



LARENKS KARSİNOMLARINDA p53 EKSPRESYONU VE PROGNOZUN DEĞERLENDİRİLMESİ

p53 EXPRESSION IN LARYNGEAL CANCER AND EVALUATIONS ITS PROGNOSIS

Dr. Kenan GÜNEY* Dr. Gülay ÖZBİLİM** Dr. Fırat FİŞENK* Dr. Müzeyyen DOĞAN*
Dr. Bülent AĞIRDİR* Dr. Esor BALKAN* Dr. Oktay DİNÇ*

ÖZET

Çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi Anabilim dalında larenks karsinomu tanısı ile ameliyat edilen 33 hasta retrospektif olarak incelenmiştir. Hastalara ait spesimenlerde immünohistokimyasal yöntemlerle p53 tümör süpresör geninin fonksiyonu araştırılmıştır. Larenks kanserlerinde prognoz üzerine etkisi olabilecek histopatolojik ve klinik kriterler ile p53 pozitifliği ele alınarak, lokal rekürrens ve uzak metastaz üzerine etkileri ortaya konulmuştur. p53 pozitifliği ele alınarak, lokal rekürrens ve uzak metastaz üzerine etkileri ortaya konulmuştur. p53 pozitifliği % 51.1 oranında saptanırken, sonuçlarımız daha önceki çalışmaların ışığında tartışılmıştır.

Anahtar Sözcükler : p53, larenks karsinomu, prognoz

SUMMARY

In this study we examined 33 patients with squamous cell carcinoma of the larynx retrospectively who were operated at the ENT and Head-Neck Surgery of Akdeniz University Hospital between 1994-1997. We studied the presence of p53 abnormalities by immunohistochemical methods and p53 expression was found to occur in 51.1 % of all pathological specimens.

This study showed that there is a significant correlation between p53 expression, locoregional recurrence and distant metastasis. Our results are also discussed with the previous studies.

Key Words: p53, laryngeal carcinoma, prognosis

* Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB - BBC Anabilim Dalı - ANTALYA

** Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı - ANTALYA

Çalışmanın Yapıldığı Klinik(ler) : Akdeniz Tıp Fak. KBB Kliniği

Çalışmanın Dergiye Ulaştığı Tarih : 25.04.2001

Çalışmanın Basıma Kabul Edildiği Tarih : 28.09.2001

Yazışma Adresi : Dr. Kenan GÜNEY, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi

KBB-BBC Anabilim Dalı - ANTALYA



GİRİŞ

Günümüzde baş-boyun bölgesinin yassı hücreli karsinomunda tedavi, histolojik grade ve TNM evresine bağlıdır. Ancak bu değerlerin tedavi sonuçlarını önceden tahmindeki yerleri sınırlıdır. Baş-boyun bölgesine ait yassı hücreli karsinomda hastaların tedaviye farklı yanıt verebilmeleri ilave bir takım prognostik faktörlerin varlığını gündeme getirmiştir.

Bunlardan biri olan p53 tümör süpresör geni in vivo olarak çeşitli insan kanserlerinde tespit edilmiştir (1, 2). Bu tümör süpresör geninin fonksiyonu hücre proliferasyonunda negatif regülatör görevi yapmasıdır. p53 geninin mutasyon ve delesyonlarla inaktivasyonu, fonksiyonun bozulmasına, dolayısıyla sınırlanamayan bir hücre gelişimine yol açar.

Baş-boyun bölgesinin yassı hücreli karsinomunda p53 proteinin ekspresyonu son zamanlarda oldukça iyi araştırılmış olup, % 34 ile % 80 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir (3, 4, 5, 6, 7, 8). Sigara içmeyenler ile sigara içenler karşılaştırıldığında sigara içenlerde p53 insidansının oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (4). Ayrıca p53 mutasyonları saptanan (küçük hücreli olmayan) akciğer ve meme kanserlerinde sağ kalım süresinin daha kısa olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (9, 10).

Bu çalışmanın amacı, larenksin squamoz hücreli karsinomunda p53 protein ekspresyonunun klinik ve prognostik önemini araştırmaktır.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Baş ve Boyun Cerrahisi Anabilim Dalında 1994-1997 tarihleri arasında larenks karsinomu tanısı ile ameliyat edilen ve düzenli takipleri olan 33 hastanın Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında cerrahi spesimenlerinin parafin bloklarından hazırlanan kesitlerin incelenmesi ile yapılmıştır.

