



OSTEOSARKOMDA MDR/P-gp FENOTİPİNİN DİFERANSİYASYON İLE İLİŞKİSİ*

THE CORRELATION OF MDR/P-gp PHENOTYPE AND DIFFERENTIATION OF OSTEOSARCOMA

Gülçin BAŞDEMİR Özden ÖZ ERSOY Fikri ÖZTOP

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

Anahtar Sözcükler: P-Glycoprotein, çoklu ilaç direnci, osteosarkom
Key Words: P-Glycoprotein, multiple drug resistance, osteosarcoma.

ÖZET

Bazı deneysel çalışmaların sonucunda, diğer malignitelerde savunulduğu gibi, osteosarkom da (OS) da, p-glikoprotein (P-gp) pozitifliğinin diferansiyasyonla doğru orantılı olarak arttığı iddia edilmektedir. Bu nedenle P-gp'nin kötü prognostik belirleyici olamayacağı öne sürülmektedir. Bu çalışmada OS'larda farklı diferansiyasyon gösteren alanlardaki P-gp pozitifliğinin dağılımı saptanarak diferansiyasyonla ilişkisi sorgulanmıştır. 1984-2000 yılları arasında, Anabilim Dalımızda osteosarkom tanısı almış, 81 primer ameliyat, 82 biyopsi, 13 akciğer, bir aksiller lenf nodülü, bir kosta metastazi, üç lokal rekürrens ameliyat materyalinden hazırlanan 337 kesite immunohistokimyasal yöntemle P-gp boyası uygulanmıştır. Kesitlerde saptanan toplam 544 değişik diferansiyasyon alanında P-gp boyanma özellikleri 0-6 arası skohanmıştır. Çalışmamızda OS'larda P-gp varlığının matriks içeriği ve diferansiyasyon ile bir ilişkisi olmadığı saptanmıştır. OS'ların histolojik alt tipleri göz önüne alınarak yapılan analizlerde de boyanma oranının farklılık göstermediği bulunmuştur. Bu proteinin diferansiyasyon ile ilişkisi olabileceğini ön gören kaynaklarla uyuşmayan bir sonuç elde edilmiştir. P-gp boyanması diferansiyasyondan bağımsız bir belirleyici gibi görünmektedir.

ABSTRACT

Recent experimental studies on osteosarcomas (OS) have postulated that similar to other malignancies, p-glycoprotein (P-gp) positivity is directly correlated with differentiation. Therefore, it has been hypothesized that P-gp cannot be a marker of poor prognosis. In this study, the distribution of P-gp positivity in different areas of OSs with variable differentiation pathways is assessed and its relationship with differentiation is questioned. The cases, which have received the diagnosis of OS in our department between 1984-2000, were included in the study. A total of 337 sections were immunohistochemically stained for P-gp, which consisted of 81 primary surgical materials, 82 biopsies, 13 lung specimens, one axillary lymph node and one rib metastasis, and three local recurrence materials. The P-gp staining patterns were scored between 0 and 6 on a total of 544 areas with different differentiation pathways. Our results have shown that P-gp expression of OSs has no correlation with the matrix content and differentiation. Furthermore, the analysis of the histological subtypes did not present any differences in the staining patterns. In conclusion, despite the previous reports demonstrating correlation of this protein with differentiation, it appears that P-gp staining of OSs is an independent factor.

Yazışma adresi: Gülçin Başdemir, Ege Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir
Makalenin geliş tarihi: 11.04. 2002; kabul tarihi: 19. 04. 2002

GİRİŞ

Kemoterapinin başarısını etkileyen farklı direnç mekaniz-
malan tanımlanmıştır (1-12). Tedavi direncini saptama

yöntemleri ve prognostik önemi konusunda fikir birliği oluşmamıştır. Multi Drug Resistance (MDR), "Çoklu ilaç direnci" ilk defa 1970 lerde Kessel ve ark (5) tarafından tanımlanmıştır. Bu direnç mekanizmalarının varlığının bugün için bilinen işaretleyicileri MDR/P-gp, MRP (Multidrug Resistance Associated Protein) ve LRP (Lung Resistance Protein) dir (13-15). Bu işaretleyicilerin saptanmasında çok çeşitli yöntemlerin kullanılması, ilaç direnci konusundaki araştırma sonuçlarının kıyaslanmasını zorlaştırmaktadır. Bu yöntemleri ve işaretleyicilerin prognostik önemlerini birbiri ile karşılaştıran ve işaretleyicilerin birbiri ile ilişkisini araştıran çok sayıda kaynak vardır (6,16-20). Araştırmalar in vitro ilaç direncinin hücre yüzeyindeki P-glikoprotein (P-gp) varlığı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (21). Ancak P-gp, intrasellüler ve nükleer olarak da bulunabilmektedir (21,22). P-gp, MDR1 geninin ürünü olup, 1280 aminoasitten oluşan, 170 kilodaltonluk, transmembranöz bir glikoproteindir (23-25). P-gp insan vücudunda normalde yaygın olarak bulunan, hücre içindeki maddelerin dışı akımını sağlayan tek taraflı, ATP bağımlı bir pompadır (1,26). P-gp miktarının artışı bir çok sitotoksik ilacın dışı akımını artırarak etken maddenin hücre içinde birikimine engel olur (6,11,24). Böylece pek çok tümörde hücrenin ölümünü engelleyerek çoklu ilaç direncine neden olabilmektedir (8,27). Ne yazık ki P-gp bağımlı çoklu ilaç direnci konusunda yapılan çalışmaların sonuçları birbiri ile çelişmektedir. MDR fenotipinin tümörün preoperatif KT'ye verdiği histolojik yanıt ile ilişkisinin olmadığını (19,28,29) ve olduğunu (30-32) gösteren farklı çalışma grupları vardır. P-gp pozitifliğinin, kanserin ilerlemiş evresi ile ilişkili bulunduğunu savunan yazarlar vardır (10,17,19,33,34). Sarkomlarda P-gp varlığının önemli bir kötü prognostik belirleyici olduğunu gösteren çalışmalar (35,36) kadar, olmadığını gösteren çalışmalar (37,38) da bulunmaktadır.

