

Parafin Emdirilmiş Larenks Tümör Dokularında p53 Protein Değerlendirilmesi*

Muhsin KOTEN¹, Vehbi SEKER², Mustafa Kemal ADALI³, Ahmet KARASALİHOĞLU⁴, Cem UZUN³, Kemal KUTLU⁵

ÖZET

Amaç: 17'inci kromozomda bulunan p53 geni normal hücre proliferasyonunu düzenleyen ve bir fosfoprotein olan p53 proteininin oluşumundan sorumludur. p53 gen fonksiyonu bozulduğunda onkogen özellik göstermektedir. Bu normalde immünohistokimyasal boyamalar ile tespit edilemeyen p53 proteininin yapısına da yansımakta ve tümör hücre nükleuslarında immünohistokimyasal boyamalar ile tespit edilebilmektedir. Bu çalışmada, larenks karsinomu dokularında p53 protein varlığı araştırılmıştır.

Yöntem ve gereçler: 69 primer larenks epidermoid kanserli olgumuzun patolojik materyellerinde immünohistokimyasal boyama yöntemi ile p53 protein varlığı araştırılmıştır.

Bulgular: Larenks kanserli 69 olguluk serimizde, %62.3 oranında pozitif immünohistokimyasal boyanma saptanmıştır.

Sonuç: Bu çalışmanın bulguları, larenks kanserinin oluşumunda p53 geni fonksiyon bozukluğunun önemli rol oynadığını 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 using immunohistochemical techniques. In this study, the existence of p53 protein in tumour 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 tumour 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

Karsinogeneziste güncel görüş, neoplastik transformasyonun farklı genetik ve epigenetik etkenlerin birikiminden oluştuğudur. Genetik etki, proto-onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpressör genlerinin inaktivasyonunu içermektedir. Bunun genetik değişiklerle birlikte olduğu bir çok malign tümörde gösterilmektedir. Tümör süpressör geni olarak bilinenler: deleted colon carcinoma (DCC) gen, neurofibromatosis tümör süpressör geni, retinoblastom gen, Wilms tümör geni, Erb A geni ve p53 genidir (1). p53 geni insanda 17'inci kromozomun kısa kolunda yerleşmiştir. Hücre

bölünmesini düzenleyen 393-amino acid nuclear phosphoprotein olan p53 proteininin yapımından sorumludur. Normal hücrelerde p53 proteininin yarılanma ömrü kısalır ve immünohistokimyasal olarak tespit edilemez. p53 genindeki fonksiyon bozukluğu, yarılanma ömrü daha uzun olan stabil mutant protein oluşumuna neden olur. Bu protein immüno-histokimyasal tetkikler kullanılarak saptanabilmektedir (2). p53 genindeki fonksiyon bozukluğu; p53 genindeki genetik değişikliğe (nokta mutasyon), protein oluşumunda viral onkoproteinler ile ilişkiye, p53'ün inaktif oluşuna ve p53 ile hücre kompartmanları arasındaki

* Bu çalışma Trakya Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

¹ Doç. Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi K.B.B. A.D.

² Yrd. Doç. Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.D.

³ Yrd. Doç. Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi K.B.B. A.D.

⁴ Prof. Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi K.B.B. A.D.

⁵ Prof. Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.D.

dislokasyona bağlı olabilmektedir(3). Tümör hücrelerinin nükleuslarında yüksek düzeyde biriken anormal p53 proteininden sıkılıkla mutasyona uğramış p53 alellerini sorumludur (4). p53 geni kanserli bir hücreye verildiğinde hücre ya gelişimini durdurur ya da nekroza uğrar. p53 geni normalde antionkogen iken mutasyona uğradığında onkogen gibi çalışmaktadır (3, 5).