Çalışmaya alınan hastaların 1'i (% 3) kadın, 32'si (% 97) erkektir. Yaşları 36-71 arasında değişmekte olup, yaş ortalaması 58.5 olarak bulunmuştur.

Çalışmada, prognozu belirlemede lokal nüks, uzak metastaz gelişip gelişmediğine bakılmıştır. Hastaların izlem süresi en az 11 ay, en fazla 4 yıldır.

Hastalarda klinik parametreler olarak yaş, cins, tümör lokalizasyonu boyunda lenfadenopati, uygulanan tedavi, takip süreleri ve prognozları kaydedilmiş ve p53 pozitifliği ile ilişkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızdaki istatistiklerde Ki kare testi kullanılmıştır.

Olguların bloklarından hazırlanan parafin kesitlerine immünohistokimyasal olarak Streptovidin-Biotin kompleksi

yöntemi ile p53 No-7 antikolar uygulanmıştır.

Boyamada chromalum-gelatin ile kaplanan lamlara alınan 4-5 mm kalınlığındaki kesitler 56°C'de etüvde 15 dk kurutulup xylolde deparafinize edildi. Daha sonra alkolden geçirilip hidrate edildi. Sonra doku kesitlerine antijenlerin yeniden kazandırılabilmesi için mikrodalga fırında "Antijen Retrieval" işlemi uygulandı. p53 için hazırlanan kesitler 0.001 molar ve pH=6 olarak hazırlanan sitrat solüsyonunda mikrodalga fırında sıvı seviyesi lamların üzerini kapatacak şekilde 10 dk "Antijen geri kazanım" işlemine tabi tutuldu ve Streptovidin-Biotin peroksidase yöntemi ile boyama gerçekleştirildi.

p53 işlemi için yapılan boyamada çekirdek boyaması pozitif ve negatif olarak değerlendirildi. Boyanan alan yüzdesi (%) ve boyama şiddeti negatif, hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak skorlandı.

BULGULAR

1994-1997 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Baş ve Boyun Cerrahisi Anabilim Dalında larenksin yassı epitel hücreli karsinomu tanısı ile ameliyat edilen 33 hastanın, yaşları 36-71 arasında değişmekte olup, ortalama 58.5'tir. Hastaların izlem süresi 11-48 ay arasında değişmektedir. İzlem sırasında bir hasta operasyondan 18 ay sonra exitus olmuştur. Diğer hastaların izlemi devam etmektedir. Hastalardaki tümör evlendirmesi AJCC (American Joint Comitee of Cancer) 1992'nin önerdiği şekilde yapılmıştır (11).

Tüm hastaların primer tedavisi cerrahi olarak planlanmıştır. 30 hasta operasyonu takiben 6 hafta sonra radyoterapi uygulanmıştır. 3 hastaya radyoterapi uygulanmamıştır.

33 olgudan 2'sine operasyon+radyoterapi sonrası nüks görülmesi üzerine kemoterapi verilmiştir. Bu hastalardan biri 52 yaşında glottik larenks Ca (T2 N0 M0) tanısı alıp opere edilmiş, p53 (+++) olarak saptanmıştır. Yara iyileşmesini takiben 6 hafta sonra radyoterapi uygulanan hastada 1 yıl sonra nüks izlenmesi üzerine kemoterapiye başlanmıştır. Bu hastada cerrahi sınır (-) gelmiştir. Diğer hasta 68 yaşında in situ Ca (T1 N0 M0) saptanarak önce kordektomi uygulanmış ardından radyoterapi uygulanmıştır. Hastada 4 yıl sonra nüks görülerek salvage cerrahisi uygulanmıştır. Bu son operasyona ait materyalde p53 (+) bulunmuştur. Hastanın izlemi sırasında karaciğerde metastaz şüphesi nedeniyle onkoloji bölümü tarafından kemoterapi açısından takibe alınmıştır. Bu hastada da cerrahi sınır (-) olarak tespit edilmiştir.

