

NAZOFARİNKS KANSERİNDE "MULTİDRUG REZİSTANCE" GENİ VE EPSTAIN-BARR VİRÜS'Ü VARLIĞININ KLİNİKOPATOLOJİK KRİTERLER İLE İLİŞKİSİ VE PROGNOSTİK ÖNEMİ

THE PROGNOSTIC IMPORTANCE AND RELATIONS OF MULTIDRUG RESISTANCE GENE EXPRESSION, EPSTAIN-BARR VIRUS PRESENCE AND CLINICOPATHOLOGICAL PARAMETERS IN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA

Dr. Bilge KANBUR (*), Dr. M. Umut AKYOL (*), Dr. Arzu SUNGUR (**),
Dr. Bülent GÜRSEL (*)

ÖZET: Nazofarinks kanserlerinde Epstein-Barr virüsü (EBV) varlığını ve multi drug resistance (MDR-1) geninin prognostik önemi ve EBV ile bazı klinikopatolojik kriterler ile ilişkilerini göstermek amacıyla 31 hastalık bir seride immünohistokimyasal metot ile çalışma düzenlenmiştir. Hastaların %22.6'sında EBV'ü gösterilmiş ancak bunun prognoza etkisi bulunamamıştır. MDR-1 geninin kemoterapi öncesi ve sonrası bakıldığı bir grup hastada tedavi öncesi MDR-1'in hastaların %36.4'ünde pozitif olduğu bu oranın tedavi sonrasında %90.9'a çıktığı saptanmıştır. EBV'ünün ilaç rezistansı gelişimini indükleyerek prognozu olumsuz yönde etkilediği düşünülmüştür. Nazofarinks kanserli hastalarda prognostik faktörler belirlenmiş ve MDR varlığına bakılarak tedavi planının belirlenmesinin yararlı olacağı ortaya konulmuştur.

Anahtar Sözcükler: Multi drug resistance, Epstein-Barr virüsü, Nazofarinks karsinomu, tedavi, prognoz

SUMMARY: A study in a series of 31 patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC), to show the prognostic significance and relations of multidrug resistance (MDR-1) gene, Epstein-Barr virus (EBV) and some clinico-pathological parameters, with immunohistochemical methods, was performed. Prognostic factors in NPC were detected. EBV presence in 22.6 % of the cases were shown, but there was no significant effect of this presence on prognosis. MDR-1 was present in 36.4 % of the patients before the chemotherapy and in 90.9 % after it. EBV was thought to affect prognosis negatively by inducing drug resistance. it was concluded that MDR positivity helps to arrange the therapeutic strategy.

Key Words: Multidrug resistance, Nasopharyngeal carcinoma, EBV, Therapy, Prognosis

GİRİŞ

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar bazı hastalarda kür sağlarken, bazı hastalar bu ilaçlara baştan rezistans göstererek tedaviden hiç yarar görmez, bazılarında ise tedavi esnasında bu ajanlara direnç gelişir. Bu nedenle son yıllarda anti kanser ilaç rezistansının genetik ve moleküler kaynaklan araştırılmaya başlanmıştır ve ilaçlara direnç gelişen kanserlerde yeni tedavi yöntemleri oluşturulmaya çalışılmaktadır (6, 14). Kemoterapötiklere karşı gelişen bu direncin tümör hücreleride multidrug resistans 1 (MDR - 1) geninin aktivasyonu ile geliştiği saptanmıştır (5). Bu gen hücre membranında 170 kilo Dalton moleküler ağırlıkta bir P-glikoproteini kodlar. Bu protein ATP bağımlı olarak çalışan ve hücredeki toksik maddeleri ve bu arada anti-kanser ilaçları aktif olarak hücre dışına atan bir membran transport pompasıdır, hücre içi ilaç konsantrasyonunu düşürüp ilaç rezistansının gelişmesine neden olur (7, 14, 15).

Bu çalışmada tedavisi büyük ölçüde radyo ve kemoterapiye bağımlı olan nazofarinks kanserli bir dizi hasta üzerinde klinik veriler, MDR-1 geni ekspresyonu, nazofarinks kanseri etiolojisinde yeri olan Epstein-Barr virüsü (EBV) varlığı ve bunların prognoz ile ilişkileri ve etkileşimleri incelenmiştir. Literatür taramalarında P-Glikoprotein ekspresyonunun nazofarinks kanserlerinde ölçümü ve bu proteinin, EBV'ü ile ilgisini araştırmaya yönelik, daha önce yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

