

# Nöroblastomda Survivin'in İlaç Direncinin Belirlenmesindeki Rolü

## Role of Survivin in Determination of Chemoresistance in Neuroblastoma

Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR,<sup>a</sup>  
Dr. Safiye AKTAŞ,<sup>a</sup>  
Dr. Zekiye ALTUN,<sup>a</sup>  
Dr. Nur OLGUN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi  
Onkoloji Enstitüsü, İzmir

Geliş Tarihi/Received: 28.07.2010  
Kabul Tarihi/Accepted: 24.05.2011

*Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu makalenin özeti, 15. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi (21-25 Mayıs 2008, Çeşme)'nde poster bildirisi olarak sunulmuş ve "Pediatrik Onkoloji Araştırma Poster Ödülünü" kazanmıştır.*

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR  
Dokuz Eylül Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Tıp AD, İzmir,  
TÜRKİYE/TURKEY  
zubeyde.erbayraktar@deu.edu.tr

**ÖZET Amaç:** Nöroblastom tedavisinde kullanılan sitotoksik ajanların bazıları etkilerini apoptoz mekanizmaları üzerinden göstermektedir. Apoptoz mekanizmaları ve ilaç etkileşimleri, üzerinde güncel çalışılan konulardır. Bcl-2, intrinsek yolakta apoptoz inhibitörüdür. Bax, Bcl-2 protein ailesinin bir üyesi olup apoptoz agonisti olarak davranır. Fas, transmembran bir protein olup ekstrinsek yolakta apoptozu uyarır. Apoptoz inhibitör protein ailesinin bir üyesi olan survivin ise, doğrudan kaspaz 3 ve kaspaz 7'yi inhibe ederek apoptozu önler. Bu çalışmanın amacı nöroblastom hücre kültür hattında apoptoz ilişkili proteinlerin kemoterapötik ajanlarla etkileşiminin araştırılmasıdır. **Gereç ve Yöntemler:** Kelly insan nöroblastom hücrelerine, retinoik asit ve sitotoksik ajanlar (sisplatin, vinkristin, siklofosfamid, etoposid, doksorubisin) ile bunların kombinasyonları; LD50 optimize edilmiş dozlarında 96 kuyucuklu kültür ortamında uygulandı. Apoptoz ilişkili proteinlerden Fas, Bcl-2, Bax ve survivin ekspresyonları immünohistokimyasal olarak belirlendi. **Bulgular:** İlaç uygulanmayan kontrol grubu nöroblastom hücreleri Fas negatif iken, retinoik asit, sitotoksik ajanlar ve kombinasyonlarında değişik düzeylerde Fas ekspresyonu gözlenmiştir. Bcl-2 kontrolde belirgin pozitif iken, sisplatin, etoposid, retinoik asit-sisplatin kombinasyonu gruplarında negatiftir. Bax kontrolde negatif iken, retinoik asit ve retinoik asit-etoposid, retinoik asit-doksorubisin kombinasyonlarında belirgin pozitifdir. Survivin kontrolde negatif iken retinoik asit, sisplatin, retinoik asit-sitotoksik ajan kombinasyonlarında pozitifdir. **Sonuç:** Apoptoz üzerinden etki eden sitotoksik ajanların ve retinoik asitin uygulanması sonrası ekstrinsek yolak başlatıcı Fas ekspresyonu ortaya çıkmıştır. İntrensek yolakta ise uygulanan ajanlarla antiapoptotik Bcl-2 ekspresyon azalışı, özellikle retinoik asit ve bazı kombinasyonlarında apoptoz agonisti Bax ekspresyonunun artışı dikkati çekmiştir. Buna karşın intrinsek ve ekstrinsek yolagin bulunduğu kaspaz ortak sisteminin inhibitörü olan Survivin ekspresyonu artmıştır. Sonuç olarak; nöroblastomda kötü prognostik kriter olarak bilinen 17q kazanç bölgesinde yer alan antiapoptotik etkili survivinin kemorezistans rolünün bulunduğu ve bu konuda daha ileri düzeyde araştırmaların yapılması gerektiği öngörülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Nöroblastoma; apoptoz; BIRC5 protein, insan

