

LARİNSİN SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMUNDA DNA İÇERİĞİ VE C-ERB B-2 PROTEİN İMMÜNOREAKTİVİTESİNİN PROGNOSTİK ÖNEMİ:

BİR HÜCRE GÖRÜNTÜ ANALİZİ VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMA

Dr. Dilaver DEMİREL*, Dr. Hakan ÇERMİK*, Dr. Fulya ÇAKALAĞAOĞLU**, Dr. Atilla GÜNGÖR***, Dr. Hüseyin BALOĞLU*, Dr. Cüneyt ÜNERİ****, Dr. Mehmet KARAMAN*, Dr. Nadir ARICAN*, Dr. Şükrü YILDIRIM*, Dr. Sevgi KÜLLÜ**

ÖZET: Bu çalışmada larinksin skuamöz hücreli karsinomundan DNA içeriği ve C-erb B-2 onkoprotein ekspresyonunun prognostik değeri araştırılmıştır. Çalışmaya larinksin skuamöz hücreli karsinomuna sahip 41 vaka dahil edilmiştir. DNA analizi için formalinde tesbit edilip parafinde bloklanan dokuların kesitleri kullanılmıştır. DNA analizi yapılar 38 vakanın 6'sında diploidi, 32 sinde ise aneuploidi görülmüştür. C-erb B-2 immün boyanması tüm vakalarda negatif olarak saptanmıştır. Bu çalışma larinksin skuamöz hücreli karsinomlarında parafin kesitlerde belirlenen DNA içeriğinin prognostik bir bilgi vermeyeceğini düşündürmektedir. C-erb B-2 onkoproteininin negatif olması larinks tümörlerinin en azından bir kısmında bu proteinin eksprese edilmediğini göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELE: Larinks, skuamöz hücreli karsinom, DNA içeriği, görüntü sitometri, oncoproteinler.

SUMMARY: PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF DNA CONTENT AND C-ERB B-2 ONCOPROTEIN IMMUNOREACTIVITY IN SQUAMOUS CELL CARCINOMAS OF THE LARYNX. A CELL IMAGE ANALYSIS AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY: Prognostic value of DNA content and C-erb B-2 oncoprotein expression of squamous cell carcinoma of larynx was investigated in this study. 41 cases with squamous cell carcinoma of larynx were included in the study. Formaline fixed and paraffin embedded tissue sections were used for DNA analysis. Diploidy was found in 6 and aneuploidy was found in 32 cases among 38 cases analysed for DNA. C-erb B-2 immunoreactivity was negative in all cases. This study suggests that there is not a prognostic significance of DNA content determined on paraffin sections in squamous cells carcinoma of the larynx. The negative C-erb B-2 staining in all our cases shows that this oncoprotein may not be expressed in at some cases of laryngeal squamous cell carcinomas.

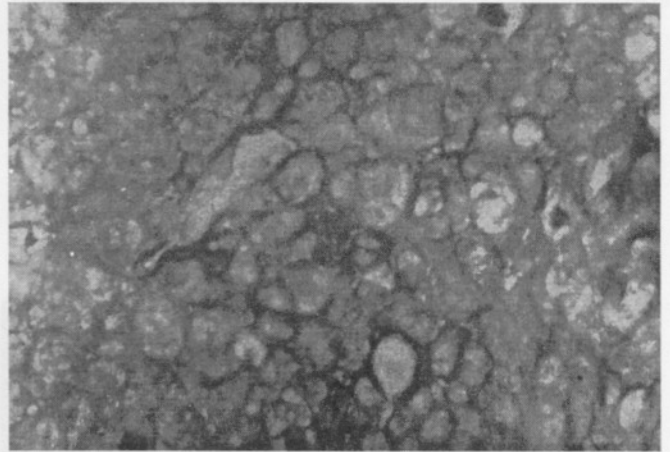
KEY WORDS: Larynx, squamous cell carcinoma, DNA content, image cytometry, oncoproteins.

