

LARENKS YASSI EPİTEL HÜCRELİ KARSİNOMUNDA TİMİDİN İŞARETLEME İNDEKSİ (+)

THYMIDINE LABELING INDEX IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE LARYNX

Dr. M. Can KARATAY (*), Dr. O. Sami KATIRCIOĞLU (*), Dr. Yusufhan SÜOĞLU (*),
Dr. Mehmet ÜNAL (*), Dr. Bülent ERDAMAR(*), Dr. Alp BİLİR (**)

ÖZET: Timidin Labeling İndeksi (TLİ) doku kültüründe üretilen tümör hücrelerinin otoradyografi yöntemiyle radyoaktif timidin ile işaretlenerek sayılması esasına dayanır. Bu çalışmada, KBB kliniğimizde larenks karsinomu nedeniyle ameliyat edilen, değişik evrelerdeki 22 olgunun tümör (n=22) ve normal kerelerinin (n=9) TLİ değerleri saptandı. Tüm hastalarda TLİ değerinin patolojik grade, TNM sınıflaması ve tümör lokalizasyonu ile olan ilişkisi ve bu ilişkinin prognostik önemi araştırıldı.

Anahtar Sözcükler: Timidin labeling indeks, larenks karsinomu, tümör markırları

SUMMARY : The principle of the Thymidine Labeling Index (TLI) is based on counting the radioactive thymidine labeled tumor cells, breded on tissue culture by method of otoradiography. In this study, TLI values of normal Kells (n=9) and tumor cells (n=22) of 22 operated cases with layngeal carcinoma at different stages were detemind and the relationship between the TLI values and pathological grade, TNM staging and tumor location, and prognostic importance of this relation were examined.

Key Words: Thymidine labeling index, Layngeal carcinoma, Tumour markers

GİRİŞ

Baş boyun kanserlerinde tedavi seçimi, prognoz tayini ve tedavi sonrası takipte kullanılabilecek belirgin bir tümör belirleyici bulunmamaktadır. Evrelemede kullanılan TNM sistemi tedavi seçimi ve prognoza dair yeterince bilgi vermemektedir. Aynı evredeki tümörlerin farklı biyolojik davranış biçimleri ve malign potansiyeller göz önüne alındığında yeni parametrelere ihtiyaç olduğu ortaya çıkmaktadır.

Baş boyun kanserlerinde gerek serumda gerek dokuda çok çeşitli tümör belirleyicileri üzerinde çalışılmıştır. Serum tümör belirleyicileri arasında skuamöz hücreli karsinom antijeni (SCCAg), karsinoembriyjenik antijen (CEA), ferritin, fibronektin, kanserle ilişkisi antijenler (CA 50, CA 199, CA 153, CA 125), siaklik asit, çeşitli enzimler, immunglobülinler (IgA, IgE), komplemanlar, glikoproteinler, prostoglandinler üzerinde en çok çalışılmışlardır. Bunlar içinde en tatmin edici olanlar SCCAg ve sialik asitle elde

edilenlerdir. Doku tümör belirleyicileri içinde ise çeşitli histopatolojik bulgular (pleomorfizm, perinöral invazyon, vasküler invazyon, tümörle ilişkili eosinofil vb.), mitotik indeks, DNA akım sitometrisi ve timidin labeling indeks yer alır. Doku tümör belirleyicileri serumdakilere göre çok daha anlamlı sonuçlar vermektedir ancak en önemli dezavantajları tedavi sonrası takipte kullanılamamalarıdır (6).

Tümör dokusu, hücre devrinin (cell-cycle) değişik fazlarında bulunan hücrelerden oluşmuş bir popülasyondur. Bu popülasyonda DNA sentezinin yapılmadığı G1 fazına ait, DNA sentezinin yapıldığı S fazına ait, DNA'nın iki kat olarak bulunduğu G2 fazı ile bölünmenin gerçekleştiği M fazına ait hücreler bulunur. S fazında bulunan hücrelerin sayısı S fazı fraksiyonu olarak, S fazında bulunan hücrelerin popülasyondaki bütün hücrelere oranı da **Labeling İndeks** olarak adlandırılır. Timidin labeling indeksin hesaplanabilmesi için hücrelere birim zamanda radyoaktif timidin (3H - TdR) uygulanır. Bu uygulama sırasında DNA sente J yapılmakta olan hücreler yeni DNA yapısına 3H-TdR'yi alırlar. Bu durum otoradyografi sonrasında ümidini alan hücre nükleoluslarında siyah noktalar halinde izlenir. İşaretli hücrelerin toplam hücrelere oranı % olarak ifade edilir. Timidin labeling indeks olarak adlandırılan bu veri hücre popülasyonunun proliferasyonunu göstermesi bakımından önemlidir (3).