**ABSTRACT Objective:** Some of the cytotoxic agents used in treatment of neuroblastoma show their effects via apoptosis mechanisms. Apoptosis mechanisms and drug interactions are currently studied topics. Bcl-2 is an inhibitor of apoptosis in intrinsic pathway. Bax is a member of Bcl-2 protein family and acts as an apoptosis agonist. Fas is a transmembrane protein and stimulates apoptosis in extrinsic pathway. Survivin, which is a member of apoptosis inhibitor protein family, prevents apoptosis by directly inhibiting caspase 3 and caspase 7. The aim of this study is to investigate the interaction of apoptosis-related proteins with chemotherapeutic agents in neuroblastoma cell culture line. **Material and Methods:** Retinoic acid and cytotoxic agents and combinations of these (cisplatin, vincristine, cyclophosphamide, etoposide, doxorubicin) were applied into 96-well culture plates in LD50 optimized doses. Expressions of Fas, Bcl-2, Bax and survivin, which are among apoptosis-related proteins were determined immunohistochemically. **Results:** While neuroblastoma cells of control group to which medication was not administered were Fas negative, varying levels of Fas expression was detected in retinoic, cytotoxic agent and combination administered groups. While Bcl-2 was predominantly positive in the control group, it was negative in cisplatin, etoposide, retinoic acid-cisplatin combination groups. While Bax was negative in control group, it was predominantly positive in retinoic acid, retinoic acid-etoposide, retinoic acid, doxorubicin combinations. While survivin was negative in control group, it was positive in retinoic acid, cisplatin, retinoic acid-cytotoxic agent combinations. **Conclusion:** Extrinsic pathway promoter Fas expression appeared after administration of cytotoxic agents and retinoic acid showing their effects via apoptosis. On the other hand, in intrinsic pathway, decrease in anti-apoptotic Bcl-2 expression with administered agents and increase in apoptosis agonist Bax expression especially with retinoic acid and some combinations of it were remarkable. On the other hand, expression of survivin increased which is the inhibitor of caspase common system in which intrinsic and extrinsic pathways come together. In conclusion, it is concluded that further research should be done about the role of antiapoptotic survivin which is located in 17q gain region and known as a poor prognostic criteria in neuroblastoma play a role in chemoresistance.

**Key Words:** Neuroblastoma; apoptosis; BIRC5 protein, human

doi:10.5336/medsci.2010-20466

Copyright © 2011 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2011;31(5):1087-93

**N**öroblastom, çocukluk çağının en sık görülen, yüksek morbidite ve mortaliteye sahip olan ekstrakraniyal solid tümördür. Primordial nöral krest hücrelerinden köken alır. Tüm çocukluk çağı kanserlerinin %8-10'unu oluşturur. Bir yaş altındaki çocukların en sık görülen tümörü olan nöroblastom, çocukluk yaş grubunda santral sinir sistemi tümörlerinden sonra ikinci sıklıkta görülür. Tümörün biyolojik davranışındaki değişiklik nedeniyle, nöroblastom spontan regresyonlar, benign transformasyon ya da agresif seyir gösterebilmekte, bu durum hastalığın prognozunu belirlemede ve tedavisinde sorunlara yol açmaktadır.<sup>1,2</sup> Özellikle ileri evre hastalarda, multimodal tedavi yaklaşımlarına ve yoğun protokollere rağmen iki yıllık hastaliksız yaşam süresi %30-40'larda seyretmektedir.<sup>2</sup> Bu durum da, nöroblastom progresyonundan ve tedavi direncinden sorumlu moleküler genetik lezyonların daha iyi anlaşılmasıyla geliştirilecek olan yeni tedavi yaklaşımlarının araştırılmasını gerektirmektedir.

Apoptozis, efektör kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanan, hem ekstrinsek (ölüm reseptörleri) hem de intrinsek (mitokondriyal) yollarla başlatılabilen aktif bir süreçtir. Aktive edilmiş reseptörler tarafından salgılanan, hedef hücrelerde apoptozu direkt olarak uyaran bazı polipeptidler, programlanmış hücre ölümü sinyalleridir. Bu hücre ölüm sinyalleri tümör nekroz faktörü (TNF) ailesine ait polipeptidlerdir. Bunlar, TNF ilişkili apoptozis uyarıcı ligandlara (TRAIL) bağlanıp normal hücreleri koruyarak sadece transforme hücrelerde seçici olarak hücre ölümünü uyabilirler. Bu ailenin en iyi tanımlanmış üyelerinden birisi, bağırsıklık sisteminde hücre ölümünü kontrol eden, Fas denilen hücre yüzey reseptörüdür. TRAIL agonistleri birçok kanser tedavisinde umut verici bir adaydır. TRAIL aracılı apoptozis, ölüm reseptörleri yolağının aktivasyonu sonucunda gerçekleşir. TRAIL kendi reseptörleri olan TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 ile etkileştikten sonra, reseptörlerin sitozolik bölümü adaptör protein FADD ve başlatıcı kaspaz-8 ile bağlanarak DISC (Death Induced Signaling Complex) adı verilen bir protein kompleks oluşturur. Sonuçta kaspaz-8 aktivasyonu meydana gelir ve böylece hücre ölümü ile sonuçlanacak olan

bir kaspaz kaskadı başlar. Diğer taraftan kaspaz-8 tarafından Bid'in kesilmesi, Bid'in mitokondriye geçişine, Bax/Bak oligomerizasyonuna ve zarı parçalayarak sitozole sitokrom C salınmasına olanak sağlar. Sitokrom C'nin mitokondriden salınımı Apaf-1 ve kaspaz-9'u içeren Apoptozom oluşumuna neden olur. Bu kaspaz-9 aktivasyonuna yol açar, bu da kaspaz-3'ün aktivasyonunu artırır. Böylece hücre ölüm reseptörlerinin kaspaz-8'i direkt olarak aktive etmesi ile her iki yolak da aktive olmakta ve kaspaz yolağının daha da çok kuvvetlenmesiyle hücre ölümü gerçekleşmektedir.<sup>3,4</sup>

