

Ewing Sarkomunda P-glikoprotein Ekspresyonunun Prognostik Anlamı

Prognostic Importance of P-glicoprotein Expression in Ewing Sarcoma

Sezak M

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Bornova-İZMİR

Özet

Giriş: Ewing sarkomu primer malign kemik tümörlerinin %6–9'unu oluşturur. Modern kemoterapi protokollerinin uygulanmadığı dönemlerde, Ewing sarkomu hastalarının yaşam süreleri hemen hemen aynıydı. Günümüzde, çoklu kemoterapinin kullanıldığı protokoller sayesinde yaşam süresi uzamıştır. Ancak bazı hastalarda kemoterapiye yanıt çok iyi olurken, bazılarında yetersiz kalmaktadır. Bu, tümör hücrelerinin çoklu sitotoksik ilaçlara direnci (MDR) ile ilişkilendirilebilir. Sitoplazmik membranda lokalize olan P-glikoprotein (PGP) ilaçların hücre dışına atım mekanizmalarını regüle eder. Ewing sarkomunda sıklıkla kullanılan tedavi protokolü, Vinkristin, Aktinomisin-D, Siklofosamid ve Adriamisinini içerir. Bunlardan siklofosamid hariç diğer tüm ajanlar PGP'nin substratıdır. Dolayısı ile PGP pozitifliğini gösterebildiğimiz tümör olgularının, bu üç ajana dirençli olması beklenir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda, 1986 ile 1999 yılları Ewing sarkomu tanı almış POG#8850 (VAC+Adr) kemoterapi protokolü ile tedavi edilmiş 36 olgu "Ewing sarkomu PGP prognostik grubuna" alındı. Otuz altı olguya, PGP'nin eksternal epitopunu tanıyan C494 monoklonal antikoruna uygulandı.

Bulgular: PGP, 16 olguda negatif, 5 olguda fokal pozitif, 15 olguda da diffüz pozitif olarak izlendi. PGP negatif grup ile PGP diffüz pozitif grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0,05$). Fokal pozitiflik gösteren grup ile diğer gruplar arasında yaşam süreleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$). PGP pozitif grup ile negatif grubun yaşam süreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$).

Tartışma: Bu sonuç, PGP ile hücre dışına atılabilen ajanların kullanıldığı Ewing sarkom kemoterapi protokollerinde, tümör hücrelerindeki PGP pozitifliğinin, tedavinin etkinliğini sınırlayabileceğini düşündürmektedir. Daha ilk biyopsisinde saptanabilecek PGP düzeylerinin uygun kemoterapötik ajanların seçilmesinde yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Ewing sarkomu, PGP, MDR, Prognoz

Summary

Introduction: Ewing sarcoma is responsible from 6–9% of the primary malignant bone tumors. Before the modern chemotherapy era, survival time of these patients were the same as other tumor cases. Nowadays, by using multiple chemotherapy regimens, survival time is much longer than before. However, some patients respond to chemotherapy very well while some others don't. This may be related to multiple drug resistance (MDR) of the tumor cells. Located on the cytoplasmic membrane, P-glicoprotein (PGP) regulates the excretion mechanisms of the drugs outside the cell. Treatment protocol of Ewing sarcoma usually consists Vincristin, Actinomycin-D, Cyclophosphamide and Adriamycin. Except Cyclophosphamide, all the other drugs are the substrates of PGP. So, in tumors in which we can show the PGP positivity, we can assume that they are resistant to the so-called drugs.

Materials and methods: In our study conducted between the years 1986–1999, 36 cases of Ewing sarcoma treated with POG#8850 (VAC+Adr) chemotherapy protocol were included in "Ewing sarcoma PGP prognostic group". C494 monoclonal antibody which recognizes the external epitope of PGP was administered to all patients.

Results: PGP was found focally positive in 5 and diffusely positive in 15 of the cases. Sixteen cases were negative for PGP. There was significant difference in survival times between diffusely positive PGP cases and the negative ones. There was no significant difference between focally positive PGP group and the others.

Discussion: The results of this study indicate that PGP positivity in tumor cells can limit the efficacy of chemotherapy in Ewing sarcoma cases. We think that demonstration of PGP values in the first biopsy may help us in choosing the most appropriate chemotherapeutic agents.

Key words: Ewing sarcoma, PGP, MDR, Prognosis

Yazışma adresi: Murat Sezak, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Patoloji Anabilim Dalı, Bornova - İZMİR

Makalenin geliş tarihi : 30.05.2007; kabul tarihi : 08.06.2007

Giriş

Kemiğin yüksek malignite gösteren yuvarlak hücreli tümörünün varlığı, ilk Luche tarafından 1866 yılında bildirilmesine karşın, ancak 1921 yılında James Ewing bu tümörü "kemiğin diffüz endotelyoması" olarak isimlendirmiş ve özelliklerini tanımlamıştır(1).

