

Larinksin Yassı Hücreli Karsinomlarında C-Met Görünümü ve Lenf Nodu Metastazlarıyla İlişkisi

C-MET OVER EXPRESSION IN LARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA AND ITS RELATION TO LYMPH NODE METASTASES

Ö.Taşkın YÜCEL*, Arzu SUNGUR**, Sefa KAYA***

* Yrd.Doç.Dr., Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB AD,
** Doç.Dr., Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD,
*** Prof.Dr., Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB AD, ANKARA

Özet

Hepatosit büyüme faktörü / Scatter faktörü (HGF/SF) hücre motilitesini artıran, epitelyal yapıların dağılmasına neden olan, sellüler matriksin invazyonuna etkisi olan ve anjiogenezi indükleyen bir faktördür. C-met onkogeni bu faktörün reseptörünü kodlamaktadır. Solid tümörlerde yapılan bir çok çalışmada C-met ve HGF/SF'nin hastalığın ilerlemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Larinkste yassı hücreli karsinomu olan supraglottik yerleşimli 60 hastada C-met görünümü immünohistokimya ile patolojik spesimen dokusunda çalışılmıştır. Bu hastaların 30'unda boyunda lenf nodu metastazı varken 30'unda yoktur. TNM evrelendirmesi, differensiyasyon, lenfovasküler ve perinöral invazyon ve tümörün büyüme patterni ve lenf nodu metastazı ile ilişkileri incelenmiştir.

C-met normalden fazla görünümü primer sahada %90 ve lenf nodu metastazında ise %83 oranında görüldü. İstatiksel olarak primer ve boyun metastazında C-met boyanması ile belirgin ilişki olduğu görüldü (Wilcoxon Signed Rank Testi $p=0.005$). Ayrıca lenfovasküler invazyonla, N evresi lenf nodu metastazıyla ilişkili bulunurken diğer değişkenler C-met artışı, T evresi, perinöral invazyon, büyüme paterni ile lenf nodu metastazı arasında ilişki gösterilemedi. (Lineeer regresyonlu Multivaryant analiz).

Bu bulgularla C-met normalden fazla görünümünün hem primer sahada hem de boyun sahasında oldukça yüksek oranda olduğunu gördük. Bu görünüm malignansinin gelişmesinde bunun rolü olabileceğini düşündürmekle beraber C-met görünümü ile lenf nodu metastazı arasında belirgin ilişki bulamadık.

Anahtar Kelimeler: Larinks neoplazmları,
Lenfatik metastaz, İmmünohistokimya,
Protoonkogenler,
Hepatosit büyüme faktörü

T Klin K.B.B. 2001, 1:1-5

Geliş Tarihi: 10.04.2000

Yazışma Adresi: Dr.Ö.Taşkın YÜCEL
Hoşdere Cad. No 49/13
06540, Y.Ayrancı, ANKARA

Summary

C-met oncogene encodes the receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF), which is known to have effects of stimulation of cell motility, dissociation of epithelial sheets, invasion of cellular matrix, and induction of angiogenesis. Many studies in solid tumors have shown the role of C-met and HGF/SF in progression of the disease. We have studied the role and relation of C-met overexpression in lymph node metastases.

The expression of c-met in tissue specimens was studied by immunohistochemistry on 60 patients with laryngeal squamous cell carcinoma at supraglottic site. 30 of these patients had lymph node metastases and the remaining 30 had none. metastases. TNM staging, differentiation, lymphovascular, perineural invasion and growth of pattern for tumor were also recorded and their relation to lymph node metastases was analysed.

Overexpression of c-met were observed in 90% of the cases at the primary site and 83% of the cases with lymph node metastases at the neck. There is statistically significant correlation between C-met staining at primary and neck with Wilcoxon Signed Rank Test. Lymphovascular invasion ($p=0.005$) and N stage ($p=0.001$) is related with lymph node metastases, but other variables; C-met overexpression, T stage, perineural invasion, growth of pattern do not have relation with lymph node metastases in multivariate analysis of the data with linear regression.

C-met overexpression is observed in both primary site and neck in laryngeal squamous cell carcinoma. We think that it may have a role during the progression of malignancy, but we have been unable to find a definite relation with c-met expression and lymph node metastases.

