

Opere erken evre küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında ERCC1 ekspresyonunun belirlenmesi faydalı mıdır?

IS IT USEFUL TO DETERMINE ERCC1 EXPRESSION IN EARLY STAGE NON-SMALL CELL LUNG CARCINOMAS?

Hasan ERSÖZ¹, İsmail AĞABABAOĞLU², Şenay ÇAKMAKOĞLU³, Duygu GÜREL⁴, Neşe ATABEY³, İlhan ÖZTOP⁵, Nezh Özdemir⁶

¹İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı, İzmir

²Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Yenimahalle Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Cerrahisi Kliniği, Ankara

³Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir

⁴Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, İzmir

⁵Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı, İzmir

⁶Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Cerrahisi Ana Bilim Dalı, İzmir

ÖZ

Amaç: Son yıllarda; küçük hücreli dışı akciğer karsinom (KHDAK)'lu hastalarda, adjuvan platin bazlı kombinasyon kemoterapisinin etkinliği üzerinde Excision-Repair-Cross-Complementing-Grup-1 (ERCC1) geni ekspresyon düzeyinin öngörücü değer taşıdığını belirten çalışmalar bildirilmekle birlikte konu hakkındaki değeri halen tartışmalıdır.

Çalışmamızda akciğer rezeksiyonu sonrası platin bazlı kemoterapi uygulanan hastalarda ERCC1 ekspresyon düzeyinin belirlenmesinde immunohistokimyasal analiz (IHK) ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemlerinin etkinliğinin karşılaştırılması ve çalışma sonunda elde edilen verilerin tedavi yanıtını öngörmedeki etkinliğinin incelenmesi hedeflendi.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamız prospektif ve tanımlayıcı özelliktedir. Ocak 2011-Ocak 2014 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Göğüs Cerrahisi Kliniği'nde KHDAK nedeniyle opere edilen ve çalışma kriterlerine uyan hastalar dahil edildi. Hastalardaki ERCC1 ekspresyon düzeyleri RT-PCR ve IHK ile analiz edildi. ERCC1 ekspresyonunun prediktif değeri, sonuçların nüks ve sağkalım açısından istatistiksel olarak incelenmesi ile değerlendirildi.


Bulgular: Çalışma 17 olgu üzerinden yürütüldü. Olguların ortalama yaşı 59.82±6.36 yıld. Üç olguda nüks gözlenirken, iki yıllık sağkalım %82.4 idi. RT-PCR ile analizi ile %64.70 olguda tümör dokusunda ERCC1 ekspresyon düzeyinin normal dokuya göre daha yüksek olduğu belirlendi. IHK analizi ile olguların %35.29'unda güçlü ekspresyon gözlemlendi. Olguların RT-PCR ile IHK skor ortalamaları arasındaki ilişki anlamlı değildi (p=0.14). Hastaların nüks gelişimi ile RT-PCR skorunun korele olduğu (r=-0.29), IHK skorlamasının ise çok zayıf korelasyon (r=0.13) gösterdiği belirlendi.

Sonuç: Çalışmamız, KHDAK' da ERCC1 ekspresyon düzeyinin RT-PCR ile belirlenmesinin IHK ile belirlenmesine göre daha güvenilir olabileceğini desteklemiştir. Ancak daha kesin yorumlar yapabilmek için çok merkezli, geniş olgu serilerinde çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: küçük-hücreli-olmayan akciğer karsinomu; ERCC1 proteini, insan; immünohistokimya; gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

Hasan ERSÖZ

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi
Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı,
Basın Sitesi/ Karabağlar – İZMİR

 <https://orcid.org/0000-0001-9877-7595>

ABSTRACT

Objective: Recent studies have been reported that expression levels of Excision-Repair-Cross-Complementing-Group-1 (ERCC1) has predictive value to anticipate the efficacy of adjuvant-platinum-based-combination-chemotherapy in patients with non-small-cell-lung-cancer (NSCLC). However, it is still controversial.

The aim of this study was to compare the efficacy of immunohistochemical analysis (IHC) and real-time-polymerase-chain-reaction (RT-PCR) to determine ERCC1 expression and, whether the ERCC1 expression levels is effective to predict the clinical outcome of the NSCLC patients who were treated with by platinum-based-chemotherapy after lung resection.

Material and Method: Our study is prospective and descriptive. Between January2011&2014, patients who were operated for NSCLC in Dokuz Eylül University Thoracic Surgery Clinic and who met the criteria of the study were included. Expression levels of ERCC1 were analyzed by RT-PCR and IHC. Predictive value of ERCC1-expression was evaluated by examining the results statistically in terms of recurrence and survival

Results: The study was conducted on 17 cases whose mean age was 59.82±6.36 years. Two-year-survival was 82.4% when recurrence was observed in three cases. By RT-PCR analysis, 64.70% of patients were found to have ERCC1-expression-level higher than normal tissue in tumor tissue. IHC-analysis showed strong expression 35.29%. The relation between the RT-PCR and IHC score averages was not significant (p=0.14). It was determined that recurrence development of the patients correlated-well with the RT-PCR score (r=-0.29), while too poor correlation (r=0.13) was observed with IHC-scoring.