Ewing sarkomu primer malign kemik tümörlerinin %6 – 9.1'ini oluşturur (2-3). Dolayısıyla osteosarkom ve kondrosarkomdan sonra karşılaşılan en sık üçüncü primer malign kemik tümörüdür.

Lokalize radyasyon tedavisinin tek başına veya cerrahi ile birlikte uygulandığı dönemlerde, Ewing sarkomu hastalarının yaşam süreleri hemen hemen aynıydı. Dahlin ve ark. modern kemoterapinin uygulanmadığı dönemde 10 yıllık yaşam süresini % 9 olarak bildirmiştir (4). Günümüzde, çoklu kemoterapinin kullanıldığı protokoller sayesinde bu oran % 50 ve üzerine çıkmaktadır (6-5).

Yaşam süresi uzamasına karşın, bazı hastalarda kemoterapiye yanıt çok iyi olurken, bazılarında yetersiz kalmaktadır. Bu, bazı tümör hücrelerinin sitotoksik ilaçlara olan direnci ile açıklanabilir.

Tümör hücrelerinin çoklu sitotoksik ilaçlara doğal direnci (MDR), tümörlerin başarılı kemoterapisini sınırlayan önemli faktörlerden biridir. Bu konuda yapılan çalışmalarla, MDR ilişkili genler ve proteinler ile etki mekanizmaları hakkında önemli ilerlemeler sağlanmıştır (7-8).

MDR gen ailesi, ATP-bağlayan-kaset (ATP-binding-cassette=ABC) taşıyıcılar süper ailesinin bir alt ailesidir. ABC taşıyıcıları, ATP bağımlı transport görevini üstlenir. Toksik bileşiklerin atılması, besinlerin alınması, iyon ve peptitlerin taşınması ve hücre sinyal iletiminde görev alır (9-10). MDR cDNA'nın klonlanması ile yapılan çalışmalar, insanda 2 küçük gen ailesi tarafından kodlandığını ortaya koymuştur.

MDR1 ilaç transportunda görevli glikoproteinleri kodlayan genlerken, MDR2/3 ilaç transportunda rol almayan glikoproteinleri kodlayan genleri içerir. MDR fenotipini gösteren hücrelerde, bazı proteinlerin salınmasında artış olduğu bulunmuştur. Bunlardan biri; MDR-1 gen ürünü olan P-glikoprotein(PGP)'dir (11-12-13-14-15). PGP'yi kodlayan genler, 7. kromozomun 21q1 bandında yer alır. Memeli PGP'si tek zincirli bir proteindir. Yaklaşık 1280 aminoasitten oluşur (16-17).

MDR-1 gen ürünlerinden (PGP) ince ve kalın barsak kolumnar epiteli, renal tubul fırçamsı kenarı, hepatositin biliyer kanalikülleri, pankreatik duktuller, gebe endometriumunun glandüler epitel hücreleri ve kan – beyin, kan – testis bariyerlerindeki kapiller endotelyal hücreler gibi normal hücrelerinin özellikle apikal yüzlerinde de bulunduğu, MDR fenotipi dışında çeşitli

fizyolojik olaylara katıldığı ve uygun uyaran ile karşılaştığında ekspresyonunu arttığı anlaşılmıştır (18-19-20-21).

PGP MDR fonksiyonunu, membran permeabilite regülasyonu ile değil, hücre içinden dışına doğru ATP bağımlı efluks pompası görevi yaparak sağlamaktadır (11). PGP'nin fosforilasyonu, ilaçların hücre dışına atım mekanizmalarını regüle eder (22). PGP eksprese eden hücreler, bir konsantrasyon gradiyentine karşı ilaç atabilir (23). PGP aracılı ilaç transportu, membran potansiyelindeki elektriksel değişikliklerden etkilenmez ve bir proton gradiyentinden ve/veya membran boyunca proton hareketinden bağımsızdır (24). PGP, daha çok doğal ürünlerden elde edilen lipofilik kemoterapötiklerle etkileşir (25). PGP'nin varlığında etkinliği azalan başlıca kemoterapötik ajanlar, antrasiklinler (daunorubisin, adriamisin), mitoksantron, epipodofilotoksinler (etopozid, tenopozid), vinka alkaloidleri (vinblastin, vinkristin), mitomisin C, taksanlar (paklitaksel, dekataksele), aktinomisin-D, kolşisin ve bleomisin (11). PGP, yapısal ve fonksiyonel olarak ilişkisiz moleküller ile etkileşir ve bu bileşiklerin çoğu PGP taşınımı için substrattır. Bunlardan siklosporin, verapamil ve trifluoperazin MDR blokajı oluşturur ve hücre dışına substrat atılımını engeller.

MDR-1 (PGP) ekspresyonu gösteren tümörlerde en çok denenen yaklaşım, verapamil veya siklosporin A ile PGP ilaç atım fonksiyonunun blokajıdır (26). Dirençli myeloma, lenfoma ve AML'de verapamil veya siklosporin kullanımının kür oranlarını değiştirmede ancak başlangıçtaki yanıtın ve histolojik sonuçların daha iyi olmasını sağladığı gösterilmiştir (27-28-29).