Larenjial kanser ile p53 proteini arasındaki ilişkiyi araştırmak için, 1993-1996 yıllarındaki 69 larenks kanserli olgumuzda, formolde fiks edilmiş ve parafin emdirilmiş tümörlü doku kesitlerinde p53 protein değerlendirmesi çalışmamızı gerçekleştirdik. Olgularımızda doku değerlendirilmesi yapıldıktan sonra yaş, boyun diseksiyonunda tümöral infiltrasyonlu lenfadenopatının var olup olmadığı, tümörün diferansiyasyonu ve p53 protein boyanması oranlarına göre değerlendirme yapılmıştır.

MATERİEL-METOD

Doku:

1993-1996 yıllarında larenks kanseri tanısı ile ameliyat yapılan olgularımızdan rastgele olarak seçilen 69 olgunun, postoperatif patoloji laboratuvarına gönderilmiş, formol ile fiks edilmiş ve parafin bloklarda saklanan tümörlü dokuları

çalışmamızda kullanılmıştır. Önceden tümörün lokalizasyonu, diferansiyasyonu veya yapılan cerrahi yöntem gibi herhangi bir ön bilgi ile olgu ayrimı yapılmamıştır.

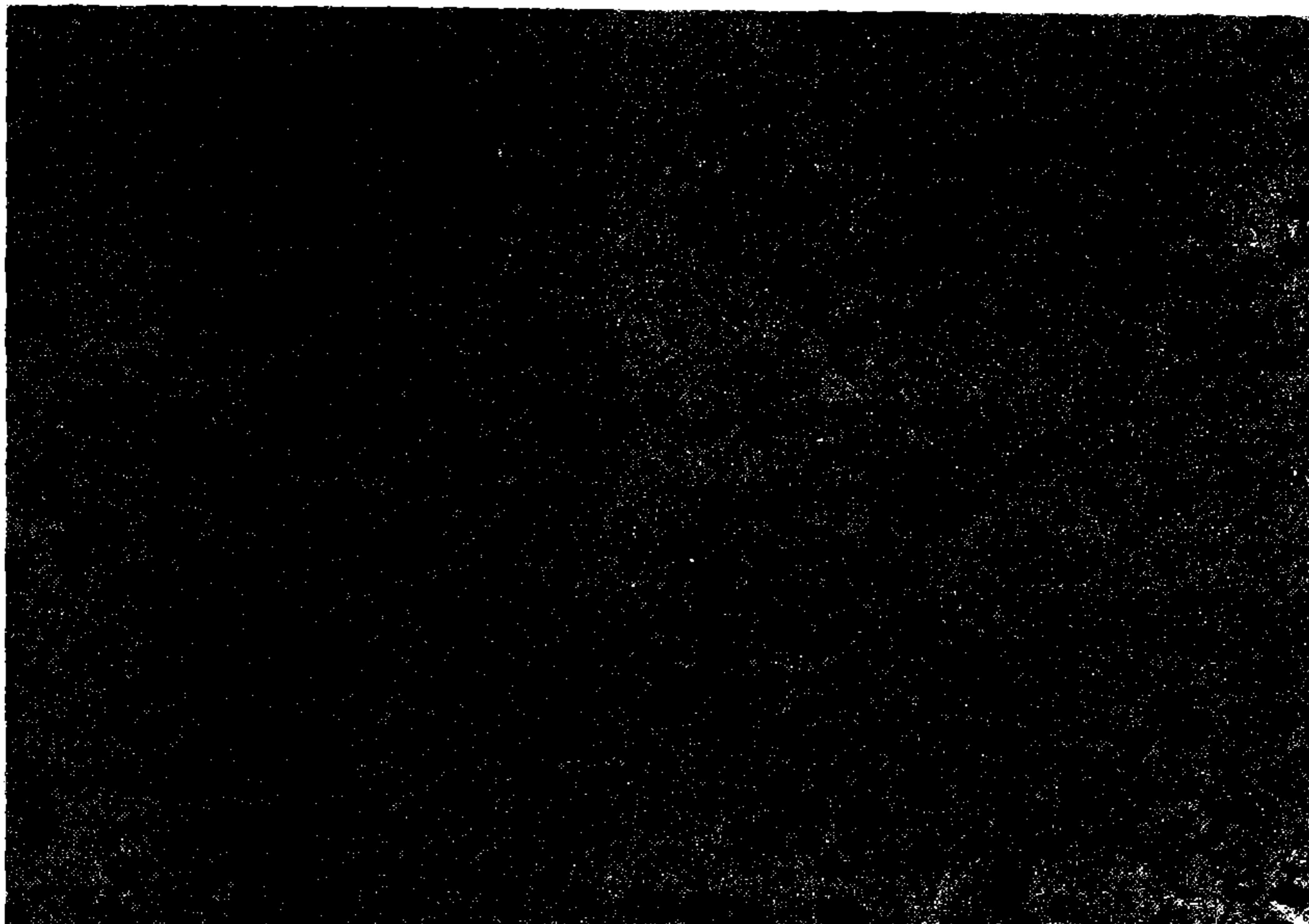
İmmünohistokimyasal boyama:

