

Larinks Skuamöz Hücreli Karsinomunda p53 Mutasyonu ve nm23 İmmünreaksiyonunun Histolojik Prognostik Faktörlerle İlişkileri

p53 MUTATION AND nm23 EXPRESSION IN LARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA AND RELATIONSHIP BETWEEN HISTOLOGICAL PROGNOSTIC PARAMETERS

Dr. Özge HAN,^a Dr. Deniz ARIK,^a Dr. Selda SEÇKİN^a

^aPatoloji Bölümü, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, ANKARA

Özet

Amaç: Çalışmamızda larinks skuamöz hücreli karsinomunda yaş, cinsiyet ve prognostik önemi bilinen tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, diferansiyasyon derecesi, kıkırdak invazyonu, lenf nodu metastazı ve metastatik lenf nodunda ekstrakapsüler yayılım ile çeşitli tümörlerde prognostik önemi gösterilmiş bir tümör supresör gen olan p53 ve antimetastatik bir gen olan nm23 immünreaksiyonunun ilişkilerinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Total larinktektomi, radikal boyun disseksiyonu uygulanmış 101 skuamöz hücreli karsinom olgusu çalışma grubumuzu oluşturdu. Tümörlerin, formalin ile fikse edilerek hazırlanan parafin bloklarından hazırlanan kesitlerine immünhistokimyasal olarak p53 (Ab-5, DO-7) ve nm23 (Ab-1) çalışıldı. Sonuçlar semikantitatif olarak değerlendirildi. Sonuçların, tümör lokalizasyonu, boyutu, diferansiyasyon derecesi, kıkırdak invazyonu, lenf nodu metastazı ve metastatik lenf nodunda ekstrakapsüler yayılım ile ilişkisi araştırıldı.

Bulgular: Olguların %46.5'inde p53 ile boyanma izlenmezken, %13'ünde (+), %27.7'sinde (++) , %12.8'inde (+++) immünreaksiyon saptandı. nm23 ile %23.8 olguda immünreaksiyon görülmedi. Olguların %17.5'inde (+), %27.3'ünde (++) , %31.4'ünde (+++) immünreaksiyon saptandı.

Sonuç: Çalışmaya alınan prognostik parametreler ile p53 mutasyonu ve nm23 immünreaksiyonunun belirgin bir ilişkisi saptanmadı. p53 mutasyonu ve nm23 immünreaksiyonunun larinks skuamöz hücreli karsinomunda prognostik parametrelerle doğrudan ilişkili olmadığı düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Laringeal skuamöz hücreli karsinom, nm23, p53

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2005, 25:348-353

Abstract

Objective: The association between age and gender of patients and histological prognostic parameters such as tumor localization, dimension, differentiation, cartilage invasion, lymph node metastasis, extracapsular extension in metastatic lymph nodes in laryngeal squamous cell carcinoma, as well as p53 and nm23 expression was evaluated.

Material and Methods: One hundred and one squamous cell carcinoma cases, in whom total laryngectomy and radical cervical lymph node dissection had been performed, constituted our patient pool. p53 (Ab-5, DO-7) and nm23 (Ab-1) were immunohistochemically examined on tumor slides. The results were evaluated semiquantitatively. Association between these results and tumor localization, dimension, differentiation, cartilage invasion, lymph node metastasis, and extracapsular extension in metastatic lymph nodes was determined.

Results: There was no staining in 46.5% of the cases for p53. In 13%, (+) staining, in 27.7% (++) , and in 12.8% (+++) staining was noted. In 23.8% of the cases, positive staining could not be observed for nm23. There was (+) staining in 17.5%, (++) in 27.3% and (+++) in 31.4% of the cases for mm23.

Conclusion: There was no association between the reviewed histological prognostic parameters and immunohistochemically-verifiable p53 mutation or nm23 expression. Therefore, we suggest that p53 mutation and nm23 expression are not directly associated with heretofore commonly accepted prognostic parameters in laryngeal squamous cell carcinoma.