Osteosarkomlarda prognostik faktörler konusunda görüş birliği olmamasına rağmen, ilaç tedavisine iyi yanıt veren grubun iyi prognoz gösteren grup olduğu kabul görmektedir. Bu nedenle cerrahi sonrası saptanabilen nekroz oranı önemli bir prognostik faktördür. Tanımlanan direnç mekanizmaları gereği; ilaç direnci saptanan, yani yüksek düzeyde MDR1 genotipi veya fenotipi gösteren tümörlerde nekroz oranı düşük beklenir. OS'ların tedavisinde etkili olan doksorubisine (adriyamisin) karşı dirençte bu pompanın etken olduğu iddia edilmektedir (39-43). MDR1 gen ürünü olan P-gp salınmasının gösterilmesinin kemoterapi ile tedavi edilen OS'lu hastaların gelecekteki klinik durumunu gösteren en önemli belirleyicilerden birisi olduğu savunulmaktadır (39-44). Ancak kaynaklarda P-gp ile nekroz oranı arasında anlamlı bir ilişki bulan az sayıda yayın vardır (18,41,45). Genelde bir ilişki gösterilememiştir (39,46-49). Baldini ve ark (39) 1995 yılında OS'larda P-gp

pozitifliği ile preoperatif KT sonrası tümör nekrozunun, prognozu işaret eden bağımsız belirleyiciler olduklarını göstermiştir. Aynı ekip, daha sonra, P-gp nin, kötü prognoz, yüksek relaps oranı ve progressif hastalıkla ilişkisini destekleyen yeni sonuçlar yayınlamışlardır (40,42,43). Chan ve ark 1997 yılında (41,44) OS olgularında tanı sırasındaki P-gp durumunun saptanmasının prognostik önemi olduğunu vurgulamıştır. Memorial Sloan Kettering Kanser Merkezi ekibi ise çalışmalarında P-gp ile tümörün KT'ye histolojik kötü yanıtı ve hastalısız sağkaim oranı arasında ilişki bulamamıştır (50).

Görüldüğü gibi kaynaklarda P-gp' nin, prognozu veya nekroz oranını belirleyiciliği üzerinde fikir birliği yoktur. Ayrıca OS'larda KT'ye karşı hassasiyeti gösterecek yöntem konusunda da henüz fikir birliği oluşmamıştır. P-gp varlığını ve MDR1 mRNA' sini saptamak için kullanılabilecek pek çok teknik vardır. Araştırma ekipleri çeşitli yöntemler kullanmıştır. Adriamisin'in kırmızı otofloresans verme özelliğinden (Adriamisin Binding Ability-ABA) yararlanan yöntemler (11,18,42,51) kadar, revers transkriptaz/polimeraz zincir reaksiyonu (6,20,52), northern blot, dot blot, slot-blot analizi, in situ hibridizasyon (6,53), RNAse protection assay (6), flow-sitometri teknikleri ile de P-gp varlığı saptanabilir (6,54). immunhistokimyasal yöntem daha çok klinik serilerde kullanılmıştır (13,39,40,43-45,47,48).

Kaynaklardaki bütün bu karmaşaya rağmen, MDR fenotipi ile tümör davranışı arasında kesin olmayan, ancak tamamen de reddedilemeyen bir ilişki olduğu açıktır. Ancak bu ilişki, sadece ilaç direnci mekanizması ile açıklanamamaktadır. Literatürdeki bu çelişkileri açıklamak üzere, 1996 yılından bu yana araştırmalar, P-gp varlığı ile diferansiyasyon arasında bir ilişki kurmaya yönelmiştir. P-gp' nin diferansiyasyonla ilişkisini öne süren bazı eski gözlemler vardır. MDR-1 geni normalde yaygın olarak insan dokularında ve dokulardan köken alan tümörlerde bulunmaktadır. Genelde bu tümörler intrensek olarak kemoterapiye dirençli olmaktadır (kolon, sürrenal, böbrek vs.) (26). Bu tümörlerde, diferansiyasyonun P-gp fenotipi ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır (34).

Normal kemik dokularında P-gp varlığı konusunda az sayıda çalışma vardır. Posl ve ark osteositler ve kondrositlerde saptayamamalarına rağmen, epifiz büyüme plağı mineralizasyon alanında, osteoklastlarda, hipertrofik kondrositlerde ve küboidal osteoblastlarda P-gp varlığını göstermişlerdir (48). OS'ların kondroblastik alt tipleri KT'ye dirençli olarak bilinirler. Radig ve ark 52 olguluk bir osteosarkom serisinde kondroblastik tiplerin tamamen yakınında P-gp varlığını göstermişlerdir (49). Bu olguların, klinik olarak tedaviye dirençli ve prognozlarının kötü olduğu bulunmuştur. Kondroblastik alt tipin diferan-

siyasyonlarından dolayı özel bir yerinin olabileceğini iddia etmişlerdir. Tıpkı ostosarkomların kondroblastik alt tipinde olduğu gibi kondrosarkomlar da KT'ye dirençli olduklarından P-gp eksprese ettikleri hipotezi kabul edilebilir gözükmektedir. Terek ve Ark P-gp salınmasını benign ve malign kırkırdak lezyonlarında yaygın olarak bulmuşlar ve kondrosarkomların kemoterapiye verdiği kötü yanıtın P-gp ekspresyonu ile ilişkili olabileceğini iddia etmişlerdir (32).