Conclusion: Our study supports that determination of ERCC1 expression level by RT-PCR may be more reliable than IHC on prediction of recurrence in NSCLC. However, in order to make more accurate interpretations, there is a need for multi-centered, large-scale case studies.

Keywords: Non-Small-Cell Lung Carcinoma, ERCC1 protein, human, immunohistochemistry, real-time polymerase chain reaction

Erken evre küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olan hastalarda cerrahi rezeksiyon temel tedavi yaklaşımı olup, küratif rezeksiyona rağmen anlamlı oranda relaps meydana gelmektedir. Bu hastalarda relaps riskini azaltmak için adjuvan kemoterapi ve radyoterapi gibi ek tedaviler uygulanmaktadır. 1867 bronş kansinomlu hasta üzerinde yapılmış olan Uluslararası Adjuvan Akciğer Kanseri Çalışması (IALT),küratif cerrahi sonrası adjuvan sisplatin bazlı kemoterapi verilmesinin hastalara 5 yıllık survey üzerinde mutlak fayda sağladığını göstermiştir (1). Bunun dışında da KHDAK'li olgularda postoperatif adjuvan platin bazlı kemoterapi uygulamasının faydalı olduğu yönünde birçok makale mevcuttur (2-5).

Bununla birlikte adjuvan platin bazlı kemoterapi uygulamasının, hastaların beş yıllık sağkalımı üzerindeki etkinliği %4 ila 15 arasında değişmektedir (2-5). Bu değişkenlik, bizlere tedavi etkinliğinde kullanılan ilaç dışındaki faktörlerin de rol oynadığını düşündürmektedir.

Bu faktörlerden biri olabilecek olan sisplatin direncinde, DNA tamir mekanizmalarının önemli rol

oynadığı bilinmektedir (6). Sisplatinin hücre yıkımı üzerindeki etkisi DNA'ya bağlanarak DNA-platin bağlarının oluşmasına dayanır. Bu bağlardan bir kısmı DNA zincirleri arasında çapraz kovalent bağ şeklinde oluşarak DNA replikasyonunu inhibe eder. ERCC(Excision Repair Cross-Complementing) Geni, DNA tamirinde önemli rol oynayan bir genidir. ERCC geninin 1, 2, 3 olarak adlandırılan üç formu bulunur. ERCC1 proteini tamir mekanizmasında işlev gören bir protein olup, yine tamir mekanizmasında görevli olan XPF (Xeroderma Pigmentosum Group F) proteini ile kompleks oluşturarak DNA da hasarlı bölgeye bağlanır (7). ERCC1DNA zincirleri arasındaki çapraz bağları kırarak rekombinasyon sürecinde DNA tamirini sağlamasına karşın, sisplatin-DNA bağlarının yok edilmesine de yol açar. Bu nedenle sisplatin direncine neden olur (8-10).

In vitro çalışmalar ERCC1 ekspresyonunun platin direnci üzerindeki etkisinin ovaryum, testis, mesane, serviks ve KHDAK'lerinde önemli rol aldığını göstermiştir (11). Bu nedenle ERCC1ekspresyon düzeyinin

değerlendirilmesi halen KHDAK'inde standart tedavi olarak kabul edilen platin bazlı kemoterapiden fayda görebilecek hastaları tanımlama konusunda yardımcı olabileceğini akla getirmektedir. Buna göre ERCC1 ekspresyon düzeyinin düşük olmasının, sisplatin tedavisine duyarlılığı gösteren bir indikatör olduğu ve prognozu öngören bir belirteç olduğu tanımlanmıştır (12).

Ancak literatürde ERCC1 ekspresyonunun sisplatin direnci ile ilişkisine yönelik veriler birbiri ile çelişkilidir. Özellikle ERCC1 ekspresyonunu belirlemede kullanılan immunohistokimyasal (IHK) çalışmalara konu olan 8F1 monoklonal antikorunun ERCC1 proteinini saptamadaki yetersizliği, bu proteini hedeflemediği ve ayrıca yanlış sonuçlar verebildiğine yönelik araştırmalar yayınlanmıştır (13,14). Bu çalışmalar sonrasında ERCC1'in saptanmasında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile ERCC1 mRNA düzeyinin belirlenmesinin daha uygun bir yöntem olduğu düşünülmüştür.