GİRİŞ

Larinksin skuamöz hücreli karsinomlarında prognoz tahmini genellikle klinik verilere göre yapılmaktadır. Cerrahi tedaviler ve radyoterapi uygulamaları bazı vakalarda yeterli olmamakta, bazılarında ise gereğinden fazla olmaktadır(1). Tümörlerin biyolojik davranışı belirlemek tedavinin doğru ve etkin olarak planlanmasına olanak sağlamaktadır. Tümör davranışını belirlemek amacı ile nükleer DNA içeriği ve onkogenlerin tayini son zamanlarda yapılan bir çok araştırmanın konusunu oluşturmaktadır.

Yapılan çalışmalarda bu tümörlerin DNA miktarı ile biyolojik davranışı arasında anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmiştir (2,3). Larinksin aneuploid tümörlerinin genellikle yüksek nüks oranı ve kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmektedir(2,3).

C-erb B-2, epidermal growth faktör reseptör ailesinden bir onkoprotein olup, bu genlerin aşırı ekspresyonunun yüksek proliferatif aktivite, düşük nükleer grade ve bölgesel lenf nodu yayılımı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir(4). Meme kanserleri başta olmak üzere adenokarsinomların birçoğunda yüksek düzeyde C-erb B-2 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmektedir(5). Çalışmamızda parafin kesit-



Şekil 1: Meme kanserinde C-erb B-2 onoprotein için kuvvetli boyanma (X440).

lerde DNA içeriği ve C-erb B-2 ekspresyonu araştırılmış ve bulgular vakaların postoperatif seyri ile karşılaştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

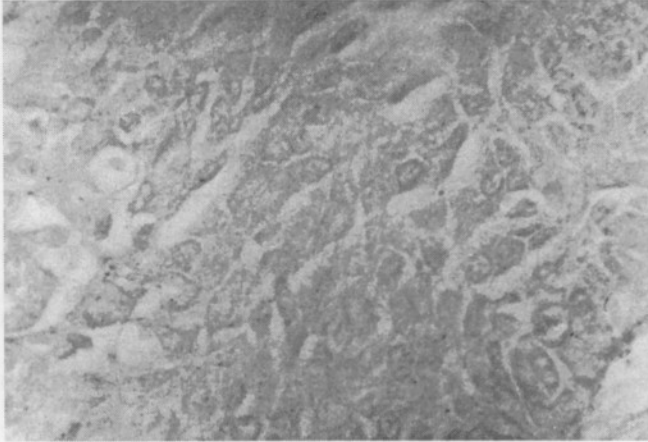
Bu çalışmaya GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi K.B.B. Kliniğinde, 1988-1997 yılları arasında larinksin skuamöz hücreli karsi-

* GATA, Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Patoloji Servisi, İstanbul.

** Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji ABD, İstanbul.

*** GATA, Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, KBB Servisi, İstanbul.

**** Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, ABB ABD, İstanbul.



Şekil 2: Larinks kanserinde C-erbB-2 onkoprotein için negatif boyanma (X440).

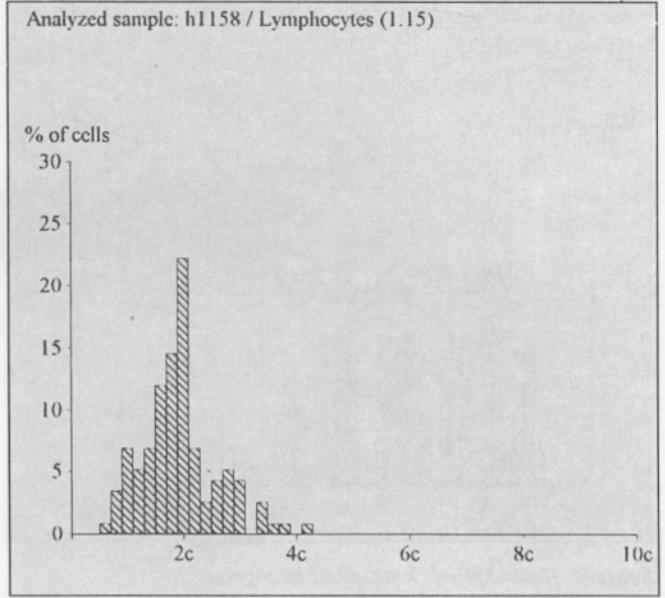
nomu tanısı ile tedavi ve takip edilen 41 vaka dahil edilmiştir. Hastaları 40'ı erkek, 1'i kadın olup, ortalama postoperatif 3 yıl (6 ay-9 yıl) süre ile takip edilmişlerdir. Vakaların larinkjektomi materyalleri ya da biyopsi örneklerinin % 10 luk tamponlu formalinde tespit edilip parafinde bloklanan dokularından 5µm kalınlığında kesitler alınıp hematoksiyen-eosin ile boyanmıştır. Tümörlerden seçilen blokların kesitlerine biotin streptavidin peroksidaz tekniği ile C-erb B-2 onkoprotein (Biogenex, USA) için immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak meme kanserine ait kesitler kullanılmıştır. C-erb B-2 ekspresyonu ışık mikroskobu altında değerlendirilmiştir.

