

İlaç Dirençliği

Doç. Dr. Meral BEKSAÇ*

Kemoterapi ile erişkin tümörlerinin ancak az bir kısmının (örneğin Hodgkin, Non-Hodgkin lenfoma, akut lösemi, teratoma) tamamen şifası mümkün olabilmektedir. Solid tümörlerin ise çoğunluğunda kemoterapiye yanıt %20'nin altında kalmakta ve ancak küçük hücreli akciğer kanseri, över kanseri ve meme kanserinde yaşam süresini uzatmak mümkün olabilmektedir. Şifa elde edilebilen tümörlerde bile nüks veya direnç gelişebilmektedir. Bu direnç durumu de novo (yani birincil) olabileceği gibi ilaç tedavisini izleyerek in vivo gelişebilmektedir (ikincil). Buna neden olan birçok mekanizma tanımlanmıştır; Multidrug resistance (mdr), glutathion transferazlar ve DNA onarımı gibi. Bu mekanizmaların anlaşılması tedavi girişimlerinin etkinliğinin artırılmasını sağlayabilir (1).

İlaç rezistansına neden olan farmakokinetik mekanizmalar ilaç uygulamasından hedef doku/hücrelere iletme kadar değişik basamaklarda oluşmaktadır. Bu mekanizmaları incelemek için değişik in vitro modeller oluşturulmuş ve in vivo uygulamalar ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu konuda öncülüğü yapan Weisenthal 1983'te hematolojik neoplazmlarda solid tümörlere oranla daha iyi bir in vivo-in vitro ilişki göstermiştir (2). Beksaç ve ark. çalışmasında da in vitro ilaç rezistansı ile in vivo rezistans arasında %90 korelasyon gösterilirken in vitro duyarlılık ile in vivo arasında ancak %60 paralellik gösterilebilmiştir (1988) (3).

Çok İlaç Dirençliliği (mdr)

Bu mekanizma oldukça sıklıkla rastlanılabilen ve genellikle kemoterapötiklerden biri ile karşılaşım sonucu çapraz reaksiyon ile Tablo 1'de örnekleri gösterilen çok sayıdaki ilaçların tümüne (daha önce hiç karşılaşmamış olmasına rağmen) karşı direnç gelişimidir.

Bu grup ilaçların ortak özelliği hem su hem de yağda çözünebilir olmalarıdır ve genellikle antrasiklinler ile vinka, alkaloidlerinden oluşmaktadırlar. Ancak plati-

num, bleomisin, sitozin arabinozid ve alkilleyici ajanlar için henüz bildirilmemiştir.

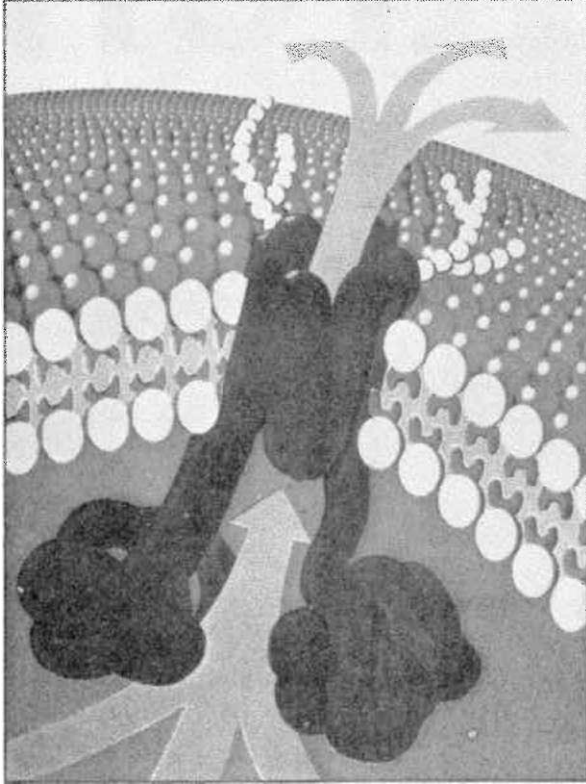
Bu grup ilaçların ortak direnç özelliklerine dair ilk bulgular in vitro hücre içi ilaç düzeylerinin yeterli olmadığı gösterilmesidir, ilaçların hücre içine girişi normal olmakla birlikte tekrar dışarıya pompalanarak etkilerinin oluşması engellenmektedir (6-8). Hücre dizilerinde bu mekanizmanın gösterilmesini klinik olgularda direnç ile in vitro hücre içi kemoterapötik düzeylerinin ilişkisinin incelenmesi izlemiştir. Beksaç ve ark. dirençli kronik lenfositler lösemide duyarlı olgulara oranla hücre içi vinka alkaloid düzeylerinin belirgin olarak azaldığını göstermişlerdir (9).

