



Osteosarkomlu hastalarda dirençle ilişkili proteinlerin prognoz ve sağkalım üzerine etkisi: İmmünohistokimyasal analiz

The effect of resistance-related proteins on the prognosis and survival of patients with osteosarcoma: an immunohistochemical analysis

Harzem ÖZGER, Levent ERALP, Ata Can ATALAR, Berkin TOKER, Lora ESBERK ATEŞ,¹
Mustafa SUNGUR, Bilge BİLGİÇ,² İnci AYAN³

*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, ²Patoloji Anabilim Dalı,
³Onkoloji Enstitüsü Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı; ¹Hisar Intercontinental Hastanesi Patoloji Bölümü*

Amaç: Kemoterapi rejimlerindeki gelişmelere rağmen osteosarkom sağkalımında çok az ilerleme olmuştur. Bu çalışmada, osteosarkomlu hastalarda prognoz ile ilişkili bazı proteinlerin sağkalım ile ilişkisi değerlendirildi.

Çalışma planı: Tedavisi ve izlemi hastanemizde yapılan 45 hastanın (24 erkek, 21 kadın) verileri geriye dönük olarak incelendi. Osteosarkom nedeniyle, neoadjuvan kemoterapi sonrasında, 41 hastaya ekstremitte koruyucu cerrahi, dört hastaya amputasyon yapılmıştı. En sık tutulum 23 hasta (%51.1) ile femur alt uç, 10 hasta (%22.2) ile tibia üst uca görüldü. Üç hastada başvuru anında metastaz vardı. Cerrahi rezeksiyon örnekleri patoloji arşivinden çıkartılarak, p-glikoprotein p170, p53, ısı şok proteini 27 (HSP27), HSP90 ve nm23 proteinlerinin ekspresyonu immünohistokimyasal yöntemlerle incelendi. Bu proteinlerin prognoz ve sağkalım üzerindeki etkileri Kaplan-Meier yöntemi ile değerlendirildi. Hastaların ortalama takip süresi 49.7 ay (dağılım 6-185 ay) idi.

Sonuçlar: Başvuru anında metastaz saptanan üç hasta beş yıl içinde akciğer metastazından yaşamını yitirdi. Yirmi dokuz hastada metastaz gelişti. Beş ve 10 yıllık genel sağkalım oranları sırasıyla %60 ve %43 bulundu. Hastalısız sağkalım oranı ise beş yıl için %41, 10 yıl için %24 idi. Metastaz gelişen hastalarda beş yıllık sağkalım oranı %29 idi. Klinik faktörler içinde, sağkalımı anlamlı etkileyen sadece başvuru anında metastaz varlığı idi (p=0.044). p53 proteininin pozitif ve negatif ekspresyonları arasında beş yıl ve on yıllık sağkalım oranları açısından anlamlı fark görülürken (p=0.04), incelenen diğer proteinler sağkalımla ilişkili bulunmadı.

Çıkarımlar: p53 ekspresyonu ile sağkalım arasındaki ilişki, p53'ün osteosarkomda prognostik gösterge olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: İlaç direnci, neoplazi; immünohistokimya; neoplazi proteinleri; osteosarkom; prognoz; sağkalım analizi; tümör belirteci, biyolojik; tümör supresyon proteini p53.

Objectives: Despite the developments in chemotherapy protocols, improvement in the survival rates of osteosarcoma has been limited. We evaluated the effect of certain prognosis-related proteins on survival of patients with osteosarcoma.

Methods: Data from 45 patients (24 males, 21 females) who were treated and followed-up for osteosarcoma were reviewed. Following neoadjuvant chemotherapy, 41 patients underwent extremity saving surgery, and four patients underwent amputation. The most frequent localization was the lower end of the femur (n=23, 51.1%), followed by the upper end of the tibia (n=10, 22.2%). Three patients had metastasis on admission. Surgical resection samples were retrieved from the pathology archive and analyzed immunohistochemically for the expression of p-glycoprotein p170, p53, heat-shock protein 27 (HSP27), HSP90, and nm23. The effect of these proteins on prognosis and survival was assessed with survival analysis using the Kaplan-Meier method. The mean follow-up was 49.7 months (range 6 to 185 months).