Survivin geni, 17. kromozomun telomerik bölgesinde q25 bandına lokalize olup, 14.7 kb uzunluğundadır ve 142 amino asit içeren 16.5 kD ağırlığında bir protein kodlar. Survivin, apoptozis inhibitörü protein (IAP) ailesinin bir üyesi olup kaspaz aktivasyon yolağını inhibe ederek hücre ölümünü bloke eden antiapoptotik bir proteindir. Bu fonksiyonel özelliği nedeniyle, tümör hücrelerinin proliferasyonunu başlatır, diferansiyasyonunu azaltır ve apoptozise gitmelerini engeller. Yapılan çalışmalarda, insan malign dokularının birçoğunda yüksek düzeylerde Survivin ekspresyonunun gözlemlendiği, buna karşın normal sağlıklı dokularda ekspresyon olmadığı veya eser düzeylerde ekspresyonu bildirilmektedir.<sup>4,5</sup> Survivin, tümör hücrelerinin apoptozise direncini artırarak bazı antikanser ajanlar ve iyonize radyasyona karşı tümörün duyarsızlaşmasına neden olduğundan, yeni terapötik yaklaşımlar için çok ideal bir moleküler hedef olarak öngörülmektedir.<sup>5</sup>

Bu çalışmanın amacı, nöroblastom hücre hattında kemoterapötik ajanların Fas, Bcl-2, Bax ve Survivin ekspresyonu üzerine etkisini araştırmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Kelly (N-Myc pozitif) N8a hücre hattında sisplatin 0.5 mmol/L, vinkristin 0.01 mmol/L, etoposid 0.1 mmol/L, siklofosamid 2.5 mmol/L, doksorubisin 25 nmol/L ve 13-cis-RA 0.0001 mol/L ile kombine şekilde 24 saat süreyle inkübe edildi. Fas, Bcl-2, Bax ve survivin ekspresyonları immünohistokimyasal olarak belirlendi.

## HÜCRE KÜLTÜRÜ

Kelly insan NB hücre hattı (DSMZ, ACC 355) üzerine retinoik asit (RA), sitotoksik ajanlar (sisplatin, vinkristin, siklofosfamid, etoposid, doksorubisin) ve bunların kombinasyonları; LD50 optimize edilmiş dozlarında 96 kuyucuklu kültür ortamında uygulandı. Yüzde elli letal doz optimizasyonunda MTT test kullanıldı. Hücre hattı %10 fetal sıgır serumu içeren RPMI 1640 ortamı ile 37°C, %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde kültüre edildi. Hücre büyüme ve çoğalması %99 olduğunda hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü plağına 5000 hücre/kuyucuk olmak üzere her bir kuyucuğa 100 µL ekim yapıldı. Yetmiş iki saatlik inkübasyondan sonra, RA ve sitotoksik ajanlar ve bunların kombinasyonları hücre içeren kuyucuklara uygulanıp 24 saat inkübe edildi.

## KEMOTERAPÖTİK AJANLAR

13-cis-RA (Sigma, R3255, Germany) ışıktan korunarak 0.01 g tartıldı, 10 mL %96'lık etil alkol ile çözüldü. Sisplatin (Sigma, P4394, Germany) ışıktan korunarak 0.003 g tartıldı, 10 mL kültür ortamı ile çözüldü. Vinkristin (Vinkristin sülfat, Mayne, 1 mg/mL), flakondan kültür ortamı ile sulandırılıp 0.01 mg/mL konsantrasyonunda hazırlandı. Siklofosfamid (Endoksan, Baxter, 261.085 g/mol) 0.001 g tartılarak 10 mL serum fizyolojik ile çözüldü. Etoposid (Fytosid, Dabur, 100 mg/5 mL), flakondan ortam ile sulandırılıp 100 µmol/mL konsantrasyonunda ilaç hazırlandı. Doksorubisin (Adriplastina, Deva, 10 mg/flakon) 0.0001 g tartılarak 10 mL serum fizyolojik ile çözüldü.

İlaçların hazırlanan stok konsantrasyonlarından farklı konsantrasyon denemeleri yapılarak her ilaç için Kelly hücreleri üzerindeki LD50 dozları hesaplandı.