(+) XXIII. Ulusal Otorinolarenoloji ve Baş-Boyun Cerrahisi Kongresinde sunulmuştur. 30 Eylül-1 Ekim 1995, ANTALYA

(*) İstanbul Tıp Fakültesi KBB Hastalıkları Anabilim Dalı, İSTANBUL

(**) İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

Biz de şimdiye dek baş boyun kanserlerinde çok az incelenmiş olan TLİ nin prognostik öneminin olup olmadığını belirlemek amacıyla, öncelikle en sık karşılaştığımız larenks karsinomlu olgularda bu araştırmayı başlattık. Bu yazıda farklı evrelerdeki 22 hastanın hücre kültüründe üretilen tümör hücreleri ve normal hücrelerinin TLİ değerlerinin patolojik grade TNM sınıflaması ve tümör lokalizasyonları ile anlamlı bir ilişkisi olup olmadığı ve prognoz tahmin edilmesindeki önemi incelendi.

YÖNTEM VE GEREÇ

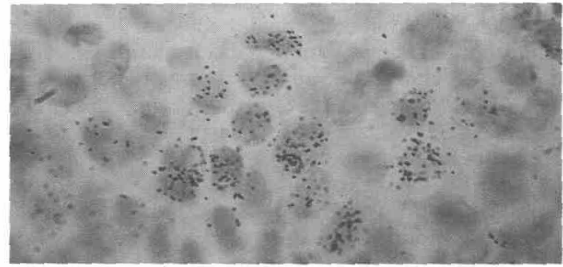
Bu ön çalışmamıza 1994-1995 yılları arasında KBB kliniğimizde larenks kanseri nedeniyle cerrahi tedavi gören 22 erkek hasta dahil edilmiştir. Tüm hastaların histopatolojik tanısı yassı epitel hücreli karsinomdur. Ortalama yaş 56 olup (en küçük 44 en büyük 78) ortalama takip süreleri 10 aydır (1 ay ile 17 ay arası). Tümörün lokalizasyonuna göre 12 olgu supraglottik (%54.5), 7 olgu glottik (% 32), 1 olgu subglottik (%4.5), 2 olgu transglottik (%9) olarak değerlendirildi. 22 hastanın, 4 tanesi primer cerrahi tedaviden sonra, 2 tanesi de rutin kontroller sırasında saptanan tümör nüksü sonrasında radyoterapi görmüştür. Glottik bölge grubundaki 3 hasta daha önceden çeşitli tedaviler görmüş, ancak primer sahada nüks etmiş olgulardır. TNM sınıflamasına göre (7) T₁ de 5 olgu T₂ ve T₃ de 6 olgu, T₄ de ise 5 olgu bulunmakta olup, nodal tutulumlarına göre 14 olgu N₀, 6 olgu N₁ ve yalnızca 1 olgu N₂ idi. Tablo I'de hastaların dökümü verilmiştir.