Results: Three patients with metastasis on admission died within five years due to pulmonary metastasis. New metastases developed in 29 patients. Total 5-year and 10-year survival rates were 60% and 43%, respectively. The corresponding disease-free survival rates were 41% and 24%. Five-year survival was 29% in patients who developed metastasis. Among clinical factors, survival was influenced only by the presence of metastasis on admission (p=0.044). Five-year and 10-year survival rates were significantly different between patients with and without p53 positivity (p=0.04), while the other proteins were not significantly associated with survival.

Conclusion: Our data suggest that p53 may be used as a prognostic marker in osteosarcoma due to its significant association with survival.

Key words: Drug resistance, neoplasm; immunohistochemistry; neoplasm proteins; osteosarcoma; prognosis; survival analysis; tumor markers, biological; tumor suppressor protein p53.

Yazışma adresi / Correspondence: Dr. Ata Can Atalar. İstanbul Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, 34093 Çapa, İstanbul.
Tel: 0212 - 635 12 35 e-posta: atalar@istanbul.edu.tr

Başvuru tarihi / Submitted: 09.06.2008 **Kabul tarihi / Accepted:** 07.02.2009

© 2009 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği / © 2009 Turkish Association of Orthopaedics and Traumatology

Osteosarkom çocuk ve erişkin dönemde uzun kemiklerde en sık karşılaşılan kötü huylu kemik tümörüdür. Son zamanlarda cerrahiye eklenen neoadjuvan ve adjuvan kemoterapi rejimleri ile birçok merkezde genel sağkalım oranları ortalama %60-70 düzeyine gelmiştir. Ancak, yine önemli oranda bir hasta grubu sistemik hastalığa bağlı olarak kaybedilmektedir. Bazı hastalarda, sistemik hastalık tedavisinde ana yöntem olan kemoterapiye arzu edilen yanıt alınmadığından, sağkalım oranları artırılmamaktadır. Kemoterapiye yanıtın bazı hastalarda istenilen düzeyde olmaması, son yıllarda kemoterapötik ilaçlara direnç gelişimi ile açıklanmaya çalışılmaktadır.^[1]

Bu çalışmada, yaş, cinsiyet, anatomik yerleşim, histolojik tip, patolojik kırık, başvuru anında metastaz gibi bazı faktörlerin ve çeşitli kanser türlerinde etkisi kanıtlanmış, prognoz ile ilişkili bazı proteinlerin ekspresyon düzeylerinin, hastanemizde tedavi edilen osteosarkom hastalarında sağkalım ile ilişkisi geriye dönük olarak araştırıldı.

Hastalar ve yöntem

1990 ile 2006 yılları arasında osteosarkom tanısı konan 185 hastanın patoloji raporları gözden geçirildi. Neoadjuvan kemoterapi öncesindeki primer biyopsileri ve takipleri aynı hastanede yapılan hastalar çalışmaya alınırken, teknik olarak antikor uygulanması zor olan hastalar çalışmaya alınmadı. Değerlendirmeler sonucunda 50 hasta çalışma için uygun bulundu. Hastaların 22'si çocukluk yaş grubunda (≤ 16 yaş) yer alırken, 28'i 16 yaşından büyüktü. Ameliyat öncesinde çocuk hastalara sisplatin, ifosfamid ve epirubisin tedavisi; daha ileri yaştakilere ise adriablastin/sisplatin; adriablastin/ifosfamid veya metotreksat tedavisi uygulanmıştı. Neoadjuvan kemoterapi sonrasında, 41 hastaya ekstremitte koruyucu cerrahi, dört hastaya amputasyon yapılmıştı. Cerrahi rezeksiyon sonrasında, her iki grupta da ameliyat öncesinde başlanan kemoterapi rejimleri tamamlamıştı. Bu hastalardan beşinin kemoterapi öncesindeki primer biyopsilerine ulaşamadı ve verileri yetersiz olduğu için çalışmadan çıkarıldı. Sonuçta, 45 hastanın (24 erkek, 21 kadın; ort. yaş 20; dağılım 8-64) hematoksilen-eozin boyalı lamaları arşivimizden çıkartılarak tekrar incelendi. Çalışmaya uygun olan lamaların, daha önceden formaline yatırılmış, gerektiğinde nitrik asit ile dekalsifiye edilmiş parafin blokları da çıkarıldı.