Key Words: Squamous cell, carcinoma, nucleoside diphosphate kinase A (nm23), genes, p53, laryngeal neoplasms

Skuamöz hücreli karsinom larinksin en sık görülen malign tümörüdür.¹ Bu tümörler klinik semptomları, postoperatif komplikas-

yonları ile dramatik sonuçlar doğurabilmektedir. Bu nedenle tedavi beklentisinin artırılabilmesi için prognostik belirleyicilerin ortaya konulması oldukça önemlidir.

Wild tip p53, hücre döngüsünü kontrol eden, hasarlı DNA'ya sahip hücrelerde apoptozise giden yolu aktive eden bir anti-onkogen olarak bilinir. p53 geninin uğradığı mutasyonların çoğu hücre siklusunda yarı ömrün uzaması ile kendini gösterir

Geliş Tarihi/Received: 17.11.2004 Kabul Tarihi/Accepted: 18.04.2005

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr. Deniz ARIK
Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Talatpaşa Bulvarı, 06100, Altındağ, ANKARA
denarik@hotmail.com

Copyright © 2005 by Türkiye Klinikleri

ve bu mutasyonlar immünohistokimyasal olarak saptanabilir.² p53 mutasyonu çeşitli kanserlerde olduğu gibi larinks skuamöz hücreli karsinomunda da en sık görülen genetik değişikliktir. Assimakopoulos ve ark. p53 mutasyonunun larinks skuamöz hücreli karsinomunda erken dönemde ortaya çıktığını, p53'ün tümörün progresyonu ile ilgili olmadığını ve prognostik bir belirleyici olmadığını belirtmiştir.³ Pai ve Narayana da çalışmalarında bu yönde sonuçlar rapor etmiştir.^{4,5} p53'ün laringeal skuamöz hücreli karsinomda prognostik etkisi olduğunu savunan çalışmalar da vardır. Buna göre Hirvikoski ve ark., p53 overekspresyonun, Chomchai ve ark. ise mutasyonunun sağ kalıma iyi yönde etki ettiğini belirtmiştir.^{6,7} Bradford ise p53 mutasyonunun ileri dönem larinks karsinomlarında sağ kalımı azalttığını rapor etmiştir.⁸

nm23, malign melanoma ve meme kanserinde, metastatik progresyonun potansiyel bir inhibitörü olduğu gösterilen, 17. kromozomda yerleşen anti-metastatik bir gen dir. nm23 immünreaksiyonunun bazı kanserlerde invazyon ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir.⁹ Gündüz ve ark. çalışmalarında larinks skuamöz hücreli karsinomunda yüksek düzeyde nm23 ekspresyonu olan olgularda metastaz ve rekürrens daha az görüldüğünü bildirmiştir.¹⁰

Çalışmamızda larinks skuamöz hücreli karsinomunda p53 mutasyonu ve nm23 immünreaksiyonunun araştırılması, bunların diğer prognostik parametrelerle ilişkisinin olup olmadığının gösterilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler

Ocak 2000-Temmuz 2004 tarihleri arasında hastanemizde total larinjektomi ve radikal boyun disseksiyonu yapılarak skuamöz hücreli karsinom tanısı alan 101 olgu çalışmaya dahil edildi. Olgular; cinsiyet, yaş, tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, diferansiyasyon derecesi, kıkırdak invazyonu, lenf nodu metastazı, metastatik lenf nodunda ekstrakapsüler yayılımın varlığı açısından değerlendirildi. Tümör lokalizasyonu supraglottik, glottik, subglottik ve transglottik olarak sınıflandırıldı. Tümör boyutu ≤ 3 cm ve > 3 cm şeklinde, diferansiyasyon derecesi iyi, orta derecede ve az

diferansiye olarak sınıflandırılarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal çalışma için tümörün en invaziv alanının izlendiği blok seçildi ve 5 μ m kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon sonrasında streptavidin-biotin yöntemi ile immünohistokimyasal çalışma yapıldı. p53 için Ab-5, klon DO-7, fare monoklonal antikor (Neomarkers), nm23 için NDP Kinaz Ab-1, tavşan poliklonal antikor (Neomarkers) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak p53 için memenin infiltratif duktal karsinomu, nm23 için kolon adenokarsinomu kullanıldı. Sonuçlar ışık mikroskopunda (Nikon, optiphot-2) iki araştırmacı tarafından değerlendirildi. Tümör hücrelerinde p53 ile nükleer, nm23 ile sitoplazmik boyanma dikkate alındı. Semikantitatif olarak skorlama yapıldı. Tüm kesit yüzeyi taranarak tümör hücrelerinde ortalama %3'ten fazla boyanma olması pozitif olarak kabul edildi. Tümör hücrelerinde boyanma %3-10 arasında ise (+), %10-50 arasında ise (++) , %50'den fazla ise (+++) olarak değerlendirildi.