YÖNTEM VE GEREÇLER

Çalışmamız HÜTF Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda 1979-1996 yılları arasında nazofarinks kanseri tanısı alan ve tedavisi yapılan 31 hasta dahil edilmiştir. Hasta kayıtlarından TNM sınıflandırmaları, tedavi protokolü, rekürrens ve uzak metastaz varlığı, tarihi ve tedavileri, hastaların kontrol verileri saptanmıştır. Daha önce başka merkezde müdahale görmüş, ikinci primer hastalığı çıkan hastalar çalışmaya dahil edilmemiş, homojen bir grup oluşturabilmek için hastaların tümüne primer tedavi olarak radyoterapi veya radyoterapi + kemoterapi verilmiş

(*) Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı

(**) Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı ANKARA

olmasına ve kemoterapi alan hastaların bu tedavilerini radyoterapi sonrası almış olmalarına dikkat edilmiştir. Eksitus olanlar dışında tüm hastaların en az 3 yıllık kontrol kayıtları vardır.

Hastaların en küçüğü 10, en büyüğü 64 yaşında olup yaş ortalamaları 35.2 +/-16.8 yıl olarak saptanmıştır. Grupta 8 kadın, 23 erkek hasta vardır ve erkek/kadın hasta oranı 2.87/1'dir.

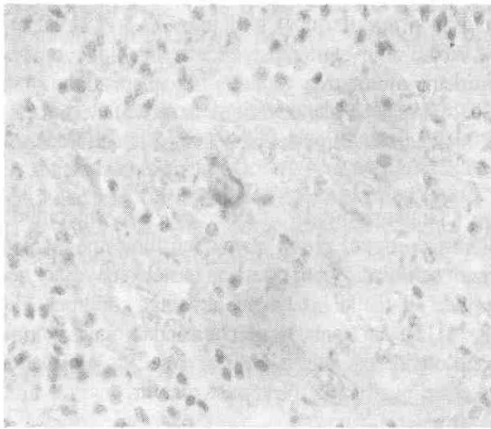
Hastaların histopatolojik tanıları WHO sınıflamasına, TNM evreleri American Joint Committee sisteminde göre gruplandırılmıştır.

26 hastaya primer tedavi yöntemi olarak RT ile birlikte veya rekürrens sonrası kemoterapi verilmiştir. Hastalara 4 ila 6 kür cisplatin, bleomisin, metoteksat, 5-FU, adriamisin, aktimonisin D, doksorubisin, vinkristin, prokarbazin, prednizolon gibi ilaçlar üçlü veya dördü kombinasyonlar şeklinde verilmiştir.

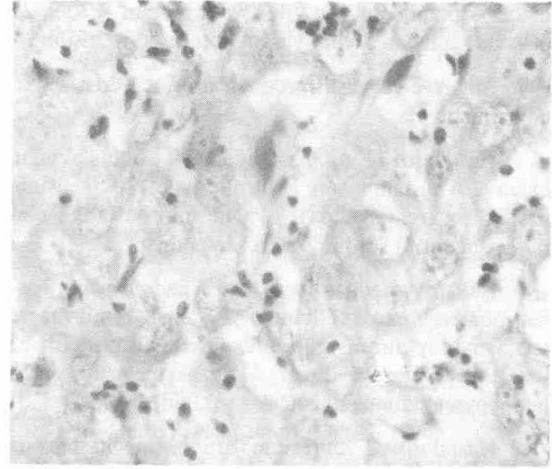
Prognozu gösteren faktörler olarak yaşam süresi, hastalısız yaşam süresi ve rekürrens (boyunda ve uzak) seçilmiştir.

Hastaların tümünde P-Glikoprotein ekspresyonu, immünohistokimyasal yöntemlerle MDR bakılması, EBV varlığı ise aynı yöntemler ile Latent Membran Proteini (LMP) bakılması şeklinde gösterilmiştir. Kemoterapi sonrası nazofarinks biyopsisi olan 11 hastada kemoterapi sonrası MDR değerleri ayrıca bakılmıştır.

İmmünohistokimyasal incelemede mevcut parafin bloklardan hazırlanan 6 mikrometrelilik kesitler kullanılmıştır. Bu kesitler uygun usullerle EBV için 1/100 dilüsyonda mouse anti latent membran protein (DAKO), MDR için 1/50 dilüsyonda mouse anti-P-Glycoprotein (Novocastra) ile boyanmışlar ve ışık mikroskopi ile antijen varlığı araştırılmıştır. (Resim 1-2).



