

# ERCC1-expresszió vizsgálata platinabázisú kezelésben részesülő tüdőrákos betegekben

Moldvay Judit<sup>1</sup>, Pápay Judit<sup>2</sup>, Puskás Rita<sup>1</sup>, Furák József<sup>3</sup>, Losonczy György<sup>1</sup>, Matolcsy András<sup>2</sup>

Semmelweis Egyetem <sup>1</sup>Pulmonológiai Klinika, <sup>2</sup>I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest, <sup>3</sup>Szegedi Tudományegyetem, ÁOK, Mellkassebészeti Tanszék, Szeged

*MKOT–Janssen–Cilag 2008 kutatási pályázat nyertese*

A tüdőrákok kezelésében alkalmazott kemoterápiáknak kevésbé ismert a szöveti biomarkerekre gyakorolt hatása. Vizsgálataink során a prediktív értékkel bíró ERCC1-expresszió változását tanulmányoztuk neoadjuváns kemoterápiában részesült betegek tumorszövetmintáin. Összesen 25 nem-kissejtes tüdőrákban szenvedő beteg (15 férfi, 10 nő) platinabázisú kemoterápia előtti és utáni tumorszövetének (14 laphámrák és 11 adenocarcinoma) ERCC1-proteinexpresszióját vizsgáltuk immunhisztokémiai módszerrel. Meghatároztuk az ERCC1-et expresszáló tumorsejtek gyakoriságát (0-100%) és az expresszió intenzitását (0-3), majd a két érték szorzatából képzett pontszám (0-300) alapján végeztünk összehasonlítást. A 14 laphámrák közül 13 esetben találtunk ERCC1-pozitivitást, ebből 4 esetben a kemoterápia hatására ERCC1-negatívvá vált a tumorminta, 8 esetben pedig csökkent az expresszió mértéke. A 11 adenocarcinomból 10 volt ERCC1-pozitív, melyből 6 a kemoterápiát követően negatívvá vált és 4-ben csökkent az expresszió. A pontszámértékek összehasonlítása alapján megállapítható, hogy a markervesztés jóval kifejezettebb volt adenocarcinómák és nőbetegek esetében. Eredményeink arra utalnak, hogy a platinabázisú kemoterápia hatására csökken a tumorszövet ERCC1-expressziója, ami jelentheti agresszívebb fenotípusú tumorsejtek szelekcióját. E megfigyelés jelentőséggel bírhat a nem-kissejtes tüdőrákok kezelésének tervezésében. Magyar Onkológia 55:105-109, 2011

**Kulcsszavak:** ERCC1-proteinexpresszió, immunhisztokémia, prediktív faktorok, neoadjuváns terápia, nem-kissejtes tüdőrák

Platinum-based chemotherapies are widely used in the treatment of lung cancer. However, little is known about their effect in the expression of certain tissue biomarkers. We have studied the ERCC1 (excision repair cross-complementation group 1) expression in tissue samples of patients treated with neoadjuvant chemotherapy. Fifty lung cancer tissue blocks of 25 patients (15 males, 10 females) were studied. They included 25 bronchoscopic biopsies (14 squamous cell carcinomas and 11 adenocarcinomas) together with their corresponding surgical biopsies after neoadjuvant chemotherapy. Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues to study the expression of ERCC1. Staining scores (0-300) were calculated by multiplying the percentage of positive tumor cells (0-100) by the staining intensity (0-3). All but one bronchoscopic squamous cell carcinoma tissues (13/14) expressed ERCC1. Four of these cases became negative after neoadjuvant therapy, and in 8 cases the level of expression decreased. In the adenocarcinoma group all but one bronchoscopic tissues (10/11) expressed ERCC1. Six of these cases became negative after neoadjuvant therapy, and in 4 cases the level of expression decreased. Comparison of staining scores before and after chemotherapy revealed more pronounced decrease in adenocarcinomas and in female patients. There was no newly expressed ERCC1-positive case in the surgical biopsy group. The results of the present study suggest that platinum-based chemotherapy affects the expression of tissue biomarker (ERCC1) which may have predictive value, and probably induces a selection of tumor cells with more aggressive phenotype. This knowledge might be of importance when designing treatment protocols for non-small cell lung cancer patients.