Tablo: Bütün hastaların genel dökümü

No:	Ad-Soyad	Yaş	Cins	Lokalizasyon	T	N	Radyoterapi	Boyun	Grade	Nüks (ay)	Takip (ay)	TLİ tümör	TLİ normal
1	M.V.	61	E	Supraglottik	2	1	—	—	II		12	23,17	
2	M.S.G	71	E	Supraglottik	2	1	—	—	I		13	12,98	
3	C.Ç.	44	E	Supraglottik	2	1	—	—	III		11	11,54	
4	D.B.	70	E	Supraglottik	3	0	—	—	III		11	32,07	10,82
5	R.K.	53	E	Supraglottik	3	2	+	+	I		11	15,87	
6	F.Ç.	50	E	Supraglottik	3	0	—	—	I	8	11	16,75	12,83
7	R.I.	66	E	Supraglottik	3	1	+	+	III		17	9,24	
8	A.Ş.	47	E	Supraglottik	4	0	—	—	I		11	15,83	
9	S.K.	69	E	Supraglottik	2	0	—	+	II		4	23,29	9,65
10	B.Ö.	53	E	Supraglottik	4	0	—	—	III		3	15,53	5,28
11	A.A	65	E	Supraglottik	1	0	—	—	I		3	15,71	14,14
12	C.ÇA	68	E	Supraglottik	3	0	—	—	I		4	14,2	7,86
13	İ.G.	50	E	Glottik	1	0	+	—	II	12	15	11,91	
14	M.K.	66	E	Glottik	1	0	—	—	I		15	13,46	
15	K.T.	44	E	Glottik	3	1	—	+	II		5	19,94	2,84
16	Y.K.	55	E	Glottik	1	0	—	—	I		1	15,83	4,87
17	R.Ş.	78	E	Subglottik	1	0	+	—	II		12	22,93	
18	M.K.	62	E	Transglottik	4	0	—	—	I		16	12,52	
19	Ö.T.	50	E	Transglottik	4	0	—	—	II		9	9,02	6,68
20	M.K.	66	E	Glottik Nüks	4	0	+	+	II	48	13	15,35	
21	F.I.	51	E	Glottik Nüks	2	1	+	+	II	96	15	6,81	
22	Ş.T.	54	E	Glottik Nüks	2	0	—	—	I		12	17,49	

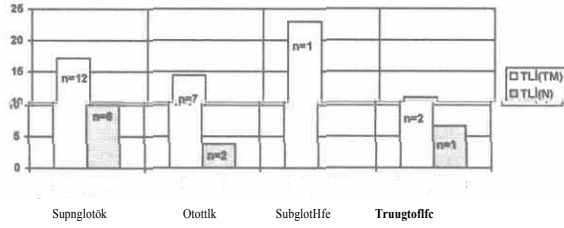
Operasyon sırasında alınan tümör dokusu M199 (Medium 199 Gibco) içerisinde doku kültürü laboratuvarına taşındı ve burada steril şartlarda medium içerisindeki tümör dokusu 1-3 mm³'lük parçalara ayrıldı. Bu parçalar, içerisinde 6 uCi/mL 3H Timidin bulunan 2 mL M199 içine alınarak 37°C'lik sallayıcı su banyosunda 1 saat süreyle inkübe edildi. Doku parçaları %10'luk tamponlu formalin ile tespit edildikten sonra dehidratasyon işleminden geçirildi. Daha sonra parafine gömülen 3 um kalınlığındaki histolojik preparatlar K2 emülsiyon film (İlford) ile kaplanarak otoradyografi yapıldı. Preparatlar 3 gün karanlıkta 4°C'de tutulduktan sonra standart banyo ve fiksasyon işlemlerinden geçirilerek Hematoksilen-Eosin boyası ile boyandı.

Işık mikroskopi ile yaklaşık 2000 karsinomatöz hücre nükleusu değerlendirildi. Nükleusları 5 ve daha fazla grain (benek tarzında leke) içeren hücre nükleusları radyoaktif Timidin ile işaretli hücre olarak kabul edildi. İşaretli hücrelerin toplam sayılan hücrelere oranında Timidin Labeling indeks değeri olarak kabul edildi (5).



Resim I: Timidin ile işaretlenmiş tümör hücreleri

Resim I: Timidin ile işaretlenmiş tümör hücreleri



Şekil 1: Çeşitli lokalizasyonlarda TLİ değerleri. TLİ (TM): TLİ tümör doku TLİ (N): TU normal doku.

Çalışma grubu içindeki 22 hastanın larenks piyeslerinde, tümörden en az 1 cm uzaklıktaki sağlam mukozadan alınan parçalar da, normal doku TLİ değerini saptamak amacıyla kontrol grubu (n=9) olarak kabul edildi.

Elde edilen değerlerin istatistiksel anlamlılıkları Student's T testi ve Ki kare testi kullanılarak yorumlandı.

