

Uzun Kemik Osteosarkomlarında Klinikopatolojik Prognostik Etmenler ve P-glikoprotein Ekspresyonu

P-glycoprotein Expression and Clinicopathologic Prognostic Factors in Extremity Osteosarcomas

Özay Özkaya¹, Şevket Ruacan¹, Arzu Sungur¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Ankara

Osteosarkom olgularında neoadjuvan kemoterapi ve ekstremité koruyucu cerrahi uygulamalarında konvansiyonel klinikopatolojik prognostik etmenler yanısıra çok ilaçlı kemoterapiye gelişen direnç mekanizmalarından birinde rol alan P-glikoprotein ekspresyonu önem taşımaktadır. Bu çalışmada preoperatif neoadjuvan kemoterapi alan (n=22) ve almayan (n=22) uzun kemik osteosarkom olgularında yaş, semptom süresi, travma/patolojik kırık varlığı, metastaz, metastazın yeri ve zamanı, uygulanan terapi süreleri ve türleri, tümörün yayılımı, nekroz yüzdesi, grade gibi parametreler ve kemoterapi alan grupta P-glikoprotein ekspresyonu immunhistokimyasal olarak araştırılarak belirlenen parametreler ve ekspresyon ile prognoz arasındaki ilişki incelendi. Her iki grupta metastaz ortaya çıkma süreleri kısaltıkça sağkalım kısalıyordu ($p<0.05$). Semptom süresi ile sağkalım arasında önemli sayılabilecek bir ilişki vardı ($p=0.084$). Travma/patolojik kırık, metastaz varlığı, nekroz yüzdesi, tümör büyüklüğü, grade, terapi cinsi, biopsi-terapi süresi parametreleri sağkalımla ilişkili bulunmadı. Immunhistokimyasal incelemede olguların % 85.7 sinde pozitif boyanma saptandı. Bunların % 38 inde boyanma şiddetliydi (3+). Boyanma varlığı, şiddeti ile sağkalım, grade, metastaz, nekroz yüzdesi arasında ilişki saptanmadı ($p>0.05$).

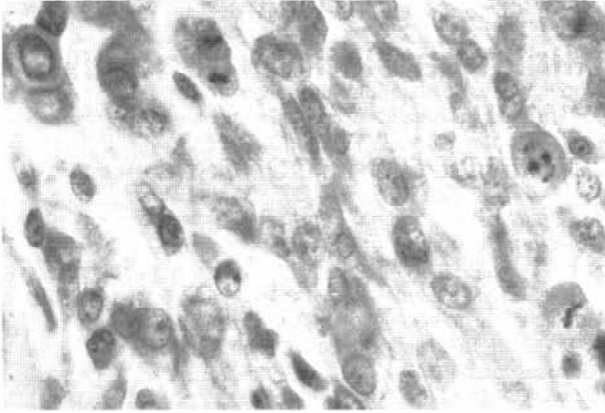
Anahtar Kelimeler : Osteosarkom, prognoz, P-glikoprotein

In application of neoadjuvant chemotherapy and limb-salvage procedures in osteosarcoma patient, expression of P-glycoprotein, which plays a role in multidrug resistance, is an important fact besides the clinicopathologic prognostic parameters. In this study, patients to whom preoperative neoadjuvant chemotherapy has been given (n=229) and has not been given (n=22) were examined by their age, duration of symptoms, existence of trauma/pathologic fracture, metastases, site and timing of metastases, types and duration of therapies, extension of the tumor, percentage of necrosis and grade. P-glyco-

protein expression of the tumor, percentage of necrosis and grade. P-glycoprotein expression was determined immunohistochemically in the chemotherapy group. The suggested parameters and P-glycoprotein status was statistically analyzed in relation to survival. There was a significant relation between the time to develop metastases and survival ($p<0.05$). The duration of symptoms was seemingly important in the survival ($p=0.084$). The presence of trauma/pathologic fracture, metastases; percentage of necrosis, size of the tumor, grade, type of therapy, time elapse between biopsy and therapy were not statistically significant in regard of survival. Immunohistologically, 85.7 % of the cases were expressing P-glycoprotein in 38 % of which expression was strong (+++). Presence, strength of expression were not found to affect survival, grade, metastases, percentage of necrosis ($p>0.05$).