Bu çalışma; ERCC1 ekspresyonunun KHDAK'li olgularda platin bazlı kemoterapi yanıtını öngörmede kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi, sağkalım ve yaşam kalitesini öngörmede rolü olup olmadığının saptanması ve ayrıca ERCC1 ekspresyonunun incelenmesinde kullanılmakta olan IHK ve RT-PCR yöntemlerinin tedavi yanıtını ve sağ kalımı öngörmedeki duyarlılık ve özgüllüklerinin karşılaştırılması amacıyla planlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız; prospektif ve tanımlayıcı özelliktedir. Çalışmaya Ocak 2011- Ocak 2014 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Göğüs Cerrahisi Kliniği'nde KHDAK nedeniyle opere edilen ve çalışma kriterlerine uyan hastalar dahil edildi. Çalışmaya katılan tüm hastalar konu ile ilgili bilgilendirilerek, kendilerinden bilgilendirilmiş onamları alındı. Çalışmamız süresince iyi klinik uygulamalar esaslarına uyuldu, Helsinki Bildirgesi dikkate alındı ve kurumsal ya da bölgesel etik standartlara uyuldu. Çalışmamız DEÜ Klinik Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulunun 01.12.2011 tarih ve 2011/38-13 sayılı kararıyla onaylandı.

Araştırmaya tam rezektabl olarak opere edilmiş evre I, II ve IIIA olan KHDAK'li olgular dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş aralığı 45-65 olarak

belirlendi. Hastaların postoperatif egzersiz düzeylerinin standardizasyonunu bozmaması için psikolojik, nörolojik, muskuloskeletal hastalıklar ya da mobilizasyonu engelleyen diğer durumları olan hastalar çalışmaya alınmadı. Yine egzersiz kapasitesi ve anket standardizasyonunu etkilemesi, ayrıca postoperatif iyileşmeyi geciktirmesi nedeniyle kanser dışında akciğer hastalığı olan olgular (tüberküloz öyküsü, KOAH vb.) da çalışmaya dahil edilmedi. Aynı sebeple araştırmaya dahil edilen hastaların preoperatif yapılan solunum fonksiyon testlerinde birinci saniyedeki zorlu ekspiratuvar volüm (FEV1) değeri, %60 ve üzeriydi. Tüm bu dışlama ve dahil etme kriterleri sayesinde, beklenen sağ kalımları ve komorbiditeleri yönüyle homojen hasta grupları oluşturulması hedeflendi. Zira bu kriterler hastanın mortalite ve morbiditesi üzerinde etkili olan parametrelerdir.

Çalışma süresinde göğüs cerrahisi kliniğinde opere edilen erken evre KHDAK'li 126 olgunun 52'si uygun yaş aralığında olmaması sebebiyle, 4'ü mobilizasyonu engelleyen ek hastalığı sebebiyle, 27'si eşlik eden akciğer hastalığı nedeniyle, 16'sı da preoperatif solunum fonksiyon testinde birinci saniyedeki FEV1 değeri %60'ın altında olması sebebiyle araştırmaya dahil edilmedi. Sonuçta ele alınan 27 olgunun biri postoperatif erken dönemde exitus olduğundan çalışmaya alınamadı. Kalan 26 olgunun ise yalnızca 17'si IHK' boyama gerçekleştirilebildiği için çalışma verileri 17 olgu üzerinden yürütüldü.

Opere edilen olguların doku örneklerinden ERCC1 gen ekspresyon düzeyi hem IHK hem de RT-PCR yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu amaçla operasyonda elde edilen ve -80°C' de saklanmakta olan normal ve tümörlü akciğer dokuları kullanıldı.

Akciğer dokusundan RNA izolasyonu MBT K0731 kitiyle (Thermo) gerçekleştirildi. Her bir örneğe ait normal ve tümör dokularından elde edilen RNA'ların saflıkları ve miktarları nanodrop (ThermoScientific) cihazı kullanılarak ölçüldü. cDNA sentezi ABM/G2361 sentez kiti ile Toplam 20 ul hacimde gerçekleştirildi. cDNA çevrimi yapılan örnekler -20°C de saklandı. RT-PCR için Roche 480 termal döngüleyici sistem ve kit olarak Lightcycler 480 RNA SYBR Green1 master kiti (Roche) kullanıldı. İnternal kontrol

olarak Beta Aktin primerleri seçildi. Analiz tüm kontrol ve hasta örnekleri ile en az üç kez tekrarlandı. Hedef gen olan ERCC1 geninin ekspresyonundaki değişiklikler referans gen olarak seçilen Actin B ile karşılaştırılarak analiz edildi (13). Normal dokuya göre erime noktasında oluşan azalma ve artma skorlandı. Ayrıca deney ve kontrol dokularındaki ortalama ERCC1 mRNA düzeyi değerlendirildi ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

RT-PCR yöntemine göre skorlama şu şekilde yapıldı;

*Skor 0: Değişmemiş (kontrol ile tümör dokusundaki ERCC1 transkript düzeyi eşit)

*Skor 1: Artmış (tümör dokusundaki ERCC1 transkript düzeyi kontrol dokusuna göre yüksek)

*Skor 2: Azalmış (tümör dokusundaki ERCC1 transkript düzeyi kontrol dokusuna göre düşük)