Bu parafin bloklardan elde edilen kesitlerden, aşağıdaki proteinlere ait immünohistokimyasal incelemeler yapıldı: (i) Daha önce çeşitli kanser türlerinde prognoz üzerine olumsuz etkisi gösterilmiş olan p53 proteini;^[2-6] (ii) farklı kanser türlerinde farklı prognostik etkileri gösterilen, ancak insan osteosarkomunda, pozitif ekspresyonun genellikle kötü prognoz ile ilişkilendirildiği ısı şok proteinleri HSP27 ve HSP90;^[7,8] (iii) bir çoklu direnç (multidrug resistance - MDR) geni tarafından üretilen plazma membran proteini olan p glikoprotein p170;^[9,10] (iv) yapılan araştırmalar sonucunda metastaz baskılayıcı gen olduğu gösterilen nm23 proteini.^[11-14]

Çalışmada p-glikoprotein antijeninin immünohistokimyasal yöntemle belirlenmesi için p170 MDR Ab-2(Clonel F4) fare monoklonal antikor (Neomarkers, Cat. no: MS-660-P1, Fremont, CA, ABD); p53 proteininin immünohistokimyasal analizi için p53 Ab-5(Clonel DO-7) fare monoklonal antikor (Neomarkers, Cat. no: MS-186-PO); ısı şok protein 27 için HSP-27 Ab-1 (Clonel G3.1) fare monoklonal antikor (Neomarkers, Cat. no: MS-101-PO); ısı şok protein 90 α için HSP86 Ab-1 tavşan poliklonal antikor (Neomarkers, Cat. no: RB-119-PO); nm23 için NCL-nm23 fare monoklonal antikor (Clonel 37.6, Novocastra, Newcastle, İngiltere) kullanıldı.

Tüm antikorlar için ortak kullanılan malzemeler şunlardı: Sekonder antikor (Lab Vision Corp., Cat. no: TP-125-HL, Fremont, CA, ABD), nonspesifik blok (Lab Vision Corp., Cat. no: TA-125-UB), streptavidin peroksidaz (Lab Vision Corp., Cat. no: TS-125-HR), AEC kromojen (Lab Vision Corp., Cat. no: TA-004-HAC) ve AEC substrat (Lab Vision Corp., Cat. no: TA-060-HA).

İmmünohistokimyasal yöntem

Seçilen parafin bloklara p-glikoprotein, p53, nm23, HSP27 ve HSP86 immünohistokimyasal antikorları uygulanmak üzere, her bir bloktan 3-5 mikron kalınlığında beş adet kesit poly-L-lysine ile kaplı hazır lamalara alındı. Bu kesitler 56 °C etüvde yaklaşık 12 saat bekletilerek kurutuldu ve kesitlerin lama yapışmaları sağlandı. Daha sonra bu lamalar, deparafinizasyon işlemi için altı ayrı ksilen banyosundan geçirilerek 30 dk bekletildi. Ardından, azalan konsantrasyonlarda önce %100'lük etil alkolden, sonra %96'lük etil alkolden altışar seri geçirilerek her birinde 15'er dakika bekletildi ve distile suya getirilen kesitler hidrate edildi.

Tablo 1. Tümör yerleşimlerinin dağılımı

Yerleşim	Sayı	Yüzde
Femur alt uç	23	51.1
Tibia üst uç	10	22.2
Humerus	5	11.1
Tibia diyafizi	5	11.1
Femur diyafizi	1	2.2
Diğer	1	11.1

p53, nm23, HSP27, HSP90 uygulanacak kesitlere antijen geri kazanım işlemi için, 2.1 gram sitrik asit 1 litre distile suda eritildi; 2 normal NaOH ile pH 6'ya ayarlandı. Hazırlanan sitrat tamponu, kapağı kapalı, ancak basınç çıkışı açık düdüklü tencere içinde kaynayınca kadar ısıtıldı. Daha önceden su aşamasına getirilmiş olan preparatlar, bir taşıyıcı aracılığıyla kaynamaya başlayan sitrat tamponu içine yerleştirildi. Kesitlerin tümünün tampon çözeltisi ile tamamen örtülmüş olmasına dikkat edilerek, düdüklü tencerenin kapağı kapatıldı. Tencerenin basınç çıkışı açık bırakıldı ve buradan, hava yerine su buharı çıkıncaya kadar ısıtma işlemine devam edildi. Su buharı çıkmaya başlayınca, basınç düzeneği kapatıldı ve ısıtma işlemine 3 dk daha devam edildi. Daha sonra, tencere ısıtıcı üzerinden alınıp 20 dk süreyle oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Yeterli derecede soğuduğundan emin olduğunda, basınç düzeneği ve kapak açılarak soğutma işlemine devam edildi. 20 dakika dolunca kesitler distile suya alındı. Elde edilen preparatlar ışık mikroskopunda incelendi. Preparatlarda, incelenen proteinlerin boyanma derecelerine göre ekspresyon düzeyleri ortaya kondu.