## İMMÜNOSİTOKİMYA

İmmünohistokimya testi, direkt 96 kültür plağındaki kuyucuklara uygulanmıştır. Bu basamaklar oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Kültür plağı, PBS (Phosphat Buffered Saline, pH 7.4) ile 10'ar dakikalık sürelerle iki defa yıkandı. Fiksasyon için %99 etanol ile 15 dakika inkübe edildi. Plak, giderek azalan alkol konsantrasyonlarında (%99, %95, %80, %70; her birinde beş dakika) rehidrate edildi,

daha sonra %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 10 dakika bekletilerek en-dojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Her aşamadaki yıkamalar PBS ile gerçekleştirildi. Bloke edici antikorun beş dakika uygulanması ile spesifik olmayan bağlanmalar bloke edildikten sonra, primer antikorlar (Fas (CD95), DBS-Mob 107; Bcl-2, DBS-Mob 247; Bax, DBS-Mob 246; Survivin, Santa Cruz Inc. USA) 1:100 dilüsyonda iki saat süreyle uygulandı. Streptavidin-biotin tekniği ile çalışan iki aşamalı universal kit (DBS, KP-50L) kullanıldı. Kromojen olarak diaminobenzidin solüsyonu (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), zıt boyama için Mayer's hematoksilen boyası uygulandı. İki kuyucuk negatif kontrol olarak sadece PBS ile inkübe edildi. Ekspresyonlar negatif, hafif, orta ve yüksek ekspresyon olarak inverted mikroskopta derecelendirildi. Nükleer ekspresyonlar dikkate alındı. Canlı hücrelerde nükleer lokalizasyonda pozitif boyanma %10'un altı negatif, %11-30 hafif (+), %31-50 orta (++), %50'nin üzeri yüksek (+++) ekspresyon olarak değerlendirildi.

## BULGULAR

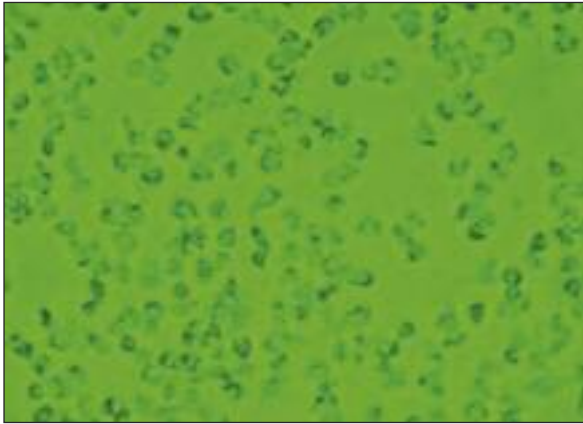
Fas, Bcl-2, Bax ve Survivin'in uygulanan ajanlar ve kombinasyonları ile ekspresyon değişimleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

İlaç uygulanmayan kontrol grubu nöroblastom hücreleri Fas negatif iken (Resim 1), retinoik

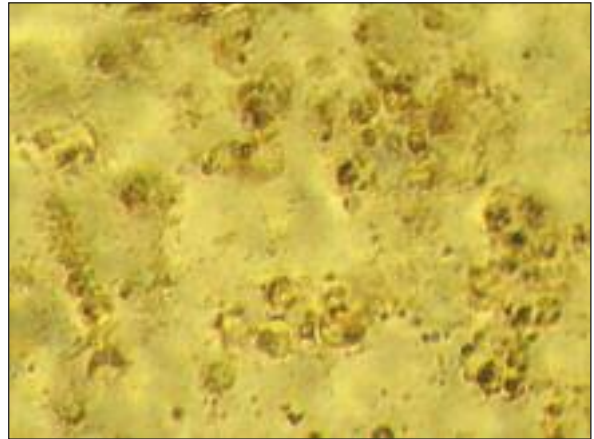
**TABLO 1:** Nöroblastom hücre hattında sitotoksik ajanların, retinoik asit ve kombinasyonlarının Fas, Bcl-2, Bax ve Survivin üzerine etkileri

Gruplar	Fas	Bcl-2	Bax	Survivin
Kontrol	-	+++	-	-
RA	+++	+	++	+++
Sisplatin	+++	-	-	+++
Vinkristin	-	++	-	-
Siklofosfamid	+	+	-	++
Etoposid	+	-	-	+
Doksorubisin	+++	+++	+	+++
RA + Sisplatin	+++	-	-	+
RA + Vinkristin	++	+	-	++
RA + Siklofosfamid	+	+	-	++
RA + Etoposid	+	++	++	++
RA + Doksorubisin	++	++	++	++

RA: Retinoik asit.