33 hastadan sadece bir tanesi sigara kullanmamaktadır ve kadındır. Diğer 32 hastanın hepsi erkek olup, sigara anamnezi vermektedirler. Sigara içmeyen hastada p53 (-) iken, sigara kullananlarda p53 (+)'liği ve negatifliği değişkenlik gös-



termektedir.

Glottik larenks Ca'lı 20 hastanın 8'inde p53 sonucu (-) bulunurken 12 hastanın p53 sonucu (+) ile (+++) arasında değişmektedir.

Supraglottik larenks Ca'lı 5 hastanın p53 değeri (-), 4 hastanın ise (+) ile (+++) arasındadır. Transglottik larenks Ca'lı 3 hastanın p53 değeri (-) bulunurken, 1 hastanın (++) olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak 33 hastanın 17'sinde p53 (% 51.5) pozitif bulunmuştur.

Lokal nüks saptanan hastaların % 50'sinde p53 pozitifdir. p53 negatif olan 16 hastada ise (% 94.1) lokal nüks mevcuttur. 15 hastada ise (% 93.8) lokal nüks izlenmemiştir.

p53 pozitif olan 17 hastanın 1'inde (% 5.9) lokal nüks saptanmıştır. 16 hastada ise (% 94.1) lokal nüks izlenmemiştir. Lokal nüks oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05).

lamli bulunmamıştır (p>0.05).

p53 pozitif olan 17 hastanın % 52.9'unda nodal tutulum yoktur. % 47'sinde ise nodal tutulum izlenmiştir. Lokal nüks oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05).

p53 pozitifliği T1-T2 tümörlerde % 35.3 iken, T3-T4 tümörlerde % 64.7 'dir. Bu sonuçlar da istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0.05).

p53 pozitifliği Stage I ve II'de % 41.2, Stage III ve IV'de ise % 62.5'dir. sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05).

p53 pozitif olan 17 hastanın % 5.9'unda cerrahi sınırlarda tümör mevcuttur. % 94.1'inde ise cerrahi sınır (-) gelmiştir.

Cerrahi sınırlarda tümör pozitif olan hastaların % 88.9'unda p53 negatif, % 11.1'inde p53 pozitifdir.

Yaş	Cins	Lokalizasyon	TNM	Cerrahi sınırlarda tümör	p53	Sigara kullanımı	Uygulanan tedavi	İzlem süresi
52	E	Glottik	T2N0M0	-	% 70 (+++)	+	TL+RT+KT	15 Ay
68	E	Supraglottik	T2N0M0	-	% 30 (+++)	+	SL+RT	29 Ay
43	E	Glottik	T2N0M0	-	(-)	+	NTL+RT	22 Ay
60	E	Glottik	T3N0M0	-	% 20 (++)	+	TL+RT	18 Ay
62	E	Glottik	T1N0M0	-	(-)	+	VL	22 Ay
50	E	Supraglottik	T2N0M0	-	% 40 (+)	+	SL+RT	16 Ay
52	E	Glottik	T3N0M0	-	(-)	+	VL+RT	12 Ay
58	E	Glottik	T2N0M0	+	(-)	+	VL+RT	48 Ay
52	E	Glottik	T3N0M0	-	% 10 (+)	+	TL+RT	12 Ay
53	E	Supraglottik	T1N0M0	+	(-)	+	TL+RT	19 Ay
54	E	Supraglottik	T2N0M0	+	(-)	+	SL+RT	20 Ay
48	E	Glottik	T3N0M0	-	% 30 (+++)	+	TL+RT	33 Ay
36	E	Glottik	T1N0M0	+	(-)	+	VL+RT	41 Ay
68	E	Glottik	T1N0M0	-	% 10 (+)	+	Korpektomi+KT	13 Ay
43	E	Supraglottik	T1N1M0	-	% 40 (++)	+	SL+RT	18 Ay
64	E	Glottik	T3N0M0	-	% 10 (+)	+	TL+RT	36 Ay
50	E	Glottik	T3N1M0	-	% 40 (++)	+	TL+RT	11 Ay
68	E	Supraglottik	T3N1M0	+	(-)	+	TL+RT	25 Ay
61	K	Glottik	T1N0M0	-	(-)	+	Korpektomi	13 Ay
62	E	Transglottik	T3N0M0	-	% 20 (++)	+	TL+RT	14 Ay
53	E	Supraglottik	T2N0M0	+	(-)	+	TL+RT	39 Ay
63	E	Supraglottik	T3N2M0	+	% 40 (+)	+	TL+RT	16 Ay
71	E	Glottik	T1N0M0	-	% 20 (+)	+	TL+RT	33 Ay
50	E	Glottik	T2N0M0	-	% 70 (+)	+	TL+RT	12 Ay
62	E	Glottik	T2N0M0	-	(-)	+	VL+RT	15 Ay
58	E	Glottik	T3N1M0	-	% 10 (+)	+	TL+RT	16 Ay
53	E	Supraglottik	T1N0M0	+	(-)	+	TL+RT	21 Ay
65	E	Transglottik	T4N1M0	-	(-)	+	TL+RT	18 Ay
60	E	Glottik	T1N0M0	-	(-)	+	TL+RT	18 Ay
67	E	Transglottik	T4N1M0	-	(-)	+	TL+RT	18 Ay
54	E	Glottik	T1N0M0	-	% 60 (+)	+	TL+RT	17 Ay
65	E	Transglottik	T4N1M0	-	(-)	+	TL+RT	15 Ay
60	E	Glottik	T3N1M0	-	% 40 (+)	+	TL+RT	11 Ay