Daha önce yayımlanmış çalışmalarında (35,39,41) P-gp varlığı ile kötü prognoz ilişkisini gösteren Rizzoli ekibinden, Scotlandi ve ark 1996' daki bir çalışmada MDR fenotipinin hem in vitro hem de klinik olarak daha agresif davranışla ilişkisi olmadığını iddia etmişlerdir (55). Aynı ekip, 1999 yılında tüm bu sonuçları bir arada tartıştıkları makalede, OS'larda P-gp'nin ileriye yönelik prognostik değerinin tartışmalı olduğunu, bu proteinin yüksek salınmasına sahip hücrelerin yüksek metastatik potansiyel ile ilişkili olmadığını iddia etmişler, P-gp'nin diferansiyasyonla ilişkisine dikkat çekmişlerdir (56).

Takeshita ve ark (11) 1996' da fare OS hücre kültürlerinde adriamisine dirençli hücrelerin, yüksek oranda alkalen fosfataz aktivitesine sahip olduğunu ve bu hücrelerin daha diferansiye olduğunu iddia etmişlerdir. Aynı ekip 1998 yılında MDR fenotipi gösteren hücrelerdeki aktin varlığını araştırmışlardır. Sonuçta aktin filamentlerinin organizasyonu ile hücrelerel diferansiyasyon ve OS hücrelerinde P-gp salınımı arasında bir ilişki olduğunu ileri sürmüşler (57); 2000 yılında gerçekleştirdikleri deneysel çalışmada ise P-gp'nin osteoblastik diferansiyasyon ve agresif fenotipin azalmasında direkt etkisi olmadığını göstermişlerdir (58).

Görüldüğü gibi son yayınlarda, osteosarkomlarda MDR fenotipi ile tümörün diferansiyasyonu arasında ilişki kurmaya yönelik bazı hipotezler öne sürülmektedir. Bu araştırma, en azından bu konudaki alternatif yaklaşımlara açıklık getirmek amacı ile planlanmıştır. Çalışmamızda OS'larda farklı diferansiyasyon gösteren alanlardaki P-gp pozitifliğinin dağılımını saptamak ve diferansiyasyonla ilişkisini sorgulamak amaçlanmıştır.

GEREÇ YÖNTEM

1984-2000 yılları arasında, histopatolojik tanısını Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında alan, neoadjuvan KT protokolü almış, opere (amputasyon, dezartikülasyon, rezeksiyon) edilmiş, %10'un üstünde canlı tümör dokusu saptanan, bloklarına ulaşılabilen, immunohistokimyasal boyama için nitelikli kesit elde edilebilen 81 olgunun ameliyat materyallerinde farklı diferansiyasyon alanlarını içeren en az üç, en fazla beş blokta hazırlanan kesitler immunohistokimyasal yön-

temle boyanmıştır. Ayrıca 82 biyopsi, 13 AC, bir aksilla, bir kosta metastazı, üç lokal rekürrens operasyon materiyalinin de P-gp boyalı preparatları bu amaçla yeniden değerlendirilmiştir.

Kesitlerde iyi diferansiye osteoblastik, kötü diferansiye osteoblastik, iyi diferansiye kondroblastik, kötü diferansiye kondroblastik, pleomorfik hücreli sarkom, fibrosarkom benzeri (iyi diferansiye), anevrizmal kemik kisti benzeri, benign dev hücreli tümör benzeri alanlar ve küçük yuvarlak hücreli alanlar boyanma özellikleri açısından ayrı ayrı incelenmiştir. Anaplastik ve MFH benzeri alanlar, pleomorfik hücreli alanlar alt başlığında kabul edilmiştir. Toplam 337 kesitte saptanan 544 değişik diferansiyasyon alanında P-gp boyanma oranı ve şiddeti hem diffüz hem de fokal olarak değerlendirilmiştir.

immunohistokimyasal yöntemle P-gp proteinin varlığını göstermek için parafin bloklardan, jelatin kaplı lam üzerine alınan 4 mikron kalınlığındaki kesitler bir gece 55 derecede etüvde kurutulmuştur. Boyama işleminden önce kesitler, pH:6 sodyum sitrat solüsyonu içinde, ev tipi mikrodalgı fırında 5 dk, 850 watt ve 20 dk, 500 watt güç altında kaynatılarak, antijen geri kazanma uygulanmıştır. 10 dakika protein bloklamadan (kod:X0909, DAKO, USA) sonra kesitler, Pgp C494 monoklonal antikoru (1/150) (DAKO; M3522) ile 30 dk enkübe edilmiştir. Daha sonra streptavidin-biotin yöntemi (DAKO, LSAB-2) ile immunhistokimyasal boyama yapılmıştır. Kromojen olarak diaminobenzidin (DAB) (DAKO, S3000) solüsyonunda tutulan kesitler asitsiz, alkolsüz Mayer Hematoksileni ile boyanmıştır. Pozitif kontrol olarak proksimal tübülüs hücrelerini içeren böbrek ve adrenal korteks dokusu kullanılmıştır.