p53 ve nm23 pozitivitesinin, olguların yaş, cinsiyet, tümör lokalizasyonu, tümör boyutu, diferansiyasyon derecesi, kıkırdak invazyonu, lenf nodu metastazı, metastatik lenf nodunda ekstrakapsüler yayılım varlığı ile ilişkisi istatistiksel olarak araştırıldı. İstatistiksel çalışmada "Student's T test", Pearson χ^2 testi, lojistik regresyon testi ve "Fisher's exact test" kullanıldı.

Bulgular

Olguların 7 (%6.9)'si kadın, 94 (%93.1)'ü erkek idi. Yaşları 26-75 (ortalama 55.6) arasında değişmekteydi. Tümör lokalizasyonu 22 olguda (%21.8) supraglottik, 26 olguda (%25.7) glottik, 2 olguda (%2) subglottik, 51 olguda (%50.5) transglottik olarak belirlendi. Tümör boyutu olguların 44 (%43.5)'ünde 3 cm veya daha küçük, 57 (%56.4)'sinde 3 cm'den büyük idi.

Tümörlerin %12.9 (13 olgu)'u az diferansiye, %49.5 (50 olgu)'i, orta derecede, %37.6 (38 olgu)'sı iyi diferansiye idi. Olguların 52 (%51.5)'sinde kıkırdak invazyonu mevcuttu. Lenf nodu metastazı olguların %35.6 (36 olgu)'sında vardı ve metastatik lenf nodu sayısı 1 ile 16 arasında değişmekteydi. Metastatik lenf nodu olan 36

olgunun 3'ünde tümörün ekstrakapsüler yayılımı izleniyordu.

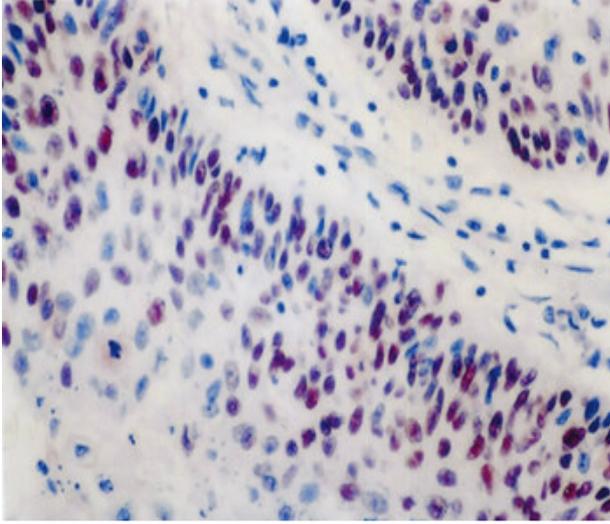
İmmünohistokimyasal olarak olguların %53.5'inde p53 ile, %76.2'sinde nm23 ile pozitivite izlendi (Resim 1-4).

Yapılan istatistiksel çalışmalarda p53 ve nm23 pozitif ve negatif olgular arasında araştırılan parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi. Ancak p53 ve nm23 pozitivitesi (+) ve (-) olarak iki grup şeklinde ele alındığında, nm23 (+) ve (-) gruplarda, tümör diferansiyasyonu açısından anlamlı bir dağılım farkı saptandı (p: 0.02). Buna göre az diferansiye tümörlerde, orta ve iyi diferansiye tümörlere göre daha az nm23