**RESİM 1:** Kelly insan nöroblastom kontrol hücrelerinde Fas negatifliği (DAB x 100).



**RESİM 2:** Sisplatin uygulaması sonrası artmış Fas pozitifliği (DAB x 100).

asit, sitotoksik ajanlar ve kombinasyonlarında değişik düzeylerde Fas ekspresyonu gözlenmiştir (Resim 2). Bcl-2 kontrolde belirgin pozitif iken (Resim 3), sisplatin, etoposid, retinoik asit-sisplatin kombinasyonu gruplarında negatiftir. Bax kontrolde negatif iken, retinoik asit ve retinoik asit-etoposid, retinoik asit-doksorubisin kombinasyonlarında belirgin pozitifdir. Survivin kontrolde negatif (Resim 4) iken retinoik asit, sisplatin, retinoik asit-sitotoksik ajan kombinasyonlarında pozitifdir (Resim 5).

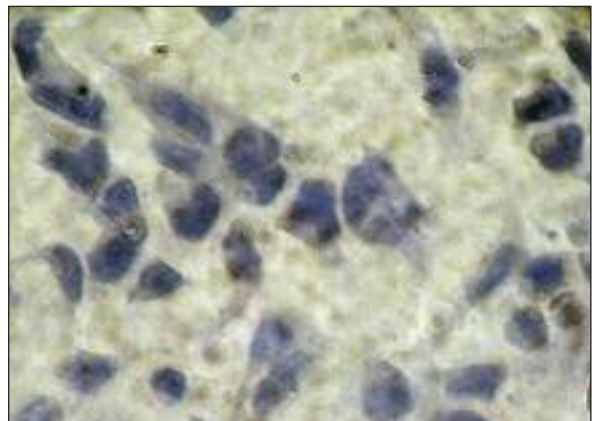
## TARTIŞMA

Bugün dünyada uygulanan nöroblastom tedavi protokollerinin çoğunda patoloji ve genetik, hastalığın tanısında, tedavisinin düzenlenmesinde ve

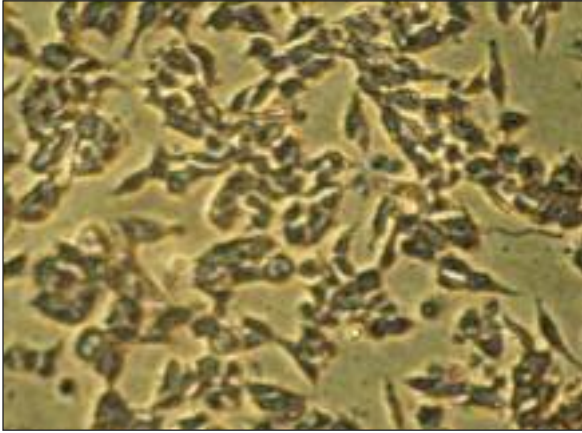
prognozun belirlenmesinde çok önemlidir. Son yıllarda tümör biyolojisi hakkında bilgilerin artmasına, lokalize hastalıkta kombine tedavi protokolleri ile başarı sağlanmasına karşın, özellikle bir yaş üzeri ileri evre hastaların (E3+E4) prognozunda belirgin bir iyileşme sağlanamamıştır. Asıl problem evre 3 (E3) ve özellikle de evre 4 (E4)'dedir. Olguların yarısından fazlasının E3 ve E4'de tanı aldığı göz önüne alınırsa nöroblastomlu hastaların büyük bir kısmında bugünkü yoğun protokoller (apoptotik, antianjiyogenik, retinoid türevleri gibi diferansiye edici ajanlar), kök hücre desteği ve immunoterapi yaklaşımlarına rağmen halen istenen başarı elde edilememektedir. Dolayısıyla, nöroblastom progresyonundan ve tedavi direncinden sorumlu moleküler genetik lezyonla-



**RESİM 3:** Kelly insan nöroblastom kontrol hücrelerinde Bcl-2 nükleer pozitifliği (DAB x 100).



**RESİM 4:** Kontrol nöroblastom hücrelerinde Survivin negatifliği (DAB x 400).



**RESİM 5:** Kontrol nöroblastom hücrelerinde Survivin negatifliği (DAB x 400).

rın daha iyi anlaşılmasıyla geliştirilecek olan daha az toksik ve daha etkin yeni tedavi yaklaşımlarına gereksinim bulunmaktadır.<sup>6</sup>

Günümüzde nöroblastom tedavisinde araştırılan alternatif yaklaşımlar arasında, apoptozu farklı mekanizmalarla indükleyen yeni moleküler ajanlar, kaspaz bağımlı ve kaspaz bağımsız yolların hedeflendiği stratejiler, ilaç rezistansından sorumlu antiapoptotik mekanizmaları tetikleyen moleküllerin blokajına yönelik uygulamalar ve çeşitli epigenetik modifikasyonlar bulunmaktadır. Bunlardan birisi de, özellikle evre 4 hastalarda tanımlanmış olan survivin-spesifik T hücrelerine karşı geliştirilen DNA aşılardır.<sup>7</sup> Çalışmamızda intrensek ve ekstresek yolağın bulunduğu kaspaz ortak sisteminin inhibitörü olan survivin kontrol grubunda negatif iken retinoik asit, sisplatin, retinoik asit-sitotoksik ajan kombinasyonlarında pozitif bulunmuştur. Bu bulgu, survivin'in ortamda herhangi bir ajan bulunmadığında eksprese edilmediğini ancak, tümörü tedavi etmek için verilen kemoterapötik bir ajan varlığında indüklenerek ekspresyonunun arttığını göstermektedir. Survivin'in artan ekspresyon düzeyleri istenmeyen bir sonuçtur, çünkü kemoterapötik ilacın etkinliğini azaltıcı bir etki oluşturarak onkolojideki tedavi başarısını düşürmektedir. Son çalışmalar, survivin'in bu olumsuz etkilerini ortadan kaldırmaya yönelik araştırmalardır.<sup>8-10</sup>