Key Words : Osteosarcoma, prognosis, P-glycoprotein

Osteosarkomlar hastaların % 80 inde 9 ay içinde akciğer metastazı yapan malign tümörlerdir. Preoperatif neoadjuvan kemoterapi protokollerine metotreksatin eklenmesinden sonra osteosarkomlarda ekstremité koruyucu cerrahi uygulamaları yoğunluk kazanmıştır^(1,2). Ancak osteosarkomlarda çoklu ilaç kemoterapisine karşı direnç gelişmekte; sağkalım ve klinik seyir grade, evre, postoperatif nekroz miktarı ve metastaz gibi parametreler yanısıra çoklu ilaç kemoterapisine gelişen dirence göre de değişmektedir⁽³⁻⁶⁾. P-glikoprotein MDR1 (multidrug resistance) geni tarafından kodlanan^(7,8), fizyolojik detoksifikasyon reaksiyonlarında ATP-bağımlı dışa atma pompası olarak rol alan 170 kD ağırlığında⁽⁹⁾ transmembran bir proteindir. Osteosarkom kemoterapi protokollerinde kullanılan en güçlü ilaçlardan biri olan doksorubisinin hücre dışına pompalamaktadır⁽¹⁰⁾. Bu çalışmada osteosarkomlu hastalarda sağkalımı etkileyebilecek prognostik parametreleri belirlemek ve P-glikoprotein ekspresyonunu araştırarak prognozda önemi araştırma amaçlanmıştır.

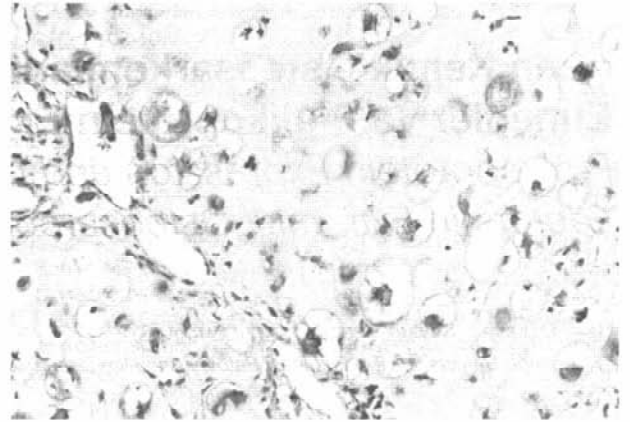


Resim 1: Sitoplazmik ve membranöz P-glikoprotein ekspresyonu gösteren sarkomatöz hücreler (immunoperoksidaz, DAB, x460).

GEREÇ ve YÖNTEM

1973-1993 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tanı konup tedavi gören 44 osteosarkom olgusu çalışma kapsamına alındı; ekstremitelerde dışı osteosarkomlar yaş, klinik seyir gibi farklılıklar sebebiyle çalışma dışında tutuldu. Olgular biopsi sonrası neoadjuvan kemoterapi alan (grup 2) ve almayan (grup 1) 22 kişilik 2 gruba ayrıldı. operasyon materyalinde cerrahi sınırlar Enneking sistemine göre belirlendi. İkinci grupta 19 olguya preoperatif kemoterapi verilmişti (4 olguya 2 kür Endoksan, 7 olguya 8 gr/m² 2-4 kür yüksek doz metotreksat, 8 olguya 120 mg/m² 3 kür cisplatin-60mg/m² adriamisin). Biopsi ve operasyon materyallerinden alınan örneklerin formalinde fikse, gerekirse dekalsifiye edildikten sonra hazırlanmış olan HE boyalı kesitleri retrospektif olarak incelendi. Grade'lemede Mirra ve Dahlin'in kullandığı modifiye Broder sistemi kullanıldı. Tümörün medüller kemik ve kemik iliğine, komşu yumuşak dokulara eklem kapsülüne ve vasküler yapılara uzanımı belirlendi. Tümör nekroz yüzdesi Picci ve arkadaşlarının tanımladığı semikantitatif yöntemle değerlendirildi⁽¹¹⁾.

