
Küçük Hücreli Akciğer Kanserinde p53 Ekspresyonunun Kemoterapiye Yanıt ve Sağkalım Üzerine Etkisi[#]

Mustafa PEHLİVAN*, Uğur YILMAZ*, Meral KOYUNCUOĞLU*, Oya İTİL*, Can SEVİNÇ*, Atilla AKKOÇLU*

* Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Akciğer Kanseri Grubu, İZMİR

ÖZET

p53 gen mutasyonları küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)'nde %35-90 oranında bildirilmiştir. KHAK'de p53 pozitifliğinin tedaviye yanıt ve median sağkalım (MS) süresine etkisi yeterince çalışılmamıştır. Bu çalışmada, 187 KHAK'li olgudan 26'sında p53 ekspresyonunun kemoterapiye (KT) yanıt ve MS süresi üzerine etkisi değerlendirildi. Hastaların median yaşı 57 (29-79), 25'i erkek, 1'i kadını ve 13'ü yaygın, 13'ü de sınırlı hastalık döneminde idi. Ondokuz olguda p53 negatif, 7 olguda p53 pozitif saptandı. Standart doz kombine KT ± radyoterapiyle p53 negatif grupta MS süresi 26.1 ay, p53 pozitif grupta ise MS süresi 14.4 ay bulundu (p= 0.199). En az 3 siklus standart doz kombine KT ± radyoterapi alan hastalarda yanıt değerlendirmesi yapıldığında p53 negatif ve pozitif gruplarda sırasıyla %47 ve %14 tam, %47 ve %43 parsiyel yanıt, %6 ve %43 progresyon saptandı (p= 0.045). p53 pozitif olan grupta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da MS süresi belirgin olarak daha kısa bulundu. p53 ile tedaviye yanıt arasında da anlamlı korelasyon vardı.

Anahtar Kelimeler: Küçük hücreli akciğer kanseri, p53 ekspresyonu, prognostik faktör.

SUMMARY

Effect of p53 Expression on Chemotherapy Response and Survival in Small-Cell Lung Cancer

The gene mutations of p53 are reported to be 35-90% in small-cell lung cancer (SCLC). p53 positivity in SCLC together with response to treatment and its effect on overall survival (OS) have not been studied in detail previously. In this study, we analyzed the expression of p53 by immunohistochemistry in the initial biopsy specimen of 26 patients who had a diagnosis of 187 SCLC cases and the response of p53 to chemotherapy and its effect on OS was evaluated. Median age was found to be 57 (29-79), all patients except one were man, 13 had limited and 13 had disseminated disease. p53 expression was found to be negative in 19 and positive in 7 patients. OS was found to be 26.1 months with standard dose combined chemotherapy in p53 negative group, while OS was found to be 14.4 months in positive groups (p= 0.199). When response evaluation was performed in patients receiving at least three cycle standard dose combined chemotherapy, in p53 negative and positive groups 47% and 14% complete remission and 47% and 43% partial remission and 6% and 43% progression was observed respectively (p= 0.045). OS in p53 positive group is shorter but statistically insignificant. A significant correlation between p53 and response to treatment was found.

Key Words: Small-cell lung cancer, p53 expression, prognostic factors.

[#] Bu makaledeki bulgular "European Respiratory Society Annual Congress Madrid, Spain, October 9-13, 1999" isimli toplantıda poster olarak sunulmuştur.

Tümör baskılayıcı bir gen ürünü olan p53, son zamanlarda moleküler düzenleyici olarak da tanımlanmıştır (1-3). p53, hücre siklusunun kontrolü, apoptozis, gen transkripsiyonu, kromozomal segregasyon ve genomik stabilite gibi kritik hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev almaktadır (4).