Parafine gömülü dokulardan 5 mikron kalınlığında alınan kesitler Labelled streptavidinbiyotin (LSAB) yöntemi (6) ile boyandı. Deparafinize edilen kesitler antijenik özelliği açığa çıkarmak için 100 santigrad derecede mikrodalga fırında sitratlı tampon solusyonu içinde benmari usulü 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 edilmiştir. Renklendirici olarak diaminobenzidinede (DAB) ve karşıt boyalar olarak Mayer's hematoksilen kullanılmıştır. Önceden kuvvetli pozitifliği tespit edilmiş olan larenks karsinomu dokusu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır, ayrıca her dokuya negatif kontrol uygulanmıştır. Boyamanın değerlendirilmesinde 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 p 53 varlığı, iyi diferansiyeli alanlarda sadece bazal hücrelerde boyanma (DAB X 50)



BULGULAR

Olgulanımızın tümü primer larenks karsinomu olup, 2 olgu bayan 67 olgu erkektir. En genç olgumuz 30 yaşında, en yaşlı olgumuz 83 yaşındadır. Bu olguların 23 (%33.3)'üne parsiyel larenjektomi, 41 (%59.4)'ine total larenjektomi, 5 (%7.3)'ine near total larenjektomi uygulanmıştır.

Parsiyl larenjektomi uygulanan olguların tümörlerinin 3'ünün az diferansiyasyon, 18'inin iyi diferansiyasyon, 2'sinin orta derecede diferansiyasyon gösterdiği, total larenjektomi uygulanan olguların 11'inin az diferansiyasyon, 23'ünün iyi diferansiyasyon 7'sinin orta derecede diferansiyasyon gösterdiği; Near total larenjektomi

uygulanan olguların birinin az diferansiyasyon, birinin orta derecede diferansiyasyon, üçünün iyi diferansiyasyon gösterdiği saptandı (Tablo 1). Toplamda 15 (%21.7) olguda az diferansiyasyon, 44 (%63.8) olguda iyi diferansiyasyon, 10 (%14.5) olguda orta derecede diferansiyasyon bulunmuştur. Pozitif p53 boyanmasına göre değerlendirildiğinde; 15 az diferansiyel olgunun 12 (%80)'sında, 44 iyi diferansiyel olgunun 26 (%59.1)'sında, 10 orta derece diferansiyel olgunun 5 (%50)'inde pozitif p53 boyanması saptanmıştır (Tablo 2). Az diferansiyel tümörlerde p53 boyanma oranı artmakla birlikte, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde fark anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$). Toplama göre

değerlendirildiğinde 69 olgunun 43(%62.3)'ünde pozitif p53 boyanması saptanmış, 26 (%37.7)'sında p53 boyanması saptanamamıştır. Boyun diseksiyonu yapılip pozitif tümör tutulumlu lenfadenopatisi olan 22 olgu olduğu görülmüş, bunların 16 (%72.7)'sında pozitif p53 boyanması bulunmuştur. Boyun diseksiyonu yapılip pozitif tümör tutulumlu lenfadenopatisi olmayan 42 olgunun 23 (%54.8)'ünde pozitif p53 boyanması ve boyun diseksiyonu yapılmayan 5 olgunun 4 (%80)'ünde pozitif p53 boyanması bulunmuştur (Tablo 3). Bu dağılım istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$).