İkinci grup olguya uygulanan immunhistokimyasal incelemede formalinle fikse parafine gömülü dokulardan hazırlanan 6-8 mikron kalınlığında kesitler poly-L-lysine kaplı lamlara alındıktan sonra streptavidin-peroksidaz yöntemi uygulandı. Deparafinizasyon ve rehidrasyondan sonra %0.3 lük metanol-hidrojen peroksit solüsyonu ile endojen peroksit bloklanıp PBS (phosphate buffered saline) ile yıkandı. NCL-JSB-1 monoklonal antikoru (Novacastra, 1/30) ile 1 saat inkübasyondan sonra PBS ile yıkanıp sekonder biotinli antikorlar (Lipshaw) ve daha sonra streptavidin peroksidaz enzim konjüguatı DAB (Lipshaw) ile inkübe edildi. Reaksiyon diaminobenzidin ile görüntülendi; zıt boya olarak Mayer hematoksilin kullanıldı. P-glikoprotein immün boyanması semikantitatif skalada değerlendirildi. Hiç boyanma olmadığında



Resim 2: Kondroblastik hücrelerde şiddetli P-glikoprotein ekspresyonu (immunoperoksidaz, DAB, x230).

sonuç negatif kabul edildi. Pozitif örnekler boyanma dağılımı ve plazma membran boyanma derecesine göre 1 ile 3 arasında derecelendirilerek az sayıda hücrede zayıf intrasitoplazmik boyanma 1+, geniş alanlarda granüler orta şiddette boyanma 2+, diffüz kuvvetli intrasitoplazmik ve membranöz boyanma 3+ olarak kabul edildi. Her skor için boyanan hücre yüzdesi hesaplandı. İstatistiksel analizde korelasyon, Kruskal-Wallis varyant analizi, Mann-Whitney U testi ve ki-kare testi uygulanarak değişik parametrelerin sağkalımla ve birbiriyle olan ilişkisi araştırıldı.

BULGULAR

Her iki gruptaki olguların klinik ve patolojik özellikleri Tablo 1 de özetlenmiştir. Birinci grupta tümör nekrozu sağkalımla ilişkili değildi. Grade sağkalımı etkilemiyordu. Metastaz varlığı sağkalımı etkilemiyor ancak metastaz gelişene kadar geçen süre kısaltıkça sağkalım azalıyordu (p=0.05). Komşu dokulara invazyon varlığı metastaz sıklığını değıştirmiyordu (p=1.00). Tümör volümü ile semptom süresi arasında ilişki yoktu. Semptom süresi ile sağkalım arasındaki ilişki anlamlı sayılabiliirdi (p=0.084).

İkinci grupta olguların %50 den fazlası mikst histoloji gösteriyordu. P-glikoprotein sarkomatöz hücrelerde kuvvetli ekspresyon gösterirken osteoid matrikste negatifti (Resim 1). Bazı histolojik varyantlar farklı boyanma karakteri sergiliyordu. Dev hücreli varyant morfolojisi ve kondroblastik varyant morfolojisi gösteren birer olgu kuvvetli ekspresyon gösteriyordu (Resim 2); dev hücreli varyantta dev hücreler aynı tümör içindeki konvansiyonel sarkom hücrelerinden daha kuvvetli boyanma özelliği sergiliyordu.

P-glikoprotein ekspresyonu gösteren ve göstermeyen olguların bazı klinik ve patolojik özellikleri Tablo 2 de gösterilmiştir.

P-glikoprotein ekspresyon varlığı sağkalımı etkilemi-

	GRUP1	GRUP2
Yaş (ortalama)	16	16
E/K	11/11	9/13
Semptom süresi (ay;ort.)	4.2	7
Patolojik kırık (%)	22.7	32
Anatomik yerleşim		
Femur	18	14
Tibia	1	4
Humerus	3	1
Radius	-	2
Fibula	-	1
Metastaz (%)	50	64
Metastaza kadar (ay;ort.)	16	23
İzlem (ay;ort)	10.5	32
sağkalım (ay;ort.)	10.5	32
Tümör hacmi (cm ³ ;ort.)	875	602
Nekroz (%;ort.)	22	35
Grade (>%50)	3-4	3-4
P-glikoprotein (%(+))	-	85.7
Histolojik tip (>%50)	Mikst	Mikst