Çalışmamızda, Fas ekspresyon düzeylerinin kontrol grubunda negatif iken retinoik asit, sito-

toksik ajanlar ve kombinasyonlarında pozitif olarak gözlenmiş olması, nöroblastom hücrelerinde uygulanan kemoterapötik ajanların ekstresek yolağ aracılığıyla apoptozu uyularak tümör hücrelerinde ölüme yol açtıklarını desteklemektedir.

Antikanser tedaviler, sitotoksik etkilerini başlıca tümör hücrelerinde proliferasyonu durdurarak, diferansiyasyonu arttırarak ve apoptozisi uyularak gerçekleştirirler.<sup>11-14</sup> Tedavide sitoredüktif ajanın net etkisi, proapoptotik ve antiapoptotik sinyaller arasındaki etkileşme sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu etkileşimde rol oynayan çok sayıda efektör molekül vardır, bunların en önemlisi kaspazlardır. Apoptozda kaspaz aktivasyonunun başlatılması basamağı, kemoterapötik ajanın etki gücünü belirleyen kritik bir basamaktır. Son çalışmalar, çeşitli intrasellüler proteinlerin hücre içinde yeterli düzeylerde bulduklarında apoptozisi inhibe ettiklerini göstermektedir.<sup>15,16</sup>

Bu basamaklarda apoptozisi inhibe eden protein (IAP) ailesinin bir üyesi olan survivin, nöroblastomda kötü prognozu gösteren bir molekül olup kemoterapötiklerin etki güçlerini azaltıcı yönde rol oynayarak ilaç direncinin ortaya çıkmasını kolaylaştırmaktadır.<sup>17</sup> Bu anlamda, aktivasyon yetersizlikleri veya aktivasyonun inhibisyonu gibi kaspaz aktivasyonundaki bozukluklar tümör hücrelerinde kemorezistansın ortaya çıkmasına neden olmaktadır.<sup>18</sup>

Özellikle ileri evre nöroblastomda, ilaç direnci ortaya çıkıncaya dek yani henüz tedavinin başlangıç döneminde sitoredüktif tedavilere cevap alınabilmektedir. Ancak burada programlanmış hücre ölümü ile ilişkili genetik farklılıklar tedaviye yanıtta önemli rol oynamaktadır. Hücrelerin neoplastik transformasyona karşı korunmasında ve sitotoksik ajanların etkilerini oluşturabilmesinde sağlam bir apoptozis yolağının varlığı gerekmektedir. Hücre ölümü ile ilişkili bu yollardaki aksaklıklar onkogenlerin deregülasyonuna neden olarak tümörigenez sürecini başlatmakta ve tedavi direncinin gelişimine zemin hazırlamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarla, tedavi direncinden sorumlu tutulabilecek mekanizmaların açıklanmasına ve bu mekanizmalarda rol oynayan moleküllerin ortaya

çıkartılmasına yönelik önemli bilgiler elde edilmiştir.<sup>19-21</sup>

Çalışmamızda, intrinsek yolda antiapoptotik etki gösteren Bcl-2 ekspresyonunun kontrol grubunda belirgin pozitif iken nöroblastom hücre kültürü ortamına uygulanan sisplatin, etoposid ve retinoik asit-sisplatin kombinasyonu gruplarında negatif olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu, sisplatin ve etoposid ile antiapoptotik etkinliğin daha belirgin oluşturulduğunu göstermekte ve bu kemoterapötiklerin antitümöral etki potansiyellerini desteklemektedir. Buna karşın, özellikle retinoik asit ve doksorubisin ile apoptoz agonisti Bax ekspresyonunda bir artış olduğu gözlenmiştir. Bcl-2 ve Bax proteinleri üzerinde daha etkin bulunan sisplatin, etoposid ve doksorubisin hücre siklusunda DNA üzerine etki ederek apoptoza yol açan ajanlardır. Burkitt's lenfoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada, DNA hasarı yaparak antitümöral etkinlik gösteren ilaçların, p53 geninden bağımsız olarak bu etkilerini gerçekleştirdikleri ve survivin ekspresyonlarını belirgin bir şekilde arttırdıkları bildirilmektedir.<sup>22</sup> Diğer taraftan vinkristin uygulanan hücrelerde, kontrol grubu hücrelerine benzer bir şekilde antiapoptotik Bcl-2 ekspresyonu gözlenirken, Fas, Bax ve survivin ekspresyonları negatif bulunmuştur. Bu ilginç bulgu, bir mitoz inhibitörü olan vinkristin tedavisi verilen nöroblastom hücrelerinde, tedavinin uygulanma süresi ile ilişkili olarak survivin ekspresyonunun henüz tetiklenmediğini düşündürmektedir. Cheung ve ark. tarafından, tedavi direncinin gelişiminden sorumlu tutulan survivinin, hücre siklusunda G<sub>2</sub>M fazındaki mikrotübül stabilizasyonunu engelleyerek vinkristin ve taksol gibi çoğu antikanser ajana karşı direnç gelişiminde önemli rol oynadığı bildirilmektedir.<sup>23</sup>