İmunohistokimyasal Boyanma Sonuçlarının Değerlendirme Yöntemi:

P-gp antikoru ile boyanan 337 kesit bağımsız iki gözlemci tarafından tümörlerin biyolojik davranışı, hastaların klinik özellikleri ve yaşam süreleri bilinmeksizin değerlendirilmiştir. Değerlendirme farklılıklarında her iki gözlemcinin üzerinde anlaşabildiği değer kaydedilmiştir. Sitoplazmik ve membranöz boyanmalar pozitif kabul edilmiştir. Pozitif boyanan tümör alanlarının oranı ve boyanma şiddeti için ayrı skorlamalar yapılmıştır. Boyanma şiddeti için ışık mikroskobunda küçük büyütme (X4 lik objektif) ile farkedilen boyanma, kuwetli boyanma, daha büyük büyütme ile farkedilebilen boyanma hafif boyanma olarak kabul edilmiştir. Skorlama, P-gp antikoru ile hiç boyanma saptanmamış ise "0", %10'un altında hafif boyanma saptanmış ise "1", %10'un altında kuwetli boyanma saptanmış ise "2", %10-50 arasında hafif boyanma saptanmış ise "3", %10-50 arasında kuwetli boyanma saptanmış ise "4", %50'nin üstünde

hafif boyanma saptanmış ise "5", %50'nin üzerinde kuwetli boyanma saptanmış ise "6" olarak yapılmıştır. Tek tük hücre boyanmaları %10' un altındaki gruba alınmıştır. Fokal de olsa en fazla boyanmanın olduğu alan daki boyanma oranının bir önemi olabileceği düşünülmüş; boyanmanın en şiddetli olduğu alandaki boyanma, genel kesit içindeki boyanma oranı ne olursa olsun, fokal boyanma olarak değerlendirilmiş ve boyanma şiddeti için yukarıda tanımlanan kriter kullanılarak skorlanmıştır. Fokal alanda boyanma yüzdesi olarak, bir büyük büyütme alanında (X40) boyanan hücrelerin oranı kabul edilmiştir. Diffüz ve fokal boyanma sonuçları her bir diferansiyasyon alanı için ayrı ayrı skorlanmıştır.

Boyanma sonuçlarının birbirleri ile olan ilişkisi Ki-kare testi ile araştırılmıştır. Boyanma sonuçları arasında rasgele olmayan uyumu araştırmak üzere Kappa değeri hesaplanmıştır. Aynı kesitlerdeki farklı diferansiyasyon alanlarındaki rasgele uyumu araştırmak üzere McNemar yöntemi kullanılmıştır.

BULGULAR

337 kesitte saptanan 544 farklı diferansiyasyon alanı P-gp boyanma özellikleri açısından skorlanmıştır. P-gp boyanma oranı diffüz ve fokal olarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir. On iki küçük hücreli OS ve bir kondroblastom benzeri osteosarkom alanında boyanma izlenmemiştir. Pozitif boyanma sonuçlarımız aşağıdaki tablolarda özetlenmiştir.

Tablo 1. Osteoblastik alanlar

skor	Diferansiye		İndiferansiye	
	diffüz	fokal	diffüz	fokal
0	22	22	149	149
1	-	-	53	28
2	1	-	12	2
3	-	-	8	20
4	-	1	12	13
5	-	-	2	16
6	4	4	41	49
Toplam	27	27	277	277

Tablo 2. Kondroblastik alanlar

skor	Diferansiye		İndiferansiye	
	diffüz	fokal	diffüz	fokal
0	21	21	43	43
1	4	1	6	4
2	1	-	1	-
3	-	1	-	1
4	3	1	2	1
5	-	2	-	1
6	2	5	5	7
Toplam	31	31	57	57

Tablo 3. Matriks içermeyen alanlardaki boyanmalar

skor	AKK benzeri		KDHT benzeri		Pleomorfik hücreli		Fibrosarkom benzeri	
	diffüz	fokal	diffüz	fokal	diffüz	fokal	diffüz	fokal
0	19	19	2	2	44	44	22	22
1	1	1	-	-	17	7	3	1
2	1	-	-	-	8	2	2	-
3	-	-	-	-	3	7	-	-
4	-	-	-	-	4	5	2	1
5	-	-	-	-	-	6	-	2
6	2	3	-	-	9	14	-	3
Toplam	23	23	2	2	85	85	29	29

AKK: Anevrizmal kemik kisti, KDHT: Kemiğin dev hücreli tümörü,

Matriks içeriği ile P-gp arasındaki ilişki:

377 kesitten 210'unda (%62.3) sadece matriks içeren alanlar, 95 kesitte (%28.2) ise matriks içeren ve içermeyen alanlar bir arada bulunmakta idi. 32 kesitte (%9.5) hiç matriks yoktu. Bu farklı alanların boyanmaları arasında rastgele olmayan uyum araştırıldığında Kappa değeri 0.436 bulundu. McNemar testi ile elde edilen "p" değeri 0.06'dır. Bu sonuçlar ışığında boyanmanın matriks içeriğine göre farklılık göstermediği sonucuna varıldı. Sonuçlarımız Tablo 4'de özetlenmiştir. Kondroblastik ve osteoblastik alanlar öncelikle kendi arasında diferansiyasyonlarına göre karşılaştırılmıştır (Tablo 5). 0-2 skor alan boyanma negatif, 3-6 skor alan boyanma pozitif kabul edilmiştir.