Moldvay J, Pápay J, Puskás R, Furák J, Losonczy G, Matolcsy A. Examination of ERCC1 expression in lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. Hungarian Oncology 55:105-109, 2011

**Keywords:** ERCC1 protein expression, immunohistochemistry, predictive factors, neoadjuvant treatment, non-small cell lung cancer

Levelezési cím: Dr. Moldvay Judit, Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinika, 1125 Budapest, Diósárok u. 1/c.  
Telefon (06-30) 253-8757, Fax: (06-1) 214-2498, e-mail: drmoldvay@hotmail.com

## BEVEZETÉS

A tüdőrák világviszonylatban és Magyarországon is a vezető daganatos halálok. Ez a betegség felelős a daganatos halálozás 20%-áért, ami Magyarországon évente kb. 8000 tüdőrákos beteg halálát jelenti. A modern képalkotó eljárások és egyéb diagnosztikus módszerek gyors fejlődése, továbbá a kombinált daganatellenes kezelések alkalmazása ellenére a betegség ötéves túlélése napjainkban még mindig 15% alatt van. Eltekintve a tüdőrák igen korai stádiumában elvégzett radikális sebészi reszekciótól, a betegség kezelésében döntő szerepet játszik a multimodalitás, tehát a sebészi és/vagy a sugárterápiás és/vagy a kemoterápiás módszerek összehangolt alkalmazása. A daganatok 80%-át kitevő nem-kissejtes tüdőrákoknál kemoterápia esetén az elmúlt évekig csak a daganatok kb. 10–20%-ánál volt megfigyelhető terápiás válasz. Manapság az új szerek alkalmazásával ez az arány 30–40%-ra emelkedett, de a kezelés hatása továbbra is inkább csak az életminőség javulásában és a betegség kiújulásáig eltelt időtartam meghosszabbodásában mutatkozik meg. Az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet 2010-es évkönyve szerint 2009-ben kemoterápiát összesen 3032 újonnan diagnosztizált tüdőrákos beteg kapott, közülük 54 neoadjuváns, 529 adjuváns kezelésként, 529 beteg kemoradioterápia részeként, míg 1920-an csak kemoterápiás kezelésben részesültek (1). Az elsővonalbeli kezelés standardját mind a mai napig a platinabázisú citotoxikus kemoterápia jelenti. A kombinációk leggyakoribb összetevője a gemcitabin, a paclitaxel, a vinorelbin, illetve újabban a pemetrexed. A választás nemritkán „empirikusan” történik, sok esetben a hozzáférhetőség, vagy a mellékhatásprofil alapján. A rutin klinikai gyakorlatban citotoxikus kemoterápia esetében betegszelekció céljából prediktív szöveti markereket (még) nem alkalmazunk, tehát rendkívül nagy jelentőségű minden olyan kutatási eredmény, ami segítheti az onkológusokat abban, hogy a betegeiket egyénre szabott kezelésben részesíthessék. Ezt szolgálhatja pl. az ERCC1 (excision repair cross-complementation group 1) repair enzim vizsgálata is, amely fontos szerepet játszik a DNS-szintézisben, valamint az esetlegesen keletkező DNS-hibák, így pl. a platinaszármazékok indukálta DNS-adduktok kijavításában (2). Az enzim alacsony szintje, illetve expressziójának hiánya esetén várható a platinaszármazékok eredményes alkalmazása (3).

## A VIZSGÁLAT ELŐZMÉNYE

A tüdőrákok kezelésében alkalmazott kemoterápiának jól ismert a klinikai hatása, azonban keveset tudunk a különböző szöveti biomarkerek expressziójára kifejtett hatásáról. Egy korábbi – a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinika és az I. sz. Patológiai és Kísérleti