İncelenen proteinlerin prognoza, dolayısıyla sağkalıma nasıl etki ettiğini incelemek için, SPSS 13.0 programı kullanılarak Kaplan-Meier yöntemiyle hastaların sağkalım analizleri yapıldı. Sağkalıma etki edebileceği düşünülen prognostik faktörler de tekyönlü ve çokyönlü varyans analizi ile incelendi. Hastaların ortalama takip süresi 49.7 ay (dağılım 6-185 ay) idi.

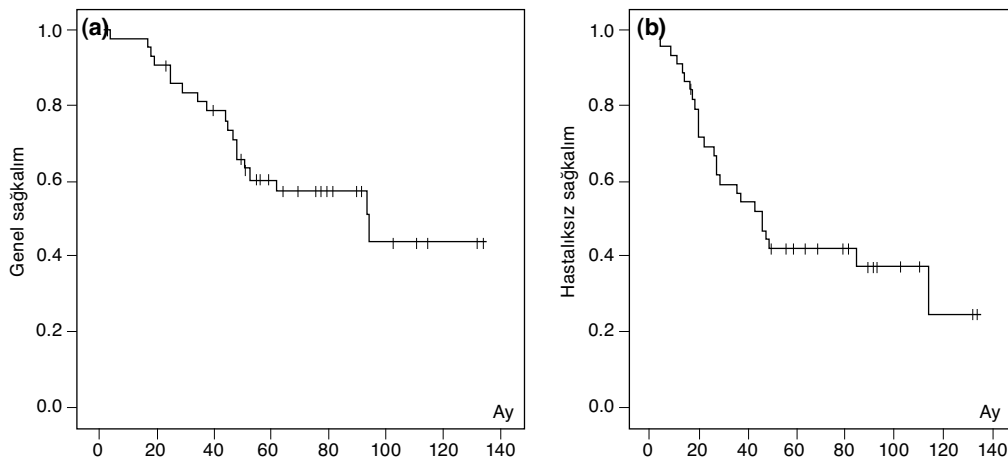
Sonuçlar

Tümör yerleşimleri Tablo 1'de gösterildi. En sık tutulum 23 hasta (%51.1) ile femur alt uç, 10 hasta (%22.2) ile tibia üst uca görüldü.

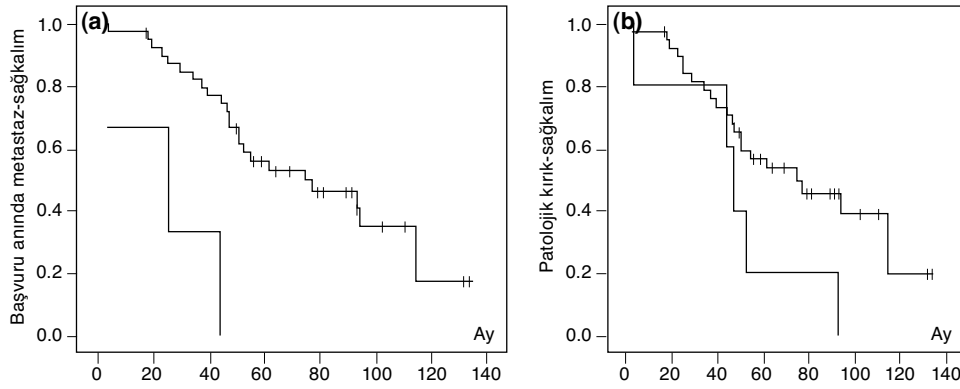
Üç hastada başvuru anında metastaz saptandı. Bu üç hasta beş yıllık süre içinde akciğer metastazından yaşamını yitirdi. Yirmi yedi hastada akciğer metastazı gelişirken, iki hastada başka organ metastazları gelişti.