Key Words: Laryngeal neoplasms, Metastases lymphatic,
Immunohistochemistry,
Protooncogenes,
Hepatocyte growth factor

T Klin J E.N.T. 2001, 1:1-5

Larinks karsinomlarında rejyonel lenf nodlarına yüksek oranda metastaza rastlanır. Bu metastazlar prognozla yakından ilişkili olduğundan larinks karsinomlarının tedavisinde oldukça büyük öneme sahiptirler. Lenf nodlarının iyi değerlendirilmesi metastaz yapabilecek lezyonların önceden bilinebilmesi ve tedavinin buna göre yönlendirilmesi bu hastalığın çok daha iyi tedavisini sağlayacaktır (1).

Moleküler işaretleyicilerinin kullanılması bu lenf nodu metastazlarının gösterilmesinde, tedavinin planlanmasında yararlı olabilir. Bu işaretleyicilerin transforme olan hücrelerle direkt ilişkilerinin olması ve çok az sayıda hücrenin bile gösterilmesinde yararlı olduklarından bunların saptanması son derece yararlı olabilmektedirler (2).

Bu onkojenlerden biri olan C-met HGF ve SF'nin reseptörü olan transmembran tirozin kinazı kodlamaktadır (3). HGF/SF'nin epitelyal hücreler üzerinde birçok etkileri vardır. Mitojenik özellikleri yanında, hücre motilitesini, epitelyal yaprakların ayrılmasını, ve sellüler matriksin invazyonunu stimüle etmektedir (4). C-met onkojeninin aktivasyonunun tümör hücrelerinin invazyonuyla ilişkisi hayvan modellerinde ve invitro hücre kültürlerindeki denemelere dayandırılarak gösterilmiştir.

C-met'in normalden fazla görünümü diferansiye tiroid (5), meme (6), pankreas (7), renal hücre karsinomları (8) gibi birçok karsinomlarda bildirilmiştir. C-met'in normalden fazla görünümünün baş, boyun karsinomlarında gösterildiği birkaç çalışma olmakla beraber lenf nodu metastazıyla ilişkiyi gösteren bir çalışma yoktur (9).

Biz çalışmamızda larinks yassı hücreli karsinomunda C-met görünümünü immünohistokimyasal yöntemlerle araştırdık ve lenf nodu metastazındaki rolünü diğer histopatolojik kriterlerle (diferensiyasyon, lenfovasküler ve perinöral invazyon ve büyüme paterni gibi.) beraber değerlendirdik.

Materyel ve Metod

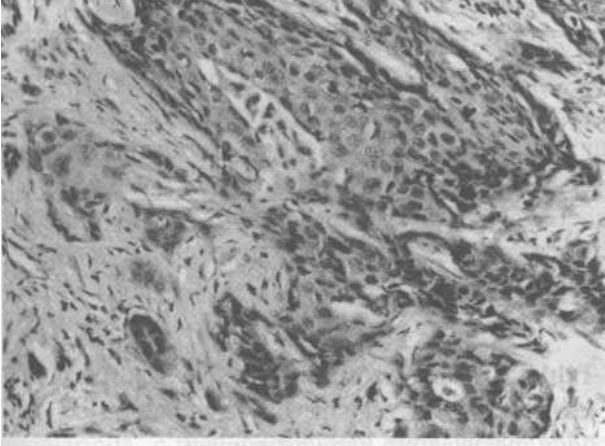
Hacettepe Üniversitesi KBB bölümünde larinks yassı hücreli karsinomu tanısıyla tedavi edilen hastalar arasından supraglottik yerleşim gösteren 60 hasta boyunda metastatik lenf nodu tespit edilip edilmemesine göre iki grup oluşturularak

seçilmiş ve bu çalışmaya dahil edilmiştir. Bu hastalar arasındaki birinci grupta 30 hastada boyunda lenf nodu metastazı tespit edilmişken, ikinci grupta yani diğer 30'unda ise tespit edilmemiştir. Hastaların ortalama yaşı 54, 56'sı erkek 4'ü ise kadındır. Bu hastaların hiçbirinde cerrahi öncesi radyoterapi veya kemoterapi uygulanmamıştır. TNM sınıflandırması AJCC'ye göre yapılırken, diferensiyasyon WHO sınıflandırmasına göre yapılmıştır. Hematoksilin eozinle boyanmış olan preparatlarda ayrıca lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon ve büyüme paterni de değerlendirilmiştir.

