

LARİNK SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMLARINDA Kİ67 EKSPRESYONU VE KLİNİKOPATOLOJİK PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ

(Expression of Ki67 in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas and its Correlation With Clinicopathological Parameters)

R. Nilgün Demirbağ*, Şebnem Batur*, Ahmet Tarlacı*, A. Mert Bilgili**, Tolga Ersözlü**

Özet

Larinks kanseri, erişkinlerde tüm kanserlerin %2'sini oluşturur. Larinks kanserlerinde prognozu etkileyen çok sayıda faktör tanımlanmakla birlikte, en önemlisi lenf nodu metastazıdır.

Son yıllarda hücre proliferasyonunun prognoza etkisi ile ilgili çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Ki67, hücre proliferasyonunu değerlendirmede kullanılan güvenilir bir belirleyici olarak kabul edilmektedir. Larinks kanserlerinde de Ki67'nin histolojik grade, metastaz, nüks ve sağkalım ile ilişkisi araştırılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Bu çalışmada larinks skuamöz hücreli karsinomlarında Ki67 ekspresyonu; hasta yaşı, tümör çapı, tümör lokalizasyonu, iltihabi ve desmoplazik yanıt, lenfovasküler, perinöral ve kıkırdak invazyonu, lenf nodu metastazı ve evre ile karşılaştırıldı. Ki67 ekspresyonu ile lenf nodu metastazı arasında pozitif ilişki bulundu ($p=0,007$). Diğer parametrelerle ilişki gösterilemedi. Bu sonuçlar larinks kanserlerinde Ki67' nin bağımsız prognostik faktör olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Larinks karsinomu, Ki67, prognoz

Summary

Laryngeal carcinomas accounts for 2% of all cancers in adults. While many factors have been evaluated as potential prognostic indicators, the most significant one is the lymph node metastasis.

In recent years the number of studies about the cell proliferation effect on prognosis are getting higher. Ki67 is expected as a reliable marker in evaluating the cell proliferation. In laryngeal carcinomas, the relation of Ki67 with histologic grade, metastasis, recurrence and survey was searched and different results were obtained.

In this study, Ki67 expression in laryngeal squamous cell carcinomas was compared with patient age, tumor size, tumor site, inflammatory and desmoplastic response, lenfovascular, perineural and cartilage invasion, lymph node metastasis and stage. A positive correlation was found between Ki67 expression and lymph node metastasis ($p=0.007$). There was no significant association between Ki67 and the other parameters. These results suggest that Ki67 can be used as an independent prognostic factor in laryngeal carcinomas.

Key words: Laryngeal carcinoma, Ki67, prognosis

* Dr., Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü, İstanbul

** Dr., Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kulak Burun Boğaz Kliniği, İstanbul

GİRİŞ

Larinks kanseri erişkinlerde tüm kanserlerin %2'sini oluşturur ⁽¹⁾. Erkeklerde bu oran %2,2, kadınlarda ise %0,4'tür ⁽²⁾. Larinks malignitelerinin %96'sı skuamöz hücreli karsinom (SHK) olup, baş boyun bölgesindeki bu cins malignitelerin %26'sı larinkste yerleşmiştir ⁽²⁻⁵⁾.

Larinks SHK'larında, biyolojik davranışı belirleyen ve tedaviye yön veren çok sayıda prognostik faktör (evre, anatomik lokalizasyon, tümör çapı, histolojik grade vb.) tanımlanmakla birlikte, en önemli prognostik faktör lenf nodu metastazıdır ^(6,7).

Son yıllarda hücre proliferasyonunun prognoza etkisi ile ilgili çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Yüksek proliferasyon hızına sahip tümörlerin prognozu daha kötüdür ^(2,8).

Ki67, hücre proliferasyonunu değerlendirmede kullanılan güvenilir bir belirleyici olarak kabul edilmektedir. Birçok sistem tümörlerinde (meme, akciğer, özofagus, böbrek ve prostat kanseri, malign melanom, nonhodgkin lenfoma, glial tümörler) yüksek Ki67 oranı kötü prognostik faktör olarak gösterilmiştir ⁽⁹⁻¹³⁾. Larinks kanserlerinde de, çok sayıda çalışmada, Ki67'nin histolojik grade, metastaz, nüks, radyoterapiye cevap ve sağkalım ile ilişkisi araştırılmış, farklı sonuçlar elde edilmiştir ^(8,14-21).