Bununla birlikte, retinoik asit ve sisplatin tek başlarına verildiğinde Fas ekspresyonu ile birlikte survivin ekspresyonunun da arttığı, ikisi birlikte kombine edilerek verildiğinde ise, Fas ekspresyonunun artarken survivin ekspresyonunun azaldığı

gözlenmiştir. Bulgularımız, nöroblastomda apoptotik yola ile ilişkili araştırılmış olan alternatif tedavi yaklaşımlarını içeren çalışmalar ile uyumludur<sup>24-28</sup> ve survivin üzerine en etkili ilaç kombinasyonunun retinoik asit ve sisplatin olduğunu desteklemektedir.

Ancak kemoterapötik ilaçlar non-spesifik olduklarından tümör hücresiyle birlikte normal hücrelere de oldukça toksik etki oluşturmaktadır; bundan dolayı apoptoz sinerjisi ile birlikte survivin inhibisyonu yapabilecek alternatif ve daha az toksik tedavi stratejileri geliştirilmesi oldukça yararlı olabilir.

Günümüzde özellikle ileri evre nöroblastom hastalarının tedavisinde uygulanan yoğun kemoterapi protokolleri ile hastanın yaşam süresi uzayabilmektedir. Ancak yaşam süresinin uzaması ile birlikte, tüm dünyada önemli bir problem olan geç relapsların görülme sıklığı da artmaktadır. Tedavinin kesilmesinden sonra özellikle birinci yıldan sonra ortaya çıkan geç relapsların sorumlusu olarak minimal rezidüel hastalık varlığı düşünülmektedir. Dolayısıyla minimal rezidüel hastalığı ortadan kaldırmaya yönelik idame tedavileri giderek önem kazanmaktadır.<sup>29-32</sup>