Tablo 4. Matriks içeren ve içermeyen alanların boyanmalarının karşılaştırılması

Matriks içeren alanlar	Matriks içermeyen alanlar		
	Negatif	Pozitif	Toplam
Negatif	64	14	78 (%82.1)
Pozitif	5	12	17 (%17.9)
Toplam	69 (%72.6)	36 (%27.4)	95(%100)

Kappa:0.436, p:0.06

Tablo 5. Diferansiyasyonlara göre kondroblastik ve osteoblastik alanların X² analiz sonuçları

	negatif	pozitif	% pozitiflik	p değeri
Diferansiye osteoblastik alanlarda diffüz boyanma	23	4	14.8	0.34
indiferansiye osteoblastik alanlarda diffüz boyanma	214	63	22.7	
Diferansiye osteoblastik alanlarda fokal boyanma	22	5	18.5	0.08
indiferansiye osteoblastik alanlarda fokal boyanma	180	97	34.7	
Diferansiye kondroblastik alanlarda diffüz boyanma	26	26	16.1	0.74
İndiferansiye kondroblastik alanlarda diffüz boyanma	50	7	12.3	
Diferansiye kondroblastik alanlarda fokal boyanma	24	7	23.3	0.38
indiferansiye kondroblastik alanlarda fokal boyanma	48	9	15.8	
indiferansiye kondroblastik alanlarda diffüz boyanma	50	7	12.3	0.43
indiferansiye osteoblastik alanlarda diffüz boyanma	214	63	22.7	

Olguların biopsi, operasyon, metastaz veya nüks materyalleri boyanma sonuçları arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır ($P>0.05$).

TARTIŞMA

Osteosarkomlarda klinik çalışmaların sonuçları genellikle MDR fenotipin kötü prognostik bir belirleyici olduğu ve agresif davranışı gösterdiği şeklindedir (39-44,59,60). Çocukluk çağı yumuşak doku sarkomlarında (35) ve erişkin dönemi YDS'de (28) da bu proteinin salınımın kötü prognostik bir belirleyici olduğu bildirilmektedir. Bunun aksine MDR fenotipin iyi diferansiyasyon göstergesi olduğunu, kötü prognostik bir belirleyici olamayacağını savunan çalışmalar da vardır (11,55,56). Scotland ve ark (55), bir çalışmalarında, P-gp'nin kötü prognoz

göstergesi olduğunu ortaya koymuşlar ve P-gp varlığın da tümörün KT'ye yanıt vermemesi nedeni ile prognozun kötü olduğunu öne sürmüşlerdir. Ancak daha sonraki çalışmalarında P-gp'nin iyi diferansiyasyonla ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir (56). Takeshita ve ark (11,57) da 1996 ve 1998 yılında bu görüşü desteklemişlerdir. Aynı ekip 2000 yılı başlarında yayınladıkları makalelerinde ise P-gp salınımı olan ve olmayan hücre kültürlerinde tümörün davranış olarak bir fark göstermediğini, P-gp'nin osteoblastik diferansiyasyon ve agresif fenotipin azalmasında doğrudan etkisi olmadığını, sonuç olarak P-gp varlığının diferansiyasyonla bir ilişkisi olmadığını bildirmişlerdir (58). Bu iki yorum birbiri ile çelişmektedir; iyi diferansiye tümörlerin, daha düşük metastatik potansi-yale sahip olmaları, hastalıksız sağ-kalım ve yaşam sürelerinin daha uzun olması beklenir bu da prognozu iyileştiren özelliklerdir.

Çalışmamızda literatürdeki bu karışıklıktan yola çıkarak, P-gp'nin diferansiyasyon ile olan ilişkisini sorgulamak hedeflenmiştir.

Bulgularımız, osteoblastik diferansiye ve indiferansiye, kondroblastik diferansiye ve indiferansiye alanlar arasında P-gp salınımı oranının farklı olmadığını göstermiştir (sırasıyla $p:0.34$ ve $p:0.74$). Her iki alanda fokal boyanma sonuçları arasında da fark bulunmamıştır ($p:0.08$ ve $p:0.38$). Osteoblastik ve kondroblastik alanlar arasında da boyanma farkı olmadığı saptanmıştır ($p:0.43$).

Osteosarkomlarda matriks içeriğinin miktarı ve biçimi diferansiyasyon göstergesidir. Bu nedenle, bu çalışmada matriks içeriği ile P-gp pozitifliğinin ilişkisi de araştırılmıştır. Matriks içeren ve matriks içermeyen alanların bir arada bulunduğu 95 kesitte, farklı histolojideki bu alanların boyanma oranlarının farklı olmadığı ($p:0.06$), aynı kesit üzerindeki farklı diferansiyasyon alanları arasında uyum olduğu saptanmıştır ($Kappa=0.43$). Yani aynı tümörün farklı diferansiyasyon alanları benzer P-gp pozitifliği göstermekte, aynı diferansiyasyon özelliklerine sahip farklı tümörler farklı P-gp pozitifliği göstermektedir. Sonuç olarak P-gp boyanma oranı iyi ya da kötü diferansiyasyonla veya matriks özellikleri ile ilişkili değildir. P-gp varlığı diferansiyasyondan bağımsız bir belirleyicidir. Bulgularımız, Takeshita ve ark'nın bulguları ile uyumdadır. Bu bulgular osteosarkomlarda metastaz biyolojisinin diferansiyasyondan bağımsız olduğunu da destekleyebilir.

Diğer yandan tümörün ilaç tedavisine yanıt verememesinin ilaç direnci dışında, farmokokinetik faktörlere, tümör tipi ve biyolojisine, konağın yanıtına, ilacın etkinliğine de bağımlı olduğu unutulmamalıdır.