Adriamisine dirençli osteosarkom hücre kültürlerine siklosporin, verapamil ve trifluoperazin uygulanarak kemoterapi direncinin değiştirilmesi denenmiş ve verapamil ile trifluoperazinin, PGP pozitif hücrelerde adriamisine olan direnci ortadan kaldırdığı gözlenmiştir(30).

Dokularda MDR-1 (PGP) ekspresyonu Dot blot, in situ hibridizasyon PCR ve immunhistokimyasal yöntemlerle gösterilebilmektedir. Immunhistokimyasal yöntemin diğerlerine göre en önemli avantajı, PGP ekspresyonu gösteren hücrenin tümöral dokuya mı yoksa normal dokuya mı ait olduğunu ayırt etmeyi mümkün kılmasıdır. Buna karşılık, boyanma şiddetinin değerlendirilmesi subjektiftir. Ayrıca PGP'nin internal veya eksternal epitopunu tanıyan C-219, MRK16, JSB-1, C-494'ten oluşan monoklonal antikolar bulunmaktadır. Bu antikor panelinde PGP'yi saptamada en duyarlı monoklonal antikorun C-494 olduğu bildirilmektedir (31).

Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda, 1986 ile 1999 yılları arasında İzmir Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Anabilim

Dalında Ewing sarkomu tanı almış, klinik takiplerine ulaşılan, POG#8850 (VAC+Adr) kemoterapi protokolü ile tedavi edilmiş, tümör dışı herhangi bir komplikasyon ile ölmemiş ve immunhistokimyasal inceleme için parafin bloklarında yeterli tümör dokusu bulunan 36 olgu "Ewing sarkomu PGP prognostik grubuna" alındı. Olguların hiçbirisi biyopsi öncesi neoadjuvan tedavi almamıştı.

Olgulara ait parafin bloklardan elde edilen 4 mikronluk tümör dokusu kesitleri jelâtin kaplı lamalar üzerine alınarak, parafinden kurtarıldı ve rehidrate edildi. Kesitler distile su ile üç kez ikişer dakika yıkandı. Beş dakika %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda, 2 dakika distile suda bekletildikten sonra lam taşıyıcıya (Coplin-Jar) yerleştirildi. Daha sonra bu şekilde hazırlanan kesitler sodyum sitrat solüsyonu (pH 6) içerisine yerleştirilerek ev tipi mikrodalgada 5 dakika 850 Watt enerjide ve sonrasında 20 dakika 500 Watt enerjide kaynatıldı. 20 dakika süren soğuma işleminden sonra tekrar distile su ile yıkanan ve 3 dakika Tris-buffer (pH=7.6) yıkama solüsyonunda bekletilen kesitlere 10 dakika protein blokama (kod:X0909, DAKO, USA) işlemi uygulandı. Protein blok solüsyonu akıtılarak kenarları kurulan lamlar üzerindeki kesitler, PGP C494 monoklonal antikorunun 1/150 oranında tris-buffer solüsyonu ile seyreltilerek hazırlanan solüsyonu ile kapatılarak 30 dakika enkübe edildi. Daha sonra kesitlere streptavidin biotin yöntemi (DAKO, LSAB-2, K=675) ile immunhistokimyasal boyama yapıldı. Bütün bu uygulama esnasındaki, inkübasyonlar arasındaki yıkamalarda TBS (pH7.6, 0.05 M) kullanılmış, inkübasyonlar oda sıcaklığında, nemli ve kapalı ortamda yapıldı. Boyama işlemi esnasında pozitif kontrol olarak proksimal tübülüs hücrelerini içeren böbrek dokusu ve tümör dokusu içerisinde bulunan damar kesitleri kullanıldı. Negatif kontrol olarak ise over dokusu kullanıldı.

Otuz altı olguya, PGP'nin eksternal epitopunu tanıyan C494 monoklonal antikorunu uygulandı. Boyanma sonuçları, tümörlerin biyolojik davranışı, hastaların klinik özellikleri ve yaşam süreleri bilinmeksizin değerlendirildi. PGP antikorunu ile immunhistokimyasal boyanma, sitoplazmik ve membranöz olduğu zaman pozitif kabul edildi. Pozitif boyanan tümör hücrelerin oranı %50'nin altında ise fokal, %50'nin üzerinde ise düffüz olarak değerlendirildi. Boyanma izlenmeyen biyopsi örneklerinde tümör dokusu içerisinde bulunan damar endotel hücrelerinde pozitif boyanma olup olmadığı kontrol edildi. Eğer endotelde de boyanma izlenmiyorsa boyanın çalışmadığı kabul edilip uygulama tekrarlandı.