p53 mutasyonlarının saptanması, birçok kanser için kötü prognostik faktördür. Yarılanma ömrü daha uzun olan mutant p53, hücre içinde ayırt edilebilir hale gelmektedir ve immünohistokimyasal teknik p53'ün saptanmasında en sık kullanılan tekniktir. Kimi tümörlerle artmış p53 protein düzeyleri veya p53 geni mutasyonları ile prognoz arasında ilişki gösterilmiştir (özefagus, mide, kolon, meme, yumuşak doku tümörleri, tiroid, serviks, safra kesesi, over, prostat, küçük hücreli dışı akciğer kanseri) (5-7). Pankreas, meme, özefagus, mesane ve bronş karsinomlarında prognozla ilişki özellikle erken evre tümörler ve displazilerde belirgindir (5). p53 gen mutasyonları, küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)'nde %35-90 ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)'nde %49-50 oranında bildirilmiştir (7-10). KHAK p53 pozitifliği ile yaş, performans durumu, hastalığın yaygınlığı, tedaviye yanıt ve sağkalım arasındaki ilişki araştırıldığında, sadece bir çalışmada korelasyon bulunmuş, başka çalışmalarda ilişki bulunmamıştır (11-13).

Bu çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Akciğer Kanseri Grubu tarafından Ocak 1990-Ekim 1998 tarihleri arasında 187 KHAK olgusundan parafin bloklarına ulaşılan ve inceleme için yeterli materyal temin edilebilen 26'sında immünohistokimyasal metotla saptanan p53 ekspresyonunun kemoterapiye (KT) yanıt ve sağkalım üzerine etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı ve Medikal Onkoloji Bilim Dalı'na Ocak 1990-Ekim 1998 tarihleri arasında başvuran ve Patoloji Anabilim Dalı tarafından sitolojik ve histolojik değerlendirilmesi yapılarak KHAK tanısı alan 26 olguda KT'ye yanıt ve toplam sağkalım ile immünohistokimyasal metotla saptanan p53 ekspresyonu arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri olarak, hastalar hakkında yeterli klinik verilerin olması ve histopatolojik incelemede p53 analizi yapabilmek için yeterli parafine gömülü tümör dokusunun bulunması şartları aranmıştır. Her hasta için morfolojik korunması iyi olan parafin bloğu seçilmiştir. Tüm olguların histolojik materyalleri tek bir patolog tarafından yeniden gözden geçirilmiştir.

Patolojik inceleme için parafine gömülü bloklardan 3 µm kalınlıkta kesitler elde edildi. Kesitler, dökülmeyi engellemek için 3-aminopropyltriethoksi-silane (APES) kaplı lamlara alınarak oda ısısında kurutuldu. Histolojik inceleme için hematoksilen ve eozin ile boyandıktan sonra immünohistokimyasal boyama için şu işlemler uygulandı; kesitler, ksilen ve alkol serilerinden geçirilerek deparafinize edilip çeşme suyu ile tekrar hidrate edildi. Ardından 98 mL metanol ve 2 mL %30 H₂O₂ ile 10 dakika inkübe edilerek endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Daha sonra, lamlar sitrat tampon (pH 6.0) içine yerleştirilerek 1 dakika 100°C mikrodalga fırında bekletildi. Bu işlem, 5 dakikalık aralarla 4 kez daha tekrarlandı. Solüsyonun kendi halinde soğuması için 20 dakika bekledikten sonra, lamlar 5 dakika süreyle tris-tamponlu salin içinde yıkandı. Lamlar bir araya getirildi ve 3 dakika süreyle 1/20 tavşan serumu içinde inkübe edildi. Fosfat tuzlu tamponda (PBS), 90 dakika primer monoklonal antikorlar (monoklonal mouse antihuman p53 protein; DAKO p53, DO 7, Copenhagen, Denmark) 1/50 dilüsyon tavşan serumu içinde uygulandı. Kesitler, 30 dakika tavşan antimouse IgG'nin (1/200 dilüsyonda) biyotinilenmiş monoklonal konjugatı içinde inkübe edildikten sonra bu işlem bir 30 dakika daha peroksidaz konjugatlı streptavidin-biyotin kompleksi (DAKO) ile yapıldı. Bu işlemden sonra lamlar 10 dakikada 2.3-diaminobenzidin ile inkübe edildi. Kesitler su ile durularak Mayer hematoksileni ile zıt boyama yapıldı. Pozitif kontroller için kolon kanseri kesitleri kullanıldı. İmmünohistokimyasal değerlendirmede neoplastik hücrelerde p53 için sadece nükleer boyanma pozitif kabul edildi. İmmünohistokimyasal reaktivitenin değerlendirme ve derecelendirilmesi şu şekilde yapıldı; (+++): Kuvvetli boyanma (> %50 immünre-

aktif neoplastik hücreler), (++)): Orta derecede boyanma (> %10-50 immünreaktif neoplastik hücreler), (+): Zayıf boyanma (> %1-10 immünreaktif neoplastik hücreler), (-): Negatif boyanma (> %0-1 immünreaktif neoplastik hücreler). İstatistiksel değerlendirmede gruplar arasındaki farklar için SPSS for Windows®'ta χ^2 ve Fisher'in kesin Ki-kare testleri, sağkalım analizleri için Kaplan-Meier eğrileri ve Log-Rank testi uygulandı.