Beş ve 10 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %60 ve %43 bulundu. Hastalısız sağkalım oranı ise beş yıl için %41, 10 yıl için %24 idi (Şekil 1). Yaş, cinsiyet, anatomik yerleşim, histolojik tip, patolojik kırık, başvuru anında metastaz gibi faktörlerin sağkalım üzerine etkileri araştırıldı. Yaş ile sağkalım arasında negatif yönde, ancak anlamlı olmayan düzeyde bir ilişki saptandı ($p=0.09$). Ayrıca, tümör yerleşimi, patolojik kırık varlığı ve başvuru şeklinin prognozla anlamlı ilişkisi gösterilemedi ($p>0.05$).

Metastaz gelişen hastalarda beş yıllık sağkalım oranı 29 ± 8 idi. Nekroz oranları %0-94 ve %94-100 olmak üzere hastalar iki gruba ayrıldı. İlk grupta 31 hasta, ikinci grupta 13 hasta vardı. Bir hastanın nekroz oranına ulaşamadı. İlk grupta beş yıllık sağ-



Şekil 1. (a) Tüm hastaların genel sağkalım eğrisi. (b) Hastalısız sağkalım eğrisi



Şekil 2. (a) Başvuru anında metastaz ile sağkalım arasındaki anlamlı ilişkiyi gösteren eğri. En geç 40. ayda metastaz ile başvuran tüm hastalar kaybedilmektedir. **(b)** Patolojik kırık ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren eğri.

kalım 43 ± 9 , 10 yıllık sağkalım 14 ± 8 iken, nekroz oranı $94-100$ olan grupta beş yıllık sağkalım 69 ± 12 bulundu. Sağkalım analizlerinde anlamlı etkisi kanıtlanan sadece başvuru anında metastaz varlığı idi ($p=0.044$). Patolojik kırık ile başvuran hastalarda prognoz daha kötü olduğu yönünde sayısal bir eğilim olmakla birlikte, bu durum anlamlı farklılık oluşturmadı (Şekil 2).

Protein ekspresyon düzeyleri ve sağkalım analizleri

Araştırılan p53, p170, nm23, HSP27 ve HSP90 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri, boyanma yok (-), $<1-10$ boyanma (+), $10-70$ boyanma (++), $70-90$ boyanma (+++) ve $90-100$ boyanma (+++++) olarak değerlendirildi. Proteinlerin ekspresyon düzeyleri ile istatistiksel analiz yapılırken, 10 'dan az boyanma olması negatif olarak kabul edilirken, 10 ve üzeri boyanma varlığı pozitif olarak kabul edildi ve analizlerde bu iki ana grup esas alındı (Tablo 2).

p53 pozitif olan 23 hastanın genel sağkalımı beş yıl için 48 ± 10 , 10 yıl için 31 ± 12 bulunurken, p53 negatif olan 22 hastada bu oranlar sırasıyla 71 ± 10 ve 53 ± 17 idi. p53 proteininin pozitif ve negatif ekspresyonları arasında sağkalım açısından anlamlı fark

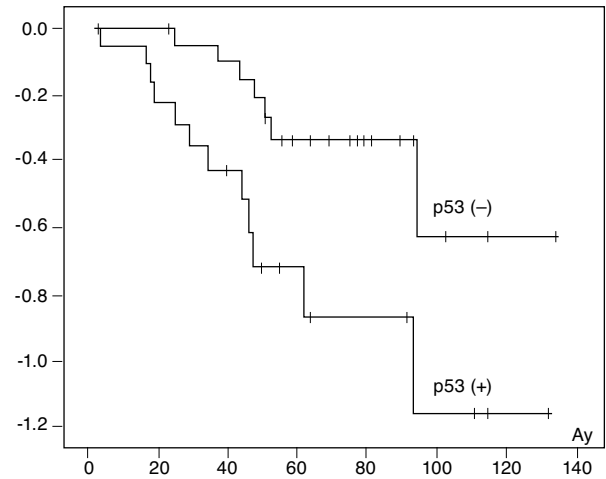
Tablo 2. İncelenen proteinlerin ekspresyon dereceleri ve bunun sağkalıma etkisi

	Pozitif	Negatif	<i>p</i>
p53	23	22	0.04
p170	43	2	-
nm23	7	38	0.59
HSP27	25	20	0.95
HSP90	3	42	-

vardı ($p=0.04$). p53 pozitif olan hastalarda prognoz daha kötü bulundu (Şekil 3).