SL: Subtotal larenjektomi
VL: Vertikal Larenjektomi
TL: Total Larenjektomi
NTL: Near-Total Larenjektomi
RT: Radyoterapi
KT: Kemoterapi



TARTIŞMA

p53 geni 17 nolu kromozomun kısa kolunda 13-1 bölgesinde lokalize 53 kDa ağırlığında olan tümör süpresör genidir. p53 geninin normal ürünü "wild tip" p53 protein olarak adlandırılan DNA'ya bağlanabilen hemodimerik bir proteindir. DNA sentezi başlamadan önce geç G1 fazında yükselir. Düşük konsantrasyonlarda eksprese edildiğinden ve sellüler proteazlar tarafından yıkıldığından hızlı döngüye sahiptir. Yarılanma ömrü kısa olduğu için ve normal hücrelerde az miktarda üretildiğinden dolayı immünohistokimyasal yöntemlerle saptanamamaktadır. p53 genindeki mutasyonlar insan tümörlerinde bulunmuş en genomik değişimlerdir.

p53 geninin 5. ve 8. eksonlarında çıkan bir mutasyon mutant protein oluşturabilir. Bu mutant proteinin yarılanma ömrü uzundur. Mutan p53 proteini konformasyonel farklılık gösterdiği için spesifik monoklonal antikor ile tanınır.

Bu çalışmanın amacı larenksin yassı hücreli karsinomunda hızlı proliferasyonun bir markeri olarak p53 mutasyonu veya protein birikimini tespit ederek, bunun bir prognostik faktör olarak yerini araştırmaktır. Ayrıca tümörün larenkste lokalizasyonuna göre p53 pozitifliğinde bir değişikliğin olup olmadığına bakılmıştır.

Wood ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada baş-boyun kanserlerinde p53 mutasyonunu değerlendirmişlerdir. Yaşları 40-83 arasında değişen 29 erkek ve 9 kadın hastanın analiz edildiği bu çalışmada, p53 mutasyonu ile yaş, seks, primer tümörün yeri arasında ilişki saptanmamıştır (11). Bizim çalışmamızda da hastalardan bir kadın olup, yaş ve cins ile p53 pozitifliği arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. İzlem sırasında sadece bir hasta exitus olduğu için toplam sağ kalım ile ilgili bir yoruma varılamamıştır. Çalışmamıza alınan hasta grubunda sadece bir hasta sigara kullanmamaktadır. Sigara kullananlarda p53 sonucu hem negatif, hem de (+)'den (++++)'e kadar değişen oranlarda boyanma özellikleri göstermişlerdir. Bu nedenle sigara kullanımının p53 birikimini indüklediği görüşü bizim çalışmamızdaki sonuçlara uygunluk göstermektedir (2).

