Parafin Emdirilmiş Larenks Tümör Dokularında p53 Protein Değerlendirilmesi*

Muhsin KOTEN1, Vehbi ŞEKER2, Mustafa Kemal ADALI3, Ahmet KARASALIHOĞLU4, Cem UZUN5, Kemal KUTLU6

ÖZET

Yöntem ve gereçler: 69 primer larenks epidermoid kanseri olgumuz patoloji materyallerinde immünohistokimyasal yöntem ile p53 protein varlığı araştırılmıştır.

Bulgular: Larenks kanseri 69 olgumuz serimizde, %62.3 oranında pozitif immünohistokimyasal boyama saptanmıştır.

Sonuç: Bu çalışmanın bulguları, larenks kanserinin oluşumunda p53 geni fonksiyon bozulüğunun önemi rol oynamadığını destekler niteliktedir.

Anahtar sözcükler: p53 protein, larenks kanseri, onkogen.

SUMMARY
ASSESSMENT OF P53 PROTEIN IN PARAFIN-EMBEDDED LARYNGEAL TUMOR TISSUES.

Purpose: p53 gene is located on human chromosome 17 and encodes a nuclear phosphoprotein thought to regulate proliferation of normal cells. The mutant forms are more stable and thus have an extended half life and can be detected by using immunohistochemical techniques. In this study, the existence of p53 protein in tumor tissue was investigated.

Methods: A series of 69 primary human squamous cell carcinomas of the larynx was examined for assessment of p53 protein in paraffin-embedded laryngeal tumor tissues by immunohistochemical approach.

Results: Immunohistochemical staining was found out in 62.3 % of laryngeal carcinoma.

Conclusion: The results of this study indicate that p53 gene function has an important role in the progress of larynx carcinoma.

Key words: p53 protein, laryngeal carcinoma, oncogene.

GİRİŞ

*Bu çalışma Trakya Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.
1 Doç. Dr. Trakya Üniversitesi Tip Fakültesi K.B.B. A.D.
2 Yrd. Doç. Dr. Trakya Üniversitesi Tip Fakültesi Patoloji A.D.
3 Yrd. Doç. Dr. Trakya Üniversitesi Tip Fakültesi Patoloji A.D.
4 Prof. Dr. Trakya Üniversitesi Tip Fakültesi K.B.B. A.D.
5 Prof. Dr. Trakya Üniversitesi Tip Fakültesi Patoloji A.D.


MATERIEL-METOD
Doku:

İmmünohistokimyasal boyama:
Parafine gömülü dokuların 5 mikron kalınlığında alınan kesitler Labelled spetreptavidinbiyotin (LSAB) yöntemli (6) ile boyandı. Deparafsinize edilen kesitler antijen özellik açağı çıkarmak için 100 sanitrad derecede mikrodalga firmada sızıntı tampon solusyonu içine benmari usulu 15-20 dakika tutulmuştur. Endojen peroksidaz, metanol içinde hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit ile giderildikten sonra primer antikor olarak monoklonal anti-human mouse p53 protein (DO-7)(DAKO) kullanılmıştır. Dokular oda sıcaklığında 30 dakika primer antikor ile inkübe edilmişdir. Renklendirici olarak diaminobenzidine (DAB) ve karıştır boyanarak Mayer's hematoksilin kullanılmıştır. Onceden kuvvetli pozitifliği tespit edilmiş olan larenks karsınomu dokusu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır, ayrıca her dokuya negatif kontrol uygulanmıştır. Boyamanın değerlendirilmesi sadece nükleer boyanma dikkate alınmış ve boyanan hücre oranına göre boyanma yoğunluğu %25'ten az ise (+), %25-50 (++), %50-75 (+++), %75'ten fazla ise (++++) ve hiç boyanma yoksa (-) olarak kabul edilmiştir (7)(Resim 1,2,3).

Resim 1: Tümör hücrelerinde fokal p33 varlığı (DAB X 400)
Resim 2: Tümör hücrelerinde yaygın p53 pozitifliği (DAB X 400)

Resim 3: Tümör dokusunda yaygın p53 varlığı, iyi diferansiyeye alanlarda sadece bazal hücrelerde boyanma (DAB X 50)

