

Malign Melanomalı Hastalarda Serum BCL-2 Düzeyleri

SERUM BCL-2 LEVELS IN PATIENTS WITH MALIGNANT MELANOMA

Dr. Derya DURANYILDIZ*, Tıbbi Bilimler Bölümü, Hilal OĞUZ**, Dr. Hakan ÇAMLICA***, Dr. Faruk TAŞ****, Dr. Vildan YASASEVER**, Dr. Erkan TOPUZ*****

* İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD

** İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Kanseri Biyokimyası Bilim Dalı

*** İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Preventif Onkoloji ABD

**** İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Klinik Onkoloji ABD

***** İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

ÖZET

Çalışmada malign melanomalı 44 hastada önemli bir anti-apoptotik protein olan bcl-2 serum düzeylerini belirlenmiş, tümör progresyonu ve klinik parametreler ile arasındaki ilişki belirlenmeye çalışılmıştır. Serum bcl-2 düzeyleri çift antikor sandüviç enzim immünassay (ELISA) tekniği ile belirlenmiştir. Malign melanomalı hastalarda bcl-2 düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0,01$). Malign melanomalı hastalarda evrelere göre bcl-2 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır. Orta doz Interferon-alfa tedavisi alan 8 nod pozitif hastada ve kombinasyon kemoterapi alan 10 metastatik hastada tedavi öncesi ve sonrası bcl-2 düzeyleri arasında da istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır. Bu küçük çalışma ile bu önemli apoptotik proteinin melanomadaki değerini belirlemek mümkün değildir. Bu alanda daha geniş çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: malign melanoma, bcl-2, serum

SUMMARY

We investigated the serum levels of an important protein, bcl-2, in 44 patients with malignant melanoma and the relationship with tumour progression and known prognostic parameters. Serum bcl-2 levels were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Biosource International, Inc. 542 Flynn Road Camarillo, California, USA). The baseline serum bcl-2 levels were significantly higher in patients with malignant melanoma than in the control group ($p=0,01$). The bcl-2 values were not changed with Interferon-alfa therapy ($n=8$) and chemotherapy ($n=10$). With this small study, it is not possible to determine the value of serum levels of bcl-2 in malignant melanoma and larger scale research studies are needed in this field.

Key words: malignant melanoma, bcl-2, serum

GİRİŞ

Gelişmiş organizmalarda gereksinim duyulmayan ve/veya fonksiyonu bozulan hücrelerin çevreye zarar vermeden kontrollü ve programlı ölümüne apoptozis denir⁽¹⁾. İlk defa 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanan apoptozis, bir çok fizyolojik ve patolojik süreçte yer almaktadır^(2,3). Apoptozisin (programlı hücre ölümünün) kontrolündeki anormallikler/bozukluklar karsinogenezde önemli rol oynarlar⁽⁴⁾. Apoptozis pek çok gen tarafından kontrol edilmektedir. Bunlardan bi-

ri de anti-apoptotik bir protein olan bcl-2 proteini-dir⁽⁵⁾. Bcl-2, hücreleri apoptozisten koruduğu belirlenen ilk genidir⁽⁶⁾. Bu anti-apoptotik etkisini mitokondriden sitokrom-c salınmasını ve buna bağlı olarak efektör kaspazların aktivasyonunu önleyerek gösterir⁽⁷⁾. Bcl-2 seviyelerindeki azalma hücreleri apoptozise götürürken, artışı hücreleri ölümden korur.

Normal endotelial hücrelerde bcl-2 seviyesi belirlenemez veya çok düşük düzeyde belirlenebilir. Pek çok çalışma ile bcl-2 gen ürünü olan proteinin melanomayıda kapsayan çeşitli solid tü-

mörlerde arttığı gösterilmiştir⁽⁸⁻¹¹⁾. Ayrıca melanoma hücre soyları ile normal melanositler arasında bcl-2 seviyeleri arasında bir fark olmadığını gösteren çalışmalarda mevcuttur^(11,12).