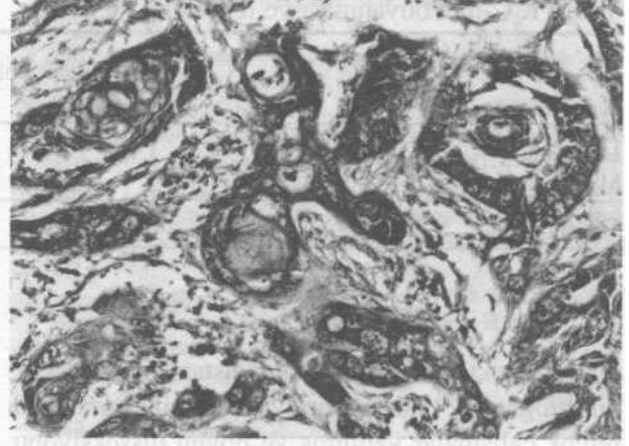
İmmünohistokimya: Formaldehidde fikse edilen parafin bloklardan 5 mikrometrelik dilimler poli L-Lizin kaplı slaytlara yerleştirilerek human c-met c 28 poliklonal antikolarıyla immünohistokimya için kullanılmıştır (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA). İmmünohistokimya avidin-biotin kompleks peroksidaz yöntemiyle yapılmıştır. Kesitler deparafinize ve rehidrate edilmiş, endojen peroksidaz aktivitesi %0.3'lük metanolde hidrojen peroksitle inkübe edilerek bloke edilmiştir. Antijen elde edilmesi 10 mmol /L tampon içinde 6 pH'da mikrodalga fırında 2 kez ısıtılarak yapılmıştır. Kesitler primer antikolarla oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Avidin Biotin deteksiyon sistemi ikinci ve üçüncü adımlarda kullanılmıştır. Peroksidaz reaksiyonu 3.3 di-amino -benzidine tetrahidroklorid H₂O₂ (Santa Cruz) kullanılarak gözlenilmiş ve hematoksilinle karşı boyama yapılmıştır.

Sitoplazmik boyanma pozitif olarak kabul edilmiştir. Sitoplazmik boyanma yoğunluğu; Negatif (0), hafif (1), orta (2), kuvvetli (3) ve çok kuvvetli (4) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 1,2). Preparatların değerlendirilmesi hasta bilgilerini bilmeyen bir patolog tarafından yapılmıştır.

İstatistik analizi "Statistical Package for Social Sciences Release 9.05 (SPSS 9.05)" bilgisayar yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Primer bölgeyle boyun c-met immünoreaktivitesinin arasındaki korelasyonu değerlendirmede Wilcoxon Signed Ranks testi kullanılmıştır. Boyun metastazı üzerindeki klinik, immünojenik, ve histopatolojik parametrelerin etkisi Lineer regresyon testiyle multivaryant analiz kullanılarak değerlendirilmiştir. Analizde lenf nodunun durumu bağımlı, diferensiyasyon, lenfovasküler invazyon, perinöral in-



Şekil 1. Primer bölgede orta derecede c-met boyanması, Immunoperoxidaz X460.



Şekil 2. Primer bölgede çok kuvvetli c-met boyanması, Immunoperoxidaz X460.

vazyon, büyüme paterni, T ve N evresi, primer sahada C-met boyanması bağımsız değişken olarak seçilmiştir.

Sonuçlar

C-met ekspresyonu

Bütün primer lezyonlarda c-met boyanması sitoplazmada gözlenmiştir. Boyanmanın dağılımı aşağıdaki gibidir. 6 vakada hafif boyanma, orta 31 vakada, kuvvetli 21 vakada, çok kuvvetli 2 vakada gözlenmiştir. Boyanma homojen olup fokal boyanma gözlenmemiştir (Tablo 1).

Metastatik lenf nodlarında c-met ekspresyonu

Bütün lenfatik metastatik odaklarda c-met boyanması gözlenmiştir, boyanmanın dağılımı şöyledir; Hafif 5, orta 16 ve kuvvetli boyanma 9 vakada görülmüştür (Tablo 1).