Bu çalışmada larinks SHK'larında, hücre proliferasyon belirleyicisi olan Ki67 ekspresyonu ile hasta yaşı, tümör çapı, tümör lokalizasyonu, iltihabi ve desmoplazik yanıt, lenfovasküler, perinöral ve kıkırdak invazyonu, lenf nodu metastazı ve evre arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Çalışmamızda Aralık 2000-Ekim 2003 tarihleri arasında Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kulak Burun Boğaz Kliniği'nde larinks karsinomu nedeniyle opere edilerek patoloji laboratuvarında incelenen olgular tarandı ve seçilen 60 olgu (59 erkek, 1 kadın) çalışma kapsamına alındı. Olgular 35-82 yaşları arasında olup, ortalama yaş 58,3±

9,71 idi. Olgulara ait tüm preparatlar yeniden gözden geçirilerek değerlendirildi. İmmünohistokimyasal inceleme için tümöre ait en uygun bloklar seçildi.

Olgulara ait klinik bilgiler arşiv kayıtlarından elde edildi. Tanı anındaki yaş, 60 yaş altı ve üstü olarak 2 gruba ayrıldı. Primer tümörün en büyük çapına göre, 4 cm'den büyük ve 4 cm'den küçük olarak iki grupta değerlendirildi. Tümör, larinkste ki yerleşim yerine göre supraglottik, glottik, transglottik olarak 3 gruba ayrıldı. Histolojik grade; keratinizasyon derecesi, pearl formasyonu, tümör hücreleri arasındaki interselüler köprülerin varlığı dikkate alınarak iyi, orta ve az diferansiye (grade 1,2,3) olarak sınıflandırıldı. Tümör çevresi iltihabi ve desmoplazik yanıt subjektif olarak zayıf, orta ve şiddetli şeklinde belirtildi. Lenfovasküler, perinöral ve kıkırdak invazyonu değerlendirildi. Primer tümör (T), lenf nodlarının durumu (N), uzak metastaz (M) varlığı ya da yokluğu değerlendirildi. AJCC (American Joint Committee on Cancer) kriterlerine göre evrelendirme yapılarak erken evre (evre 1-2) ve ileri evre (evre 3-4) olarak gruplandırıldı.

İmmünohistokimyasal inceleme

Tümörlerin 2-3 µm'lik parafin kesitleri, önceden Histogrip'le (Zymed) muamele edilmiş lamlara alınarak, bir gece etüvde 37°C'de bekletildi. Kesitler ksilende berraklaştırılıp, alkol içerisinde rehidrate edildi. Antijeni açığa çıkarmak için, kesitler 10mM sitratlı tampon (pH 6) içerisinde mikrodalga fırında 3x5 dakika ısıtıldı. Aynı tampon içerisinde 20-30 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için, kesitlere %3'lük hidrojen peroksit çözeltisi damlatılıp 10 dakika beklendi. Daha sonra sırasıyla, protein blok solüsyonu (TA-125-UB, Lab Vision Corp. Fremont, CA, USA, 10dak), primer antikor Ki67 Ab-2 (Klon MB67, Mouse monoklonal antibody, Neomarkers, Fremont, CA, USA, 80 dak.), sekonder antikor (TA-125-BN, Lab Vision Corp. Fremont, CA, USA, 10 dak.) ve streptavidin-HRP ile işleminden geçirildi (TA-125-HR, Lab Vision Corp. Fremont, CA, USA, 10dak.). Kromojen olarak aminoethyl karbazole (TA-125-HA, Lab Vi-

sion Corp. Fremont, CA, USA, 20 dak.) kullanıldı. Her işlemten sonra kesitler PBS ile çalkalandı. Son olarak Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıp, kapatıldı. Negatif kontrol, primer antikor basamağının atlanması ile yapıldı. Ki67 için internal pozitif kontrol olarak, epitel bazal tabakası ve germinal merkezler kullanıldı.