Literatürde malign melanoma hücrelerinde bcl-2 ekspresyonu ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır⁽¹¹⁻¹⁵⁾. Bu antiapoptik proteinin invaziv fenotip, daha ileri hastalık ve kısa sağkalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

GEREÇ-YÖNTEM

Çalışmamızda apoptozisin düzenlenmesinde etkili olan bcl-2 protein düzeyleri İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü'ne başvuran 44 malign melanomalı hastada ve 18 sağlıklı kontrolde belirlenmiştir. Hastaların tanıları patolojik olarak konmuş ve AJCC 2002 sınıflandırma sistemine dayalı olarak evrelemeleri yapılmıştır. Hastaların özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Erken evre hastalara (Evre I-II) herhangi bir tedavi uygulanmamış ve düzenli takip altına alınmışlardır. Lenf nodu pozitif olan 8 hastaya adjuvan immunoterapi (interferon-alfa-2b, 10 mU/gün) haftanın 3 günü subkutan uygulanırken, 10 metastatik hastaya da DTIC bazlı kemoterapi uygulanmıştır.

Hastalardan alınan kanlardan ayrılan serumlar, gerekli test sayısı tamamlanincaya kadar -20°C'de saklanmıştır. Bcl-2 düzeyleri çift antikor sandüviç enzim immünassay (ELISA) tekniği ile (Biosource International, Inc. 542 Flynn Road Camarillo, California, USA) belirlenmiştir.

Data analizi SPSS Software (SPSS, Chicago, IL, USA) kullanılarak yapılmıştır. Veriler istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

Tablo 1. Hastaların özellikleri	
	Hasta sayısı (n=44)
Yaş<50	19
<50	25
Cinsiyet Kadın/erkek	22/22
Tümör yerleşimi Gövde/ekstremita	24/19
Evre I-II/III/IV	26/8/10

Tablo 2. Malign melanomalı hastalar ile kontrol grubuna ait bcl-2 düzeyleri

	Hasta sayısı (n)	bcl-2 (U/mL) x±sd;m
Malign melanoma	44	45,6±55,5; 23,5
Sağlıklı kontrol	18	20±10,4; 15,5
P		0,01

BULGULAR

Malign melanomalı hastalar ve sağlıklı kontrollerdeki bcl-2 düzeyleri Tablo 2'de gösterilmiştir. Malign melanomalı hastalarda bcl-2 düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p=0,01).

Malign melanomalı hastalarda evrelere göre bcl-2 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır. Evrelere göre aritmetik ortalama, standart sapma ve ortanca değerleri erken evre hastalarda (n=26) 63,4±66,3; 35,3, evre III hastalarda (n=8) ve evre IV hastalarda 22,1±15,2; 16,4 olarak bulunmuştur.

Bcl-2 düzeyleri ile cinsiyet, tümör yerleşimi, metastaz yeri ve sayısı, LDH, NSE ve kemoterapiye direnç arasında bir ilişki bulunamamıştır. Fakat bcl-2 düzeyi ile yaş ve lenf nodu tutulumu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki mevcuttur (p=0,025, p=0,003) (Tablo 3).

Lenf nodu pozitif olan 8 hastada tedavi öncesi ve sonrası bcl-2 düzeylerinde bir değişiklik görülmemiştir. Interferon-alfa tedavisi alan bu hastalarda tedavi öncesi bcl-2'ye ait aritmetik ortalama,

Tablo 3. Serum bcl-2'nin diğer parametreler ile ilişkisi

	bcl-2 (U/mL)
Yaş	0,025
Cinsiyet	Anlamlı değil
Tümör yerleşimi	Anlamlı değil
Lenf nodu tutulumu	0,003
Metastaz yeri	Anlamlı değil
Metastaz sayısı	Anlamlı değil
Laktat dehidrogenaz (LDH)	Anlamlı değil
Nöron spesifik enolaz (NSE)	Anlamlı değil
Kemoterapiye direnç	Anlamlı değil

standart sapma ve ortanca değerleri $17,1\pm 3,6$; 17 iken tedaviden 1 ay sonra $16,85\pm 2,8$; 15,9 ve tedaviden 3 ay sonra ise $14,93\pm 4,84$; $15,7$ olarak bulunmuştur.

Aynı şekilde kemoterapi alan 10 metastatik hastada da tedavi öncesi ve sonrası bcl-2 düzeylerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. Tedavi öncesi $22,1\pm 15,2$; $16,4$ olan değerler tedavi sonrası $14,64\pm 8,78$; $14,8$ olarak belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada önemli bir anti-apoptotik protein olan bcl-2'nin malign melanoma ile ilişkisini araştırdık. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma monoklonal antikor kullanılarak malign melanomalı hastalarda serum bcl-2 miktarını belirleyen ilk çalışmadır. Şimdiye kadar bu proteinle ilgili tüm bilgiler hücre kültürü ile yapılan çalışmalar sonucu elde edilmiştir. Biz de sonuçlarımızı bu bilgilerle karşılaştıracağız.