İmmün boyama için ERCC1 Antikoru olarak clone 8F1 kullanıldı. Olguların parafine gömülü normal ve tümöral doku örnekleri ERCC1 antikoru ile boyandı. Pozitif kontrol olarak, tonsillerepitelial hücreleri kullanıldı. Boyanmış preparatlar değerlendirilerek skorlaması yapıldı. Parafine gömülü dokulardan poly-Lizin kaplı lamalar üzerine 3 mikrometrek kesitler alındı. Deparafinizasyonda dahil olmak üzere ekstraksiyon, antijenle muamele ve immün boyama gibi basamaklar otomatik IHK boyama cihazında gerçekleştirildi (Ventana Bench Mark Ultra Ventana Medical Systems Tucson, AZ). Çalışmada Biotinsiz hidrojen peroksitli antikor tanıma kiti kullanıldı (ultraView™ Universal DAB Detection Kit, Catalog number 760-500, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Dokular Anti ERCC1 antikoru (clone 8F1, Santa Cruz Biotechnology) ile inkübe edilerek boyandı.

IHK boyama sonrasında elde edilen veriler aşağıdaki skorlama sistemi kullanılarak değerlendirildi

*Skor 0: Nükleer ERCC1 ekspresyonu yok (nükleer boyama olan hücre sayısı %10 dan az)

*Skor 1: Zayıf ERCC1 ekspresyonu nükleer boyama olan hücre sayısı %10 veya %10'dan çok, %50 den az)

*Skor 2: Güçlü ERCC1 ekspresyonu (%50 veya %50 den fazla hücrede nükleer boyama var).

Hastalar postoperatif dönemde platin bazlı kemoterapilerini aldı. Ayrıca postoperatif kontrollerinde 6, 12, 18 ve 24. aylarda rutin olarak uygulamış olduğumuz torakoabdominal BT ile takip edildi ve böylece nüks olup olmadığı ile gelişen ek durumların olup olmadığı kaydedildi.

Sonuçların istatistiksel analizleri, SPSS 20.0 programı yardımıyla yapıldı. Bağımlı ve bağımsız değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri frekans değerleriyle gösterildi; ortalama, standart sapma ve yüzdeler belirtildi. Bağımsız değişkenlerden etkilenen bağımlı değişkenlerin ölçümlerinde; her grubun kendi içindeki tekrarlanan ölçümlerinin karşılaştırılmasında "Wilcoxon işaretli sıralı test" kullanıldı. Parametrik ve ölçüm verilerinin analizinde Pearson korelasyon analizi, numerik olan verilerin analizinde Spearman sıra korelasyon analizi kullanılmıştır. Elde edilen veriler arasındaki korelasyon Pearson korelasyon testi ile hesaplanarak yorumlandı. Anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ değerine göre %95 güven aralığında belirlendi.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 17 olgunun biri (%5.88) kadın, 16'sı (%94.12) erkek hastadır. Hastaların ortalama yaşı 59.82 ± 6.36 yıldır. Olguların biri (%5.88) büyük hücreli karsinom, dördü (%23.52) adenokarsinom ve 12'si (%70.59) skuamöz hücreli karsinom tanısı aldı. Seçilen hastalara ait veriler Tablo I de sunulmaktadır.

Çalışma sürecinde olguların normal ve tümör dokularından RNA izole edildi. RNA verimi dokunun büyüklüğü, nekrotik doku miktarı gibi parametrelere bağlı olarak değişkenlik göstermekteydi. Bu örneklerin RNA ölçümleri sonucu RNA konsantrasyon miktarlarının en az $2.1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ve en çok $859.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ olduğu belirlendi.

Olgularda, pozitif ve negatif kontrollere ait RT-PCR ile elde edilmiş amplifikasyon eğrileri analiz edildiğinde her bir olgunun normal dokulardaki ve tümör dokularındaki ERCC1 ekspresyon düzeylerinin 3 farklı ölçüm sonucunda elde edilen ortalama düzeyleri belirlendi (Tablo II).

Tablo I. Çalışmaya dahil edilen olgular ve özellikleri

	n	%
Cinsiyet		
Kadın	1	5.9
Erkek	16	94.1
Histopatoloji		
Skvamöz Hücreli Karsinom	12	70.6
Adenokarsinom	4	23.5
Büyük Hücreli Karsinom	1	5.9
Evre		
1B	1	5.9
2A	9	52.9
2B	5	29.4
3A	2	11.8
RT-PCR Skoru		
0	1	5.9
1	11	64.7
2	5	29.4
IHK Skoru		
0	9	52.9
1	2	11.8
2	6	35.3
KT		
Sisplatin	3	17.7
Karboplatin	1	5.9
Sisplatin + Vinorelbin	10	58.8
Sisplatin + Decetaksel	2	11.8
Sisplatin + Gemstabin	1	5.9
RT		
Var	4	23.5
Yok	13	76.5
Nüks		
Var	3	17.6
Yok	14	82.4
Sağkalım		
Sağ	14	82.4
Exitus	3	17.6