Bu kadar çok çeşitli ilacı birden bağliyabilecek kadar geniş özelliklere sahip tek bir transport proteini varlığı kolay inanılacak bir hipotez gibi görülmemiş ve uzun araştırmalara neden olmuştur. Çözüm çok dirençli bir serviks karsinoma hücre dizisinden mdr1 geninin izolasyonu ile gelmiştir. Bu genin transfeksiyonu ile sentezlettiği membran proteini olan p-glikoprotein (pgp) yapısı ve fonksiyonları anlaşılabilmiştir (10). 1280 aminoasitten oluşan ve 170 KD büyüklüğündeki bu transmembran yapı (Şekil 1) ATP ve ilaçları bağlayarak aktif bir pompa işlevi görmektedir. Bu tek proteinin ila-

Tablo 1. mdr grubundaki ilaçlar (4)

Antikanser ilaçlar	Diğerleri
Actinomycin	Colchicine
Daunomycin	Emetine
Doxorubicine	Ethidium bromide
Etoposide(VP-16)	Gramicidin D
Mitoxantrone	Mithramycin
Taxol	Puromycin
Teniposide (VM-26)	Vallnomycin
Vinblastine	Lidocaine
Vincristine	Propranolol
	Glukokortikoidler

* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Hematoloji BD, ANKARA



Şekil 1. P-Glikoprotein yapısı.

ca duyarlı hücrelere nakli ile hücre dirençli duruma geçmektedir (11). insanda mdr1 geni 12. kromozom üzerinde yerleşmiştir. Ayrıca mdr3 geni gösterilmişse de bu gen ilaç direncine yol açmamaktadır.

İlginç olan pgp'nin normal dokularda da gösterilmesidir (5) (Tablo 2). Hepatositlerin bilier yüzeylerinde, renal proksimal tübüllerin lümenal yüzeylerinde, ince ve kalın barsakların mukozal yüzeylerinde, ayrıca pankreas kanalıklarında gösterilmiştir. Ayrıca beyin, testis, kapiller endotelial hücreleri ile plasenta ve adrenal korteks'de bulunmuştur. Fizyolojik koşullarda bu proteinin yukarıda adı söylenen işlevi, hücreleri toksik maddelerden korumak ve steroid hormonların ekskresyonunu sağlamaktır. Kan-beyin ve kan-testis engelini böylece oluşturmaktadır. Bu bulgular uzun sürelerdir kanser kemoterapötikleri hakkında bildiklerimiz ile uyumludur. Örneğin mdr grubundaki antineoplastik ilaçlar gastrointestinal absorpsiyon olmadığı için oral alınmamakta ve intravenöz uygulanmaktadır. Genellikle de safra ve idrarla aktif olarak atıldıkları bilinmektedir.

1000'e yakın tümör örneğinde mdr1 düzeyleri incelenmiştir. VVilm's tümörü, över ve meme kanseri gibi duyarlı tümörlerde mdr1 düşük düzeylerde bulunurken adenokarsinomu ve diğer küçük hücreli olmayan akciğer kansinomlarında klinik dirence rağmen mdr1 yüksek bulunmamıştır (12).