Değerlendirmelere alınan kişilerin oluşturduğu grubun verileri üzerinde sağkalım eğrilerinin çizilmesinde "Kaplan Meier", yaşam süresi ve sağkalım ile ilişkisini inceleyen parametreler için ise "Log Rank" istatistiksel analiz yöntemleri kullanıldı.

Bulgular

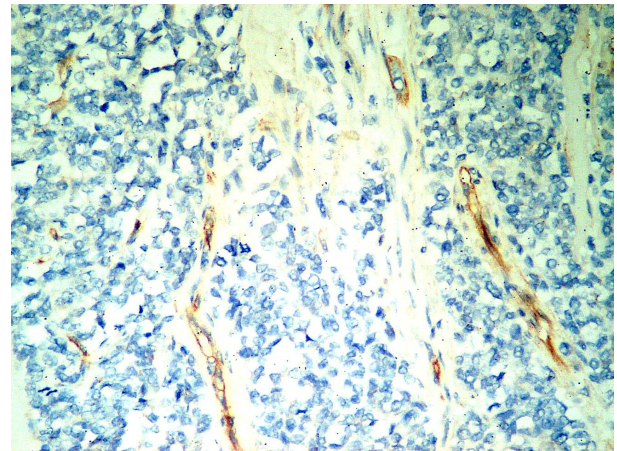
Prognostik gruba alınan 36 olgunun yaşları 8 ile 35 arasında ve yaş ortalaması 17,8 olup, olguların 22'si (%61,1) erkek, 14'ü (%38,9) kadındı. Tümör, olguların 19'unda (%52,8) ekstremitelerde, 13'ünde (%36,1) aksiyal iskelet, 4'ünde (%11,1) ise fibula ve kosta gibi tamamının çıkarılmasının fonksiyonel problem oluşturmayacağı lokalizasyonlardaydı. Tanı öncesi, hastalar ortalama 5,6 ayı bulan ağrı, şişlik şikayetleri tanımlamaktaydı. Tanı konulduğunda hastaların 10'unda (%27,8) metastaz saptanırken, tanı konulduktan sonra ortalama 12 ay içinde 19 (%52,8) olguda metastaz gelişti. Neoadjuvan kemoterapi protokolü uygulanması nedeniyle ortalama 6,2 ay sonra tümöre cerrahi rezeksiyon ve veya radyoterapi uygulandı. Olguların 21'ine lokal tedavi olarak yalnızca radyoterapi, 9'una yalnızca cerrahi rezeksiyon uygulanırken 6'sına hem radyoterapi hem de cerrahi rezeksiyon uygulandı. 36 olgunun takipleri 6 ile 170 ay arasında (ortalama 41,3 ay) değişmekteydi. Bu süre içinde olguların 17'si hayatta iken 19'u tümör nedeniyle eks oldu. (Tablo 1)

Prognostik grubun 5 yıllık takibi sonunda, 8 olgu (%22,2) hayatta kalır iken, 19 olgu (%52,8) öldü (9 kişinin takipleri 5 yıla ulaşmamaktaydı).

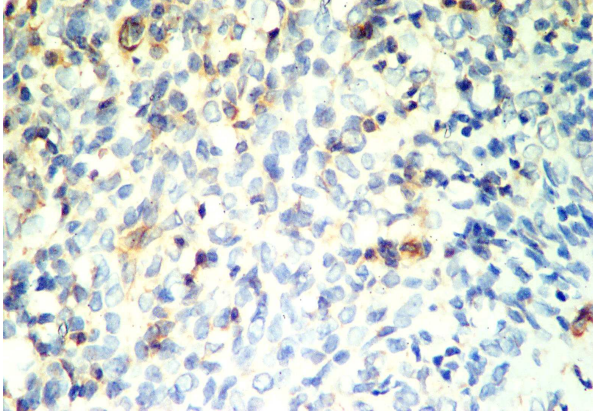
Prognostik gruba alınan 36 olgunun Kaplan Meier yaşam eğrisi ile beklenen yaşam süresi ortalama 80,26 ay (Güven aralığı (GA)=54,3-106,1) olarak hesaplandı.

Neoadjuvan kemoterapi öncesi alınan ilk biyopsilerde, PGP düzeyi immunhistokimyasal olarak değerlendirildi. PGP, 16 olguda negatif, 5 olguda fokal pozitif, 15 olguda da diffüz pozitif olarak izlendi. (Resim 1-2-3).

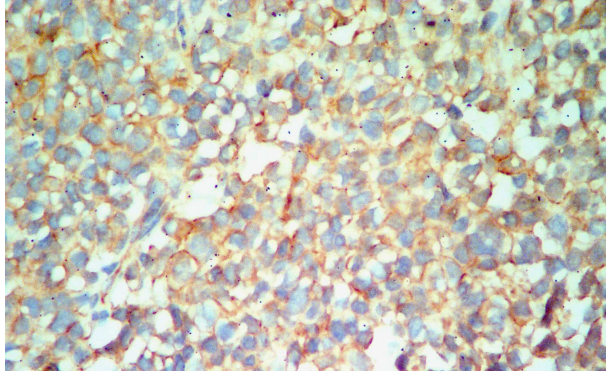
PGP ile hiçbir boyanma izlenmeyen 16 olgu, izlenmeleri süresince 12'si hayatta kalırken 4'ü eks oldu.