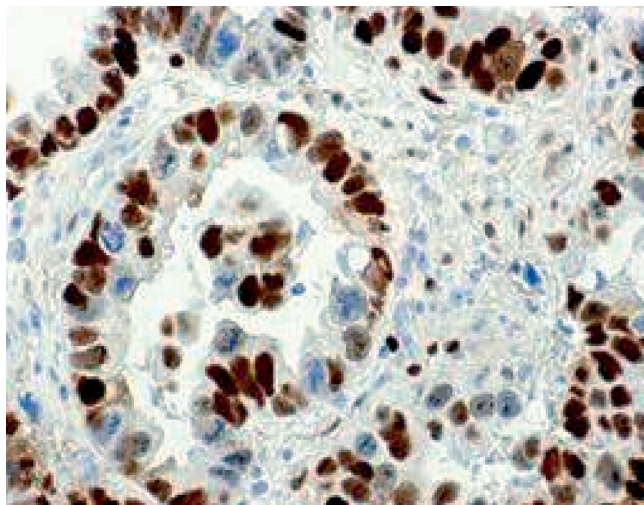
1. táblázat. Az ERCC1 és a Ki-67 fehérjék expressziójának változása kemoterápia hatására

	ERCC1		Ki-67	
	Pre-kemo	Poszt-kemo	Pre-kemo	Poszt-kemo
SCC	poz.	neg.	25	70
SCC	poz.	neg.	30	50
SCC	neg.	neg.	70	40
SCC	poz.	neg.	40	5
SCC	neg.	neg.	60	80
SCC	poz.	neg.	10	10
SCC	poz.	neg.	50	90
SCC	poz.	neg.	10	20
ADC	neg.	neg.	5	20
ADC	neg.	neg.	50	40
ADC	poz.	neg.	30	30
ADC	neg.	neg.	5	30
ADC	poz.	poz.	50	60
ADC	neg.	neg.	50	90
ADC	neg.	neg.	0	5
ADC	neg.	neg.	60	40
ADC	neg.	neg.	10	10

□ SCC: laphámrák, □ ADC: adenocarcinoma

Rákkutató Intézet együttműködésének keretében elvégzett – vizsgálat során nem-kissejtes tüdőrákban szenvedő betegek tumorszövetmintáin különböző szöveti markerek expresszióját tanulmányoztuk immunhisztokémiai módszerrel (4). A 9 adenocarcinomás és 8 laphámrákos beteg platinabázisú neoadjuváns kemoterápiában részesült. A kemoterápia előtti, bronchoszkópos biopsziából származó mintákat összehasonlítottuk a kemoterápiát követő műtéttől származó reszekátummal. A tanulmányozott fehérjék között szerepeltek az apoptózis szabályozásában résztvevő fehérjék (p53, Bcl-2, Bax, Fas-ligandum), a Ki-67 proliferációs marker, valamint a DNS-repair-ben meghatározó fontosságú ERCC1. Az immunfestett metszetek értékelése során a Ki-67 esetében az osztódó sejtek százalékos arányát határoztuk meg, míg a többi markernél két kategóriát különítettünk el: ha a tumorsejtek több mint 5%-a expresszálta az adott fehérjét, a mintát pozitívnak, ellenkező esetben negatívnak minősítettük. A p53, a Bcl-2, a Bax és a Fas-ligandum esetében nem találtunk szignifikáns különbséget sem a két szövettani csoportban észlelt expresszió tekintetében, sem pedig a kemoterápia előtti és utáni minták összehasonlításakor. Ezzel szemben a Ki-67 expressziója a kemoterápia hatására 7 esetben fokozódott, 3-ban pedig csökkent. ERCC1-pozitivitást gyakrabban észleltünk laphámrákokban (6/8 eset), mint

1. ábra. ERCC1-pozitív tüdő-adenocarcinoma (H, x300)



adenocarcinomákban (2/9 eset), és a kezdetben pozitív tumorok egy adenocarcinomás minta kivételével mind negatívvá váltak. Olyan eset nem fordult elő, amelyben egy kezdetben ERCC1-negatív minta a kemoterápia hatására pozitívvá vált volna (1. táblázat). Eredményeink arra utaltak, hogy a kemoterápia hatására a daganatsejtekben szelekciós mechanizmus érvényesül, melynek során azok a sejtek kerülnek túlsúlyba, amelyek platinaszármazékokra ugyan érzékenyebbek, de proliferációs aktivitásuk fokozott, tehát agresszívebb fenotípusúak.