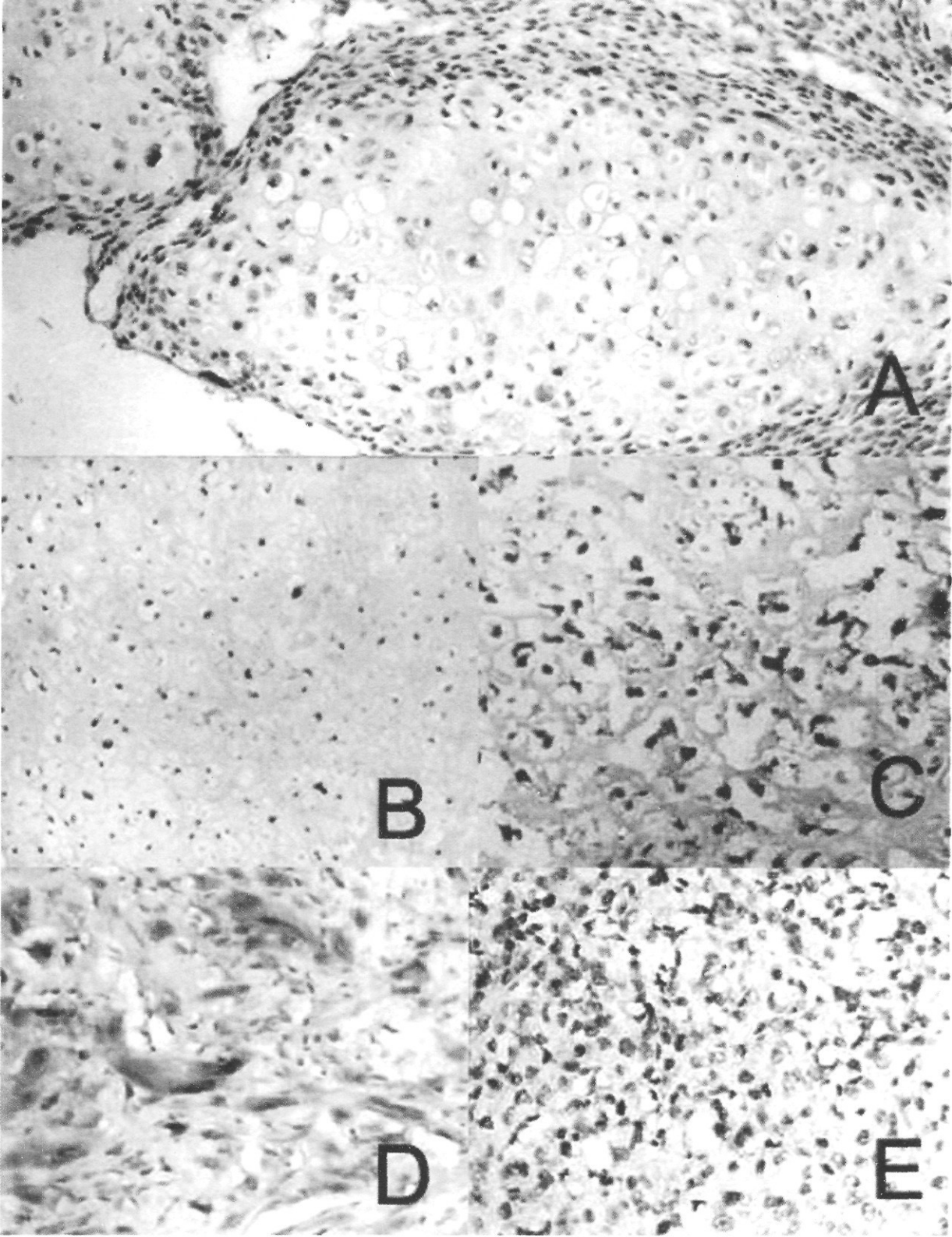
KAYNAKLAR

1. Bert L Lum and Michael P. Gosland. MDR ekspresyon in normal tissues. Drug resistance in clinical oncol. and hematol 1995 ; 9:319-335.
2. Holzmayer TA, Hilsenbeck S, Von Hoff DD, Roninson IB. Clinical correlates of MDR1 (P-glycoprotein) gene expression in ovarian and small-cell lung carcinomas. J Natl Cancer Inst 1992; 262:84-89.
3. Keizer HG, Schuurhuis GJ, Broxterman HJ et al. Correlation of multidrug resistance with decreased drug accumulation, altered subcellular drug distribution and increased P-glycoprotein expression in cultured SW-1573 human lung tumor cells, Cancer Research 1989; 49:2988-2993.
4. Kelley SL, Basu A, Teicher BA et al. Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. Science 1988; vol. 241:1813-1815.
5. Kessel D, Bosmann HB. On the characteristics of actinomycin D resistance in L51784 cells. Cancer Res 1970; 30:2695-2701.
6. Leighton JC and Goldstein LJ. P-glycoprotein in adult solid tumors. Drug resistance in clinical oncol. and hematol 1995; Vol:9, 251-273.
7. Mealey KL, Barhoumi R, Rogers K, Kochevar DT. Doxorubicin induced expression of P-glycoprotein in canine osteosarcoma cell line. Cancer Lett 1998; 126:187-192.
8. Pastan I and Gottesman M. Multiple-drug resistance in human cancer. N. Engl. J. Med 1987; 316:1388-1393.
9. Peltier Leonard F. Adbridged from Jaffe.N. Recent advances in the chemotherapy of metastatic osteogenic sarcoma (Cancer 1972; 30: 1627.). Clin. Orthopaedics and Related Research 1991; 270:5-7.
10. Sutoh I, Kohno H, Nakashima Y et al. Concurrent expressions of metallothionein, glutathione S-transferase-pi, and P-glycoprotein in colorectal cancers. Dis. Colon Rectum 2000; 43: 221-232.
- H. Takeshita H, Gebhard MC, Springfield DS et al. Experimental models for the study of drug resistance in osteosarcoma: P-glycoprotein-positive, murine osteosarcoma cell lines. J Bone Joint Surg Am 1996; 78:366-375.
12. Samuels BL, Murray JL, Cohen MB et al. Increased glutathione peroxidase activity in a human sarcoma cell line with inherent doxorubicin resistance. Cancer Research 1991; 51:512-527.
13. Chan HS, Grogan TM, Haddad G et al. Standardizasyon of a single-cell assay for sensitive detection of multidrug resistance protein expression in normal and malignant cells in archival clinical samples. J Lab Clin Med 1997; 130:297-306.