BULGULAR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Akciğer Kanseri Grubu tarafından Ocak 1990-Ekim 1998 tarihleri arasında izlenen ve 3 siklus KT sonunda yanıt değerlendirmesi yapılan 187 olgunun 26'sında immünohistokimyasal metotla saptanan p53 ekspresyonunun KT'ye yanıt ve sağkalım süresi üzerine etkisi araştırıldı.

Bu olguların median yaşı 57 (29-79) ve 25 (%96)'i erkekti. Hastaların 13 (%50)'ü yaygın hastalık, diğer 13 (%50)'ü sınırlı hastalık olarak evrelendirildi. KHAK'li 26 olgunun 19 (%73)'ünde p53 negatif saptanırken, 4'ünde (+), 2'sinde (++) ve 1'inde de (+++) saptandı (toplam 7: %27). p53 pozitif olanların tümünde, p53 negatif olanların %84'ünde sigara içim öyküsü vardı.

Hastalar değerlendirildiğinde standart doz kombine KT ± torasik (RT) ile p53 negatif grupta

median sağkalım süresi 26.1 ay, 2 yıllık sağkalım olasılığı %52, p53 pozitif grupta ise median sağkalım süresi 14.4 ay, 2 yıllık sağkalım olasılığı %0 bulundu ($p < 0.20$). Hastalara KT rejimi olarak CAV/EP alterne, EP (etoposid, sisplatin) ve CAV (siklofosamid, doksorubisin, vinkristin), CAE rejimleri verilmişti ve KT rejimlerinin dağılımı her 2 grupta benzerdi. En az 3 siklus kombine KT uygulanmış olan hastalarda KT'ye yanıt değerlendirildiğinde p53 negatif olgularda tam, kısmi ve toplam yanıt oranları sırasıyla %47, %47 ve %94 oldu. p53 pozitif olgularda ise bu oranlar %14, %43 ve %57 oldu ($p < 0.045$) (Tablo 1) (Şekil 1).

TARTIŞMA

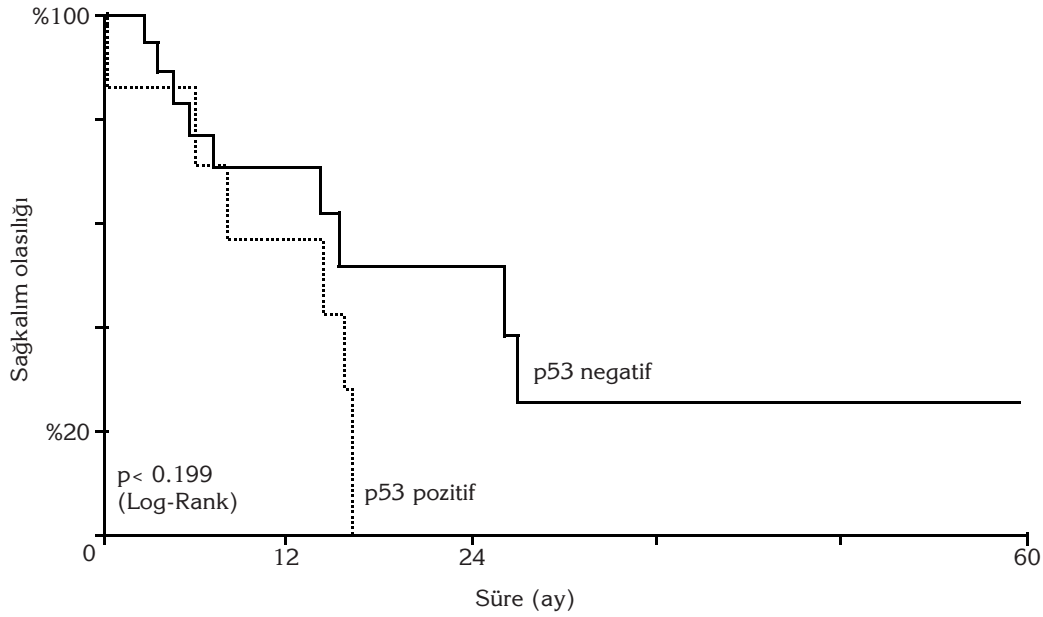
Çalışmamızda, 187 olguluk serimizde p53 mutasyonu varlığının immünohistokimyasal inceleme ile araştırılmasının mümkün olduğu 26 olguda p53 ekspresyonu ile KT'ye yanıt ve sağkalım arasındaki ilişki araştırıldı. p53 pozitif olan grupta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da median sağkalım süresinin belirgin olarak daha kısa olduğu görüldü (14.4'e karşın 26.1 ay, $p = 0.199$). p53 ile KT'ye yanıt oranı arasında da anlamlı korelasyon bulundu ($p = 0.045$).