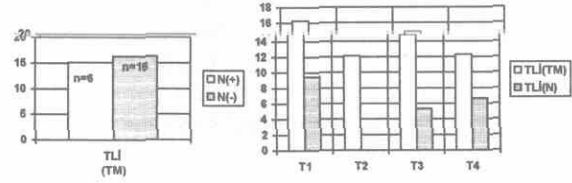
BULGULAR

22 hastanın tamamında tümör dokusundaki TLİ değeri ortaya konurken, bunlar içinden 9 tanesinde kontrol grubu için sağlam mukozadan alınan dokular da TLİ bakıldı. Elde edilen ortalama tümör dokusu TLİ değeri (%15,97) ile ortalama normal doku TLİ değeri (%8,33) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Çeşitli lokalizasyonlardaki TLİ tümör doku ve normal doku değerleri Şekil 1'de gösterilmiştir.

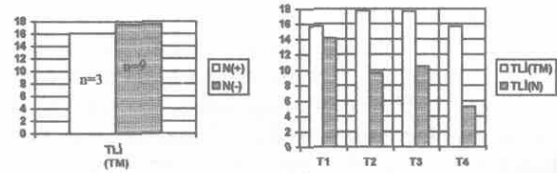
Supraglottik tümörlerde ortalama tümör dokusu TLİ değeri %17,18 ve ortalama kontrol TLİ değeri %10,09; glottik tümörlerde ortalama TLİ (TM) %14,4 ve ortalama kontrol TLİ %3,86; tek bir subglottik tümöre sahip hastada ortalama TLİ(TM) değeri %22,93 ; transglottik tümörlerde ortalama TLİ(TM) değeri % 10,77 ve ortalama normal doku TLİ değeri %6,68 olarak bulunmuştur. Tüm lokalizasyon gruplarında tümör doku normal doku TLİ değerleri arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Lokalizasyonlar arasında TLİ değerinde vaka sayısının yeterli olmaması nedeniyle istatistiksel bir yorum yapılmamıştır.

TNM sınıflandırmasıyla tüm vaka serimizdeki TLİ arasındaki ilişki Şekil 2'de gösterilmiştir. Bütün T1'lerde TLİ(TM) değeri %16,28 ve ortalama TLİ(N) %9,5 ; bütün T2'lerde ortalama TLİ(TM) %12,15 ; bütün T3'lerde ortalama TLİ(TM) %14,88 ve ortalama TLİ(N) %5,35 ; bütün T4'lerde ortalama TLİ(TM) %12,30 ve ortalama TLİ(N) %6,68 olarak bulunmuştur. Tüm T'lerde TLİ(TM) ve TLİ(N) değerleri arasındaki fark anlamlı ($p < 0,05$) ancak T arttıkça TLİ'deki değişiklik anlamlı değildir. Patolojik olarak nodal tutulumu olan N(+) grupta TLİ(TM) %15,1 ; nodal tutulumu olmayan N(-) grupta TLİ(TM) %16,3 değerleri arasında anlamlı fark bulunamamıştır.



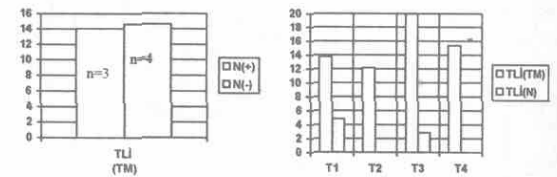
Şekil 2: T ve N ile TLİ arasındaki ilişki.

Supraglottik lokalizasyondaki T1 tümörlerde ortalama TLİ(TM) %15,71 ve ortalama TLİ(N) %14,14 ; T2'lerde TLİ(TM) %17,75 ve TLİ(N) %9,65 ; T3'lerde TLİ(TM) %17,63 ve TLİ(N) %10,5 ; T4'lerde TLİ(TM) %15,68 ve TLİ(N) %5,28 olarak N(+)'lerde TLİ(TM) %16,13 ; N(-)'lerde ise %17,13 olarak bulunmuştur. Bu lokalizasyonun kendi içinde TNM'i ile TLİ değeri arasında anlamlı ilişki gösterilemedi. Şekil 3'te bulgular özetlenmiştir.



Şekil 3: Supraglottik lokalizasyonun TLİ değeri ile TNM'i arasındaki ilişki.