Ancak mdr1'in yüksek bulunduğu över kanserleri, nöroblastoma, myeloma ve akut lösemiler kemoterapö-

Tablo 2. mdr 1 RNA'nın normal ve tumoral dokularda dağılımı (5)

Normal Doku	Tedavi Görmemiş Kanser Dokusu Yüksek mdr 1 düzeyi	Kemoterapi ile Direnç Gelişen Tümörler
Adrenal Kolon Böbrek Karaciğer Akciğer	Feokromasitoma Adrenal korteks Kolon kanseri Renal kanser	Feokromasitoma ALL Neuroblastoma
	Düşük mdr 1 düzeyi	
Kemik iliği, dalak Deri, subkutan doku Akciğer Çizgili ve kalp kası Prostat Över Mide	Lösemiler Meme Ca ' Over karsinomu Tiroid karsinomu Neuroblastoma Feokromasitoma Adrenal korteks	

Tablo 3. Klinik mdr inceleme yöntemleri

DNA amplifikasyonu (Southern blotting)
RNA analizleri
Northern blotting
Slot blotting
in situ hibridizasyonu
Poliimeraz zincir reaksiyonu
P-glikoprotein analizi
Western blotting
jmmünositokimya
Flow sitometri

tiklere karşı belirgin direnç göstermektedir. Bu bulgular mdr1 dışı direnç mekanizmalarının yanı sıra mevcut moleküler biyolojik yöntemlerle bile gösterilemeyen mdr varlığını düşündürmektedir (Tablo 3).

Hematolojik neoplazmlardan Multipl Myeloma (MM) mdr1'in incelendiği ilk hastalık olmuştur. 100'den fazla myeloma örneğinin incelenmesi sonucunda tedavi almamış MM'da tanı anında pgp'nin %10'dan az olduğu ancak doğal ürünlerle tedavi görenlerde bu oranın %50'ye ulaştığı gözlenmiştir (13).

Bir başka B-lenfoproliferatif hastalık olan kronik lenfositler lösemide tedavi almamış olguların %57'sinde almiş olgularda da yine benzer bir oranda %51 mdr ekspresyonu gözlenmiştir (14). Mdr ekspresyon şiddeti ise kemoterapiyle karşılaşma sonucu artmakta, tedavinin kesilmesi ile tekrar bazal değerlere dönmektedir.

Myeloid malign hastalıklardan akut myeloblastik lösemi, myelodisplastik sendrom ve kronik myelositer lösemi blastik krizinde tedavi almamış olgularda %45-57 pgp pozitifliği bildirilmiştir. AÜTF Hematoloji kli-

niğinde izlenen 40 refrakter olguda bu oran Akut Myeloblastik lösemi için %75, ALL için ise %50 olarak bulunmuştur (15). İlginç olan bir bulgu da List tarafından da bildirildiği gibi stern hücre fenotipi (CD34 pozitifliği) ile pgp pozitifliği arası önemli korelasyondur (16). Bizim çalışmamızda da bu değer $r=0.55$ ($p<0.05$) bulunmuştur. Stem hücreleri kemoterapötik ve toksik maddelerin sitotoksik etkilerinden koruyabilecek olan mdr, lösemi koşullarında tedaviyi güçleştirmektedir.

Yakın zamanda yayınlanan iki klinik çalışmada AML'de pgp düzeyleri ile klinik sonuçlar arası ilişki araştırılmıştır. Maile ve ark. çalışmasında 41 AML'li olguda tanı sırasında %19 olan pgp pozitifliğinin relapsta %50'ye çıktığı, pozitiflerde tam yanıt oranının (%25) negatiflere göre (%67) daha az olduğu ($p:0.03$) ve in vitro kemorezistans ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (17). Campos'un bulguları da benzer olarak ancak 150 AML olgusu ile yine tam yanıtın pgp negatiflerde pozitiflere oranla daha yüksek olduğunu (%81-%30 $p<10$), ayrıca CD34 pozitifliği ile remisyon oranı/süresinin azaldığı ve CD34 ile pgp arası önemli bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. İlginç bir bulgu t (15,17) sık olan (Promyelosik) lösemide pgp pozitifliğine az rastlanılmasıdır (18).