Tablo II. KHDAK'li olguların normal ve tümörlü dokularındaki ERCC1 ekspresyon düzeyleri*

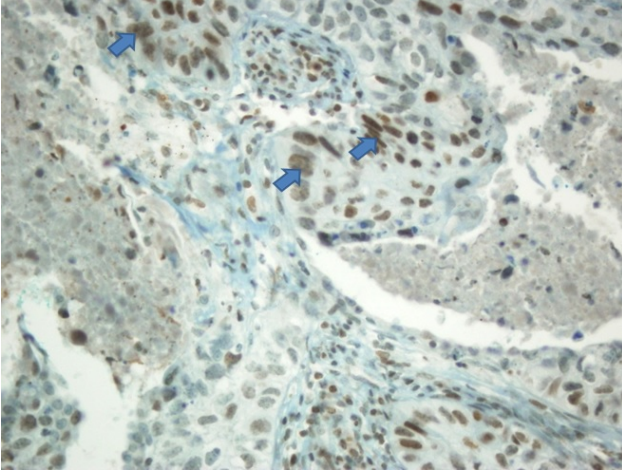
Olgu No	Doku No	Normal T/R Ekspresyonu Değeri** (ng/μl)	Tm T/R Ekspresyonu Değeri** (ng/μl)
1	D1	9.7	19.2
2	D2	15.6	17.9
3	D3	15.5	5.7
4	D5	8.82	35.9
5	D8	25.4	17.3
6	D9	12.4	21.2
7	D10	23.7	22.7
8	D12	12.8	17.7
9	D13	23.1	21.2
10	D14	4.66	20.7
11	D16	12.9	20.1
12	D20	22.1	19.2
13	D22	4.3	8.1
14	D23	10.2	17.2
15	D25	15.1	30.6
16	D26	22.5	15.2
17	D27	17.9	14
ORTALAMA ± SD		15.1 ± 6.38	19.1 ± 6.83

*17 olgunun verisinin normal dağılımda olup olmadığı Kolmogorov Simirnov/Shapiro-Wilk's test ile analiz edildi. Veriler normal dağılımda olduğu için son satırda tüm verilerin ortalama ± standart sapma (SD) değerleri sunuldu

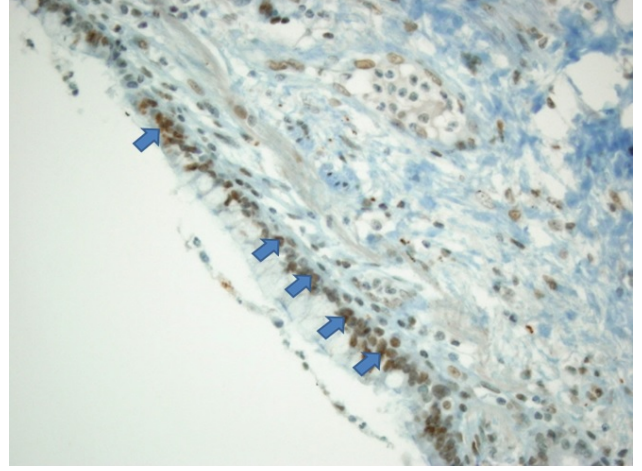
**Değerler her bir olgunun normal dokulardaki ve tümör dokularındaki ERCC1 ekspresyon düzeylerinin 3 farklı ölçüm sonucunda elde edilen ortalama düzeylerini belirtmektedir

Tümör dokularındaki rölatif ERCC1 ekspresyonunun 19.3 ± 1.6 ng/ μ l normal dokuda ise 14.9 ± 1.5 ng/ μ l olduğu saptandı. ERCC1 genindeki ekspresyon değişiklikleri her olguya ait normal ve tümörle karşılaştırılarak elde edildi. Bu analiz sonucunda ERCC1 ekspresyon düzeyinin, 17 olgunun 11'inde (%64,70) normal dokuya göre tümör dokusunda daha yüksek olduğu, olguların beşinde (%29,41) normal dokuya göre azalma olduğu, bir (%5,88) olguda ise normal doku ile tümör dokusundaki ekspresyon düzeylerinin benzer olduğu belirlendi. Elde edilen bu veriler ışığında, RT-PCR ile belirlenen ERCC1 geni ekspresyon düzeyleri gereç ve yöntem bölümünde tanımlandığı şekilde skor 0, 1 ya da 2 olarak skorlandı.

