, bu bulgumuzda bcl-2 ekspresyonunun genellikle düşük malignite gösteren iyi differansiye tümörlerde saptanmasıyla uyumlu değildir.

Yaşam süresinden başka klinik parametrelerden TNM klasifikasyonu, hastalığın evresi, kraniyal sinir parafizisi varlığı ile bcl-2 ekspresyonu arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır. Ayrıca mutant p53 protein birikimi, proliferatif aktivite indeksi (PCNA, Ki-67) ve EBV varlığı ile de belirgin bir ilişki gösterilememiştir. Tek anlamlı korelasyon MDR-1 geni ile bcl-2 ekspresyonu arasında bulunmuştur (Kruskar-Walls, p<0.05).

Bazı lenfomalarla EBV ilişkisi iyi bilinmektedir. EBV'ün B lenfositleri enfekte eder. Virüse ait latent membran proteini (LMP) bcl-2 ile etkileşerek hücrelerin ölümsüz hale gelmesini sağlar (5). Buna benzer bir ilişki EBV ile NFK lan arasında gösterilmemiştir. Bizim serimizde EBV yüksek oranda bulunmamıştır. Ancak bu bizim kullandığımız tekniğin (immünohistokimya) yeterince duyarlı olmamasından kaynaklanıyor olabilir. Bu nedenle NFK larında EBV ile bcl-2 birlikteliğinin daha geniş serilerde ve moleküller tekniklerin de katkısı ile araştırılmasının uygun olacağını düşünüyoruz.

Yazışma Adresi: Dr Umut AKYOL
İran cad. 47/10, GOP
06 - 700 ANKARA

KAYNAKLAR

1. American Joint Committee on Cancer. Manual For staging of cancer. 4th. ed. Philadelphia, JB Lippincott, 1992.
2. BARETTON GB, DIEBOLD J, CHRISTOFORIS G, VOGT M, MÜLLER C, DOPFER K, SCHNEIDER-BANGER K, SCHMIDT M., LÖHRS U. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer* 1996; 77:255-64.
3. CHOA G. NASOPHARYNGEAL CARCINOMA; ENGLISH GM (ed): Otolaryngology, Philadelphia, JB Lippincott Co., 1991, vol 15, chpt16N.
4. COTRAN RS, KUMAR V, ROBBINS SL, SCHOEN FJ (eds) Robbins Pathologic basis of disease, 5th ed., Philadelphia, WB sounders Co. 1994, pp 260-261.
5. COTRAN RS, KUMAR V, ROBBINS SL, SCHOEN FJ (eds) Robbins Pathologic Basis of disease. 5th ed., Philadelphia, WB Saunders Co. 1994, pp270-271.
6. GENÇ E, GEDİKOĞLU G, HOŞAL Ş. Nazofarinks Kanserlerinde klinik parametrelerin, p53, PCNA ve Kİ67 immünreaktivitelerinin prognostik önemi. *Türk Patoloji Bülteni* 1996; 13:18-23,
7. HOCKENBERRY DM, ZUTTER M, HICKEY W, NAHM M, KORSMAYER SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:6961-6965.
8. KANBUR B Nazofarinks Kanserlerinde P-Glikoprotein Ekspresyonunun Ebstein-Barr Virüs ile İlişkisi ve Prognostik Önemi. Hacettepe Üniversitesi KBB AD Uzmanlık Tezi, 1996.
9. RAAB-TRAUB N. Estain-Barr Virus and nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 1992; 3:297-307.
10. ROYCHOWDHURY DF, TSENG A, FU KK, WEINBERG V, WEIDNER N. New prognostic factors in nasopharyngeal carcinoma: Tumor angiogenesis and C-erbB2 expression. *Cancer* 1996; 77: 1419-1426.
11. SHAHMUGARATNAM K, SOBIN L. Histological typing of upper respiratory tract tumors. International histologic typing of tumors. Geneva, WHO, 1978.
12. SONG WYW. In-situ localisation of EBV encoded RN in non-nasal/nasopharyngeal CD56-positive and CD56-negative T-cell lymphomas. *Human Pathol* 1994; 25: 758-765.
13. SUN Y, HEGAMYER G, CHENG YJ, HILDESHEIM A, CHEN JY, CHEN IH, CAO Y, YAO KT, COLBURN NH. An infrequent point mutation of the p53 gene in human nasopharyngeal carcinoma. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992; 89: 6516-6520.