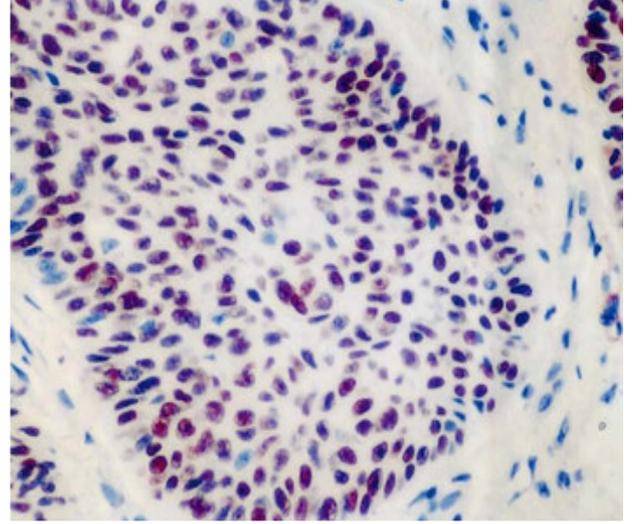
immünpozitivitesi mevcuttur. Diğer prognostik parametrelerden herhangi birinin p53 veya nm23 ile istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişkisi bulunamadı (Tablo 1).

Tartışma

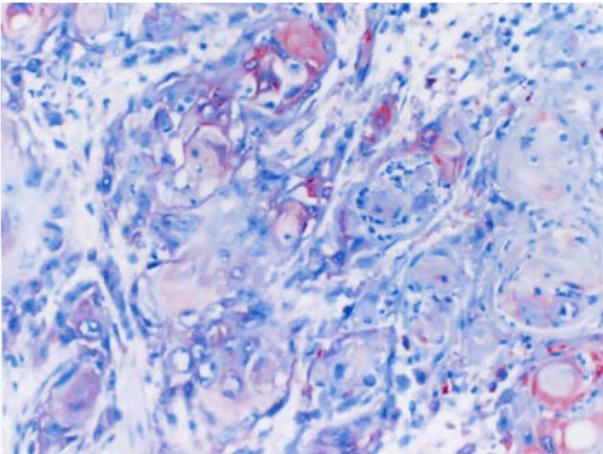
Laringeal mukozada epitelyal hiperplastik lezyonlardan kanser gelişimi sırasında hücrelerde çeşitli genetik değişiklikler olur. Laringeal kanserde de pek çok tümörde olduğu gibi en sık görülen genetik değişiklik p53 mutasyonudur. p53 mutasyonu noninvaziv lezyonlarda ortaya çıkar ve invaziv karsinomlarda sıklığı giderek artar. p53'ün asıl rolü hücrenin DNA hasarı oluşturan streslere,



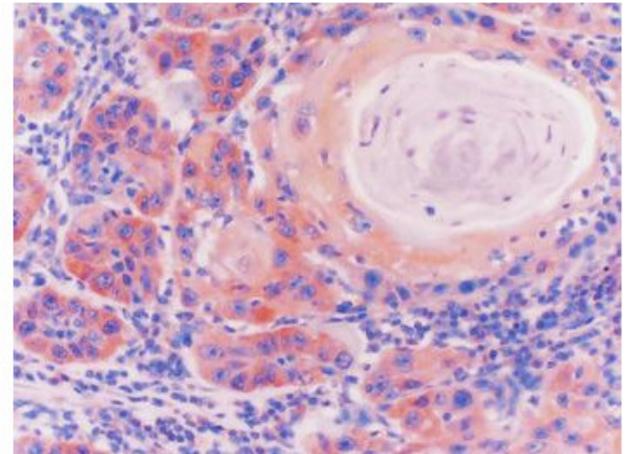
Resim 1. (++) p53 immünboyanması (x200, İHK).



Resim 2. (+++) p53 immünboyanması (x200, İHK).



Resim 3. (++) nm23 immünreaksiyonu (x200, İHK).



Resim 4. (+++) nm23 immünreaksiyonu (x200, İHK).

Tablo 1. p53 ile nm23 boyanma sonuçları ile prognostik parametrelerin karşılaştırılması.