14. Oda Y, Dockhorn-Dvorniczak B, Jurgens H, Roessner A. Expression of multidrug resistance-associated protein gene in ewing sarcoma and malignant peripheral neuroectodermal tumor of bone. J Cancer Res Clin Oncol 1997; 123:237-239.
15. Scheffer GL, Winjgaard PLJ, Flens MJ et al. The drug resistance-related protein LRP is the major vault protein. Nature (Med.) 1995; 1:578-582.
16. Delamou A, Yamamoto T, Kato S, Kasai S. Histopathological assesment of multidrug resistance in gastric cancer: Expression of P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein, and lung resistance protein. Am J Surg 1999; 29:401-406.
17. Filipits M, Suchomel RW, Dekan G et al. MRP and MDR1 gene expression in primary breast carcinomas. Clinical Cancer Research 1996; 2:1231-1237.
18. Kusuzaki K, Takeshita H, Murata H et al. Relation between cellular doxorubicin binding ability to nuclear DNA and histologic response to preoperative chemotherapy in patients with osteosarcoma. Cancer 1998; 82:2343-2349.
19. Linn SC, Pinedo HM, Van Ark-Otte J et al. Expression of drug resistance proteins in breast cancer, in relation to chemotherapy. Cancer 1997; 71:787-795.
20. Oda Y, Schneider-Stock R, Rys J et al. Revers transcriptase-polimerase chain reaction amplification of MDR1 gene expression in adult soft tissue sarcomas. Diagn Mol Pathol 1996; 5:98-106.
21. Maraldi NM, Zini N, Santi S et al. P-glycoprotein subcellüler localization and cell morphotype in MDR1 gene-transfected human osteosarcoma cells. Biol Celi 1999; 91:17-28.
22. Maraldi NM, Zini N, Sabatelli P et al. Ultrastructural features and P-glycoprotein immunolocalization in Saos-2/DX 580 multidrug-resistant human osteosarcoma cells. J Submicrosc Cytol Pathol 1996; 28:93-100.
23. Chen CJ, Chin JE, Ueda K et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in MDR-1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. Celi 1986; 47:371-380.
24. Chin JE, Soffir R, Noonan KE et al. Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family. Molec, Celi, Biol 1989; 9:3808-3820.
25. Mickley L and Fojo AT. Cancer-Clinical science in practice "Drug resistance in treatment of cancer". Cambridge University Press 1998:101-131.
26. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ et al. Ekspresyon of a multidrug resistance gene in human tumors and tissues. Proc. Natl. Acad Sci USA 1987; 84:265-269.
27. Fojo AT, Akiyama S, Gottesman MM et al. Reduced drug accumulation in multiple drug-resistance human KB carcinoma cell lines. Cancer Res 1985; 45:3002-3007.