Aynı bloklardan hazırlanan 10 µm kalınlığındaki kesitler, Feulgen-pararosaniline tekniği ile boyanmıştır. Feulgen boyalı kesitler değerlendirme yapılcaya kadar karanlık ortamda tutulmuştur. Bu kesitler SAMBA 4000 görüntü analiz sisteminin Ploidy 4.04 (Alcatel TITN Answare, 1994) programında analiz edilmiştir. Her preparatta tümör alanlarında izole, intakt en az 100 hücre sayılmıştır. Eksternal referans olarak fare karaciğeri imprintleri kullanılmıştır. Corrective (doğrulama) faktörü 1.19 olarak belirlenmiştir. Vakalar; C-erb B-2 ekspresyonu, DNA içeriği, hiper-hipodiploidi ve aneuploid pik sayısı parametreleri ile yaşam süresi açısından Fisher exact testi kullanılarak istatistiksel olarak irdelenmiştir.

BULGULAR

Kontrol dokularında (meme kanseri) kuvvetli pozitif boyanma görülmesine karşın (Şekil 1), larinks kanserli 41 vakanın hiçbirinde C-erb B-2 ekspresyonu saptanmamıştır (Şekil 2). DNA içeriği yönünden Feulgen-pararosaniline tekniği ile incelenen 41 vakadan 3'ü suboptimal boyanma nedeni ile değerlendirme dışı bırakılmıştır. 38 vakanın DNA içeriği tablo I de gösterilmiştir. Vakalar DNA paternine göre diploid (Şekil 3) ve aneuploid olarak sınıflanmıştır. Aneuploid vakalar ise hipodiploid (Şekil 4), hiperdiploid, tek aneuploid ve multipl aneuploid (Şekil 5) olarak ayrılmıştır.

Hastalar 6 ay ile 9 yıl arasında takip edilmiş olup, 5 hasta 1 yıl sonunda ölmüştür. 36 hasta ise bir nüks belirtisi ol-

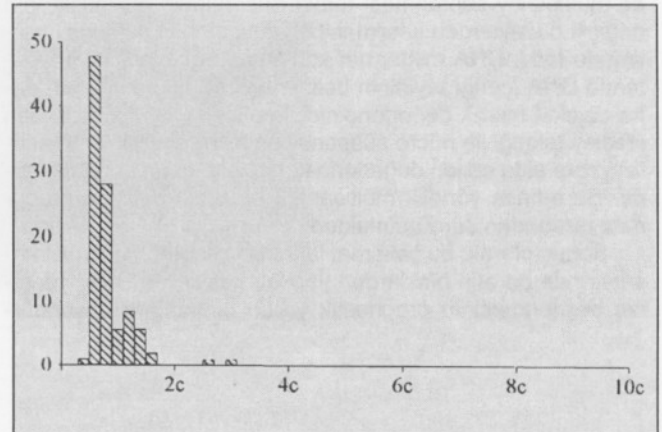


Şekil 3: Diploid histogram.