Tablo 1 : Olguların klinik ve patolojik özellikleri

	P-glikoprotein (-)	P-glikoprotein (+)
Sağkalım (ay;ort.)	38.7	30
Grade		
1-2	2	5
3-4	1	13
Metastaz (+)	2	12
Nekroz		
0-%50	2	13
%51-90	1	5
>%90	-	-

Tablo 2 : P-glikoprotein ekspresyonu (-) ve (+) olguların bazı klinik ve patolojik özellikleri

ordu ($p=0.61$). P-glikoprotein ekspresyon şiddeti tanıdan tedaviye geçen sürenin değişmesiyle farklılaşmıyordu. Postoperatif nekroz yüzdesi P-glikoprotein ekspresyonu ile ilişkili değildi ($p=0.56$). Metastaz varlığı sağkalımı etkilemiyordu. Metastaz gelişme zamanı ile sağkalım arasında kuvvetli ilişki vardı ($p=0.00$). Yüksek doz metotreksat verilen olgularda sağkalım diğer protokol-

lerin verildiği olguların sağkalımından farklı değildi. Nekroz yüzdesi de farklı kemoterapi protokollerine göre değişiklik göstermiyordu.

TARTIŞMA

Osteosarkomlar populasyonun az bir kısmında görülmekle birlikte önemli morbidite ve mortaliteye sebep olan malign tümörlerdir. Tedavi seçimi prognostik parametrelere dayalı olarak yapılmaktadır. Bu parametreler uzun dönem takipleri olan geniş hasta serileri ile çalışan değişik araştırmacılar tarafından tanımlanmıştır. Bunlar arasında evre, grade, ve nekroz yaygınlığı en önemli parametreler olarak sayılmaktadır ⁽¹²⁾. 10 yaşından küçük veya 20 yaşından büyük olma, erkek olma, 1-2 aydan kısa süreli semptom verme, patolojik kırık varlığı kötü prognostik parametreler olarak saptanmıştır ⁽¹³⁾. Prognoz farklı histolojik varyantlara göre değişmemektedir; yüksek grade ve ileri evre kötü prognoza işaret etmektedir. Preoperatif neoadjuvan kemoterapiye tümörün verdiği yanıtlar nekroz ise tek ve çok değişkenli analizlerde prognoza etki eden faktör olarak bulunmuştur ⁽¹¹⁾. Bizim çalışmamızda her iki grup olguda tanıdan metastaz oluşana kadar geçen süre kısaltıldıkça sağkalımın kısaltıldığı bulunmuştur. Nekroz yaygınlığı ve grade sağkalımı etkilememektedir.

Yaş, epifiz çizgisinin kapaması, anatomik yerleşim, tümörün büyüklüğü ve yaygınlığı, olguların çoklu ilaç tedavisine yanıtları ve çoklu ilaca direncin erken saptanması osteosarkomlarda ekstremitte koruyucu cerrahi uygulamalarında endikasyonları belirlemede önemli faktörlerdir. Direnç gelişim mekanizmalarını tanımlamak ve olgulardaki geçerliliğini belirlemek gelecek çalışmalara ışık tutacaktır. MDR1 gen ürünü P-glikoprotein yoluyla gerçekleşen çoklu ilaca direnç bunlardan biridir ve osteosarkomlarda cerrahi ve kemoterapi yönünde yeni ufuklar açmaktadır. Direnç gelişiminin erken dönemlerinde sitotoksik protokollere direnç modifiye edici ajanlar eklenmeli ⁽¹⁴⁾ ve protokollerin MDR1 ekspresyonu gösteren tümör hücrelerini öldürmekteki etkinliği in situ metodlarla monitorize edilmelidir. Bizim çalışmamızda P-glikoprotein ekspresyonu ile ilişkili değerler kısa klinik takipler ve olgu sayısının azaldığı sebebiyle istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olsa da osteosarkomlarda farklı şiddette ve dağılımda P-glikoprotein varlığını gösterir niteliktedir. Olgularımızın bazılarında saptadığımız fokal boyanmalar ve farklı hücre tiplerinin farklı boyanma özellikleri göstermesi (kondroblastik) literatürle paralellik göstermektedir ⁽¹⁵⁾.