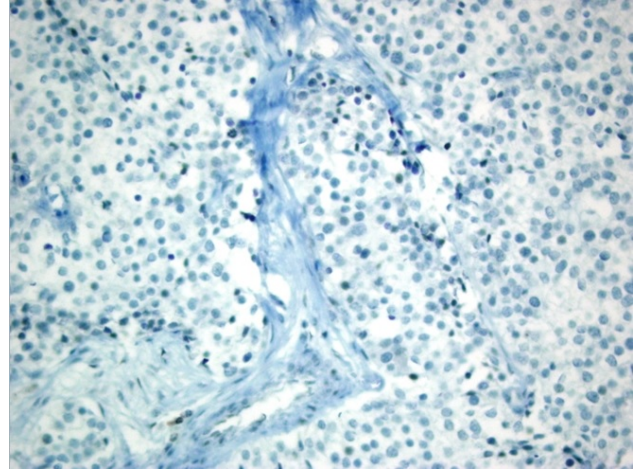
IHK sonuçlarına göre, çalışmaya dahil edilen 17 hastadan dokuzunda (%52,94) ERCC1 ekspresyonu artışı yok iken ikisinde (%11,77) zayıf; altısında (%3,29) ise güçlü ERCC1 ekspresyonu gözlemlendi. Buna göre IHK skorlamaları yapıldı (Resim 1-4).



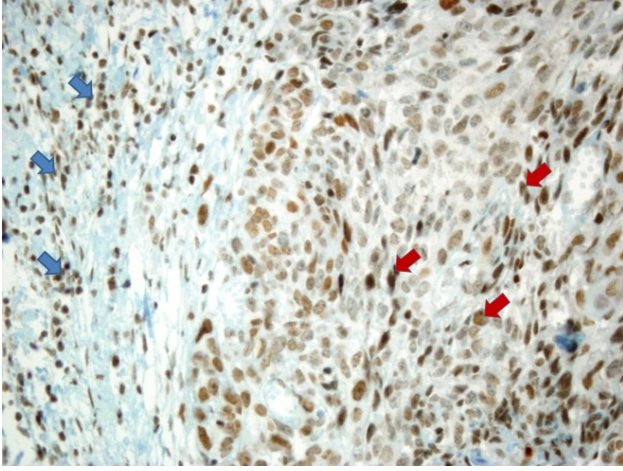
Resim 1: Tümördeki ekspresyon (ok) (IHK skor:1) (x40)



Resim 2: Bronş mukoza epitelindeki ekspresyonlar (ok) (x40)



Resim 3: Tümörde ekspresyon görülmedi (IHK skor:0) (x40)



Resim 4: Tumorde (kırmızı ok) ve stromadaki enflamatuvar hücrelerde (mavi ok) belirgin ekspresyon mevcut (IHK skor:2) (x40)

Olguların RT-PCR Skor ortalaması 1.24 ± 0.56 , IHK Skor ortalaması 0.82 ± 0.95 olup aralarında anlamlı ilişki bulunmadı ($p=0.14$).

Olguların nüksleri incelendiğinde nüks gözlenen dört olgunun ortalama nüks gelişim zamanı 14.75 ± 9.29 ay olarak bulundu.

Tüm bu elde edilen veriler daha önce kaydedilen klinik ve histopatolojik veriler ile karşılaştırıldı (Tablo III). Buna göre, ERCC1 ekspresyonunun immunohistokimyasal yöntem ile yapılan skorlamasıyla RT-PCR skoru karşılaştırıldığında anlamlı ilişki ya da güçlü korelasyon görülmedi ($p>0.05$, $r<0.50$).

Hastaların nüks gelişimi ile her iki skorlama karşılaştırıldığında RT-PCR skorunun orta derecede korele olduğu ($r=-0.29$) IHK skorlamasının ise korele olmadığı ($r=0.13$) belirlendi.

Hastalığın evresi ile her iki skorlama karşılaştırıldığında, RT-PCR skorunun hastalığın evresi ile orta derecede korele olduğu görülürken ($r=-0.44$), IHK skoru bu derecede korelasyon göstermemektedir ($r=0.09$).

IHK skoru ise tümörün histopatolojik tipi orta derece korele izlenmişken ($r=-0.32$), RT-PCR skorunda bu derecede korelasyon görülmedi ($r=0.14$).

Hastaların sağ kalımları ile IHK ve RT-PCR skorlarının her ikisi de birbirine yakın değerlerle orta derecede korele izlendi ($r=0.25, -0.24$).