### A VIZSGÁLAT CÉLJA

Jelen vizsgálatunk célja az volt, hogy tanulmányozzuk, milyen hatást fejt ki a platinabázisú kemoterápia az ERCC1 fehérje expressziójára nem-kissejtes tüdőrákból származó szövetmintákban, valamint, hogy a korábbi tanulmányok eredményeit alátámasszuk egy nagyobb esetszámmal végzett vizsgálattal. A citosztatikus kezelés előtti és utáni markerszintek összehasonlítására neoadjuváns kemoterápiában részesült betegek tumorszövetmintáin került sor.

### BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

25 nem-kissejtes tüdőrákban szenvedő, platinabázisú neoadjuváns kemoterápiát követően megoperált beteget vettünk be a vizsgálatba. A vizsgált betegek közül 15 férfi és 10 nő volt, átlagéletkoruk 61 év. Valamennyi beteg IIIA stádiumú tüdőrákban szenvedett. A daganat szövettani típusa 14 esetben planocellularis carcinoma, 11 esetben pedig adenocarcinoma volt. A betegek azonos arányban részesültek ciszplatin-etoposid, ciszplatin-gemcitabin és carboplatin-paclitaxel kombinációjú kemoterápiában.

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövettani blokkokból készült metszeteken a standard avidin-biotin-peroxidáz immunhisztokémiai módszerrel mutattuk ki az ERCC1 fehérje jelenlétét. Az immunreakcióhoz egérben termelt monoklonális anti-ERCC1 antitestet (8F1, BIOZOL) használtunk. Az antigénfeltárást citrátpufferben végeztük, az antitestet 1:50 arányban hígítottuk. A primer antitesttel történő inkubáció 20 percen keresztül szobahőmérsékleten történt. Az immunpozitivitás nukleáris lokalizációjú volt (1. ábra). Az immunfestett metszetek értékelésekor meghatároztuk az ERCC1-et expresszáló tumorsejtek százalékos arányát, valamint az expresszió intenzitását, amit egy 0–3-ig terjedő skálán fejeztünk ki. A két érték szorzatából 0–300 közötti pontszámértéket képeztünk. Kiszámoltuk a kemoterápia előtti és utáni mintákhoz tartozó pontszámértékek átlagát, külön értékelve a két szövettani csoportban kapott eredményeket. A továbbiakban az ilyen módon nyert adatokat hasonlítottuk össze egymással.

A statisztikai adatfeldolgozás Wilcoxon-féle párosított próba (Wilcoxon matched pairs test) segítségével történt.

### EREDMÉNYEK

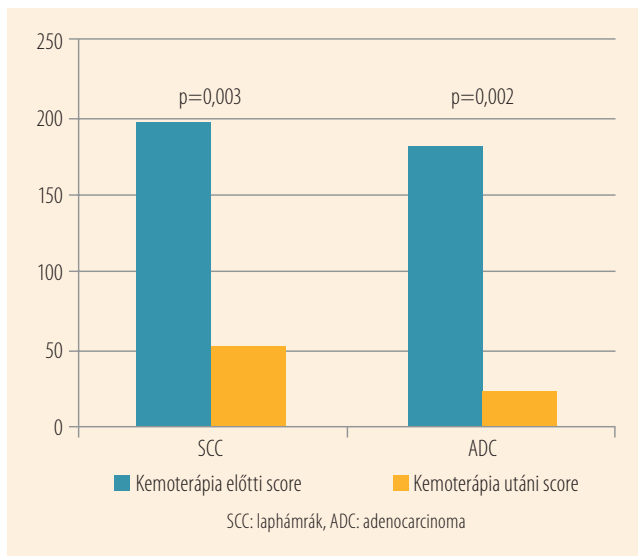
A 14 laphámrák közül 13 esetben találtunk ERCC1-pozitivitást, ebből 4 esetben a kemoterápia hatására negatívvá vált a minta, 8 esetben pedig csökkent az expresszió

2. táblázat. Az ERCC1-expresszió változása platinabázisú kemoterápia hatására

Laphámrák		Adenocarcinoma	
Kemoterápia előtti pontszám	Kemoterápia utáni pontszám	Kemoterápia előtti pontszám	Kemoterápia utáni pontszám
210	60	140	0
120	120	150	0
100	60	0	0
120	20	285	160
240	210	210	0
285	0	285	0
285	0	270	60
270	140	270	20
285	20	240	0
270	100	15	20
285	30	140	0
160	0		
140	0		
0	0		
<b>Átlag: 198</b>	<b>Átlag: 54</b>	<b>Átlag: 182</b>	<b>Átlag: 24</b>