BULGULAR
Olgulanımızın tümü primer larenks karsinomu olup, 2 olgu bayan 67 olgu erkektr. En genç olgumuz 30 yaşında, en yaşlı olgumuz 83 yaşında. Bu olguların 23 (33.3)’üne parsiyel larenjektomi, 41 (59.4)’üne total larenjektomi, 5 (7.3)’üne near total larenjektomi uygulanmışdır. Parsiyel larenjektomi uygulanılan olguların tümörlerinin 3’unun az diferansiyasyon, 18’inin iyi diferansiyasyon, 2’sinin orta derecede diferansiyasyon gösterdiği, total larenjektomi uygulanan olguların 11’in az diferansiyasyon, 23’unun iyi diferansiyasyon 7’sinin orta derecede diferansiyasyon gösterdiği; Near total larenjektomi
uygulanan olguların birinin az differansiyasyon, birinin orta derecede differansiyasyon, üçünün iyi differansiyasyon gösterdiği saptanıdı (Tablo 1). Toplamda 15 (%21.7) olguda az differansiyasyon, 44 (%63.8) olguda iyi differansiyasyon, 10 (%14.5) olguda orta derecede differansiyasyon bulunmuştur. Pozitif p53 boya名义na göre değerlendirildiğinde; 15 az differansiyeye olgunun 12 (%80)’inde, 44 iyi differansiyeye olgunun 26 (%59.1)’inde, 10 orta derece differansiyeye olgunun 5 (%50)’inde pozitif p53 boyanması saptanmıştır (Tablo 2). Diferansiyeye tümörlerde p53 boyanma oranı artıktakı birlikte, istatistik olarak değerlendirildiğinde fark anlamaz bulunmuştur (p>0.05). Toplama göre değerlendirildiğinde 69 olgunun 43 (%62.3)’ündeki pozitif p53 boyanması saptanmış, 26 (%37.7)’ında p53 boyanması saptanmamıştır. Boyun diseksiyonu yapılp pozitif tümör tutulumu lenfadenopati olası 22 olgu olduğu görülmüş, bunların 16 (%72.7)’inde pozitif p53 boyanması bulunmuştur. Boyun diseksiyonu yapılp pozitif tümör tutulumu lenfadenopati olmamayan 42 olgunun 23 (%54.8)’ündeki pozitif p53 boyanması ve boyun diseksiyonu yapılmayan 5 olgunun 4 (%80)’ünde pozitif p53 boyanması bulunmuştur (Tablo 3). Bu dağılım istatistiksel olarak anlamaz bulunmuştur (p>0.05).

<p>| Tablo 1: Tümör differansiyasyonunun ameliyat türüne göre dağılımı |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|</p>
<table>
<thead>
<tr>
<th>Ameliyat türü</th>
<th>Olgu sayısı</th>
<th>AZ</th>
<th>ORTA</th>
<th>IYI</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Total Larenejktomi</td>
<td>41</td>
<td>11 (%26.8)</td>
<td>7 (%17.1)</td>
<td>23 (%56.1)</td>
</tr>
<tr>
<td>Parsiyel Larenejktomi</td>
<td>23</td>
<td>3 (%13.0)</td>
<td>2 (%8.7)</td>
<td>18 (%78.3)</td>
</tr>
<tr>
<td>Near Total Larenejktomi</td>
<td>5</td>
<td>1 (%20.0)</td>
<td>1 (%20.0)</td>
<td>3 (%60.0)</td>
</tr>
<tr>
<td><strong>TOPLAM</strong></td>
<td><strong>69</strong></td>
<td><strong>15 (%21.7)</strong></td>
<td><strong>10 (%14.5)</strong></td>
<td><strong>44 (%63.8)</strong></td>
</tr>
</tbody>
</table>

<p>| Tablo 2: Olguların Differansiyasyonu Göre Pozitif P53 Boyanma Oranları |
|-------------------|-------------------|-------------------|</p>
<table>
<thead>
<tr>
<th>Differansiyasyon</th>
<th>Olgu sayısı</th>
<th>Pozitif p53 boyanma oranları</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Az differansiyasyon</td>
<td>15</td>
<td>12 (%80.0)</td>
</tr>
<tr>
<td>İyi differansiyasyon</td>
<td>44</td>
<td>26 (%59.1)</td>
</tr>
<tr>
<td>Orta differansiyasyon</td>
<td>10</td>
<td>5 (%50.0)</td>
</tr>
</tbody>
</table>

(p > 0.05)

<p>| Tablo 3: Olguların Boyun Diseksiyonuna Göre Pozitif P53 Boyanma Oranları |
|-------------------|-------------------|-------------------|</p>
<table>
<thead>
<tr>
<th>Diseksiyonda tümör metastazlı lenfadenopati var</th>
<th>Olgu Sayısı</th>
<th>Pozitif p53 Boyanma oranı</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Diseksiyonda. tümör metastazlı lenfadenopati yok</td>
<td>22</td>
<td>16 (%72.7)</td>
</tr>
<tr>
<td>Boyun diseksiyonu yok</td>
<td>42</td>
<td>23 (%54.8)</td>
</tr>
<tr>
<td><strong>Boyun diseksiyonu yok</strong></td>
<td><strong>5</strong></td>
<td><strong>4 (%80.0)</strong></td>
</tr>
</tbody>
</table>

**TARTIŞMA**

neoplaziler görülür. Aile üyeslerinde beklenmedik erken yaşarda tümör gelişir (3). Bizim olgularımızın genç 30 yaşından olduğundan bu sendromu değerlendirirken almalıyız.