Resim 1. PGP negatif bir tümörde PGP pozitif damar endotel hücreleri (Internal kontrol) (x4)



Resim 2. Negatif tümör hücreleri arasında fokal PGP pozitif tümör hücreleri (X20).



Resim 3. Tümör hücrelerinde intrasitoplazmik ve sitoplazmik membranda, diffüz PGP pozitifliği (x 20)

Olguların Kaplan Meier yaşam eğrisi ile beklenen yaşam süresi ortalama 79,9 ay (GA=58,1–101,78) olarak hesaplandı.

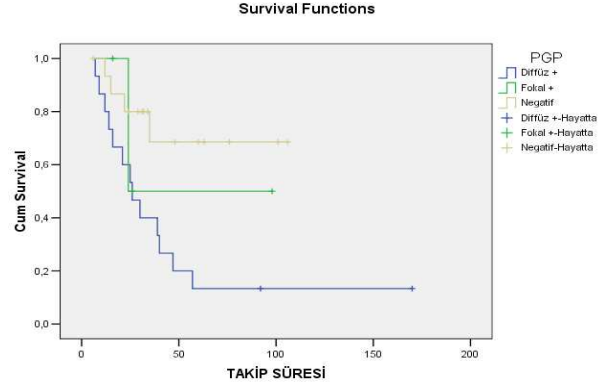
PGP ile fokal pozitiflik izlenen 5 olgunun izlemleri süresince 3'ü hayatta kalırken 2'si eks oldu. Olguların Kaplan Meier yaşam eğrisi ile beklenen yaşam süresi ortalama 61,0 ay (GA=27,7–97,2) olarak hesaplandı.

PGP ile diffüz pozitiflik izlenen 15 olgunun izlemleri süresince 2'si hayata kalırken 13'ü eks oldu. Olguların Kaplan Meier yaşam eğrisi ile beklenen yaşam süresi ortalama 45,5 ay (GA=19,8–71,2) olarak hesaplandı.

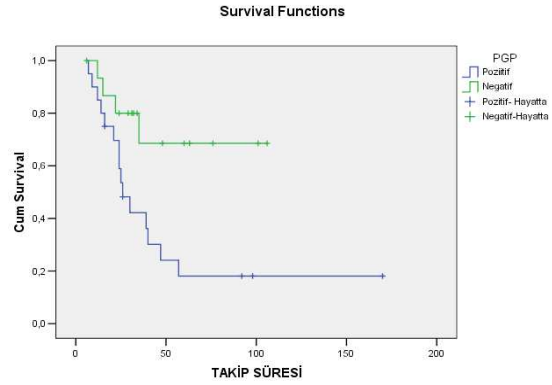
Bu gruplar arasında, PGP negatif grup ile PGP diffüz pozitif grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p < 0,05$). Fokal pozitiflik gösteren grup ile diğer gruplar arasında yaşam süreleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p > 0,05$). (Grafik 1)

Olgular, PGP pozitif ve negatif olarak gruplandırıldığında, PGP negatif 16 olgunun ortalama yaşam süreleri 79,1 ay (GA=58,1–101,7) iken, PGP pozitif olan 21 olgunun ortalama yaşam süresi 52,9 ay (GA=20,5–79,2) olarak hesaplandı.

PGP pozitif grup ile negatif grubun yaşam süreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$). (Grafik 2)



Grafik 1. PGP boyanmasına göre, grupların Kaplan Meier yaşam eğrileri (+ takip süresince hayatta kalanlar)



Grafik 2. PGP pozitif veya negatif olguların Kaplan Meier yaşam eğrileri (+ takip süresince hayatta kalanlar)

Tartışma

Tümör hücrelerinin çoklu sitotoksik ilaçlara doğal direnci (MDR), tümörlerin başarılı kemoterapisini sınırlayan önemli faktörlerden biridir. Çoklu sitotoksik ilaç direncinden sorumlu genetik ve biyokimyasal değişiklikler, çeyrek yüzyıldan daha uzun süredir yoğun araştırmaların odak noktası olmuştur. MDR fenotipini gösteren hücrelerin, daha çok, doğal ürünlerden elde edilen lipofilik kemoterapötiklere direnç gösterdiği söylenebilir²⁵. Bu hücrelerde bazı proteinlerin salınmasında artış olduğu bulunmuştur. Bunlar; MDR-1 gen ürünü olan P-glikoprotein (PGP), MDR-ilişkili protein(MRP), akciğer rezistans proteini (LRP)'dir. LRP'nin glutatyon metabolizması ile ilişkili bir protein olduğu gösterilmiştir. Bütün bu proteinlerin herbiri, tek bir hücresel ilaç direnç profili ile ilişkili olabilmesinin yanında zaman zaman bu mekanizmalar birlikte iş görebilmektedir(11).