□ nők □ férfiak

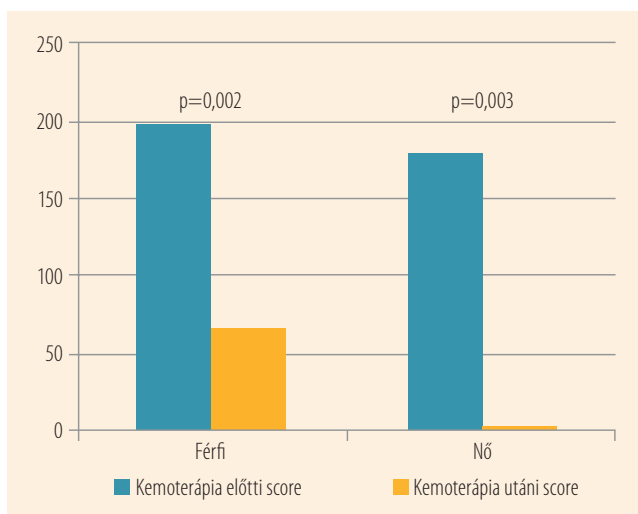
**2. ábra.** Az ERCC1-expresszió változása kemoterápia hatására laphámrák- és adenocarcinoma-mintákban



mértéke (2. táblázat). A 11 adenocarcinomból 10 volt ERCC1-pozitív, melyből 6 tumor a kemoterápiát követően negatívvá vált és 4 esetben csökkent az expresszió. Olyan eset nem fordult elő, amelyben a kezdetben ERCC1-negatív tumor a citosztatikus kezelés hatására pozitívvá vált volna.

A platinabázisú kemoterápia előtti és utáni átlagos pontszámértékek viszonyát a vizsgált két szövettani csoportban a 2. ábra szemlélteti. A planocellularis carcinomák esetében a kezdeti ERCC1-expresszió közel a negyedére csökkent a kemoterápia hatására ( $p=0,003$ ). Ennél is jelentősebb

**3. ábra.** Az ERCC1-expresszió változása kemoterápia hatására férfi- és nőbetegek mintáiban



markervesztést tapasztaltunk az adenocarcinomák esetében: a posztoperatív mintákban az ERCC1-expresszió kezdeti mértékének csupán 1/8-át találtuk ( $p=0,002$ ). Jelentős különbség mutatkozott a markervesztés mértékében a férfiak és nők között (3. ábra). Míg férfiak esetében az expresszió mértéke körülbelül a harmadára csökkent a citosztatikumok hatására ( $p=0,002$ ), addig nőbetegekben ennél jóval kifejezettebb csökkenést tapasztaltunk ( $p=0,003$ ).

Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy nemkissejtes tüdőrákban a platinabázisú kemoterápia hatására jelentősen csökken a tumorszövet ERCC1-expressziója. Ez a megfigyelés összhangban van a korábbi vizsgálatunk eredményével, ugyanakkor a kombinált pontszámérték bevezetése pontosabb elemzést tett lehetővé. Új megfigyelés, hogy az adenocarcinomák esetében kifejezettebb a markervesztés, mint a laphámrákokban. Érdemes hangsúlyozni, hogy nőbetegek tumorszövetében jelentősebb mértékben csökkent az expresszió a kemoterápia hatására, mint a férfibetegekből származó mintákban.