Bütün bu pgp'nin klinik prognoza olumsuz etkilerini gösteren bulgular membran proteinin incelenmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Tsuruo ve ark.'nın pgp'nin etkisinin in vitro verapamil uygulaması ile geri döndürüldüğünü göstermesini bu şekilde etkili birçok ilacın gösterilmesi izlemiştir (19). Böyle etkisi olan ilaçlar Tablo 4'de özetlenmiştir.

in vitro mdr'nin geri döndürülebildiğinin gösterilmesini klinik çalışmalar izlemiş ve önce kolon, meme, pankreas över karsinoması gibi solid tümörlerde, takiben myeloma, lenfomalarda da verapamil, trifluoperazine ile kemoterapi kombinasyonları uygulanmaya başlanmıştır (20). Kliniğimizde refrakter akut lösemilerde verapamil (12 olgu) ve ciclosporin A (7 olgu)'mn daha önce verilen ile aynı kemoterapiye eklenmesi önemli bir toksisite artışına yol açmazken, %58 (Verapamil) ve %43 (Ciclosporin A) tam yanıt elde edilmiştir (15).

Yakın zamanda Fransa'dan başlatılan bir faz I-II çalışmada 17 refrakter veya relaps akut lösemide ciclosporin A'nın kemoterapiye eklenmesi ile %40 tam yanıt elde edilirken olgulardaki pgp pozitifliği negatifliğe dönüşmüştür (21).

Tablo 4. mdr'yi invitro geri döndüren kemosensitizan ilaçlar (13).

Kalsiyum kanal blokerleri	Steroid hormonlar
Verapamil	Progesterone
Nifedipine	Siklik peptid antibiotikler
Azidopine	Cyclosporin-A
Antiarritmikler	Sefalosporinler (Cephaperazone)
Amiodarone	Eritromisin
Quinidine	

Halen başta EORTC olmak üzere birçok merkezde klinik çalışmalar mdr'nin geri döndürülmesi ve mdr dışı direnç mekanizmaları olan DNA topoizomerez ve glutatyon 5 transferaz üzerine yürütülmektedir.

Topoizomerezlar

Bu enzimler DNA'nın ikincil ve üçüncül yapılarındaki değişiklikleri katalize eder ve DNA replikasyon ile transkripsiyonunda rol oynarlar. Birçok antikanser ilaç bu enzimler aracılığı ile DNA hasarı geliştirmektedir (20).

Bu enzimlerden Topoizomerez I DNA transkripsiyon ve replikasyonunda rol oynar. Dinlenen ve proliferen hücrelerde eşit miktarda bulunmaktadır. Bilinen tek inhibitörü Camptothecin adlı sitotoksik bir bitki alkaloididir. Organ toksisitesinin önemli derecede oluşu bu ilacın klinik uygulamaya girmesini çok geciktirmiş olmakla birlikte yakın zamanda bu direnç mekanizması nedeniyle tekrar gündeme gelmiştir. Camptothecin analogu CPT-11 (Topotecan) faz I olarak Fransa (59 olgu), Hollanda (22 olgu), ABD ve Japonya (20 olgu) da refrakter olgularda uygulanmaya başlamıştır (22). Bu ilaç antitümör etkisini topoizomerez I'nin katalitik etkisini inhibe ederek göstermektedir. Böylece enzimin DNA birleştirici etkisi önlenmektedir. DNA topoizomerez II ise DNA replikasyonunda rol oynar ve birçok antikanser ilacın (Amsacrine, podofilotoksinler, adriamisin, dacinomisin, mitoxantron dahil olmak üzere) hedefini oluşturmaktadır. Hücre aktivitesine paralel olarak değişim gösteren bu enzim düzeylerinin azalması bu antikanser ilaçlara karşı dirence neden olmaktadır.