TABLO 1: Tümör diferansiyasyonunun ameliyat türüne göre dağılımı

Ameliyat türü	Olgı sayısı	Diferansiyasyon		
		AZ	ORTA	İYİ
Total Larenjektomi	41	11 (%26.8)	7 (%17.1)	23 (%56.1)
Parsiyel Larenjektomi	23	3 (%13.0)	2 (%8.7)	18 (%78.3)
Near Total Larenjektomi	5	1 (%20.0)	1 (%20.0)	3 (%60.0)
TOPLAM	69	15 (%21.7)	10 (%14.5)	44 (%63.8)

TABLO 2: Olguların Diferansiyasyona Göre Pozitif p53 Boyanma Oranları

	Olgı sayısı	Pozitif p53 boyanması alanlar
Az diferansiyasyon	15	12 (%80.0)
İyi diferansiyasyon	44	26 (%59.1)
Orta diferansiyasyon	10	5 (%50.0)

($p > 0.05$)

TABLO 3: Olguların Boyun Diseksiyonuna Göre Pozitif p53 Boyanma Oranları

	Olgı Sayısı	Pozitif p53 Boyanma oranı
Diseksiyonda tümör metastazlı lenfadenopati var	22	16 (%72.7)
Diseksiyonda tümör metastazlı lenfadenopati yok	42	23 (%54.8)
Boyun diseksiyonu yok	5	4 (%80.0)

TARTIŞMA

İnsan malignitelerinde en yaygın identifiye edilen mutasyon p53 genine aittir (8). p53 genindeki bu mutasyon yarılanma ömrü uzun olan stabil mutant protein oluşumuna neden olmaktadır. Normal hücrelerde yarılanma ömrü kısa ve immünohistokimyasal boyamalar ile tespit edilemeyen p53 proteini, p53 genindeki fonksiyon bozukluğunda oluşan yapısıyla immuno-histokimyasal boyamalar ile tespit edilebilmektedir. Monoklonal antikor normal p53 proteini tespit etmemektedir. Tümör süpresörü olan p53 geninin kodladığı protein normal hücre proliferasyonunu düzenleyen p53 proteini olup immuno-histokimyasal boyamalar ile tespit edilemezken, fonksiyon bozulup kanser geni (onkogen) haline gelen p53 geninin kodladığı protein kanser hücreyi

nükleuslarında immünohistokimyasal boyamalar ile tespit edilebilmektedir. Bunun yanında bütün larengal kanser örneklerinde pozitif p53 protein boyanması saptanamamakta, bazı p53 pozitif tümörler de uniform yapı göstermemektedir. Bu hücre siklusunun devresi ile p53 oluşumundaki değişikliğe bağlanmaktadır (9). Hücre siklusundaki bu varyasyon, metafazda olan tümör pozitif hücrelerde komple boyanma yokluğu nedenidir. p53 oluşumunun yokluğunun diğer teorik açıklaması, malign transformasyonda her iki p53 alelinin kaybolması olasılığıdır ki bu tümör süpresör proteinin komple yokluğuna yol açmaktadır.

Otozomal dominant geçme özelliği olan Li-Fraumeni sendromunda konjenital p53 gen mutasyonu (germline p53 mutasyon) vardır. Multiple yerleşimli farklı mezenkimal ve epitelyal

neoplaziler görülür. Aile üyelerinde beklenmedik erken yaşlarda tümör gelişir (3). Bizim olgularımızın en genci 30 yaşında olduğundan bu sendromu değerlendirmeye almadık.