Nm23 negatif olan yedi hastada beş yıllık sağkalım oranı 62 ± 21 iken, nm23 pozitif olan 38 hastada beş yıllık sağkalım oranı 60 ± 8 , 10 yıllık 38 ± 12 bulundu; iki grup arasında anlamlı fark yoktu ($p=0.59$).

HSP27 negatif olan 25 hastada 5 ve 10 yıllık sağkalım oranları sırasıyla 62 ± 10 ve 41 ± 12 bulunurken, HSP27 pozitif olan 20 hastada beş yıllık sağkalım 57 ± 11 idi, 10 yıllık sağkalım ise hesaplanmadı. HSP27 negatif ve pozitif olan hastalar arasında da sağkalım açısından anlamlı fark bulunmadı



Şekil 3. p53 proteini ile sağkalım arasındaki ilişkiyi gösteren grafik. Altta p53 ekspresyonu gösteren grubu, üstte p53 ekspresyonu olmayan grubu temsil etmektedir. p53(+) olan grupta aylar ilerledikçe sağkalım daha fazla düşerken p53(-) grubunda bu değer daha yüksek düzeylerde kalmaktadır.

($p=0.95$). HSP90 ve p170 proteinleri preparatlarda orantısız dağıldığından istatistiksel analiz yapılamadı.

Tartışma

Bu çalışmada incelenen heterojen grupta 10 yıllık genel sağkalım oranı %60, hastalısız sağkalım oranı ise %44 bulundu. Osteosarkom tedavisi tüm dünyada standartlaşmış olmakla birlikte, çeşitli büyük merkezlerde beş yıllık genel sağkalım oranı %50 ile %70 arasında değişmektedir.^[15-20] En geniş çalışma 1702 hasta ile Alman-İsviçre-Avusturya ortak osteosarkom çalışma grubunun olup, 10 yıllık genel sağkalım oranı %59.8 olarak bildirilmiştir.^[16] Rizzoli Enstitüsü, metastaz ile başvuran hastaların dahil edilmediği çalışmada 10 yıllık sağkalım oranını %70, hastalısız sağkalım oranını ise %59 olarak bildirmiştir.^[15] Çalışmamızda ulaşılan sağkalım oranının adı geçen çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir.

Prognozu etkileyen faktörler incelendiğinde, başvuru anında metastazın, birçok çalışmada gösterildiği gibi, bu çalışmada da anlamlı derecede etkili olduğu bulunmuştur. Bazı çalışmalarda bildirilen patolojik kırık ile kötü prognoz bağlantısı^[21] ise, çalışmamızda istatistiksel olarak olmasa da, sayısal olarak prognozu olumsuz etkilediği görülmüştür.

p53 tümör baskılayıcı gendeki mutasyonların osteosarkom patogenezinde ve hücre proliferasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir. Çeşitli çalışmalarda, p53 ekspresyonunun meme, mide, kolon, rektum, mesane ve küçük hücre dışı akciğer kanseri gibi kanser tiplerinde kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.^[2-6] Ancak, osteosarkom ve p53 ilişkisini araştıran çoğu çalışmada böyle bir ilişki saptanmamıştır; bir başka çalışmada da, hasta sayısının az olması ve istatistiksel güvenilirliliğinin düşük olması nedeniyle prognoz ile açık bir ilişki gösterilememiştir.^[22] Wadayama ve ark.nın^[6] çalışmasında, osteosarkomlu 67 hastanın 19'unda (%28.4) p53 ekspresyonu gösterilmiş ve primer ve metastatik tümörler arasında bu açıdan anlamlı fark saptanmamıştır. Birçok çalışmada klinik ilişki yalnızca %15-25 oranlarında p53 pozitifliği ile gösterilebilmiş iken,^[5] çalışmamızda p53 pozitifliği ve sağkalım arasında güçlü bir ilişki görülmüştür; bu önemli bulgu p53 ekspresyonunun osteosarkomda prognostik gösterge olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