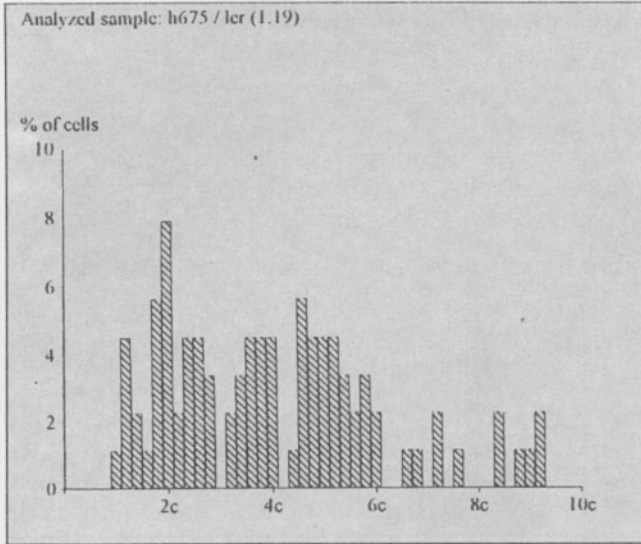
maksızın yaşamaktadır. Hastalarımıza ait materyalde DNA içeriği, hiperhipodiploidi durumu ve aneuploid pik sayısı ile postoperatif yaşam süresi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($P>0.05$).

TARTIŞMA

Larinksin skuamöz hücreli karsinomunda C-erb B-2 reaktivitesi, bilgilerimize göre ingilizce literatürde sadece iki çalışmada araştırılmış olup, bunlardan birinde ekspresyon saptanmış ve bunun prognostik önemine dikkat çekilmiştir(6). Diğerinde ise bu marker için pozitif boyanma saptanmamıştır(7). Bizim çalışmamızda kontrol dokularının kuvvetli reaktivitesine karşın larinks kanserlerinin bu onkoproteini ekspres etmediği görülmüştür. Larinks karsinomlarında aneuploidi oranı farklı çalışmada %45-87 arasında saptanmıştır(8,9).



Şekil 4: Hipodiploid histogram.



Şekil 5: Hiperdiploid, multiploid histogram.

Bu tümörlerde DNA içeriği ile prognoz arasında çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. İki çalışmada aneuploid tümörlerde nüks oranında artış ve hastalıksız dönem süresinde kısalma saptanmıştır(10,11). Diğer bir çalışmada ise aneuploidinin larinks tümörlerinde daha iyi prognoz göstergesi olduğu bildirilmiştir(12). Ancak çalışmaların çoğunda aneuploidinin bu tümörlerde kötü prognoz ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır(1,10,11,13,14). Bizim çalışmamızda ise tümörlerin DNA içeriği ile vakaların prognozu arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır($P < 0.05$).

Hücre görüntü analiziyle ploidy tayininde genellikle imrintler veya Hedley tekniği ile hazırlanan hücre süspansiyonları kullanılmaktadır(15,16,17). Parafin kesitlerin Feulgen yöntemi ile boyanarak DNA içeriği yönünden analizi son zamanlarda denenmekte olan bir yöntem olup (13) bu amaçla kullanılabilirliği henüz kanıtlanmamıştır. Bu yöntem prostat (18) ve karaciğer tümörleri (19), jinekolojik tümörler(20) ve meme kanserlerinde (21) nükleer DNA miktarını tayin etmek amacı ile denenmiştir. Bizim çalışmamızda; vakaların çoğunda multiploidy saptanması tümör hücrelerinin nükleuslarının değişik düzeylerden kesilmesine ve incelenen nükleus kesitlerinde farklı DNA miktarının varlığına bağlı olabilir. Bu yöntemle DNA içeriği tayininin belirlenebilme doğruluğunun daha objektif olarak değerlendirilebilmesi için, aynı vakalardan Hedley tekniği ile hücre süspansiyon hazırlanarak DNA analizi yapıp elde edilen değerlerin karşılaştırılması gerekmektedir. Bu amaca yönelik multisentrik bir proje çalışma grubumuz tarafından sürdürülmektedir.