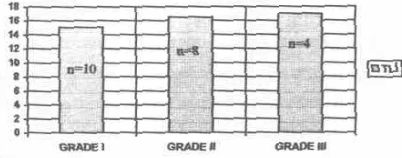
Glottik lokalizasyonda T1'deki ortalama TLİ (TM) %13,73 ortalama TLİ(N) %4,87 ; T2'deki TLİ (TM) %12,15 ; T3'deki TLİ(TM) %19,94 TLİ(N) %2,84 ; T4'deki TLİ(TM) %15,35 ve N(+)'lerdeki ortalama TLİ(TM) %14,03 N(-)'lerdeki ise %14,67 olarak bulundu yine istatistiksel anlamlılık görülmedi. Şekil 4'te glottik bölge özetlenmiştir.



Şekil 4: Glottik lokalizasyonun TLİ değeri ile TNM'i arasındaki ilişki.

Hastaların 10 tanesinin (%45) patolojik grade derecesi I ve ortalama TLİ değeri %15,06, 8 tanesinde (%36) grade TLİ değeri %16,5, 4 tanesinde (%19) grade III ve ortalama TLİ değeri %17 olarak bulundu. Patolojik grade ile TLİ arasındaki ilişki Şekil 5'te

özetlenmiştir. Patolojik grade arttıkça yani tümörün differansiyonu azaldıkça TLİ değeri artmaktadır ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 5: Patolojik grade ile TLİ arasındaki ilişki.

TARTIŞMA

Son yıllarda tümör hücresi DNA içeriğinin ölçülmesi objektif bir test olarak prognoz tayininde önem kazanmıştır. Bu konudaki temel yöntemlerden olan **TLİ** tayini birçok tümörlerde prognostik parametre olarak güvenle kullanılmaktadır.

TLİ'nin en önemli yönü objektifliği ve hata oranının çok düşük olmasıdır. Bir diğer avantajı da sonucunu 4 günde elde edilebilmesidir. En önemli dezavantajları ise pahalılığı, bu konuda yetişmiş sitolog ve laboratuvar imkanları gerektirmesidir.

TLİ, 1980'lerin ortasından itibaren tümör hücrelerinin malignite potansiyellerini objektif olarak değerlendirmek ve tedavi protokollerinin oluşmasında katkıda bulunmak amaçları için giderek artan bir ilgi ile tıbbi literatürde yerini almaktadır.

Farklı evrelerdeki 22 olgumuzun tümör dokusundaki TLİ değeri ortalama olarak %15.97 bulunurken normal dokudaki bu değer %8.33 bulunmuş ve TLİ değerinin tümör dokusunun hücreli mitotik aktivitesinin objektif bir göstergesi olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir. Olguların sayısal olarak yetersiz olması nedeniyle, tümör lokalizasyonları arasında ortalama TLİ değerlerinin istatistiksel anlamlılığı ortaya konulmasa da supraglottik bölge (n=12, TLİ %17.18) ve subglottik bölge (n=1, TLİ %22.93) yerleşimli tümörlerdeki ortalama TLİ değerinin glottik bölge (n=7, TLİ %14.4) değerine göre yüksek olması dikkat çekicidir. Yine yalnızca iki olgunun dahil olduğu transglottik karsinom ortalama TLİ değeri en düşük olup (%10.77) paradoks oluşturmaktadır.

TNM sınıflamasına göre gruplanan olguların tümör dokusu ortalama TLİ değerleri incelendiğinde, greek T sınıfı gerekse nodal durumunun bu değerler üzerinde istatistiksel bir farklılık yaratacak etkisi görülemez.

Larenks piyeslerinin histopatolojik incelenmesi sonucu tüm hastaların patolojik gradeleri belirlenmiş-

tir. Hücre farklılaşması azaldıkça ortalama TLİ değeri artış göstermekle birlikte, gradeler arası istatistiksel anlamlılık bulunmamaktadır.