Tanı ve tedavideki gelişmelere rağmen, kanser hastalarında en sık ölüm nedeni konvansiyonel tedaviye dirençli olan metastazlardır. Azalmış nm23 ekspresyonunun meme, over, gastrik, hepatoselüler karsinom ve melanom gibi kanser türlerinde metastazla ilişkili olabileceğini gösteren kanıtlar bulunmaktadır.^[11-14] Osteosarkom ile ilgili immünohistokimyasal ve moleküler çalışmalarda, nm23'ün metastazın baskılanmasından çok, metastazın ilerlemesinde rol oynadığı gösterilmiştir.^[23] Bu çalışmalarda, nm23 ekspresyonu metastaz bölgelerinde, primer tümör bölgesi ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur. Osteosarkom ile ilgili çalışmalarda, nm23 ekspresyonu ve erken metastaz arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır; ancak, nm23 ekspresyonu pozitif olan olgularda erken metastaza eğilim saptanmıştır.^[11] Çalışmamızda da, diğer çalışmalara paralel olarak, nm23 ekspresyonu ile sağkalım arasında anlamlı ilişki bulunamadı; ancak nm23 pozitif olgularda metastaz ve ölüm oranı daha yüksekti.

Isı şok proteinleri (HSP), ısı ve ilaca maruz kalmak gibi hücresel stresler sırasında ekspresyonları artan bir grup proteindir. Çeşitli çalışmalarda, HSP27'nin osteosarkom ve over kanserlerinde sağkalım açısından kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.^[13,14,24,25] Öte yandan, HSP ve osteosarkom ile ilgili sınırlı sayıda çalışmada, HSP90 ekspresyonunun iyi prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur.^[5,13] Bir başka çalışmada ise, HSP90 ekspresyonu ile osteosarkom prognozu arasında ilişki bulunmamıştır.^[8] Çalışmamızda, ısı şok proteinlerinin sağkalım üzerine anlamlı bir etkisi saptanmadı.

P170 (p glikoprotein), çalışmamızda incelenen bir başka protein idi. p170'in pozitif ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğunu gösteren bazı yayınlar vardır.^[26] Serra ve ark.^[9] p-glikoprotein ekspresyonunun artmış bulunduğu hücre soyları için, primer çoklu ilaç direnci nedeniyle, daha agresif kemoterapiye ihtiyaç duyulduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, düzensiz dağılım nedeniyle p170 ile ilgili istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

Yukarıda belirtilen bazı istatistiksel yetersizlikler dışında, çalışmada kontrol grubunun olmaması, kemoterapiye dirençli ve direnç göstermeyen altgrupların oluşturulmamış olması da çalışmanın zayıf yönleri olarak vurgulanabilir.

Sonuç olarak, immünohistokimyasal yöntemler yardımıyla osteosarkomda p53 pozitifliğinin kötü

prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Daha önce çeşitli kanser tiplerinde prognozla ilişkileri gösterilmiş olan ısı şok proteinleri (HSP27 ve HSP90), nm23 ve p170 proteinlerinin osteosarkom prognozunu anlamlı derecede etkilediği istatistiksel olarak gösterilememiştir. Daha geniş çalışmalarda bu proteinlerin prognostik değeri tekrar incelendiğinde farklı sonuçlar alınabilir.