Lenf nodu metastazı ve perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon, diferensiyasyon, büyüme paterni ve TNM sınıflandırmasıyla ilişkisi (Tablo 2)

Diferansiyasyon-lenf nodu metastazı: az diferansiye 5, orta derecede diferansiye 15 ve iyi diferansiye 10 hastada lenf nodu metastazı mevcuttur.

Lenfovasküler invazyon-lenf nodu metastazı; lenfovasküler invazyonu olan 13 hastada lenf nodu metastazı mevcutken, 2 hastada yoktur.

Perinöral invazyon- lenf nodu metastazı: perinöral invazyonu olan 5 hastada lenf nodu metastazı varken, 3 hastada yoktur.

Büyüme paterni- lenf nodu metastazı; Metastazı olan 21 hastada "pushing " tarzında büyüme paterni mevcutken, 9 hastada "infiltratif " tarzda büyüme şekli mevcuttur.

T evresi -lenf nodu metastazı;T1 4 hastada, T2 21 hastada, T3 3 hastada ve T4 2 hastada lenf nodu metastazı mevcuttur.

N evresi-lenf nodu metastazı; N0 6 hastada,N1 15 hastada, N2 7 hastada, N3 2 hastada lenf nodu metastazı mevcuttur.

Hiçbir hastada uzak metastaz yoktur.

Minör tükrük bezlerinde ve vasküler endotelial hücrelerde de hafif c-met immünoreaktivitesi gözlenmiştir.

İstatiksel analiz

Primer ve boyunda c-met boyanmasında korelasyon Wilcoxon Signed Ranks testine göre önemlidir ($p < 0.05$).

Boyun metastazına etki eden parametrelerin çok değişkenli analizi yapıldığında buna etkili olan faktörlerin lenfovasküler invazyon ve preoperatif N evresinin olduğu görülmüştür. (Lenfovasküler invazyon için $p=0.005$, N için $P=0.001$) Diğer parametrelerle lenf nodu metastazı arasında önemli bir ilişki bulunmamıştır.

Tartışma

Larinks kanserlerinde prognozu belirleyen en önemli faktörün lenf nodu metastazı olduğu

Tablo 1. C-met boyanması ve lenf nodu metastazı

		Primer Bölgede C-Met Boyanma Derecesi				Toplam
		1	2	3	4	
Lenf Nodu	-	1	15	12	2	30
Metastazı	+	5	16	9	0	30
Toplam		6	31	21	2	60

düşünülmektedir. Boyunda metastazı belirleyecek bir prognostik faktörü ortaya çıkarmak amacıyla birçok çalışmalar yapılmış ve boyun disseksiyonu yapılacak hastaların seçimi için bir kriter belirlenmeye çalışılmıştır (10). Özellikle No hastalarda boyun disseksiyonu gerektirecek hastaların seçimi için spesifik testlere ihtiyaç bulunmaktadır. Radyolojik görüntüleme tetkikleri bu konuda yardımcı olmakla beraber bazen yeterli olmamaktadırlar (11).

Çeşitli histopatolojik parametreler; tümör diferansiyasyonu, perinöral ve vasküler invazyon, büyüme paterni gb. birçok çalışmalarda araştırılmıştır (12,13). Küçük sinirlerin perinöral invazyonu bazı çalışmalarda kötü prognostik faktör olarak ortaya çıkarken, bazı çalışmalarda ise önemli bulunmamıştır (14).

Bunları araştıran diğer çalışmalarda diferansiyasyonla, "pushing" tarzındaki büyüme paterni ile boyun metastazları arasında ters ilişki olduğu görülmüştür (15,16).

Moleküler belirleyiciler son yıllarda oldukça fazla oranda çalışılmıştır ve oldukça yararlı olabilecek sonuçlar vaat etmektedirler.