Biz bu çalışmada değerlendirdiğimiz 69 primer epidermoid larenks kanseri olgumuzda immuno-histokimyasal boyama yöntemi ile %56.7 pozitif p53 protein boyanması saptadık. Nazofarenks karsinomlarında p53 ekspresyonu %84.6 pozitif (10), tükruk bezi neoplazmlarında (malign lezyonlarda) %29.4 pozitif boyanma (11), hipofarenks yassı hücreli karsinomlarında %37 (12); beyin tünnörlerinde %33 (9), dil yassı hücreli karsinomlarında servikal nodül olan olgularda %43, olmayan olgularda %61 (8), kolorektal karsinomlarda %46.5 (13), kronik myeloid lösemide kronik fazda %7, ani kriz fazında %22, artmış fazda %60 (14), prostat kanserlerinde %20.4 (15) oranında p53 proteini pozitif bulunmuştur. Boag ve ark. (16) 21 larenks kanseri ve 16 larenks selim lezyonunda p53 protein varlığını araştırmış ve kanserli 21 olgunun 14 (%67)'nde pozitif boyanma olurken az diferansiyel lezyonların hepsinde pozitif boyanma olduğunu; selim lezyonlardan sadece bir kord vokal kistinde pozitif boyanma bulduğunu belirtmektedirler.

Sauter ve ark. (17) primer ve metastatik baş boyun karsinomlarında p53 değerlendirmesinde primer olguların %42'sinde, lenf bezinin metastazı olan olguların %43'ünde pozitif p53 boyanması saptamışlardır.

Pavelic ve ark. (18) immünohistokimyasal boyama yöntemini kullanarak çalışmaları baş boyun dokularının %42'sinde pozitif p53 boyanması saptamışlardır.

Maestro ve ark. (19) larenks kanserlerinde protein artışı ile birlikte p53 genindeki yüksek orandaki değişiklikleri immuno-histokimyasal boyama ve moleküler değerlendirme ile araştırmışlardır. Immünohistokimyasal yöntemde %60 pozitif boyanma ve bunun p53 genindeki yapısal ve / veya kopyalama bozukluğu ile birlikte olduğunu ileri sürmektedirler.

Scholnick ve ark. (20) olgularının %53'ünde p53 geninde, %59'unda retinoblastom geninde alel kaybı bulduklarını, bunun da larengial karsinomada bu süpresörlerin büyük rolü olduğunu gösterdiğini belirtmektedirler.

Brenman ve ark. (21) baş boyun yassı hücreli karsinomlu olgulannda p53 geninde mutasyon ile sigara içilmesini karşılaştırmak için yaptıkları çalışmada olguların genel toplamında %42 oranında gen mutasyonu bulmuşlardır. Sigara

içenlerde %47, içmeyen olgularda %14, alkol kullananlarda %55, kullanmayan olgularda %20 oranında gen mutasyonu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada p53 mutasyon oranı sigara içen ve alkol kullanan olgularda %58, sigara ve alkol kullanma hikayesi olmayanlarda %17 bulunmuştur. Sigara içen ve alkol kullanan olgulardaki %58'lük p53 mutasyon oranı bizim çalışmamızdaki %62.3'lük pozitif p53 boyanması oranına çok yakınlığı ile larenks kanserlerinde sigara ve alkolün etkisini destekler bulunmuştur.

Stringer ve ark. (22) cilt kanserlerinde p53 immuno-histokimyasal boyanma ile metastaz oranı ve прогноз arasında ilişkiye araştırmışlardır. p53'ün pozitif immünohistokimyasal boyanmasının artmış lokal metastaz oranı ile birlikte olduğunu bulmuşlardır ve bunun lokal lenfatiklerin elektif tedavisi değerlendirilirken yararlı klinik veri olarak alınabileceğini belirtmektedirler.