Tablo 1.Tüm olguların özelliklerinin dökümü

	K/E	Yaş	Yerleşim	Tanı Met	PGP	AY	Takip Sonu Durum
1	E	16	Aksiyal	Yok	Negatif	6	Hayatta
2	K	15	Aksiyal	Var	Diffüz	7	Eks
3	E	20	Aksiyal	Var	Diffüz	9	Eks
4	E	20	Aksiyal	Yok	Negatif	12	Eks
5	K	18	Aksiyal	Yok	Diffüz	12	Eks
6	K	30	Ekstremit	Yok	Diffüz	14	Eks
7	K	25	Ekstremit	Var	Negatif	15	Eks
8	K	22	Aksiyal	Yok	Fokal	16	Hayatta
9	E	28	Ekstremit	Var	Diffüz	16	Eks
10	E	13	Aksiyal	Yok	Diffüz	21	Eks
11	E	16	Ekstremit	Yok	Negatif	22	Eks
12	E	8	Ekstremit	Var	Negatif	24	Hayatta
13	K	11	Aksiyal	Yok	Fokal	24	Eks
14	E	18	Ekstremit	Yok	Fokal	24	Eks
15	E	18	Ekstremit	Yok	Diffüz	25	Eks
16	E	17	Kosta fibula	Yok	Fokal	26	Hayatta
17	E	17	Aksiyal	Var	Diffüz	26	Eks
18	K	17	Ekstremit	Yok	Negatif	29	Hayatta
19	K	17	Kosta fibula	Yok	Diffüz	30	Eks
20	K	13	Ekstremit	Var	Negatif	31	Hayatta
21	E	24	Ekstremit	Var	Negatif	32	Hayatta
22	K	9	Aksiyal	Yok	Negatif	34	Hayatta
23	K	9	Ekstremit	Yok	Negatif	35	Eks
24	K	19	Ekstremit	Yok	Diffüz	39	Eks
25	E	35	Aksiyal	Yok	Diffüz	40	Eks
26	E	14	Ekstremit	Yok	Diffüz	47	Eks
27	E	12	Ekstremit	Yok	Negatif	48	Hayatta
28	E	20	Kosta fibula	Yok	Diffüz	57	Eks
29	K	13	Ekstremit	Yok	Negatif	60	Hayatta
30	E	16	Ekstremit	Var	Negatif	63	Hayatta
31	E	22	Ekstremit	Yok	Negatif	76	Hayatta
32	E	16	Kosta fibula	Yok	Diffüz	92	Hayatta
33	E	16	Aksiyal	Yok	Fokal	98	Hayatta
34	K	22	Ekstremit	Yok	Negatif	101	Hayatta
35	E	14	Ekstremit	Var	Negatif	106	Hayatta
36	E	22	Aksiyal	Yok	Diffüz	170	Hayatta

PGP, daha çok doğal ürünlerden elde edilen lipofilik kemoterapötiklerle etkileşir²⁵. PGP'nin varlığında etkinliği azalan başlıca kemoterapötik ajanlar, antrasiklinler (daunorubisin, adriamisin), mitoksantron, epipodofilotoksinler (etopozid, tenopozid), vinka alkaloidleri (vinblastin, vinkristin), mitomisin C, taksanlar (paklitaksel, dekataksele), aktinomisin-D, kolşisin ve bleomisin'dir (11). Eğer, bir tümör, PGP tarafından hücreden dışarı çıkarılan kemoterapötik ajanlardan oluşan kemoterapi protokolü ile tedavi ediliyorsa ve bu tümör PGP pozitif ise, tedavi protokolünün yetersiz kalma olasılığı vardır.

Ewing sarkomunda sıklıkla kullanılan tedavi protokolü, Vinkristin, Aktinomisin-D, Siklofosfamid ve Adriamisini içerir. Bunlardan siklofosfamid hariç diğer tüm ajanlar

PGP'nin sübstratıdır. Bizim çalışmamızda yer alan olgular da bu kemoterapötik ajanlardan oluşan bir protokol ile tedavi edilmişlerdir. Dolayısı ile PGP pozitifliğini gösterdiğimiz tümör olgularının, klasik bilgilerimize göre, bu üç ajana dirençli olması beklenir. Ancak siklofosfamide dirençli olup olmadığını kestirmek güçtür. PGP pozitifliği gösterilen Ewing sarkomu olguları, bu üç ajana karşı direnç gösterdiğinden, (teorik olarak) sağkalım sürelerinin, PGP negatif olgulara kıyasla daha kısa olması beklenir. Bu hipotezi irdelemek için, ayrıntılı klinik takiplerine ulaştığımız ve neoadjuvant kemoterapi almadan önceki biyopsi materyallerini de elde ettiğimiz 36 olguda PGP'nin varlığını immunhistokimyasal olarak araştırdık.