Sonuç olarak; bu çalışma, larinksin skuamöz hücreli kanserlerinde parafin bloklardan yapılan kesitlerde DNA içeriğinin belirlenmesinin prognostik yararı olmadığını düşündür-

mektedir. Larinksin skuamöz hücreli kanserlerinde C-erb B-2 oncoprotein ekspresyonu ile ilişkili olarak literatürdeki az sayıda çalışmada elde edilen farklı bulguların daha geniş çalışmalarla değerlendirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Truelson JM, Fisher SG, Beals TE, et al. DNA content and histologic growth pattern correlate with advanced squamous cell carcinoma of the larynx. *Cancer* 1992;70:56-62.
2. Wolf GT, Beals TE, Carey TE, et al. Cytophotometric analysis of the DNA content of human head and neck squamous carcinoma cell lines. *Head Neck Cancer* 1990;2:102-108.
3. Lampe HB, Flint A, Wolf GT, et al. Flow cytometry DNA analysis of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *J Otolaryngol* 1987;16:371-376.
4. McCann A, Dervan PA, Johnston PA, et al. C-erb B-2 oncoprotein expression in primary human tumors. *Cancer* 1990;65:88-92.
5. Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A, et al. Indicators of prognosis in node negative breast cancer. *N Engl J Med* 1990;322:1045-50.
6. Weinstein GS, Nuamah IF, Tucker J, et al. Evaluation of HER-2/neu (c-erb B-2) oncogene expression in whole organ section of supraglottic squamous cells carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105:275-79.
7. Kury FD, Schneeberger C, Sliutz G, et al. Determination of HER-2/neu amplification and expression in tumor tissue and cultured cells using a simple, phenol free method for nucleic acid isolation. *Oncogene* 1990;5:1403-08.
8. Goldsmith MM, Cresson DS, Postma DS, et al. Significance of ploidy in laryngeal cancer. *Am J Surg* 1986;152:396-402.
9. Rua S, Comino A, Fruttero A, et al. Relationship between histologic features, DNA flow cytometry, and clinical behavior of squamous cell carcinoma of the larynx. *Cancer* 1991; 67:141-49.
10. Gou YC, DeSanto L, Osetinsky GV. Prognostic implications of nuclear DNA content in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1989;100:95-98.
11. Kokal WA, Gardine RL, Sheibani K, et al. Tumor DNA content as a prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the head and neck region. *Am J Surg* 1988;156:276-80.
12. Goldsmith MM, Cresson DH, Arnold LA, et al. Part 1: DNA flow cytometry as a prognostic indicator in head neck cancer. *Head Neck Surg* 1987;96:307-18.
13. Williams RA, Baak JPA, Meijer GA, et al. Exploring the possibility of DNA ploidy measurements in tissue sections using liver as a model. *Analyt Quant Cytol Histol* 1997;19:19-29.
14. Zheng H, Lin D, Hong B, et al. Prognostic significance of nuclear DNA measurement with flow cytometry for laryngeal squamous cell carcinoma. Hua Hsi I Ko Ta Hsueh Pao (abstract) 1992;23:276-79.
15. Chatelation R, Hoffmeister B, Bocking A, et al. DNA grading of oral squamous carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1989;18:43-46.
16. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, et al. Method of analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983;31:1333-35.
17. Bocking A, Auffermann W, Vogel H, et al. Diagnosis and grading of malignancy in squamous epithelial lesions of the larynx with DNA cytophotometry. *Cancer* 1985;56:1600-04.
18. Greene DR, Taylor SR, Wheeler TM, et al. DAN ploidy by image analysis of individual foci of prostate cancer. A preliminary report. *Cancer Res* 1991;51:4084-89.
19. Mc Gready RW, Papadimitriou JM. An analysis of DNA cytophotometry on tissue section in a rat liver model. *Analyt Quant Cytol Histol* 1983;31:1333-35.
20. Bocking A, Adler GP, Comman HH, et al. Algorithm for a DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. *Analyt Quant Cytol Histol* 1984;6:1-8.
21. Theissing F, Dimmer V, Haroske G, et al. Use of nuclear image cytometry to make breast cancer prognosis more objective. *Anal Cell Pathol* 1991;3:351-60.