28. Levine EA., Holzmayer T, Bacus S et al. Evaluation of newer prognostic markers for adult soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol* 1997; 15:3249-3257.
29. Chan HSL, Thorner PS, Haddad G , Ling V. Immunohistochemical detection of p-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J. Clin Oncol* 1990; 8:689-704.
30. Jimenez RE, Zalupski MM, Frank JJ et al. Multidrug resistance phenotype in high grade soft tissue sarcoma (Correlation of P-glycoprotein immunohistochemistry with pathologic response to chemotherapy). *Cancer* 1999; 86:976-981.
31. Jungsil R, Şahin Ayşegül, Jae YR et al. Immunohistochemical analysis of P-glycoprotein expression oorrrelated with chemotherapy resistance in locally advanced breast cancer. *Hum Pathol* 1990; 21:787-791.
32. Terek RM, Schwartz GK, Devaney K et al. Chemotherapy and P-glycoprotein expression in chondrosarcoma. *J. Orthop Res* 1998; 16:585-590.
33. Eid H, Geczi L, Magori A et al. Drug resistance and sensitivity of germ celi testicular tumors: evaluation of clinical relevans of MDRI/Pgp, p53, and metallothionein (MT) proteins. *Anticancer Res* 1998; 18(4C):3059-3064.
34. Weinstein RS, Jakate SM, Dominguez JM et al. Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. *Cancer Research* 1991; 51:2720-2726.
35. Chan HSL, Thorner PS, Haddad G, Ling V. immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol* 1990; 8:689-704.
36. Serra M, Scotlandi K, Manara MC et al. Evaluation of P-glycoprotein expression in soft tissue sarcomas of the extremities. *Cytotechnology* 1996; 19:253-256.
37. Kuttesch JF, Parham DM, Luo X et al. P-glycoprotein expression at diagnosis may not be a primary mechanism of therapeutic failure in childhood rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 1996; 14:886-900.
38. Lopes JM, Bruland OS, Bjerkehagen B et al. Synovial sarcoma: immunohistochemical expression of P-glycoprotein and glutathione S transferase-pi and clinical drug resistance. *Pathol Res Pract* 1997; 193:21-36.
39. Baldini N, Scotlandi K, Barbanti-Brodano G et al. Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. *N, Engl, J, Med* 1995; 333:1380-1385.
40. Baldini N, Scotlandi K, Serra M et al. P-glycoprotein expression in osteosarcoma: A basis for risk-adapted adjuvant chemotherapy. *J Orthop Res* 1999; 17: 629-632.
41. Chan HSL, Grogan TM, Haddad G et al. P-glycoprotein expression: Critical determinant in the response to osteosarcoma chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1706-1715.
42. Serra M, Scotlandi K, Manara MC et al. Analysis of P-glycoprotein expression in osteosarcoma. *European Journal of Cancer* 1995; 31 A: 1998-2002.
43. Serra M, Maurici D, Scotlandi K et al. Relationship between P-glycoprotein expression and P53 status in high-grade osteosarcoma. *Int J Oncol* 1999; 14:301-307.
44. Chan HS, Grogan TM, DeBoer G et al. importance of P-glycoprotein as determinant of chemotherapy response in osteosarcoma. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 1996; 37 (A):2220-2225.
45. Bodey B, Taylor CR, Siegel SE, Kaiser HE. immunocytochemical observation of multidrug resistance (MDR) p170 glycoprotein expression in human osteosarcoma cells: the clinical significance of MDR protein overexpression. *Anticancer Research* 1996; 15 (6B):2461-2468.
46. Lee PD, Noble-Topham-SE, Bell RS, Andrulis İL. Quantitative analysis of multidrug resistance gene expression in human osteosarcomas. *Br. J. Cancer* 1996; 74:1046-1050.
47. Posl M, Grahl K, Amling M et al. P-glycoprotein expression in osteosarcoma. *Pathologe* 1996; 17:50-55.
48. Posl M, Amling M, Grahl K et al. P-glycoprotein expression in high grade central osteosarcoma and normal bone cells: An immunohistochemical study. *Gen Diagn Pathol* 1997; 142:317-325.
49. Radig K, Haeckel C, Herting J et al. Expression of P-glycoprotein in high grade osteosarcomas with special emphasis on chondroblastic subtype. *General & Diagnostic Pathology* 1997; 142:139-145.
50. Gorlick R, Huvos AG, Heller G et al. Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma. *J Clin Oncol* 1999; 17:2781-2788.
51. Kusuzaki K, Hirata M, Takeshita H et al. Relationship between P-glycoprotein positivity, doxorubicin binding ability and histologic response to chemotherapy in osteosarcomas. *Cancer Lett* 1999; 138:203-208.
52. Dietel M. Polymerase chain reaction in diagnostic pathologie. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1994; 78:136-145.
53. Vergier B, Cany L, Bonnet F et al. Expression of MDR1/ P- glycoprotein in human sarcomas. *Br J Cancer* 1993; 68:1221-1226.
54. Kunikane H, Zalupski MM, Ramachandran C et al. Flow cytometric analysis of P-glycoprotein expression and drug efflux in human soft tissue and bone sarcomas. *Cytometry* 1997; 30:197-203.

55. Scotlandi K, Serra M, Nicoletti G et al. Multidrug resistance and malignancy in human osteosarcoma. *Cancer Research* 1996; 56:2434-2439.
56. Scotlandi K, Manara MC, Serra M et al. The Expression of P-glycoprotein is causally related to a less aggressive phenotype in human osteosarcoma cells. *Oncogene* 1999; 18:739-746.
57. Takeshita H, Kusuzaki K, Ashihara T et al. Actin organization associated with the expression of multidrug resistant phenotype in osteosarcoma cells and the effect of actin depolymerization on drug resistance. *Cancer Lett* 1998; 126:75-81.
58. Takeshita H, Kusuzaki K, Murata H et al. Osteoblastic differentiation and P-glycoprotein multidrug resistance in a murine osteosarcoma model. *Br J Cancer* 2000; 82:1327-1331.
59. Park YB, Kim HS, Oh JH, Lee SH. The co-expression of p53 protein and P-glycoprotein is correlated to a poor prognosis in osteosarcoma. *Int Orthop* 2001; 24:307-310.
60. Homicek FJ, Gebhardt MC, Wolfe MW et al. P-glycoprotein levels predict poor outcome in patients with osteosarcoma. *Clin Orthop* 2000; 373:11-17.

*Bu çalışma Adana,2001, XV.Ulusal Patoloji Kongresinde bildiri olarak sunulmuştur.



Resim 1. A; Diferansiye kıkırdak alanlarında %50 nin altında pozitiflik; çevrede matriks içermeyen tümör dokusunda boyanma yok, (DABX20). B; Kıkırdak matriks içeren alanda tümör hücrelerinde boyanma yok, (DABX20). C; Osteoid matriks içeren alanda bütün tümör hücreleri P-gp (+) (DABX20). D; Pleomorfik alanda tümör hücrelerinde P-gp pozitifliği, DABX20. E; Pleomorfik alanda tümör hücrelerinde boyanma yok, (DABX20).