Hepatosit büyüme faktörü/Scatter faktörü (HGF/SF) epitelyal hücrelerin büyümesinde ve dağılımında promotör görevi görmektedir. Fibroblastlar tarafından üretilen bu faktör inaktif bir polipeptid olarak salgılandıktan sonra ürokinaz tipinde plazminojen aktivatörü tarafından kesilerek aktive hale getirilmektedir (17). Aktive hale gelen formu c-met protoonkogen tarafından kodlanan tirozin kinazla etkileşime girerek etkilerini oluşturmaktadır (3). Bu etkileşim sonucunda motilite artışı, proteaz üretimi ve anjiyogenez artışı olmaktadır (18). Bu etkilerin normal embriyolojik

Tablo 2. TNM evresi, diferansiyasyon, perinöral, lenfovasküler invazyon, büyüme paterni ve lenf nodu metastazının karşılaştırılması

	Lenf Nodu Metastazı	
	-	+
Perinöral İnvazyon (+)	3	5
Diferansiyasyon		
Az		5
Orta		15
İyi		10
Lenfovasküler İnvazyon (+)	2	13
Pushing		9
İnfiltratif		21
T1		4
T2		21
T3		3
T4		2
NO		6
N1		15
N2		7
N3		2

gelişimde ve yara iyileşmesinde sorumlu olduğu bulunmuştur (19). HGF/SF receptorü hücre fizyolojisinde dokunun gelişim ve rejenerasyonunda önemli bir rol oynamakta ve birçok normal epitelyal hücrede eksprese olmaktadır. Fakat bu reseptörün aktivasyonu aynı zamanda hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına da neden olmaktadır.

HGF/SF ve reseptörü c-met'in tumor gelişiminde invazyon ve metastazda birçok rolü olduğu gösterilmiştir. Gastrik, prostat, pankreas, tiroid ve hepatosellüler karsinomlarda artışı bildirilmiştir (5-8). Baş boyun karsinomlarında da larinks ve oral kavite karsinomlarında artmış olduğu gösterilmiştir (9,20).

Marshall ve ark (9) c-met'in oral kavitenin yassı hücreli karsinomlarında normal ve displastik hücrelere göre normalden fazla görünümünü olduğunu göstermişlerdir. Diferansiyasyonla boyanma arasında bir ilişki olmadığını söylemekte, ayrıca boyanmanın sitoplazmik olduğunu belirtmektedirler. Çalışmalarının önemli bir bulgusu da kontrol vakalarında boyanma görülmemesi, dolayısıyla da c-met boyanmasının oldukça spesifik olduğudur. Çalışmalarında c-met boyanmasıyla boyun lenf nodu metastazları arasındaki ilişki hakkında bir bilgi yoktur.

Bu konudaki bir diğer çalışmada larinks karsinomlarında c-met normalden fazla görünümüne bakılmıştır. Belirgin boyanma oranını %55 olarak verdikleri bu çalışmada minor tükürük bezlerinde ve vasküler endotel hücrelerinde de hafif boyanma olduğunu belirtmişlerdir. Lenf nodlarının durumu ile korelasyon olduğunu ancak yaş, histolojik tip, T evresi, uzak metastaz v evre arasında ilişki bulamadıklarını söylemişlerdir. Serilerinde 82 larinks hastasının 10'unda lenf nodu metastazı mevcuttur ve bunların 9'unda metastatik bölge c-met pozitif boyanmıştır (20).

Galeazzi ve ark.(21) çalışmalarında baş,boyun kanseri olan hastaların %70'inde c-met görünümünün 2 ila 50 kat arttığını göstermişlerdir. Normal lenfoid dokuda hücrelerin c-met ile boyanmadığını, ancak metastatik lenf nodlarında kuvvetle pozitif boyanma olduğunu bildirmişlerdir. C-met'in normalden fazla görülmesinin baş boyun kanserlerinde metastaz gelişiminde görev alabileceğini öne sürmüşlerdir.

Biz çalışmamızda lenfovasküler invazyon ve preoperatif N evresinin larinks yassı hücreli karsinomlarında lenf nodu metastazı açısından önemli olduğunu gösterdik. C-met görünümünün yassı hücreli karsinomda oldukça spesifik olduğu özellikle metastaz olan lenf nodlarında yalnızca metastatik odağın boyandığı görülmüştür. Vakaların %90'ında c-met'in normalden fazla görülmesiyle beraber, c-met pozitifliği ile boyun metastazı arasında bir ilişki ortaya koyamadık. C-met tümör gelişiminde önemli bir rol oynuyor gözükse bile spesifik olarak metastazı olanlarda görülmemesi nedeniyle ne yazık ki bize boyun metastazını gösterecek bir faktör olarak ortaya çıkmamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Harrison DFN, Thawley SE. Surgical therapy of the larynx. Comprehensive Management of Head and Neck Tumors. Thawley

SE, Panje WR. Eds. Philadelphia: WB Saunders Company, 1987: II: 929-959.