		p53				p	nm23				p
		(+) (+)		(-) (-)			(+) (+)		(-) (-)		
		n	%	n	%		n	%	n	%	
Cinsiyet	Erkek	52	55.3	42	44.7	0.25	71	75.5	23	24.5	1.0
	Kadın	2	28.6	5	71.4		6	85.7	1	14.3	
Lokalizasyon	Supraglottik	12	54.5	10	45.5	0.93	16	72.7	6	27.3	0.22
	Glottik	15	57.7	11	42.3		16	61.5	10	38.5	
	İnfraglottik	1	50.0	1	50.0		1	50.0	1	50.0	
	Transglottik	26	51.8	25	48.2		44	86.3	7	13.7	
Diferansiyasyon	İyi	20	52.6	18	47.4	0.99	30	78.9	8	21.1	0.02
	Orta	27	54.0	23	46.0		41	82.0	9	18.0	
	Az	7	53.8	6	46.2		6	46.2	7	53.8	
Tümör boyutu	≤ 3 cm	22	50.0	22	50.0	0.54	31	70.5	13	29.5	0.23
	> 3 cm	32	56.1	25	43.9		46	80.7	11	19.3	
Lenf nodu metastazı	(+) Eks (+)	1	33.3	2	66.7	0.80	2	66.7	1	33.3	0.42
	(-) Eks (-)	16	48.4	17	51.6		25	75.7	8	14.3	
	(-) Eks (-)	37	56.9	28	43.1		48	73.8	17	26.2	
Kıkırdak invazyonu	(+) Eks (+)	29	55.8	23	44.2	0.63	40	76.9	12	23.1	0.87
	(-) Eks (-)	25	51.0	24	49.0		37	75.5	12	24.5	
(n:101)		ort	SD	ort	SD	p	ort	SD	ort	SD	p
Yaş (n: 81)		55.7	9.6	55.6	10.9	0.34	55.0	9.6	57.6	11.7	0.39

Eks: Ekstrakapsüler yayılım, SD: Standart sapma.

apoptozis veya hücre bölünmesi gibi yanıtlar vermesini sağlamaktır.¹¹ Mutasyonu halinde DNA hasarı olup da apoptozise gidemeyen hücrelerde yarı ömürde uzama olur. Sonuç tümöral gelişimdir. Larinks skuamöz hücreli karsinomunda p53 immünreaksiyonunun %51-80 arasında değişen oranlarda saptandığı belirtilmektedir ve p53'ün malign transformasyonun erken dönemlerinde larinks skuamöz hücreli karsinomu oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir. Ancak p53 immünreaksiyonunun lenf nodu metastazı, sağ kalım, tümör rekürrensi veya prognoz ile ilişkisi net değildir.^{3,12-15}

Brennan ve ark. yaptıkları çalışmada, cerrahi sınırları histolojik olarak tümörsüz olarak izlenen ancak rekürrens gelişen olgularda, mukozada yüksek p53 immünreaksiyonu olduğunu göstermişlerdir.¹⁶

Çalışmamızda olguların %53.5'inde p53 ile pozitifite izlendi. Sonuçlarımız, larinks skuamöz hücreli karsinomunda daha önce yapılan bazı çalışmaların pozitifite oranları ile benzerlik göstermektedir. Ancak p53 pozitifitesinin varlığı ve bunun derecesinin çalışılan prognostik faktörlerden hiçbirisi ile istatistiksel açıdan anlamlı ilişkisi saptanmadı. Transglottik yerleşimli, > 3cm boyuta

sahip, az diferansiye, lenf nodu metastazı veya kıkırdak invazyonu olan tümörlerden bazılarında p53 (-) saptanırken, glottik ya da supraglottik yerleşimli, ≤ 3 cm boyuta sahip, iyi diferansiye, lenf nodu metastazı veya kıkırdak invazyonu izlenmeyen tümörlerin bazılarında (++) ya da (+++) p53 pozitifitesi saptandı. Yüz bir olgunun 7 (%6.9)'si kadındı. Kadın olguların %28.6'sında, erkek olguların %55.3'ünde p53 pozitifitesi saptanmıştır. Kadın ve erkek olgularda p53 pozitifitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (p: 0.17).