Benzer çalışmaların geniş olgu serilerinde yapılmasıyla elde edilen sonuçlar osteosarkomlarda konvansiyonel antineoplastik ilaçlarla MDR fenotipini etkileyecek ajanları kombine eden tedavilerin uygulanabileceği olguların seçiminde önemli rol oynayacaktır ^(14,16).

Rezeksiyon materyalindeki nekroz yaygınlığının kemoterapiye yanıtı göstermede en güvenilir belirleyici olduğu göz önüne alınarak nekroz yaygınlığını belirlemede haritalama yöntemi kullanılmalıdır ⁽¹¹⁾. Bizim çalışmamızda ve diğer birkaç başka çalışmada gösterildiği

şekilde, P-glikoprotein ekspresyonu ve nekroz yaygınlığı arasında ilişki saptanamamış olması tümör hücrelerinin büyük kısmının P-glikoproteinden bağımsız bir ilaç tarafından ortadan kaldırıldıklarının gösteriyor olabilir⁽¹⁷⁾. P-glikoprotein ekspresyonunun herhangi bir tedavi verilmeden henüz ilk tanı aşamasında belirlenebiliyor olması onu nekroz yaygınlığından daha iyi bir prognostik faktör haline getirmektedir.

KAYNAKLAR

1. Eilber Fr, Mirra J et al. Is amputation necessary for osteosarcomas? *Ann Surg* 1980;192(4):431-438
2. Roufgraff B et al. Limb salvage compared with amputation for osteosarcoma of the distal end of the femur. *J Bone Joint Surg* 1994; 76-A(5): 649-655
3. Serra M et al. Establishment and characterization of multidrug-resistant human osteosarcoma cell lines. *Anticancer Res* 1993; 13: 323-330
4. Stein U et al. Expression of mdr1 gene in bone and soft tissue sarcomas of adult patient. *Eur J Cancer* 1993; 29A(14): 1979-1981
5. Hornicek FJ, Gebhardt MC et al. P-glycoprotein levels predict poor outcome in patients with osteosarcoma. *Clin Orthop* 2000;373:11-17
6. Chan HS, Grogan TM, Haddad G, DeBoer G, Ling V. P-glycoprotein expression: critical determinant in the response to osteosarcoma chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(22): 1706-1715
7. Deuchar KL, Ling V. P-glycoprotein and multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Semin Oncol* 1989; 16(2): 156-165
8. Nooter K et al. Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer. *Br J Cancer* 1991; 63:663-669
9. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976;455: 152-162
10. Alexander M van der Bliek et al. Multidrug resistance. *Adv. in Cancer Res* 1989;52: 165-201
11. Picci P, Bacci G, Campanacci M et al. Histologic evaluation of necrosis in osteosarcoma induced by chemotherapy. regional mapping of viable and nonviable tumor. *Cancer* 1985;56: 1515-1521
12. Davis AM et al. Prognostic factors in osteosarcoma: A critical review. *J Clin Oncol* 1994;12: 423-431
13. Taylo WF et al. Trends and variability in survival among patients with osteosarcoma: A 7 year update. *Mayo Clin Proc* 1985; 60: 91-104
14. Takeshita H, Kusuzaki K et al. Avoidance of doxorubicin resistance in osteosarcoma cells using a new guanine derivative, MS-209. *Anticancer Res* 1998; 18(2A): 739-742
15. Radig K, Hackel C et al. Expression of P-glycoprotein in high grade osteosarcomas with special emphasis on chondroblastic subtype. *Gen Diagn Pathol* 1997;142(3-4):139-145
16. Baldini N, Scotlandi K, Serra M, Picci P, Bacci G, Sottili S, Campanacci M. P-glycoprotein expression in osteosarcoma: a basis for risk-adapted adjuvant chemotherapy. *J Orthop Res* 1999; 17(5): 629-632
17. Scotlandi K, Serra M et al. Multidrug resistance and malignancy in human osteosarcoma. *Cancer Res* 1996; 56(10): 2434-2439