Çalışmanın sonucunda, bcl-2 seviyesinin malign melanomalı hastalarda sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu da serum bcl-2 düzeyinin artmasının apoptozisin azalmasında etkili olduğunu göstermektedir. Malign melanomada kemoterapi oldukça etkisizdir. Hastalığın kötü prognozu genellikle kemoterapiye dirençten kaynaklanmaktadır. Pek çok çalışma ile kemoterapideki ilaç direncinin apoptotik süreçteki bozukluktan kaynaklandığı gösterilmiştir⁽¹⁶⁾.

Kanserde bcl-2'ye karşı duyarsızlaştırma çalışmaları oldukça ümit verici bir tedavi şeklidir ve kronik lenfositik lösemi, multipl myelom ve malign melanom gibi hastalıklarda kanser ilaçları ile birlikte faz III çalışmaları aşamasında denemeleri sürmektedir⁽¹⁷⁾.

Daha önceki çalışmalarda malign melanomada bcl-2'nin immunohistokimyasal ekspresyonu gösterilmiştir. Leiter ve arkadaşları⁽¹⁴⁾ melanomanın progresyonu ile bcl-2 gen ekspresyonunun arttığını gösterirken, Gradilone ve arkadaşları^(13,18) hastalığın ilerlemesi ile bcl-2 ekspresyonu arasında herhangi bir ilişki bulamamışlardır.

Malign melanomada interferon-alfa apoptozisi indükleyebilir. Interferon-alfa'nın, p-53 ekspresyonunu azaltıp, bcl-2 ekspresyonunu artırarak apoptozisin artmasını sağladığı gösterilmiştir⁽¹⁹⁾. Ancak biz bunun aksine, interferon-alfa tedavisi alan hastalarda herhangi bir değişiklik belirleyemedik.

Bcl-2'nin ekspresyonunun artışı, kemoterapiye direnç ve melanoma hastalarının kötü prognozu ile ilişkilidir. On kişilik küçük metastatik hasta grubu-

muza kemoterapi öncesi ve sonrasındaki serum bcl-2 seviyelerinde bir değişiklik gözlenmemiştir.

Sonuç olarak, bu küçük çalışma ile bu önemli apoptotik proteinin melanomadaki değerini belirlemek mümkün değildir. Bu alanda daha geniş çalışmalar yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Cohen JJ. Apoptosis: mechanisms of life and death in the immune system. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Apr; 103(4):548-54.
2. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J cancer* 26:239-257, 1972.
3. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):770-6.
4. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 1994 Apr 15;73(8):2013-26.
5. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2000 Jan;6(1):127-34.
6. Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science.* 1992 Oct 9;258(5080):302-4
7. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol.* 2000 Mar;2(3):156-62.
8. Hague A, Moorghen M, Hicks D, Chapman M, Parakeva C. BCL-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Oncogene.* 1994 Nov;9(11):3367-70.
9. Ben-Ezra JM, Kornstein MJ, Grimes MM, Krystal G. Small cell carcinomas of the lung express the Bcl-2 protein. *Am J Pathol.* 1994 Nov;145(5):1036-40.
10. McDonnell TJ, Troncso P, Brisbay SM, Logothetis C, Chung LW, Hsieh JT, Tu SM, Campbell ML. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 1992 Dec 15;52(24):6940-4.
11. Tang L, Tron VA, Reed JC, Mah KJ, Krajewska M, Li G, Zhou X, Ho VC, Trotter MJ. Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 1998 Aug;4(8):1865-71.
12. Selzer E, Schlagbauer-Wadl H, Okamoto I, Pehamberger H, Potter R, Jansen B. Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 1998 Jun;8(3):197-203.
13. Gradilone A, Gazzaniga P, Ribuffo D, Scarpa S, Cigna E, Vasaturo F, Bottoni U, Innocenzi D, Calvieri S, Scuderi N, Frati L, Agliano AM. Survivin, bcl-2, bax, and bcl-X gene expression in sentinel lymph nodes from melanoma patients. *J Clin Oncol.* 2003 Jan 15;21(2):306-12.
14. Leiter U, Schmid RM, Kaskel P, Peter RU, Krahn G. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch Dermatol Res.* 2000 May;292(5):225-32.
15. Radji JM. Malignant melanoma arising from nevi, p53, p16, and bcl-2 expression in benign versus malignant components. *J Cutan Med Surg* 1999; 3:293-297.