Tablo III. Çalışma sonunda elde edilen verilerin korelasyon ve karşılaştırma analizi değerleri*

r/rho p	RT-PCR skoru	IHK skoru	Yaş	Histopatoloji	Evre	Kemoterapi	Nüks	Sağkalım
RT-PCR skoru	-	-0,19 0,49	0,12 0,67	0,14 0,61	-0,44 0,09	0,22 0,41	-0,29 0,27	-0,24 0,36
IHK skoru	-0,19 0,49	-	-0,22 0,39	-0,32 0,21	0,09 0,74	-0,01 0,99	0,13 0,62	0,25 0,34
Yaş	0,12 0,67	-0,22 0,39	-	-0,22 0,40	-0,16 0,54	0,07 0,79	-0,07 0,80	-0,16 0,55
Histopatoloji	0,14 0,61	-0,32 0,21	-0,22 0,40	-	-0,28 0,27	-0,25 0,34	-0,35 0,17	-0,30 0,25

Evre	-0,44 0,09	0,09 0,74	-0,16 0,54	-0,28 0,27	-	0,23 0,38	0,32 0,22	0,42 0,10
Kemoterapi	0,22 0,41	-0,01 0,99	0,07 0,79	-0,25 0,34	0,23 0,38	-	-0,06 0,82	0,12 0,67
Nüks	-0,29 0,27	0,13 0,62	-0,07 0,80	-0,35 0,17	0,32 0,22	-0,06 0,82	-	0,89 0,00
Sağkalım	-0,24 0,36	0,25 0,34	-0,16 0,55	-0,30 0,25	0,42 0,10	0,12 0,67	0,89 0,00	-

*Ölçüm verilerinin analizinde Pearson korelasyon analizi (r), numerik olan verilerin analizinde Spearman sıra korelasyon analizi (rho) kullanılmıştır.

TARTIŞMA

Araştırmamız sonucunda elde etmiş olduğumuz verilere göre; ERCC1 ekspresyonunun immunohistokimyasal yöntem ile yapılan skorlamasıyla RT-PCR skoru karşılaştırıldığında anlamlı ilişki görülmemiştir. Bununla birlikte hastaların nüks gelişimi ile karşılaştırıldığında RT-PCR skorunun orta derecede korele olduğu ancak aradaki farkın anlamlı olmadığı gözlenirken IHK skorlamasının yalnızca zayıf korelasyon gösterdiği izlenmekteydi. Buna göre elde edilen veri ışığında RT-PCR skorunun IHK skoruna göre nüksleri ön görmede daha başarılı olduğu, ancak olgu sayımızın kısıtlı olması sebebiyle korelasyon gösteren verilerin anlamlı sonuç doğurmadığı izlenmiştir. Verilerimizde iki yöntemin birbiri ile olan ilişkilerinde de güçlü korelasyon görülmemesi sebebiyle RT-PCR skorunun nüksleri ön görmede IHK skoruna göre daha güvenilir olabileceği öngörüsüne ulaşılmıştır.

RT-PCR skorunun hastalığın evresi ile orta derecede korele olduğu görülürken, IHK skoru korelasyon göstermemekteydi. Bu durum da RT-PCR skorunun IHK skoruna göre üstünlüğünü düşündürmüştür.

IHK skoru ise tümörün histopatolojik tipi orta derece korele izlenmişken, RT-PCR skorunda korelasyon görülmemiştir. Bu durum IHK boyamanın hastanın histopatolojik tipi gibi faktörlerden etkilenebileceğini, hastanın nüks ve sağkalımını göstermede yanıltıcı bir faktör olabileceğini göz önüne sermiştir.

Literatürde ERCC1 ekspresyonunun sisplatin direnci ile ilişkisine yönelik veriler birbiri ile çelişkilidir. Özellikle ERCC1 ekspresyonunu belirlemede kullanılan immunohistokimyasal çalışmalara konu olan 8F1 monoklonal antikorunun ERCC1 proteinini saptamadaki yetersizliği, bu proteini hedeflemediği ve ayrıca yanlış sonuçlar verebildiğine yönelik araştırmalar yayınlanmıştır (13,14). Bu çalışmalar sonrasında ERCC1'in saptanmasında RT-PCR yöntemi ile ERCC1 mRNA düzeyinin belirlenmesinin daha uygun bir yöntem olduğu düşünülmüştür. Buna göre, çalışmamızda elde etmiş olduğumuz tüm bu veriler, literatürdeki verilerle birebir uyumlu olduğu söylenebilir.

İlginç olarak hastaların sağkalımları ile IHK ve RT-PCR skorlarının her ikisi de birbirine yakın değerlerle orta derecede korele izlenmiştir. RT-PCR sonucunun nüksleri göstermede IHK skoruna üstünlüğünü göz önünde bulundurduğumuzda hastalısız sağkalım konusunda da RT-PCR skorunun üstün olduğu sonucuna ulaşılabilir. Bununla birlikte, veri sayısının yetersiz olduğu ve sağ kalımı etkileyen faktörlerin kapsamlı değerlendirilmediği araştırmamızda kapsamlı bir sağ kalım analizi yapılması amaçlanmamıştır. Yeterli olgu sayısının ve değerlendirme parametrelerinin kapsamlı olduğu araştırmalarda sağ kalımın ayrıntılı olarak analiz edilip yorumlanması gerektiğine inanmaktayız.