Koempel ve ark. (23) erken larengial kanserlerde p53 değerlendirmesi yapmışlar ve olgularının radyoterapiye yanıtlarında pozitif p53 protein boyanması ile ilişki olup olmadığını araştırmışlardır. Olgularının %60'ında pozitif p53 protein boyanması bulmuşlar, pozitif p53 protein boyanması varlığının erken glottik tümörlerin radyoterapi ile tedavisinde başarının belirlenmesinde yol gösterici olmadığını belirtmişlerdir.

Roland ve ark. (24) 41 larenks karsinomlu olgularında p53 protein varlığını değerlendirecek %43.9 pozitif boyanma bulduklarını ve bunun prognostik marker olarak kabul edilemeyeceğini ileri sürmüşlerdir. Bu olgularda 5 yıllık yaşam oranını, pozitif p53 protein boyanması olnarda %61 bulurlarken, p53 protein boyanması bulamadıklarında %74 bulduklarını, bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmişlerdir. Soylu ve ark. (25) larengial epidermoid karsinomlarda p53 tümör süpresör geninin rolünü araştırmışlar ve 40 olgunun %47.5'inde mutant p53 proteini bulmuşlardır. Tümörün boyutu, nodal tutulum ve evresi ile mutant p53 proteininin artışı arasında ilişki olmadığı, ancak tümörün grade' i ile p53 proteininin artışı arasında ilişkili olduğunu belirtmektedirler. Otörler p53 gen mutasyonunun larengial karsinomların gelişiminde rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda pozitif boyanma olan 43 olgunun 16'sında nodal tutulum bulunurken, nodal tutulum bulunan 22 olgunun altısında pozitif p53 protein boyanması olmamıştır. Nodal tutulum olmayan olgularımızın larenks tümör dokularında p53 protein boyanması

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

Bizim değerlendirdiğimiz 69 primer larenks epidermoid kanserli olgumuzda immuno-histokimyasal boyama yöntemi ile bulduğumuz