Biz bu çalışmada değerlendirildiğimiz 69 primer epidermoid larenks kanseri olgumuzda immün-histokimyasal boyama yöntemi ile %56.7 pozitif p53 protein boynaması saptadık. Nazofarenks karsinomlarında p53 ekspresyonu %84.6 pozitif (10), tüberküloz bezi neoplazilerinde (malign lezonlarda) %29.4 pozitif boynama (11), hipofarenks yassi hücreli karsinomlarında %37 (12); beyin tümörlerinde %33 (9), dil yassi hücreli karsinomlarında servikal nodül olan olgulara %43, olmayan olgulara %61 (8), kolorektal karsinomlarda %46.5 (13), kronik myeloid lösemi kronik fazda %67, ani kriz fazında %22, artmış fazda %60 (14), prostat kanserlerinde %20.4 (15) oranında p53 protein pozitif bulunmuştur. Boag ve ark. (16) 21 larenks kanseri ve 16 larenks selim lezonunda p53 protein varlığının artırılması ve kancerli 21 olgunun 14 (%67)’inde pozitif boynama olurken az diferansiyeye lezonların hepsinde pozitif boynama olduğu; selim lezonlarından sadece bir kord vokal kısımda pozitif boynama bulunduğu belirtmektedirler.

Sauter ve ark. (17) primer ve metastatik baş boyun karsinomlarında p53 değiştirildirmesin primer olguların %42’sinde, lenf bezleri metastaz olunan olguların %43’sinde pozitif p53 boynaması saptamışlardır.

Pavelic ve ark. (18) immünohistokimyasal boyama yönteminin kullanarak çalışıkları baş boyun dokularının %42’sinde pozitif p53 boynama saptamışlardır.

Maestro ve ark. (19) larenks kanserlerinde protein artışı ile birlikte p53 gen indeki yüksek orandaki değişiklikleri immün-histokimyasal boyama ve moleküler değerlendirmeye ile artırılmışlardır. Immünohistokimyasal yöntemde %60 pozitif boynama ve bunun p53 genindeki yapısı ve veya kopyalama bozukluğu ile birlikte olduğunu ileri sürmektedirler.

Scholnick ve ark. (20) olgularının %53’ünde p53 geninde, %59’unda retinoblastom geninde alel kaybi buldukları, bunun da larengeal karsinomda supeşresörlerin büyük rolü olduğunun gösterdiğini belirtmektedirler.

Brennan ve ark. (21) baş boyun yassi hücreli karsinomları olgularda p53 geninde mutasyon ile sigara içilmesi karsılaştırmak için yaptıkları çalışmada olguların genel toplamında %42 oranında gen mutasyonu bulmuşlardır. Sigara içenlerde %47, içmeyen olgulara %14, alkoll kullanlanlarda %55, kullanmayan olgulara %20 oranında gen mutasyonu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada p53 mutasyon oranı sigara içen ve alkoll kullanlan olgularda %58, sigara ve alkoll kullanma hikayesi olmayanlarda %17 bulunmuştur. Sigara içen ve alkoll kullanlan olgulardaki %58’lik p53 mutasyon oranı bizim çalışmamızdaki %62.3’lük pozitif p53 boynaması oranına çok yakınlığı ile larenks kanserlerinde sigara ve alkollun etkisini destekle bulunmaktadır.

Stringer ve ark. (22) cilt kanserlerinde p53 immün-histokimyasal boyama ile metastaz oranı ve prognoz arasında ilişiği araştırmışlardır. p53’ün pozitif immünohistokimyasal boynamasının artmış lokal metastaz oranı ile birlikte olduğunu bulmuşlardır ve bunun lokal lenfaticilerin elektrik tedavisi değerlendirilirken yararlı klinik veri olarak alınabileceğini belirtmektedirler.


değerlendirildiğinde pozitif boyanma olan olgu oranı daha düşük saptanmış, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Birim değerlendirmizde 69 primer larenks epidermoid kanseri olgunuunda immuno-
histokimyasal boyama yöntemi ile bulduğumuz %62.3 pozitif p53 protein boyanması oranının diğer çalışma sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak; çalışmanının verileri larenks kanserlerinin olgununda p53 geni fonksiyon bozukluğunun önemli rol oynadığı görüldü destekler nitelikte bulunmuştur.

**KAYNAKLAR**

8. Leedy DA, Trune DR, Kronz JD, Weidner N, Cohen JL: Tumor Angiogenesis, the p53 Anti-
20. Scholnich SB, Sun PC, Shaw ME, Haughey BH, El-Moffy SK: Frequent Loss of Heterozy-
gosity for Rb, TPS3, and Chromosome Arm 3p, but not NME 1 in Squamous Cell Carci-