PGP'nin gösterilmesinde immünohistokimyasal yöntemi kullanmamızın en önemli nedeni, biyopsi içerisinde bulunan tümöral ve tümör dışı alanlardaki PGP varlığını ayrı ayrı görebilmemiz idi. Ayrıca bu yöntemin, retrospektif bir çalışma için uygun olması da bizim için bir tercih nedeni oldu. İmmünohistokimyasal boyama yönteminin bu avantajlarının yanısıra belki de en zayıf olduğu nokta, boyama şiddetinin değerlendirilmesinin öznel olması ve zaman zaman hücreler arasında zemin boyanması gösterebilmesiydi.

Kaplan- Meier yaşam tablosuna göre, PGP negatif grubun, PGP ile diffüz kuvvetli boyanma gösteren gruba göre daha uzun yaşam süresine sahip olduğunu saptadık. İmmünohistokimyasal boyanma sonuçlarını negatif ve pozitif olmak üzere iki grupta incelediğimizde de PGP negatif grubun PGP pozitif gruba göre daha uzun yaşam süresine sahip olduğunu gördük. Bu sonuç, PGP ile hücre dışına atılabilen ajanların kullanıldığı Ewing sarkom kemoterapi protokollerinde, tümör hücrelerindeki PGP pozitifliğinin, tedavinin etkinliğini sınırlayabileceğini düşündürmektedir.

Ewing sarkomunda PGP ekspresyonunu ve prognoz ilişkisini Chan(32), Roessner(33), Hijazi(13) ve Perri(34) yaptıkları çalışmalarda incelemişlerdir. Bulgularımız, Chan ve Roessner'in bulduğu sonuçlarla uyumludur. Ancak, Hijazi ve Perri, yaptıkları çalışmalarda böyle bir ilişki saptayamamışlardır. Chan ve Roessner'in çalışmalarına alınan olgulara uygulanan kemoterapi protokolleri,

bizim çalışmamızda yer alan olguların kemoterapi protokolleri ile benzerdi. Ancak Hijazi, çalışmasına aldığı olguların kemoterapi protokollerini bildirmemişti. Uygulanan kemoterapi protokolünde PGP ile hücre dışına atılmayan kemoterapötik ajanların varlığı sonuçları etkileyebilir ve bu nedenle, PGP varlığı ile kemoterapi direnci arasında bir ilişki saptanamayabilir. Perri'nin çalışmasında, 1972 ile 1997 yılları arasında tanı almış olgularda PGP ile yaşam süresi ilişkisini incelenmiştir. Ancak bu çalışmada yer alan olgular 25 yıllık bir süreçteki olguları kapsamaktadır. Bu süreçteki kemoterapi protokollerinde mutlaka değişiklikler olmuş ve standart bir kemoterapi protokolü ile tedavi edilememiş olmaları muhtemeldir. Hijazi ve Perri'nin çalışmalarını bizim çalışmamızdan ayıran temel özellik, onların olgularının aldığı kemoterapi protokollerinin açık ve standart olmamasıdır.

PGP ile hücre dışına taşınmayan kemoterapötik ajanlarla tedavi olan hastalarda, "PGP pozitifliği bu tümörde kemoterapötik ajanlara direnci yansıtmamaktadır" gibi bir neden sonuç ilişkisi kurmak pek doğru gözükmemektedir.

Biz bu çalışmamızın sonucunda, Ewing sarkomu tanısı verdiğimiz olguların daha ilk biyopsisinde saptanabilecek PGP düzeylerinin uygun kemoterapötik ajanların seçilmesinde yardımcı olacağı ve ileride PGP ilaç atım fonksiyonunun blokajı ile hedef tedavilerin seçiminin mümkün olabileceği görüşündeyiz.

Kaynaklar

1. Ewing J. Diffuse endothelioma of bone. Proc NY Pathol Soc 1921;21:17-24
2. Robert E. Fechner M.D, Stacey E. Mills, M.D. Armed Forces Institute of Pathology. Tumors of the bones and joints. 1993
3. K. Krishnan Unni. Dahlin's Bone Tumors; General Aspects and data on 11087 Cases. Lippincott-Raven Philadelphia 1996
4. Dahlin DC, Coventy MD, Scanlon PW. Ewing's sarcoma: a critical analysis of 165 cases. J Bone Joint Surg Am 1962;43:185.
5. Picci P, Rougraff BT, Bacci G. Prognostic significance of histopathologic response to chemotherapy in nonmetastatic Ewing sarcoma of extremities. J Clin oncol 1993
6. Bacci G, Picci P, Ruggeri P. No advantages in addition of ifosfamide and VP-16 to the standard four -drug regimen in the maintenance Phase of neoadjuvant chemotherapy of Ewing's sarcoma of bone; results of two sequential studies. J Chemother 1993
7. Helen S.L Chan, Paul S. Thorner, George Haddad and Victor Ling :Immunohistochemical Detection of P-Glycoprotein: Prognostic Correlation in Soft Tissue Sarcoma of Childhood. J.Clin Oncol 1990; 8: 689-704
8. Vergier B, Cany L, Bonnet F, Robert J, et al. Expression of MDRI/P-glycoprotein in human sarcomas. BR J Cancer 1993; 68:1221-1226.
9. Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, et al. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance, and bacterial transport. Nature 1990, 346, 362-365.
10. Mimura CS, Holbrook SR, Ames GF-L. Structural model of the nucleotide-binding conserved component of periplasmic permeases. Proc Natl Acad Sci USA 1991, 88, 84-88.
11. U.A. Germann. P-Glycoprotein a mediator of multidrug resistance in tumour cells. European Journal of Cancer 1996, vol 32A, no.6, 927-944