%62.3 pozitif p53 protein boyanması oranının diğer çalışma sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir. Sonuç olarak; çalışmamızın verileri larenks kanserlerinin oluşumunda p53 geni fonksiyon bozukluğunun önemli rol oynadığı görüşünü destekler nitelikte bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Weinberg RA: Tumor Suppressor Gene. *Science*, 1991; 254:1138-1146.,
2. Ogden GR, Kiddie RA, Lunny DP, Lane DP: Assessment of p53 Protein Expression In Normal, Benign, and Malignant Oral Mucosa. *Journal of Pathology*, 1992; 166:389-394.
3. Chang F, Syjanen S, Syjanen K: Implications of the p53 Tumor-Suppressor Gene in Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology*, 1995; 13:1009-1022.
4. Bookstein R, MacGrogan D, Hilsenbeck SG, Sharkey F, Allred DC: p53 is Mutated in a Subset of Advanced-stage Prostate Cancer. *Cancer Res*, 1993; 53:3369-3373.
5. Ömür M: p53. *KBB Postası*, 1994; 3:22-23.
6. Giorno R: A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidinbiotin interaction. *Diag Immunol*, 1984;2: 161.
7. Joypaul BV, Vojteschs B, Newman EL, Hopwood D, Grant A, Lene DP, et al: Enzyme-linked immunosorbent assay for p53 in gastrointestinal malignancy: comparison with immunohistochemistry. *Histopathology*, 1993; 23:465-470.
8. Leedy DA, Trune DR, Kronz JD, Weidner N, Cohen JI: Tumor Angiogenesis, the p53 Antigen, and Cervical metastasis in Squamous Cell Carcinoma of the Tongue. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1994; 111:417-422.
9. Russell SJ, Ye Y, Waber PG, Shuford M, Schold SC, Niesen PD: p53 Mutations, 06-Alkylguanine DNA Alkyltransferase Activity and Sensitivity to Procarbazine in Human Brain Tumors. *Cancer*, 1995; 75: 1339-1342.,
10. -Dursun G, Akpolat I, Akyol G, Dursun A, Küçük B, Cuhruk C, et al: Nazofarenks Karsinomlarında p53 Ekspresyonu. *KBB İhtisas Dergisi*, 1995; 2:319-321.
11. Dursun G, Akpolat I, Akyol G, Dursun A, Küçük B, Cuhruk C, et al : Tükrük Bezi Neoplazmalarında p53 Ekspresyonu. *KBB İhtisas Dergisi*, 1995; 2:341-343.
12. Frank JL, Bur ME, Garb JL, Kay S, Ware JL, Sismanis A, et al: p53 Tumor Suppressor Onkogene Expression in Squamous Cell Carcinoma of the Hypopharynx. *Cancer*, 1994; 73:181-180.
13. Purdie CA, O'Grady J, Piris J, Wylie AB, Brid CC: p53 Expression in Colorectal Tumors. *Am J Pathol*, 1991; 138:807-813.
14. Mashal R, Shtalrid M, Talpaz M, Kantarjian H, Smith L, Beran M, et al: Rearrangement and Expression of p53 in the Chronic Phase and Blast Crisis of Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood*, 1990; 75: 180-189.
15. İnci O, Kaya E, Özyılmaz F, Hüseyin İ, Alagöl B, Bakırçivi İ, et al: Prostat Adenokarsinomlarında p53 varlığı ile evre ve прогноз ilişkisi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 1995; 10:120.
16. Boag G, Lee S, Charalambous D, Rode J: p53 Expression in Laryngeal Carcinoma. *Pathology*, 1993; 25: 394-397.
17. Sauter ER, Ridge JA, Trock B, Cleveland D, Whitley KV, Mohr RM, et al: Over expression of the p53 Gene in Primary and Metastatic Head Neck Carcinomas. *Laryngoscope*, 1995; 105:653-656.
18. Pavelic ZP, Portugal LG, Gootee MJ, Stambrook PJ, Smith C, Mugue RE, et al: Retrieval of p53 Protein in Paraffin-Embedded Head and Neck Tumor Tissues. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1993; 119:1206-1209.
19. Maestro R, Dolcetti R, Gasparotto D, Dogliani C, Pelucchi S, Barzan L, et al: High Frequency of p53 gene Alterations associated with Protein Overexpression in Human Squamous Cell Carcinoma of the Larynx. *Oncogene*, 1992; 7:1159-1166.
20. Scholnick SB, Sun PC, Shaw ME, Haughey BH, El-Mofty SK: Frequent Loss of Heterozygosity for Rb, TPS3, and Chromosome Arm 3p, but not NME 1 in Squamous Cell Carcinomas of the Supraglottic Larynx. *Cancer*, 1994; 73:2472-2480.

21. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, et al: Association Between Cigarette and Mutation of p53 Gene in Squamous-Cell Carcinoma of Head and Neck. *The New England Journal Medicine*, 1995; 332: 712-716.
22. Stringer SP, Alderman J, Colvin P, Mendenhall WM: Relationship of p53. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 1995; 113: 51.
23. Koempel JA, Portugal LG, Rubin SJ, Farolen MJ, Primer JL, Sabnani J, et al: The Role of p53 as a Predictor of Response to Primary Radiation therapy and Survival in Early Laryngeal Carcinoma. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 1995; 113: 67.
24. Roland NJ, Rowley H, Caslin FAW, Jones AS: p53 Expression in Laryngeal Carcinoma. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 1995; 113 : 80.
25. Soylu L, Yurdakul H, Paydas S, Aydoğan B: The Role of p53 Tumor Suppressor Gene in Laryngeal Epidermoid Carcinomas. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 1995 113:81.