Sonuç olarak, nöroblastomda kötü prognostik kriter olarak bilinen 17q kazanç bölgesinde yer alan antiapoptotik etkili survivinin kemorezistansta rolünün bulunduğu ve bu konuda daha ileri düzeyde araştırmaların yapılması gerektiği, böylece önemli yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebileceği öngörülmektedir. Kronik bir hastalık olan nöroblastomda uygulanacak olan retinoik asit ile kombine sisplatin içeren metronomik tedavi uygulamaları ile, tedavi direncinin azaltılacağı yönünde olumlu bir gelişme sağlanabileceği düşünülmektedir. Bu konuda da yapılacak olan ileri farmakokinetik çalışmalarla, doz optimizasyonlarının düzenlenmesinin ve kişiye özel tedavi protokollerinin oluşturulmasının gerekliliği, bu çalışmamız ile bir kez daha vurgulanmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1999;17(7):2264-79.
2. Olgun N, Kansoy S, Aksoylar S, Cetingul N, Vergin C, Oniz H, et al. Experience of the Izmir Pediatric Oncology Group on Neuroblastoma: IPOG-NBL-92 Protocol. *Pediatr Hematol Oncol* 2003;20(3):211-8.
3. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(6805):770-6.
4. Goldsmith KC, Hogarty MD. Targeting programmed cell death pathways with experimental therapeutics: opportunities in high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett* 2005;228(1-2):133-41.
5. Li C, Wu Z, Liu M, Pazgier M, Lu W. Chemically synthesized human survivin does not inhibit caspase-3. *Protein Sci* 2008;17(9):1624-9.
6. Matthay KK, Perez C, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Atkinson JB, et al. Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 1998;16(4):1256-64.
7. Zenclussen AC, Michalsky E, Jaeger IS, Preissner R, Hohn O, Weixler S, et al. Survivin minigene DNA vaccination is effective against neuroblastoma. *Int J Cancer* 2009;125(1):104-14.
8. Fukuda S, Abe M, Onishi C, Taketani T, Puvrevsuren J, Yamaguchi S, et al. Survivin selectively modulates genes deregulated in human leukemia stem cells. *J Oncol* 2011;2011:946936.
9. Fukuda S, Singh P, Moh A, Abe M, Conway EM, Boswell HS, et al. Survivin mediates aberrant hematopoietic progenitor cell proliferation and acute leukemia in mice induced by internal tandem duplication of Flt3. *Blood* 2009;114(2):394-403.
10. Kita A, Nakahara T, Yamanaka K, Nakano K, Nakata M, Mori M, et al. Antitumor effects of YM155, a novel survivin suppressant, against human aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Res* 2011 Jan 13; doi:10.1016/j.leukres.2010.11.016
11. Sandler A, Scott D, Azuhata T, Takamizawa S, O'Dorisio S. The survivin:Fas ratio is predictive of recurrent disease in neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2002;37(3):507-11.
12. Miller MA, Ohashi K, Zhu X, McGrady P, London WB, Hogarty M, et al. Survivin mRNA levels are associated with biology of disease and patient survival in neuroblastoma: a report from the children's oncology group. *J Pediatr Hematol Oncol* 2006;28(7):412-7.
13. Kuwana T, Newmeyer DD. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(6):691-9.
14. Wang Z, Cuddy M, Samuel T, Welsh K, Schimmer A, Hanai F, et al. Cellular, biochemical, and genetic analysis of mechanism of small molecule IAP inhibitors. *J Biol Chem* 2004;279(46):48168-76.
15. Hellebrekers DM, Griffioen AW, van Engeland M. Dual targeting of epigenetic therapy in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007;1775(1):76-91.
16. Eggert A, Grotzer MA, Zuzak TJ, Wiewrodt BR, Ho R, Ikegaki N, et al. Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res* 2001;61(4):1314-9.
17. Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions. *J Cell Mol Med* 2005;9(2):360-72.
18. Fulda S. Exploiting mitochondrial apoptosis for the treatment of cancer. *Mitochondrion* 2010;10(6):598-603.
19. Azuhata T, Scott D, Griffith TS, Miller M, Sandler AD. Survivin inhibits apoptosis induced by TRAIL, and the ratio between survivin and TRAIL receptors is predictive of recurrent disease in neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2006;41(8):1431-40.
20. Guin S, Ma Q, Padhye S, Zhou YQ, Yao HP, Wang MH. Targeting acute hypoxic cancer cells by doxorubicin-immunoliposomes directed by monoclonal antibodies specific to RON receptor tyrosine kinase. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;67(5):1073-83.
21. Arlt M, Haase D, Hampel S, Oswald S, Bachmatiuk A, Klingeler R, et al. Delivery of carboplatin by carbon-based nanocontainers mediates increased cancer cell death. *Nanotechnology* 2010;21(33):335101.
22. Simões Magluta EP, Vasconcelos FC, Maia RC, Klumb CE. Insights into apoptosis mechanisms induced by DNA-damaging agents in Burkitt's lymphoma cells. *Cancer Invest* 2009;27(8):830-5.
23. Cheung CH, Chen HH, Kuo CC, Chang CY, Coumar MS, Hsieh HP, et al. Survivin counteracts the therapeutic effect of microtubule de-stabilizers by stabilizing tubulin polymers. *Mol Cancer* 2009;8:43.
24. Modak S, Cheung NK. Neuroblastoma: Therapeutic strategies for a clinical enigma. *Cancer Treat Rev* 2010;36(4):307-17.
25. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Pediatr Clin North Am* 2008;55(1):97-120, x.
26. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am* 2010;24(1):65-86.
27. Mueller S, Matthay KK. Neuroblastoma: biology and staging. *Curr Oncol Rep* 2009;11(6):431-8.
28. Pastorino F, Di Paolo D, Loi M, Becherini P, Caffa I, Zorzoli A, et al. Recent advances in targeted anti-vasculature therapy: the neuroblastoma model. *Curr Drug Targets* 2009;10(10):1021-7.
29. Gleissman H, Segerström L, Hamberg M, Ponthan F, Lindskog M, Johnsen JI, et al. Omega-3 fatty acid supplementation delays the progression of neuroblastoma in vivo. *Int J Cancer* 2011;128(7):1703-11.
30. Jubert C, Wall DA, Grimley M, Champagne MA, Duval M. Engraftment of unrelated cord blood after reduced-intensity conditioning regimen in children with refractory neuroblastoma: a feasibility trial. *Bone Marrow Transplant* 2011;46(2):232-7.
31. Kushner BH, Kramer K, Modak S, Akhurst TJ, Cheung NK. A focal lesion in the falx cerebri: Harbinger of classic stage 4 neuroblastoma in an infant cured despite residual disease after minimal therapy. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53(7):1340-2.
32. Yamane BH, Hank JA, Albertini MR, Sondel PM. The development of antibody-IL-2 based immunotherapy with hu14.18-IL2 (EMD-273063) in melanoma and neuroblastoma. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18(7):991-1000.