2. Schantz SP. Head and neck oncology research . Curr Opin Oncol 1994; 6: 265-71.

3. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM-L, Kmieciak TE, Woude GFV, Aaronson SA. Identification of the hepatocyte growth factor as the c-met protooncogene product. Science 1991; 251: 802-4.

4. Weidner KM, Sachs M, Birchmeier W. The Met receptor kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter/hepatocyte growth factor in epithelial cells. J Cell Biol 1993; 121:145-54.

5. Ruco LP, Ranalli T, Marzullo A, Bianco P, Prat M, Comoglio P, Baroni CD. Expression of met protein in thyroid tumours. J of Pathol 1996; 180:266-70.

6. Jin L, Fuchs A, Schnilt SJ, et al. Expression of scatter factor and c-met receptor I benign and malignant breast tissue. Cancer 1997; 79: 749-60.

7. Finukawd T, Duguid W, Kobari M et al. Hepatocyte growth factor and met receptor expression in human pancreatic carcinogenesis. Am J Pathol 1995; 147: 386-95.

8. Humphrey PA, Xiaopei Z, Zarnegar R et al. Hepatocyte growth factor and its receptor (c met) in prostatic carcinoma. Am J Pathol 1995; 147:385-95.

9. Marshall DD, Kornberg LJ. Overexpression of scatter factor and its receptor (c-met) in oral squamous cell carcinoma. Laryngoscope 1998; 108: 1413-17.

10. Richard JM, Sancho-Garnier H, Micheau C, Saravane D, Cachin Y. Prognostic factors in cervical lymph node metastases in upper respiratory and digestive tract carcinomas :Study of 1703 cases during a 15 year period. Laryngoscope 1987; 97:97-101.

11. Van der Brekel MWM, Castelijns JA, Snow GB. Diagnostic evaluation of the neck. Otol Clin N Am 1998; 31; 601-20.

12. Fagan JJ, Collins B, Barnes L, D'Amico F, Myers EN, Johnson JT. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1998 Jun; 124(6):637-40

13. Yılmaz T, Hosal AS, Gedikoglu G, Onerci M, Gursel B. Prognostic significance of vascular and perineural invasion in cancer of the larynx. Am J Otolaryngol 1998 Mar-Apr; 19(2):83-8.

14. Mukherji SK, O'Brien SM, Gerstle RJ, Weissler M, Shockley W, Castillo M. Tumor volume: an independent predictor of outcome for laryngeal cancer. J Comput Assist Tomogr 1999 Jan-Feb; 23(1):50-4.

15. Gilbert RW, Lundgren JA, van Nostrand AW, Keane TJ T3N0M0 glottic carcinoma--a pathologic analysis of 41 patients treated surgically following radiotherapy. Clin Otolaryngol 1988 Dec; 13(6):467-79.

16. Manni JJ, Terhaard CH, de Boer MF, Croll GA, Hilgers FJ, Annyas AA, van der Meij AG, Hordijk GJ. Prognostic factors for survival in patients with T3 laryngeal carcinoma. Am J Surg 1992 Dec; 164(6):682-7.

17. Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, et al. Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor /scatter factor. EMBO J 1992; 11:4825-33.

18. Rosen EM, Goldberg IG. Scatter factor and angiogenesis. Adv Cancer Res 1995; 67:257-79.

19. Bladt F, Riethmacher, Isenmann S ,et al. essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. Nature 1995; 375:699-702.

20. Sawatsubashi M, Sasatomi E, Mizokami H, Tokunaga O, Shin T. Expression of c-Met in laryngeal carcinoma. Virchows Arch 1998; 432: 331-5.

21. Galeazzi E, Olivero M, Gervasio FC, et al. Detection of Met oncogene / hepatocyte growth factor receptor in lymph node metastases from head and neck squamous cell carcinomas. Eur Arch Otorhinolaryngol 1997; 254(Suppl):138-43.