## MEGBESZÉLÉS

Jelen vizsgálati eredményeink a korábbi megfigyelésekkel és a klinikai tapasztalattal összhangban valószínűsítik azt az elképzelést, miszerint a platinabázisú kemoterápiás kezelések hatására a tumorsejtekben szelekciós mechanizmus érvényesül. A tumorszövetben a citotoxikus kezelés hatására csökken az ERCC1 enzim mennyisége, így csökken a platinaszármazékok indukálta DNS-károsodásokat javító repair-rendszer hatékonysága, ezáltal a daganat érzékenyebbé válik a platinavegyületek citotoxikus hatásaival szemben. A klinikai tapasztalat azonban azt mutatja, hogy a betegek egy részénél a kemoterápiára adott biztató terápiás válasz ellenére a hosszabbtávú túlélési mutatók nem javulnak. Korábbi vizsgálatunkban a citotoxikus kemoterápia hatására a Ki-67 expressziójának szignifikáns emelkedése volt megfigyelhető, ami a daganat nagyobb proliferációs aktivitására, agresszívabb biológiai viselkedésére utal. Így tehát valószínűsíthető, hogy a kiszelektálódott tumorsejtek az esetlegesen fokozott platinaérzékenység mellett agresszívabb fenotípusúakká válhatnak.

Munkánk során a vizsgált preoperatív minta bronchoszkópos excízióból, a posztoperatív minta pedig sebészi reszekatumból származott. Felmerül a kérdés, hogy vajon a biopsziából származó apró szövettanmintából és a műtét során eltávolított jóval nagyobb volumenű, heterogén tumorszövetből készült metszetek összehasonlíthatóak-e egymással, az így nyert eredmények hitelesek és reprodukálhatóak-e. Több tanulmány is foglalkozott ezzel a kérdéssel, és különböző markerek – köztük az ERCC1 fehérje – expresszióját vizsgálták a biopsziával nyert mintákban és az azoknak megfelelő

műtéti specimenekben immunhisztokémiai módszerrel. Az ERCC1 tekintetében szignifikáns egyezést tapasztaltak a pre- és posztoperatív mintákban mért markerszintek között (5, 6). Ezek alapján hitelesnek tarthatóak a hasonló metodikával végzett vizsgálatok eredményei. Saját vizsgálatunkban ráadásul kizárólag a kisebb, preoperatív pozitív minták negatívvá válását tapasztaltuk a nagyobb sebési mintákban, ennek ellenkezőjét – ami esetleg metodikai kérdéseket vethetne fel – egyetlen tumorszövet-párnánál sem.

Összefoglalásképpen elmondható, hogy eredményeink alapján feltételezzük, hogy a tüdőrákok kezelésében leggyakrabban alkalmazott citotoxikus kemoterápia elősegítheti az agresszívabb fenotípusú tumorsejtek szelekcióját, illetve, hogy befolyásolhatja a prediktív értékkel bíró szöveti biomarkernek, az ERCC1-nek az expresszióját. Mindez jelentőséggel bírhat a nem-kissejtes tüdőrákok terápiás protokolljainak kidolgozásakor.

A jövőben saját kutatásunk nagyobb esetszámmal való folytatását és további markerek vizsgálatával történő kiegészítést tervezzük, de emellett hasznos tapasztalatok szerezhetők e marker vizsgálatával platinabázisú kemoterápiával kezelt, egyéb daganatban – mint pl. ovariumcarcinómában – szenvedő betegek vizsgálata esetében.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetet mondanak a Magyar Klinikai Onkológiai Társaságnak és a Janssen-Cilag Kft-nek, hogy támogatásuk révén lehetővé vált a fenti vizsgálat elvégzése. Köszönet illeti emellett Dr. Kenessey Istvánt a statisztikai kiértékelésben, valamint Tamási Annát az immunhisztokémiai vizsgálatokban nyújtott segítségért.

## IRODALOM

1. A Pulmonológiai Intézmények 2009. évi epidemiológiai és működési adatai. Korányi Bulletin, 2. szám, 2010
2. Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: The role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 14:1291–1295, 2008
3. Meert AP, Martin B, Verdebout JM, et al. Correlation of different markers (p53, EGF-R, c-erbB-2, Ki-67) expression in the diagnostic biopsies and the corresponding resected tumors in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 44: 295–301, 2004
4. Pápay J, Sápi Z, Egri G, et al. Platinum-based chemotherapy in lung cancer affects the expression of certain biomarkers including ERCC1. *Pathol Oncol Res* 15:445–450, 2009
5. Taillade L, Penault-Llorca F, Boulet T, et al. Immunohistochemical expression of biomarkers: a comparative study between diagnostic bronchial biopsies and surgical specimens of non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 18:1043–1050, 2007
6. Zheng Z, Chen T, Li X, et al. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N Engl J Med* 356:800–808, 2007