Resim 1: LMP ile sitoplazmik membranda pozitif boyanma (İmmünperoksidaz x 460)



Resim 2: MDR ile boyanma (İmmünperoksidaz x 460)

İstatistiksel Analizlerde SPSS for Windows paket bilgisayar programından faydalanılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde Kaplan Meier survival analizi, Cox regrsyon modeli ile multivaryant analiz, Mann-Whitney U testi, t testi, Fisher kesin ki-kare testi, iki yüzde arasındaki farkın anlamlılık testleri kullanılmıştır.

BULGULAR

Hastaların 29'unda (%93.5) indifferansiye, 2'sinde (%6.5) az diferansiye epidermoid karsinom saptanmıştır. Hastaların TNM sınıflandırmaları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Hastaların T ve N evrelerine göre dağılımları.

Evre	T1	T2	T3	T4	Toplam
N0	4	1	4	2	11
N1	1	1	1	3	6
N2	2	4	—	—	6
N3	1	1	3	3	8
Toplam	8	7	8	8	31

Hastaların %64.6'sında klinik olarak boyunda lenfadenopati saptanmıştır. Hastaların ortalama yaşam süresi 131.04 +/-17.32 ay, ortalama hastalısız yaşam süreleri 44.65 +/-51.19 ay (median: 33 ay)

olarak saptanmıştır. Üç yıllık yaşam oranı %70.9, 27 hastada saptanan 5 yıllık yaşam oranı ise %62.9'dur.

Cinsiyet ve yaşın prognoz üzerine etkisi saptanamamıştır.

Hastaların 11'inin hastalığa bağlı eksitus olduğu, kalan 20 hastanın son kontrollerinde, 10 tanesinin hastaliksız (remisyonda), 10 tanesinin hastalıklı olarak yaşamlarını sürdürdükleri saptanmıştır.

Çalışmaya alınan hastaların 4'ünde hastalık baştan itibaren kontrol edilememiş, 17'sinde remisyona ve sonrasında rekürrens görülmüştür. Rekürrenslerin 8'i lokal 4'ü boyun metastazı, 4'ü uzak metastaz ve 1'i hem boyun hem uzak metastaz şeklindedir.

Hastaların T evresinin artmasının hastaliksız yaşam süresini istatistiki olarak anlamlı olmaya küçülttüğü (p = 0.02), N evrelerinin ise yaşam süreleri üzerine anlamlı etkisi olmadığı saptanmıştır.

Hastaların 8'inde tanıda bir veya daha fazla kranial sinirin tutulduğu ve bunun prognozu kötü yönde etkilediği (p = 0.01) saptanmıştır.

Hastaların %22.6'sında EBV'ü varlığı (LMP-1) gösterilmiştir. (Resim 1) EBV varlığının prognoza etkisi gösterilememiştir. Ancak EBV'ü 30 yaşın altındaki hastalarda 940 oranında pozitif iken 30 yaşın üzerinde bu oran %6.3'lür (p = 0.02).

Tüm hastaların oluşturduğu grupta kemoterapi öncesi MDR pozitifliği %45.2 olarak tespit edilmiştir. (Resim 2) Tedavi sonrası da MDR bakılabilen 11 hastada bu oranın tedavi öncesinde %36.4'ten tedavi sonrasında %90.9'a çıktığı gözlenmiştir ki bu oran p = 0.02 değerinde anlamlıdır.

Tedavi öncesinde MDR pozitif ve negatif olan hastaların ortalama yaşam süreleri 109.43 + / -14.69 ile 124.07 + / -2.71 ay ve hastaliksız yaşam süreleri 76.64 + / - 18.96 ile 77.85 + / - 20.86 ay olarak saptanmıştır. Aralarındaki fark anlamlı bulunmamıştır.

İstatistiki olarak MDR ve EBV pozitifliği arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır. MDR ve EBV pozitifliği ile lokal rekürrens, boyun ve uzak metastazlar varlığı arasında anlamlı ilişki gösterilememiştir.

Multifaktöriyel analiz ile tümörün T evresi (p = 0.001) ve kranial sinir tutulumunun (p = 0.003) prognostik parametreler olduğu saptanmıştır.

TARTIŞMA

Kemoterapi öncesinde hastanın tedaviye cevabının bilinmesi, tedavi protokolünün belirlenmesine etkili olarak, hastalığın prognozunu etkileyen bir fak-

tördür. Primer tedavisi radyoterapi olan nazofarinks kanserlerinde ileri evre hastaların büyük çoğunluğunun uzak metastazlar nedeniyle kaybedilmesi bu hastalıkta kemoterapinin önemini ortaya koymaktadır (8, 10). Literatürde birçok kanserde ilaç direnciyle ilgili çalışma var olmasına rağmen nazofarinks kanserinde böyle bir çalışmaya rastlanılmaması bizi bu çalışmaya yapmaya itmiştir. T hücreli lenfomalarda yapılan çalışmalarda kemoterapötik ajanların hücre içerisinde inaktif olarak bulunan EBV'ünü uyarak MDR-1 geninin aktivasyonuna yol açtığı öne sürülmesine rağmen, nazofarinks kanserinde MDR-1 geni ile EBV ilişkisi de daha önce araştırılmamıştır (15).