Değerlendirme

İmmünohistokimyasal incelemede Ki67 pozitifliği, nükleer boyanma olarak izlendi. Tümör içerisinde, boyanmanın en yaygın izlendiği alanda, toplam 1000 hücre sayıldı. Pozitif reaksiyon gösteren hücreler belirlendi ve yüzdeleri hesaplandı. Boyanma şiddeti dikkate alınmadı. Değerlendirmeler, Olympus Bx50 ışık mikroskopunda, 400x (40x objektif lens, 10x oküler lens, 0,151 mm²) büyütmede yapıldı.

Verilerin istatistiksel analizi SSPS/PC+ programında ki kare (chi square) testi, Fisher's exact test, Kruskal Wallis varyans analizi, Mann Whitney-U testi kullanılarak yapıldı. 0,05'in altındaki p değerleri anlamlı kabul edildi.

SONUÇLAR

Ki67 ekspresyonu: İmmünohistokimya ile pozitif reaksiyon nükleer boyanma şeklinde görüldü (Resim 1). Ki67 ile boyanma en düşük %1, en yüksek %76,6 olarak izlendi. Ortalama değer %34,73 (SS: 15,77), medyan değer %31,60'tı. Ki67 ile lenf nodu metastazı arasında pozitif ilişki saptandı (p=0,007). Lenf nodu pozitif olgularda, Ki67 oranı, lenf nodu negatif olgulara göre yüksek olarak izlendi. Ki67 ile diğer parametreler (yaş, çap, grade, lokalizasyon, iltihabi yanıt, desmoplazik yanıt, lenf damarı invazyonu, kan damarı invazyonu, perinöral invazyon, kıkırdak invazyonu, T kategorisi, evre) arasında ilişki gösterilemedi (Tablo 1).

TARTIŞMA

Larinks kanserleri, baş-boyun bölgesinin en sık görülen, uygun tanı ve tedavi yöntemleri uygulandığında tedaviye en iyi cevap veren kanserlerin-

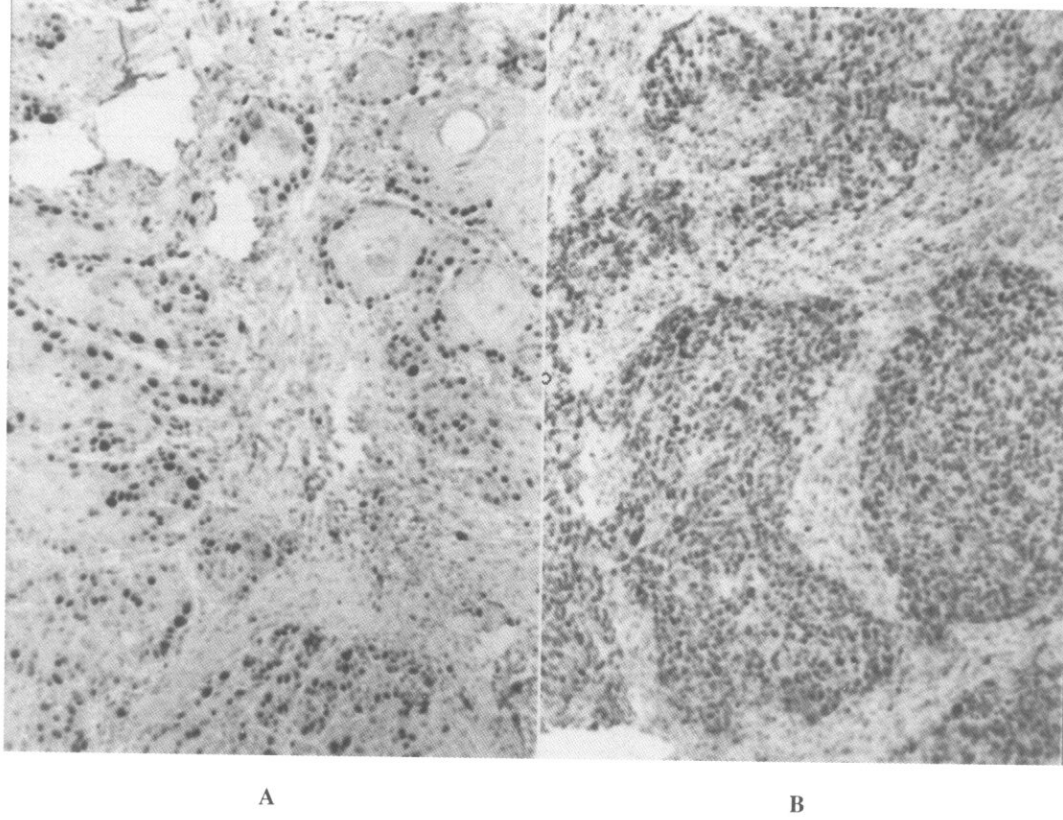
dendir (22). Aynı yaşta, lokalizasyonu ve TNM sınıflaması aynı, tedavi girişimleri benzer hasta gruplarında gözlenen prognoz farklılıkları, tümörün davranışını etkileyen ve ilerlemesinde rol oynayan başka faktörlerin olduğunu düşündürmektedir (22-23).