TLİ başta meme kanseri olmak üzere tiroid, kolorektal, prostat, over karsinomlarında ve lenfomalarda çalışılmış özellikle meme kanserinde prognoz tayininde rutin uygulamaya irmek üzeredir. Ancak baş boyun kanserlerinde TLİ ile ilgili çalışmalar azdır, sonuçlar da değişkendir. Balzi ve arkadaşları, larenks kanserinde yaptıkları çalışmada TLİ değerinin T1 ile T3 arasında anlamlı olarak arttığını ancak N(+) ile N(-) arasında anlamlı bir fark bulunmadığını belirtmişlerdir (1). Yine aynı grubun 45 larenks kanserli hasta üzerinde yaptıkları bir başka çalışmada TLİ değeri %2,78 ile %32,29 arasında yer almış ve TLİ değerinin %16,30'un üzerinde olmasının larenks kanserinde kötü prognozu işaret ettiğini vurgulanmıştır (2). Veneroni ve arkadaşları oral kavite tümörlerinde TLİ değerini radyoterapiye seçilecek hastaların tayinine yardımcı olmak üzere değerlendirmiş ve orta düzeyde proliferatif tümörlerde (%1.5 ile %9 arası) tercih edilmesini öneren bir sonuca ulaşmıştır (8). elprana ve arkadaşları, baş boyunda yassı epitel hücreli karsinomunda in vitro olarak kemoterapötillerin tümör hücreleri üzerine etkisini TLİ ile değerlendirmişler ve bunun objektif bir test olarak kemosensitivitenin değerlendirilmesinde kullanılabileceği sonucuna varmışlardır (4).

Bu yazıda sunulan çalışmamızın gerek olgu sayısı, gerekse izleme süresi açısından yetersiz olması nedeniyle kesin yargılara varılması için henüz erken olduğu düşüncesindeyiz.

SONUÇ

Timidin labelling indeks, bir hücre popülasyonunun proliferasyon oranını göstermesi nedeniyle önemli bir klinik parametredir. TLİ tümör hücre büyümesini, saldırganlığını, tedaviden sonra nüksetme oranını, hastaların sürvisini verebilir; tedavinin planlanmasına da katkıda bulunabilir (3).

Elde ettiğimiz bulgular, TLİ nin baş boyun tümörlerinde patolojik grade ile uyumlu olduğu, kontrol doku ile tümör dokusu değerlerinin anlamlı derecede farklı olduğunu. TNM ile ise henüz bir anlamlılık bulamadık. İzleme süremizde sağkalım hakkında TLİ değeriyle ilişkili bilgi verecek düzeyde değildir.

Bu elde ettiğimiz ilk sonuçlar TLİ nin baş boyun kanserlerinde bir prognostik parametre olabileceği yönündedir. Ancak bu bulgular yapmayı planladığımız geniş kapsamlı çalışmanın ilk değerleridir. Bundan sonra hem veri sayımızı arttırıp hem de başta in-

vitro kemoterapötiklere tümör doku duyarlılığı olmak üzere çeşitli tedavi seçeneklerinde TLİ değerinin kullanılmasını planlamaktayız.

Yazışma Adresi: Dr. Can KARATAY
İ.Ü. Tıp Fakültesi
KBB Anabilim Dalı
Çapa-İSTANBUL

KAYNAKLAR

1. BALZI M, NINU BM, BECCIOLINI A, SCUBLA E: Labeling index in squamous cell carcinoma of the larynx. Head Neck Jul-Aug 1991 13(4) p344-8.
2. BALZI M, BECCIOLINI A, MAURI P, BOANNIN P: The prognostic role of thymidine labeling index in larynx carcinoma. Cell Proliferation 1994.
3. BİLİR A., GÜLGÜNC.: Tümör prognozunda Timidin Labeling İndeks'in önemi İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası 58:2(111-116) 1995.
4. ELPRANAD., SCHWACHÖFER J., KUIJPERS W.: In vitro chemosensitivity testing of squamous cell carcinoma of the head and neck. Acta Otolaryng 1987 103;529-36
5. GOLDSMITH M.M., PILLSBURY H.C.: Pathologic ad cytometric indicators of biologic behavior in laryngeal cancer. Laryngeal Cancer Carl E. SU ver ed. (27-33) 1991.
6. ÖZ F., ÖKTİM F.: Baş boyun kanserlerinde tümör belirleyicileri. KBB İhtisas Dergisi 2:1 (26-33) 1994.
7. VENERONI S., COSTA A., SALVATORI P., MOLINARI R., SILVESTRINI R.: Prognostic role of cell proliferation to monitor radiosensitivity I oral cavity cancer patients. Cell Proliferation 1994.
8. SPIESSL B., BEAHR O.H., HERMANEK P ET ALL: TNM Atlas, 3rded. Springer-Verlag, 1989.