Olgularımızda displastik laringeal epitelde de p53 ile pozitifite olması ve bu pozitifitenin tümör hücrelerinde de devam etmesi, p53 mutasyonunun, larinks skuamöz hücreli karsinomu karsinogenezinde rolü olduğunu düşündürebilir. Ancak prognostik parametreler ile ilişkili olmadığı göz önüne alınırsa hastaların sağ kalımına direkt etkisi olmayacağı öngörülebilir. Benzer şekilde Nadal ve ark. çalışmalarında p53 immünreaksiyonunun, evre, diferansiyasyon derecesi veya prognoz ile ilişkili olmadığını, bu immünreaksiyonun prekanseröz lezyonlarda da görüldüğünü belirtmişlerdir.¹⁷ Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar da p53'ün larinks skuamöz hücreli karsinomunda

karsinogenezde rolü olduğunu, ancak prognostik parametreler ile direkt ilişkili olmadığını destekler niteliktedir. Dolcetti ve ark., çalışmalarında primer tümör ve bu tümörün lenf nodu metastazı arasında p53 immünreaksiyonu açısından benzerlik saptadığını rapor etmişlerdir. Bu bulgularla p53 gen değişikliklerinin tümörün başlangıç dönemlerinde etkili olduğu, neoplastik transformasyonun ileri dönemlerinde rol almadığı sonucuna varılabileceği belirtilmektedir.¹⁸

nm23 geni, 17. kromozomda yerleşen, meme kanseri ve malign melanom gibi bazı tümörlerde metastatik potansiyeli inhibe ettiği gösterilen antimetastatik bir gendir. Bazı tümörlerde (kolorektal karsinom, tiroid kanserleri) yapılan çalışmalarda ise metastaz ile ilişkili olduğu ya da olmadığı yönünde yayınlar mevcuttur.^{19,20} Gündüz ve ark. çalışmalarında larinks skuamöz hücreli karsinomunda nm23 immünreaksiyonunun metastaz ile ilişkisini araştırmışlar, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da metastatik tümörlerde nm23 immünreaksiyonunun metastaz olmayan olgulara göre daha düşük oranda olduğunu belirtmişlerdir.¹⁰ Metastatik lenf noduna yapılan immünohistokimyasal çalışmada da nm23 pozitivitesinin düşük bulunduğunu saptamış, böylece metastaz yapan hücrelerin nm23'ü az eksprese eden hücreler olduğu yorumunu yapmışlar, ayrıca az diferansiye tümörlerde nm23 immünreaksiyonunun iyi ve orta derecede diferansiye tümörlere göre daha az olduğunu belirtmişlerdir.¹⁰ Sikorska ve ark. larinks skuamöz hücreli karsinomunda nm23 eksprese eden olgularda sağ kalımın eksprese etmeyenlerden daha fazla olduğunu rapor etmiştir.²¹

Çalışmamızda olguların %76.2'sinde nm23 ile pozitive saptanmıştır. İyi ve orta derecede diferansiye tümörlerde, az diferansiye tümörlere göre nm23 pozitivitesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak tümör lokalizasyonu, boyutu, lenf nodu metastazı, metastatik lenf nodunda ekstrakapsüler yayılım veya kıkırdak invazyonu ile nm23 immünreaksiyonu arasında ilişki bulunmamıştır. Örneğin birden fazla lenf nodu metastazı olan 15 olgudan 7 (++++)'sinde nm23 immünreaksiyonu

saptanırken, 101 olgudan lenf nodu metastazı olmayan 17'sinde nm23 immünreaksiyonu gözlenmemiştir.

Cinsiyete göre nm23 pozitivitesi ayrı ayrı değerlendirildiğinde, 7 kadın olgunun 6'sında nm23 pozitivitesi saptanmıştır (%85.7). Erkeklerde ise bu oran %75.5'tir. nm23 pozitivitesi açısından cinsiyetin istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadığı görülmüştür (p: 0.54). Ancak kadın olguların azlığı nedeniyle istatistiksel fark ortaya çıkmayabilir. Bu konuda sağlıklı yorum yapabilmek için daha geniş seriler gereklidir.

Sonuçta p53'ün larinks skuamöz hücreli karsinomunun karsinogenezinde etkili olduğu ancak prognozda bugüne dek önemi belirlenmiş parametrelerle direkt ilişkili olmadığı görüldü. nm23 immünreaksiyonu ile tümör diferansiyasyonu arasındaki ilişki literatür bilgileri ile paralellik göstermekteydi. Ancak diğer prognostik parametreler ve özellikle de lenf nodu metastazı ile ilişki saptanmaması farklı faktörlerin de bu süreçte rol alıyor olabileceğini düşündürmüştür.