Çalışmamız, RT-PCR yöntemi ile incelenen KHDAK'li olguların tamamında ERCC1 geninin ekspresyonunu göstermiştir. Ortalama ERCC1 ekspresyon

düzeyinin KHDAK'li olguların tümör dokularında normal dokularına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu karsinogenez sürecinde artan genomik instabiliteye bağlı olarak artan DNA tamir oranının artması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

RT-PCR ile ERCC1 ekspresyonunun arttığı saptanan olgulardan yarısından azı (11' de 5, %46) IHK ile de pozitif saptanmıştır. Bu durum, RT-PCR yönteminin sensitivitesinin daha yüksek olduğunu tanımlayan literatür verileri ile uyumludur. Ayrıca literatürde bu antikorun farklı proteinleri tanıyabiliyor olacağı ile (13-15) uyumlu olarak, RT-PCR ile ERCC1 ekspresyonu olmadığı tekrarlayan kereler kontroller eşliğinde saptandığı bir olguda da ERCC1 boyaması pozitif bulunmuştur. Ayrıca ERCC1 in farklı varyant formlarının da bulunduğu bu farklı formların RT-PCR ile ayırt edilebilirken antikorlar tarafından tanınmadığı belirlenmiştir (15).

Hastaların yaşam süresinin yaş, solunum fonksiyonları, ek hastalıklar ve hastaların egzersiz kapasitesi faktörlerinden direkt olarak etkilendiği kanıtlanmıştır. Bu faktörleri dışladığımız için sonuçları daha doğru yorumlamamız kolaylaşmaktadır. Çalışmamızdaki dahil etme ve dışlama kriterlerine göre yaşam süresini etkileyecek faktörler düşünülerek homojen bir hasta grubunda çalışmış olmamız, her ne kadar olgu sayımızı kısıtlayıp verilerimizin anlamlılığı üzerinde olumsuz etki yaratsa da elde etmiş olduğumuz korelasyon sonuçlarının güvenilirliğini arttırmakta ve elde etmiş olduğumuz sonuçlarda hastaların KHDAK dışı faktörlerden etkilenme durumunu dışlamaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamızda incelenen klinik ve histopatolojik parametreler ile ERCC1 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki olmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte çalışmamızın sınırlı hasta sayısı göz önünde bulundurularak yapmış olduğumuz korelasyon analizlerinde ERCC1 ekspresyonu ile KHDAK'li olgularda klinik, histopatolojik bulgular ve bunların yanı sıra tedavi yanıtı arasındaki ilişkinin belirlenebilmesi için bazı ipuçları elde edilmiştir. Konu hakkında daha net verilere ulaşım daha kesin yorumlar yapabilmek için çok merkezli, geniş olgu serilerinde çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J. Cisplatin based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-smallcell lung cancer. *N Engl J Med* 2004;350:351-360.
2. Gurubhagavatula S, Lynch TJ. The role of adjuvant chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Semin Respir Crit Care Med*. 2005;26:298-303.
3. Winton T, Livingston R, Johnson D, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2005;352:2589-2597.
4. Douillard J, Rosell R, Delena M, Legroumellet A, Torres A, Carpagnano F. ANITA: Phase III adjuvant vinorelbine (N) and cisplatin (P) versus observation (OBS) in completely resected (stage I-III) non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (pts): final results after 70-month median follow-up. *J Clin Oncol*. 2005;23:Suppl 16:A7013-A7013 abstract.
5. Strauss GM, Herndon J, Maddaus A, et al. Randomized clinical trial of adjuvant chemotherapy with paclitaxel and carboplatin following resection in stage IB non-small cell lung cancer (NSCLC): report of Cancer and Leukemia Group B (CALGB) protocol 9633. *J Clin Oncol*. 2004;22:Suppl 14:A7019-A7019.
6. Simon GR, Ismail-Khan R, Bepler G. Nuclear excision repair based personalized therapy for non-small cell lung cancer: From hypothesis to reality. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:1318-1328.
7. Reed E. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev*. 1998;24:331-344.
8. Breen D, Barlési F. The place of excision repair cross complementation 1 (ERCC1)in surgically treated non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008;33:805-811.
9. Mu D, Hsu DS, Sancar A. Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem*. 1996;271:8285-8294.

10. Sancar A. Mechanisms of DNA excision repair. *Science*. 1994;266:1954-1956.
11. Zamble DB, Mu D, Reardon JT, Sancar A, Lippard SJ. Repair of cisplatin-DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry*. 1996;35:10004- 10013.
12. Postel-Vinay S, Soria JC. ERCC1 as Predictor of Platinum Benefit in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2017;35:384-386.
13. Olausson KA, Fouret P, Kroemer G. ERCC1-specific immunostaining in non- small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2007;357:1559-1561.
14. Olausson KA, Soria JC. Validation of ERCC1-XPF immunodetection—letter. *Cancer Res*. 2010;70:3851-3852.
15. Friboulet L, Olausson KA, Pignon JP, et al. ERCC1 Isoform Expression and DNA Repair in Non-SmallCell Lung Cancer. 2013;368:1101-1110.