Hücre proliferasyonu, mitoz sayımı, flow sitometri, timidin labeling indeks veya immünohistokimyasal olarak hücre siklusu içerisinde yapılan proteinlerin (Ki67, PCNA, siklinler vb.) tayini ile ölçülebilir. Yüksek proliferasyon hızına sahip tümörlerin prognozu daha kötüdür (2). Ki67 hücre proliferasyonunun değerlendirilmesinde sık kullanılan, güvenilir bir belirleyicidir (13,18). İlk kez 1983'de Gerdes ve arkadaşları tarafından tanımlanmış, tonsil germinal merkez hücreleri, epitel bazal hücreleri ve intestinal epitelin kript hücreleri gibi proliferatif hücrelerde gösterilmiştir. Ki67, hücre siklusunun Go fazı dışında tüm fazlarında bulunan nonhistone nükleer proteindir. 345 ve 395 kd ağırlığında iki molekülden oluşur ve geni 10. kromozom üzerinde yer alır (17,24). İmmünohistokimya ile Ki67 için pozitif nükleer boyanma gösteren hücre yüzdesi, proliferatif fraksiyonu gösterir. Agresif tümörlerde bu oran yüksektir (8,9). Birçok sistem tümörlerinde (meme, akciğer, özofagus, böbrek ve prostat kanseri, malign melanom, nonhodgkin lenfoma, glial tümörler) yüksek Ki67 oranı kötü prognostik faktör olarak gösterilmiştir (9-13).

Larinks kanserlerinde hücre proliferasyonunun prognozdaki rolü tartışmalıdır. Çalışmaların bir kısmında yüksek proliferasyon indeksi, erken nüks veya kısa sağkalım süresiyle ilişkili bulunurken (6,16,18,21), diğerlerinde proliferasyon indeksi ile prognoz arasında ilişki gösterilememiştir (19). Çeşitli sonuçların nedenleri arasında, farklı hasta popülasyonlarının seçimi (grade, stage, tümör lokalizasyonu vb.), farklı teknik değerlendirme metodları, farklı antikor kullanımı ve sınırlı olgu sayısı gösterilebilir (10,18).

Larinks kanserlerinde lenf nodu metastazı en önemli prognostik faktör olarak gösterilmektedir (6,25-27). Sağkalım süresi, nüks, nüks hızı ve tedavide başarısızlık, pozitif lenf nodu ile ilişkilidir. Lenf nodu pozitif ve negatif grup arasında sağkalım oranında belirgin bir fark olmakla beraber, sağkalım

Resim 1. A) İyi diferansiye SHK olgusunda, düşük Ki67 pozitifliği, B) Az diferansiye SHK olgusunda, yaygın Ki67 pozitifliği (Ki67,x125)



sadece pozitif ve negatifliğe değil, tutulan lenf nodunun düzeyine de bağlıdır. Klinikte üst ve orta juguler bölgede pozitif lenf nodu varlığının, diğer bölgelere göre daha iyi prognoza sahip olduğu gösterilmiştir (26,28). Tutulan lenf nodu sayısının, prognostik önemi olmadığı düşünülmekle birlikte; üçten fazla lenf nodunun tutulumunda mortalitenin %65'ten %84'e çıktığı bildirilmiştir (14,26,29). Lenf nodu metastazı olan hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı %29-%54 arasında iken, lenf nodu metastazı olmayan olgularda %64-%94,5 arasında değişmektedir (30).