Çalışmamızın yukarıda özetlenen bulgularından ilginç sonuçlar ortaya çıkmaktadır.

Nazofarinks kanserinin genetik, çevresel-coğrafi ve EBV'ü varlığına bağlı olarak, bu faktörlerin ortak etkileşimi sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir (2, 3, 6, 11, 12). Değişik ülkelerden yapılan çalışmalarda nazofarinks kanserinde EBV varlığı yüksek oranlarda gösterilmişken ülkemizde bu oranı immünohistokimyasal yöntem ile %22.6 bulduk. Kullandığımız yöntemin düşük sensitivitesi ve genel limitasyonları göz önüne alındığında, polimeraz zincir reaksiyonu ve insitu hibridizasyon gibi daha gelişmiş ve hassas yöntemler ile bu oranın daha yüksek saptanması beklenilmelidir.

EBV enfeksiyonu tespit edilen hastalarımızın yaşlarının tespit edilmeyenlerden anlamlı olarak düşük saptanması ilginçtir ve genç yaşlarda görülen nazofarinks kanserlerinde EBV'ünün etiyolojideki yerinin daha belirgin olduğunu düşündürmektedir. EBV varlığı gösterilen hastaların ortalama hastaliksız yaşam sürelerinin, EBV varlığı gösterilmeyenlerden daha kısa olduğu görülmekte beraber, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Dickson ve arkadaşları (4) bir çalışmalarında nazofarinks kanserlerinin Çinlilerde %71.8 ve beyazlarda %64.2'sinin indifferansiye kanserler olduğunu belirtirken yurdumuzda yapılmış iki çalışmada bu oran %91.4 ile %84.2 olarak verilmiştir (1, 13). Serimizdeki nazofarinks kanserlerinin %93.55'i indifferansiye-dir.

Klinikopatolojik kriterlerden yaş, literatürde olumsuz prognoz kriteri olarak belirtilmesine rağmen bizim serimizde yaşın ortalama hastaliksız yaşam süresinde istatistiki bir önemi olmadığı görülmektedir (8, 9, 11). Bu sonuç seriler arasındaki sayı farkına bağlı olabileceği gibi coğrafi-çevresel vb. gibi başka etkenlerin varlığı da söz konusu olabilir.

Gene literatürde, cinsiyetin prognozu etkilemediğini savunanlar olduğu gibi kadınlarda prognozun daha iyi olduğunu belirtenler olmasına rağmen çalış-

mamızda cinsiyetin prognozu anlamlı olarak etkilemediği görülmektedir (3, 12),

Çalışmamızda hastalarımızın 3 yıllık yaşam oranı %70.9 ve 5 yıllık oranı %62.9'dur. Literatürde %8 ile %93 arasında değişen 5 yıllık yaşam oranları ile çalışmamızda elde ettiğimiz yaşam oranımızı karşılaştırdığımızda, hastalarımızın yaşam sürelerinin, ortalamanın üzerinde olduğu görülmüştür. Bunun nedeni hastalarımızın 9^93.5'inin yaşam süresi en yüksek olduğu bilinen histopatolojik tip olan indiferansiye tipte olması ve hiçbirisinde yaşam süresini olumsuz etkilediği bilinen boyundan biyopsi girişiminin yapılmamış olması olarak açıklanabilir.

Literatürde boyunda lenfadenopatinin varlığı ve yerleşiminin olumsuz prognoz belirlediği yönünde yazılar olmakla birlikte bizim çalışmamızda LAP varlığının olumsuz prognoz göstergesi olduğu gösterilememiştir (8, 9).

Çalışmamızda klinik kriterlerden kraniyel sinir tutulumunun ve tümörün T evresinin hastalıklı yaşam süresini etkilediği saptanmıştır ki bu sonuç literatürün geneliyle de uyum içerisindedir.

MDR pozitifliğinin ve EBV enfeksiyonu varlığının rekürrens üzerine etkisi bulunmamıştır.

MDR pozitif hastaların % 35.7'sinde EBV varlığı gösterilirken, EBV varlığı gösterilen hastalarda MDR'nin %71.4 oranında pozitif bulunması EBV varlığının ilaç rezistansı gelişmesinde rol oynadığını düşündürmektedir.