Fransa'da yapılan bir çalışmada Fagen ve arkadaşları 78 hastayı değerlendirerek primer tümör ve nod metastazında mutasyon insidansını farklı bulmamışlardır. Bizim çalışmamızda da p53 pozitif olan 17 hastanın % 52.9'unda nodal tutulum izlenmemiştir. Hastaların % 47.1'inde ise nodal tutulum saptanırken, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (12). Bu gen değişikliğinin metastatik yayılmaya bağlı olmadığı görüşü bizim çalışma sonuçlarımızla desteklenmektedir.

Field ve arkadaşları yaptıkları çalışmada p53 ekspresyonunun prognostik öneminin olmadığını ifade etmiştir (13). Bizim çalışmamızda p53 pozitifliği T1-T2 tümörlerde % 35.3 iken T3-T4 tümörlerde % 64.7'dir. sonuçlar istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır. Stage I-II' de p53 pozitifliği % 41.2, stage III ve IV' de ise % 62.5 olarak değerlendirilirken istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

Fagen ve arkadaşları hastalığın progresyonu ile p53 over- ekspresyonu arasında bir ilişki saptamamışlardır (12). Biz de p53 pozitif olan 17 hastanın 1'inde (% 5.9) lokal nüks saptarken, 16 hastada (% 94.1) lokal nüks tespit etmedik. Lokal nüks oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç olarak; p53 pozitifliği ile nodal tutulum ve lokal rekürrens arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Toplam sağ kalım süreleri ile p53 ilişkisini değerlendirmek amacıyla çalışmamız devam etmektedir. Şu anki izlem süremiz bu konuda yorum yapmak için kısa olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca sigara kullanan hastaların bir kısmında p53 (-) iken, diğer bir kısmında (+) ile (+++) arasında değerlerin saptanması sigara ile p53 arasındaki ilişkinin belirleyici olmadığı sonucunu doğurmaktadır.



KAYNAKLAR

1. GREENBLATT MSN, BENNETT WP, HOLLSTEIN M et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, 1994; 154: 4855-78.
2. BOYLE JO, HAKIM J, KOCH W, et al. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res.*, 1993; 53:4477-80.
3. CAAMARO J, ZHANG SY, ROSVALD EA, BAUER B, Klein-Szanto AJP. p53 alterations in human squamous cell carcinoma cell lines. *Am J Pathol.*, 1993; 142: 1131-39.
4. FIELD JK, SPANDIDOS DA, MALLIRI A, GOSNEY JR, Viganinis M, Steel PM. Elevated p53 expression correlates with history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br j Cancer*, 1991; 64:573-7.
5. GUSTERSON B, ANBAZHAGEN R, WARREN W, MIDDLEY C, LANE DP, OLTARE M, et al. Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene*, 1991; 6: 1785-89.
6. LARYDOR JD, PARTRIDGE M. expression of the tumor suppressor gene p53 in oral cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg.*, 1992; 30 : 214-20.
7. WARNAKULASURIYA KAAS, JOHNSON NW. Expression of mutant nuclear phosphoprotein in oral carcinoma and potentially malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med.*, 1992; 21: 404-8.
8. DURSUN G, SAK SD, AKYOL G, DURSUN A, EREKUL S, DEMIRELLER A, AKİNER M. overexpression of p53 in laryngeal carcinoma: clinicopathological implications. *ENT Journal*, 1995; 74: 4
9. HARIO Y, TAKAHASHI T, KUROISHI T, HIBI K, SUYAMA M, NIIMIM T, et al. Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 1993; 53: 1-4.
10. THORLACILLIS S, BÖRRSEN AL, EYFJÖRD JE. Somatic p53 mutations in human breast carcinomas in an Icelandic population: a prognostic factor. *Cancer Res.*, 1992; 53: 1637-41.
11. AMERICAN JOINT COMITEE ON CANCER: Manual for Staging cancer. Philadelphia. Lippincott. 1992
12. WOOD NB, KOTELNIKOV V, CALDERELLI D, et al. Mutation of p53 correlates with rapid tumor proliferation and poor survival in squamous cell cancer of the head and neck. *Laryngoscope*. 1997; 107: 827-33.
13. FIELD JK, PAVELIC ZK, SPANDIDOS DA, STAMBROOK PJ, JONES AS, GMLUCKMAN JL. The role of the p53 tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head and Neck Surg.*, 1993; 119: 1118-22.