Çalışmamızda larinks SHK'larında lenf nodu metastazı ile Ki67 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. Buna göre lenf nodu pozitif olgularda Ki67 oranı, lenf nodu negatif olgulara göre daha yüksektir. Çalışmacıların bir kısmı da bizimle aynı sonuca ulaşmıştır (18,21). Ancak farklı görüş bildiren çalışmalar da mevcuttur (6,15,16).

Çalışmacıların bir kısmı, larinks SHK'larında histolojik grade ile Ki67 arasında ilişki bulamazken, (6,15,21) diğerleri ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir (17,18). Buna göre yüksek gradeli tümörler, yüksek Ki67 indeksine sahiptirler.

Çalışmaların bir kısmında, Ki67 ile T kategorisi ve evre arasında anlamlı ilişki bulunamazken, (13,15,21) diğerleri ilişkili olduğunu göstermişlerdir (6,11,18).

Açıkalın ve arkadaşları,18 larinkste tümör lokalizasyonu ile Ki67 arasında ilişki gösterememişlerdir. Aynı çalışmada, farklı olarak hasta yaşı ile Ki67 arasında pozitif ilişki saptanmıştır.

Bu çalışmada Ki67 ile diğer parametreler (yaş, çap, grade, lokalizasyon, iltihabi yanıt, desmoplazik yanıt, lenf damarı invazyonu, perinöral invazyon, kıkırdak invazyonu, T kategorisi, evre) arasında ilişki gösterilemedi.

Tablo 1. Larinks SHK'larında Ki67 ekspresyonu ile klinikopatolojik parametrelerin karşılaştırılması

Ki67					
Parametre	Kategori	Vaka sayısı	Ortalama	Standart sapma	p
Yaş	≤ 60	34	37.547	16.421	0.109
	> 60	26	31.065	14.358	
Çap (cm)	≤ 4	41	34.037	16.834	0.588
	> 4	19	36.253	13.482	
Grade	1	11	25.827	11.330	0.100
	2	22	38.055	16.328	
	3	27	35.667	15.992	
Lokalizasyon	supraglottik	24	37.633	15.331	0.332
	glottik	14	29.700	16.431	
	transglottik	22	34.786	15.734	
İltihabi yanıt	zayıf	15	41.060	17.468	0.174
	orta	26	31.531	15.011	
	şiddetli	19	34.137	14.704	
Desmoplazik yanıt	zayıf	23	31.765	17.933	0.510
	orta	26	36.965	12.534	
	şiddetli	11	35.691	18.239	
Lenf damarı invazyonu	görülemedi	32	32.181	16.209	0.179
	mevcut	28	37.661	15.004	
Kan damarı invazyonu	görülemedi	54	34.246	16.229	0.347
	mevcut	6	39.167	10.773	
Perinöral invazyon	görülemedi	47	33.879	16.260	0.392
	mevcut	13	37.846	13.991	
Kıkırdak invazyonu	görülemedi	42	36.483	17.368	0.117
	mevcut	18	30.667	10.508	
T	1-2	13	38.938	19.457	0.369
	3-4	47	33.577	14.622	
Lenf nodu metastazı	Yok	40	30.565	13.552	0.007*
	Var	20	43.085	16.888	
Evre	1-2	11	33.891	16.430	0.851
	3-4	49	34.929	15.786	

*p<0,05 anlamlı

Larinks kanserlerinde Ki67 oranı, tedaviye cevap vermeyen olgularda, tedaviye iyi cevap veren olgulara göre daha yüksek olarak bildirilmiştir⁽¹⁸⁾. Bu da Ki67'nin tedaviye cevabı belirlemede önemli bir kriter olabileceğini ve Ki67 oranının yüksek olduğu olgularda daha agresif tedavi seçeneklerinin uygulanması gerektiğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak larinks kanserlerinde lenf nodu metastazı kötü prognostik faktör olarak bilinmektedir. Ki67 ekspresyonunun diğer parametreler ile ilişkili olmayıp, lenf nodu metastazı ile pozitif ilişkili olması, larinks kanserlerinde Ki67'nin bağımsız prognostik faktör olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.