p53 gen mutasyonları KHAK'de %35-90 ve KHDAK'de %49-50 oranında bildirilmiştir (8-

Tablo 1. KHAK'de p53 ekspresyonunun kemoterapiye yanıt ve median sağkalım süresi üzerine etkisi.

	p53 pozitif (n= 7)	p53 negatif (n= 19)	p
Yaygın-sınırlı hastalık	4-3	9-10	
Cins E/K	7-0	18-1	
Yaş (median)	58 (36-72)	55 (29-79)	
Sigara kullanımı	7 (%100)	16 (%84)	
MSS	14.4	26.1	0.199 (Log-Rank)
Bir yıllık sağkalım	%57	%70	
İki yıllık sağkalım	%0	%52	
KT rejimi			
EP	2	3	
[CAV, CAE]	2	5	
CAV/EP	3	11	
KT'ye yanıt			
Progresyon	3 (%43)	1 (%6)	0.045 (Ki-kare)
Parsiyel yanıt	3 (%43)	9 (%47)	
Tam yanıt	1 (%14)	9 (%47)	

MSS: Median sağkalım süresi, CAV: Siklofosamid, doksorubisin, vinkristin, P: Sisplatin, E: Etoposid, EP: Etoposid, sisplatin, CAV/EP: Siklofosamid, doksorubisin, vinkristin ve etoposid, sisplatin'in alterne verilmesi, n: Hasta sayısı.



Şekil 1. İmmünohistokimyasal metotla saptanan p53 proteininin sağkalım olasılığı üzerine etkisi.

11). Preklinik çalışmalarda, p53 mutasyonları ile farklı KT rejimlerine yanıt arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir. p53 mutant olanlarda, doğal (wild-type) p53 saptananlara göre tamoksifen ve radyoterapiye yanıt daha kötü bulunmuştur. Akut miyelositer lösemi, miyelodisplastik sendrom, kronik lenfositik lösemi, malign lenfoma, over ve meme kansinomlarında mutant p53 varlığının KT'ye kötü yanıtla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda; kolorektal ve meme kanserlerinde de p53 antikor titreleriyle tedaviye yanıt ile relapslar arasında korelasyon olduğu bildirilmektedir (14,15). KHDAK'de p53 mutasyonu olan hastalarda prognozun daha kötü olduğu saptanmıştır (16). p53 gen mutasyonları ile p53 protein ekspresyonu ve p53 antikorları arasında anlamlı bir korelasyon vardır. Serumda %5-24 oranında p53 antikorları saptanabilmektedir. Segawa ve arkadaşları, KHAK'li 36 hastada, serumda ELISA ile ölçülen p53 antikorları ile sigara içimi, yaş ve hastalığın gidişi ile korelasyon saptayamamışlardır ve klinik kullanımda önemi olmadığını ileri sürmüşlerdir (17). Rosenfeld ve arkadaşları, prospektif 170 KHAK hastasını içeren serumda Western Blot yöntemiyle p53 antikor baktıkları çalışmalarında, %16 oranında p53 pozitifliği saptamışlardır. Bu çalışma-