12. Vergier B et al. Expression of MDR1/P-gp in human sarcomas. *Br J Cancer* 1993
13. Hijazi YM et al. Immunohistochemical detection of P-gp in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors before and after chemotherapy. *Am J Clin Pathol* 1994
14. Chan HS, Grogan TM, DeBoer G, Haddad G, Ling V. Diagnosis and Reversal of Multidrug Resistance in Paediatric Cancer. *European Journal of Cancer* 1996, vol 32A, no.6, 1051-1061
15. Triche TJ. Multiple-drug Resistance in Ewing's sarcoma and PNET. *American Journal of Clinical Pathology*, 1994 July 1-2, editorial
16. Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Ann Rev Biochem* 1989, 58, 137-171
17. Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Ann Rev Biochem* 1993, 62,385-427.
18. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, et al. Cellular localization of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84, 7735-7738
19. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein, P170: evidence for localization in brain capillaries and cross-reactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem* 1989, 37, 159-164
20. Cordon-Cardo C, O'Brian JP, Casals D, et al. Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at the blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86, 695-698
21. Arceci RJ, Croop JM, Horwitz SB, Housman DE. The gene encoding multidrug resistance is induced and expressed at high levels during pregnancy in the secretory epithelium of the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85, 4350-1354
22. Chambers TC. Phosphorylation of proteins involved in multidrug resistance. In Gupta S, Tsuruo T, ed. *Multidrug Resistance in Cancer Cells*. Chichester, U.K., John Wiley & Sons, 1996
23. Lankelma J, Spoelstra EC, Dekker H, Broxterman HJ. Evidence for daunomycin efflux from multidrug-resistant 2780AD human ovarian carcinoma cells against a concentration gradient. *Biochim Biophys Acta* 1990, 1055, 217-222.
24. Ruetz S, Gros P. Functional expression of P-glycoprotein in secretory vesicles. *J Biol Chem* 1994,269, 12277-12284
25. Pastan I., Gottesman M. Multiple-Drug Resistance in Human Cancer. *N. Engl J. Med* 1987; 316, 1388-93
26. Slater L, Sweet P, Wetzell M, Stupecky M, Osann K. Comparison of cyclosporin A, verapamil, PSC-833 and cremophor EL as enhancing agents of VP-16 in murine lymphoid leukemias. *Leukemia Res* 1995, 19, 543-548
27. Miller TP, Grogan TM, Dalton WS, Spier CM, Scheper RJ, Salmon SE. Pgp expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. *J Clin Oncol* 1991,9, 17-24
28. Sonneveld P, Durie BG, Lokhorst HM, et al. Modulation of multidrug-resistant multiple myeloma by cyclosporin. The Leukaemia Group of the EORTC and the HOVON. *The Lancet* 1992,340,255 259
29. Cowie FJ, Pinkerton CR, Phillips M, et al. Continuous-infusion verapamil with etoposide in relapsed or resistant paediatric cancers. *Br J Cancer* 1995, 71, 877- 881
30. Takeshita H, Gebhardt MC, Springfield DS, Kusuzaki K, Mankin HJ. Experimental models for the study of drug resistance in osteosarcoma: P-glycoprotein-positive, murine osteosarcoma cell lines. *J Bone Joint Surg Am* 1996 Mar;78(3):366-75
31. Lacueva FJ, Teruel A, Calpena R, Medrano J, et al. Detection of P-glycoprotein in frozen and paraffin-embedded gastric adenocarcinoma tissues using a panel of monoclonal antibodies. *Histopathology* 1998 Apr;32(4):328-34
32. Chan HSL, Thorne PS, Haddad G, Ling V. Immunohistochemical detection of P-gp: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol* 1990,8,689-704
33. Roessner A.et al. Prognostic implication of immunodetection of P-gp in Ewing's sarcoma. *Cancer Res Clin Oncol* 1993
34. Perri T, Fogel M, Mor S, Horev G, et al. Effect of P-glycoprotein expression on outcome in the Ewing family of tumors. *Pediatr Hematol Oncol* 2001 Jul-Aug;18(5):325-34