Kaynaklar

1. Chou AJ, Gorlick R. Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006;6:1075-85.
2. Davidoff AM, Iglehart JD, Marks JR. Immune response to p53 is dependent upon p53/HSP70 complexes in breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3439-42.
3. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4855-78.
4. Miller CW, Aslo A, Won A, Tan M, Lampkin B, Koeffler HP. Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996;122:559-65.
5. Trieb K, Kotz R. Proteins expressed in osteosarcoma and serum levels as prognostic factors. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:11-7.
6. Wadayama B, Toguchida J, Yamaguchi T, Sasaki MS, Yamamuro T. p53 expression and its relationship to DNA alterations in bone and soft tissue sarcomas. *Br J Cancer* 1993;68:1134-9.
7. Love S, King RJ. A 27 kDa heat shock protein that has anomalous prognostic powers in early and advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1994;69:743-8.
8. Trieb K, Gerth R, Holzer G, Grohs JG, Berger P, Kotz R. Antibodies to heat shock protein 90 in osteosarcoma patients correlate with response to neoadjuvant chemotherapy. *Br J Cancer* 2000;82:85-7.
9. Serra M, Maurici D, Scotlandi K, Barbanti-Brodano G, Manara MC, Benini S, et al. Relationship between P-glycoprotein expression and p53 status in high-grade osteosarcoma. *Int J Oncol* 1999;14:301-7.
10. Serra M, Scotlandi K, Manara MC, Maurici D, Benini S, Sarti M, et al. Analysis of P-glycoprotein expression in osteosarcoma. *Eur J Cancer* 1995;31A:1998-2002.
11. MacDonald NJ, de la Rosa A, Steeg PS. The potential roles of nm23 in cancer metastasis and cellular differentiation. *Eur J Cancer* 1995;31A:1096-100.
12. Oda Y, Naka T, Takeshita M, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Comparison of histological changes and changes in nm23 and c-MET expression between primary and metastatic sites in osteosarcoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *Hum Pathol* 2000;31:709-16.
13. Ueda Y, Dockhorn-Dworniczak B, Blasius S, Mellin W, Wuisman P, Böcker W, et al. Analysis of mutant P53 protein in osteosarcomas and other malignant and benign lesions of bone. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993;119:172-8.
14. Uozaki H, Horiuchi H, Ishida T, Iijima T, Imamura T, Machinami R. Overexpression of resistance-related proteins (metallothioneins, glutathione-S-transferase pi, heat shock protein 27, and lung resistance-related protein) in osteosarcoma. Relationship with poor prognosis. *Cancer* 1997;79:2336-44.
15. Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Ruggieri P, Picci P, Longhi A, et al. Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at the Istituto Ortopedico Rizzoli according to the Istituto Ortopedico Rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report. *J Clin Oncol* 2000;18:4016-27.
16. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol* 2002;20:776-90.
17. Meyers PA, Gorlick R, Heller G, Casper E, Lane J, Huvos AG, et al. Intensification of preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: results of the Memorial Sloan-Kettering (T12) protocol. *J Clin Oncol* 1998;16:2452-8.
18. Özger H, Eralp L, Atalar AC, Tokar B, Ayan İ, Kebudi R, et al. Survival analysis and the effects of prognostic factors in patients treated for osteosarcoma. [Article in Turkish] *Acta Orthop Traumatol Turc* 2007;41:211-9.
19. Petrilli AS, de Camargo B, Filho VO, Bruniera P, Brunetto AL, Jesus-Garcia R, et al. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. *J Clin Oncol* 2006;24:1161-8.
20. Winkler K, Beron G, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Beck J, Beck W, et al. Neoadjuvant chemotherapy for osteogenic sarcoma: results of a Cooperative German/Austrian study. *J Clin Oncol* 1984;2:617-24.
21. Scully SP, Ghert MA, Zurakowski D, Thompson RC, Gebhardt MC. Pathologic fracture in osteosarcoma: prognostic importance and treatment implications. *J Bone Joint Surg [Am]* 2002;84:49-57.
22. Pápai Z, Féja CN, Hanna EN, Sztán M, Oláh E, Szendrői M. P53 Overexpression as an indicator of overall survival and response to treatment in osteosarcomas. *Pathol Oncol Res* 1997;3:15-9.
23. Honoki K, Tsutsumi M, Miyauchi Y, Mii Y, Tsujiuchi T, Morishita T, et al. Increased expression of nucleoside diphosphate kinase/nm23 and c-Ha-ras mRNA is associated with spontaneous lung metastasis in rat-transplantable osteosarcomas. *Cancer Res* 1993;53:5038-42.
24. Schneider J, Jimenez E, Marenbach K, Marx D, Meden H. Co-expression of the MDR1 gene and HSP27 in human ovarian cancer. *Anticancer Res* 1998;18:2967-71.

25. Uozaki H, Ishida T, Kakiuchi C, Horiuchi H, Gotoh T, Iijima T, et al. Expression of heat shock proteins in osteosarcoma and its relationship to prognosis. *Pathol Res Pract* 2000;196:665-73.
26. Chan HS, Grogan TM, Haddad G, DeBoer G, Ling V. P-glycoprotein expression: critical determinant in the response to osteosarcoma chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1706-15.