larda, p53 pozitifliği ile yaş, performans statusu, hastalığın yaygınlığı, tedaviye yanıt ve sağkalım arasında ilişki gösterilememiştir (12,13). Zalcman ve arkadaşları, ELISA ile p53 antikor pozitif 16 (9 KHAK) ve p53 negatif 16 (11 KHAK) akciğer kanserli hastayı 32 ay boyunca p53 antikorları yönünden monitörize etmişlerdir. Antikor pozitif 16 hastada p53 antikor titreleri ile KT'ye yanıt arasında anlamlı bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, p53 titrelerinin monitörizasyonu ile çoğu relapslar klinik olarak ortaya çıkmasından önce gösterilebilmektedir (18). Son yıllarda kolorektal ve meme kanserlerinde de p53 antikor titreleriyle tedaviye yanıt ve relapslar arasında korelasyon olduğu bildirilmektedir (14,15).

KHAK'de p53'ün prognoza etkisi halen araştırma konusudur. Araştırmamızda, p53 mutasyonuna sekonder olarak p53'ün pozitif bulunmasının prognozu kötü yönde etkilediği lehinde bulgular elde edilse de bu bulgular olgu sayısının kısıtlı ve retrospektif olması nedeni ile kesinlik arz etmemektedir. Buna karşın elde ettiğimiz sonuçlar, p53'ün KHAK'nin prognozuna etkisinin diğer değişkenlerle birlikte prospektif olarak araştırılması gerektiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Jenkins JR, Rudge K, Currie GA. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 1984; 312: 651-4.
2. Parada LF, Land H, Weinberg RA, et al. Cooperation between gene encoding p53 tumor antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 1984; 312: 649-51.
3. Rovinski B, Benchimol S. Immortalization of rat embryo fibroblasts by the cellular p53 oncogene. *Oncogene* 1988; 2: 445-52.
4. Lane D. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.
5. Chang F, Syrjanen S, Syrjanen K. Implication of the p53 tumor suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1009-22.
6. Elledge R, Allred D. p53 status: Impact on breast tumor biology and response to therapy. In: Klijn J (ed). *Prognostic and Predictive Value of p53*. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1997: 63-76.
7. Dearing MP, Steinberg SM, Phelps R, et al. Outcome of patients with small-cell lung cancer: Effect of changes in staging procedures and imaging technology on prognostic factors over 14 years. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1042-9.
8. Stefanaki K, Rontogiannis D, Vamvouka C, et al. Immunohistochemical detection of bcl2, p53, mdm2 and p21/waf1 proteins in small-cell lung carcinomas. *Anti-cancer Res* 1998; 18: 1167-73.
9. Wiethage T, Voss B, Müller KM. p53 accumulation and proliferating-cell nuclear antigen expression in human lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995; 121: 371-7.
10. D'Amico D, Carbone D, Mitsudomi T, et al. High frequency of somatically acquired p54 mutations in small cell lung cancer cell line and tumors. *Oncogene* 1992; 7: 339-46.
11. Richardson GE, Johnson BE. The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 1993; 20: 105-7.
12. Winter SF, Minna JD, Johnson BE, et al. Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation. *Cancer Res* 1992; 52: 4168-74.
13. Rosenfeld MR, Malats N, Schramm L, et al. Serum anti-p53 antibodies and prognosis of patients with small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 381-5.
14. Ko LJ, Prives C. p53: Puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996; 15: 1179-89.
15. Hammel P, Boissier B, Chaumette MT, et al. Detection and monitoring of serum p53 antibodies in patients with colorectal cancer. *Gut* 1997; 40: 356-61.
16. Carbone DP, Mitsudomi T, Rusch V, et al. p53 protein overexpression, but not gene mutation is predictive of significantly shortened survival in resected nonsmall cell lung cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1993; 12: 334.
17. Segawa Y, Takigawa N, Mandai K, et al. Measurement of serum p53 protein in patients with small cell lung cancer and results of its clinicopathological evaluation. *Lung Cancer* 1997; 16: 229-38.
18. Zalzman G, Schlichtholz B, Tredaniel J, et al. Monitoring of p53 autoantibodies in lung cancer during therapy: Relationship to response to treatment. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1359-66.

Yazışma Adresi:

Dr. Mustafa PEHLİVAN

Kasırga Sokak No: 20/22

Balçova, İZMİR