Hastalarımızda tedavi öncesinde MDR-1 geni %45.2 oranında pozitif saptanmıştır. MDR + hastaların yaşam süreleri MDR - hastalara göre daha kısa olmasına rağmen aradaki fark istatistiki olarak anlamlı değildir. Ancak, MDR pozitiflik oranı kemoterapi sonrasında da biyopsisi olan hastalar için tedavi öncesi %36.4'den tedavi sonrasında %90.9'a çıkmıştır. Tedaviye bağlı gelişen bu rezistans tümör hücrelerinde kemoterapinin etkinliğini azaltarak prognozu olumsuz yönde etkilemektedir.

Sonuç olarak; nazofarinks kanseri tedavisi planlamasında, pratik bir yöntem olan immünohistokimya ile tümör hücrelerinde MDR-1 geni varlığı bakılmasının ilaç rezistansının dolayısı ile hastanın kemoterapiye vereceği cevabın belirlenerek, yol gösterici olabileceği ortaya konulmuştur.

Yazışma Adresi: Dr. M. Umut AKYOL
HÜTF KBB Anabilim Dalı
Samanpazarı - ANKARA

KAYNAKLAR

1. AYAS, K., Nazofarinks kanserinin teşhisinde kör biyopsinin değeri. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 1973.
2. BERKMEN, Ş., CUHRUK, Ç., ÇAĞLAR, Y., Nazofarinks Kanseri. Kanser 1,5: 503-521, 1971.
3. CHEW C.T., Nasopharynx. in Scott-Brown's Otolaryngology: Rhinology, Vol, 4, 5th ed., Butterworth and Co. Ltd. 1987,312-340.
4. DICKSON, I.R. Nasopharyngeal Carcinoma: An Evaluation of 209 Patients. The Laryngoscope, 16: 333-354, 1981.
5. FLENS, J.M., ZAMAN, G.J.R., IZQUIERDA, M.A., Tissue Distribution of the Multi-Drug Resistance Protein. Am. J. Pathol., 148: 1237-147, 1996.
6. FREEMAN, J.L., MCIVAR, N.P., FEINMESSER, R., Epstein-Barr Virus and Nasopharyngeal Carcinoma: Bringing Molecular Genetics Strategies to Head and Neck Oncology. J. Otolaryngol., 23: 130-134, 1994.
7. HAMADA, H., TSURUA, T, Purification of the 170- to 180- kilo Dalton Membrane Glycoprotein associated with Multidrug Resistance. J. Biol. Chemistry, 263: 1454- 1458,
8. HUANG, S., LUI, T.L., LYNN, T., Nasopharyngeal Cancer: Study III. A Review of 1206 Patients Treated with Combined modalities. Int. J. Radiation Oncology biol. Phys. U: 1789- 1793, 1985.
9. KAASA, S., KRAGH-JENSEN, E., BJORDAL, K., Prognostic Factors in Patients with Nasopharyngeal Carcinoma. Acta Oncologica, 32: 531 - 536, 1993.
10. KIM, T.H. MCLAREN, J., ALVARADO, C., Adjuvant Chemotherapy for Advanced Nasopharyngeal Carcinoma in Childhood. Cancer, 63: 1922 - 1926, 1989.
11. NEEL, H.B. III., A Prospective Evaluation of Patients with Nasopharyngeal Carcinoma: An Overview. J. Otolaryngol., 15: 137- 144, 1986.
12. NEEL, H.B. III., Symposium on Squamous Cell Cancer of the Head and Neck, Nasopharyngeal Carcinoma, Clinical Presentation, Diagnosis, Treatment, and Prognosis. Otolaryngologic Clinics of North America, 18:479-490,1985.
13. ÖZYAR, E., ATAHAN L., AKYOL F., GÜRKAYNAK M., ZORLU A.F., Prognostic factors in nasopharyngeal carcinoma: results of a multivariate analysis. Turkish Journal of Cancer, 25: 42 - 50; 1995.
14. PASTAN, L, GATTESMAN, M., Seminars in Medicine of the Bath Israel Hospital. Boston. Multiple-Drug Resistance in Human Cancer. The New England J. Med., 316: 1388- 1393, 1987.
15. SU, I.J., TSAD, T., LA Y, J. Retinoic Acid-Induced Apoptosis and Regression of a Refractory Epstein-Barr Virus-Containing T Cell Lymphoma Expressing Multidrug-Resistance Phenotypes. Human J. Pathol., 177:826-828, 1993.