KAYNAKLAR

1. Mendenhall WM, Million RR, Stringer SP, Cassini N. Squamous cell carcinoma of the glottic larynx: Review emphasizing the University of Florida Philosophy. South Med J 1999;92:385-93.
2. Nathan CA, Sanders K, Abreo FW, Nassar R, Glass J. Correlation of p53 and the proto-oncogene eIF4E in larynx cancers: Prognostic implications. Cancer Res 2000;60:3599-604.
3. Assimakopoulos D, Kolettas E, Zagorianakou N, Evangelou A, Skevas A, Agnantis NJ. Prognostic significance of p53 in the cancer of the larynx. Anticancer Res 2000;20:3555-64.
4. Pai HH, Rochon L, Clark B, Black M, Shenouda G. Overexpression of p53 protein does not predict local-regional control or survival in patients with early-stage squamous cell carcinoma of the glottic larynx treated with radiotherapy. Int J Rad Oncol 1998;41:37-42.
5. Narayana A, Vaughan ATM, Gunarante S, Kathuria S, Walter SA, Reddy SP. Is p53 an independent prognostic factor in patients with laryngeal carcinoma? Cancer 1998;82:286-91.
6. Hirvikoski P, Kumpulainen E, Virtaniemi J, et al. p53 expression and cell proliferation as prognostic factors in laryngeal squamous cell carcinoma. J Clin Oncol 1997;15:3111-20.
7. Chomchai JS, Du W, Sarkar FH, et al. Prognostic significance of p53 gene mutations in laryngeal cancer. Laryngoscope 1999;109:455-9.

8. Bradford CR, Zhu S, Poore J, et al. p53 mutation as a prognostic marker in advanced laryngeal carcinoma. Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Cooperative Study Group. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:605-9.
9. Simone G, Falco G, Caponi MA, et al. nm23 expression in malignant ascitic effusions of serous ovarian adenocarcinoma. *Int J Oncol* 2001;19:885-90.
10. Gündüz M, Ayhan A, Güllü İ, et al. nm23 protein expression in larynx cancer and the relationship with metastasis. *Eur J Cancer* 1997;33:2338-41.
11. Freidman M, Lim JW, Manders E, et al. Prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *Head & Neck* 2001;23:280-5.
12. Kumar RV, Shenoy AM, Daniel R, Shah KV. Cyclin d1, p53, MIB1, intratumoral microvessel density and human papillomavirus in advanced laryngeal squamous cell carcinoma: Association with nodal metastasis. *Otolaryngol Head Neck Surgery* 2004;131:509-13.
13. Büyükbayram H, Cüreoğlu S, Arslan H, İsikakdoğan AR. Prognostic value of PCNA and mutant p53 expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Invest* 2004;22:195-202.
14. Garcia Lozano MC, Orradre Romero JL, Caro Garcia M, Saez del Castillo AI, Piris Pinilla MA. Immunohistochemic expression of p53 protein and TTS prognostic value in the larynx cancer. *An Otorrinolaringol Ibero Am* 2004;31:515-29.
15. Nadal A, Cardese A. Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2003;442:1-7.
16. Brennan JA, Mao L, Hruban LH. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of head and neck. *N Engl J Med* 1995;332:429-35.
17. Nadal A, Jares P, Cazorla M, et al. p21^{WAF1/Cip1} expression is associated with cell differentiation but not with p53 mutations in squamous cell carcinomas of the larynx. *J Pathol* 1997;183:156-63.
18. Dolcetti R, Doglioni C, Maestro R, Gasparotto D, Barzan L. p53 overexpression is an early event in the development of human squamous cell carcinoma of the larynx; genetic and prognostic implications. *Int J Cancer* 1992;52:178-82.
19. Ayhan A, Yasui W, Yokozaki H. Reduced expression of nm23 protein is associated with advanced tumor stage and distant metastases in human colorectal carcinomas. *Virchows Arch* 1993;63:213-8.
20. Arai T, Yamashita T, Urano T. Peripheral reduction of nm23-h1 gene product in metastatic from papillary and follicular carcinomas of thyroid. *Mod Pathol* 1995;8:252-6.
21. Sikorska B, Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M. Prognostic significance of CD44v6 and p53 protein immunoeexpression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Pol J Pathol* 2002;53:17-24.