Topoizomerezların pgp'den farkı ilaçların hedefini oluşturmaları ve tüm normal hücreler için gerekli olmalarıdır. Henüz bu aktiviteyi geri döndürücü ajanlar bulunmamıştır. KLL'de topoizomerez H'nin düşük olması kolon ca'da ise topoizomerez I'nin yüksek oluşu ilaç dirençliliği ile uyumlu bulgulardır (20).

Diğer Mekanizmalar

Hücre içinde ilaç birikimi ve ilaç hedeflerindeki değişimlere ilaveten ilaç metabolizmasında rol oynayan proteinlerdeki değişiklikler de diğer direnç mekanizmalarındandır. Faz I reaksiyonlarda hidrofobik toksinler (xenobiotikler) daha çözünmüş ve reaktif ürünlere dönüştürülürken faz II reaksiyonlarda, faz I ürünleri substrat olarak kullanılır ve konjugasyon ile suda daha da çözünebilir ürünler şekline inaktive edilebilirler. Faz I enzimleri aril hidrokarbon hidrolaz ve diğer sitokrom p-450 enzimleridir. Doksorubisin dirençliliğinde bu enzim düzeylerinde azalma bildirilmiştir. Faz II enzimleri ise sulfotransferaz, glukroniltransferaz, glutatyon S transferaz (GST) gibi konjugazları içermektedir. Birçok insan tümöründe GST düzeylerinde artış bildirilmiştir (20). Mdr'nin aksine GST transfeksiyon çalışmaları ile ilaç dirençliliğinin nakli gerçekleştirilememiştir. Ayrıca bu iki protein birbirleriyle ortak davranmamaktadırlar. GST'nin inhibisyonunu sağlayan buthionine sulfoximine (BSO), doxorubicin, cisplatin, melphalan'a karşı duyarlılığın art-

masını sağlamaktadır (20). Faz I bir çalışmada 20 ileri kanser olgusunda melfalan ile kombinasyonu 1992'de bildirilmektedir (22).

Görüldüğü üzere klinikte kemoterapötiklerin etkilerini arttırmaya yönelik girişimler onkogenezin da-

ha iyi aydınlatılmasında yardımcı olmaktadır. Bu alandaki randomize klinik çalışmaların sonuçları ile tanı anında direnç ve duyarlılığın önceden tespiti ve buna yönelik önlemlerin erkenden alınmasına olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Hochhauser D, Harris AL. Drug resistance. *British Medical Bulletin* 1991;47(1):178-96.
- Weisenthal LM, Marsden JA, Dill PL, Macaluso CK. A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. *Cancer Res* 1983; 43:749-53.
- Beksac M, Kansu E, Kars A, Ibrahimoglu Z, Firat D. A rapid drug sensitivity assay for neoplastic cells. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 1988; 5(4):253-7.
- Pastan I, Gottesman M. Multidrug resistance. *Annu Rev Med* 1991;42:277-86.
- Pastan I, Gottesman M. Multidrug resistance in human cancer. *N Engl J Med* 1987; 316(22):1388-93.
- Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim biophys acta* 1973; 323:466-83.
- Ling V, Thomson LH. Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J Cell Physiol* 1974; 83:103-16.
- Fojo A, Akiyama SI, Gottesman M, Pastan I. Reduced drug accumulation in multiply drug resistant human KB carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1985; 45:3002-7.
- Beksac M, Peterson C, Reizenstein P. Decreased retention of vinca alkaloids in chronic lymphatic leukemia cells from refractory patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1985; 15:72-75.
- Ueda K, Pastan I, Gottesman MM. Isolation and sequence of the promoter region of the human multidrug resistance (p-glycoprotein) gene. *J Biol Chem* 1987; 262:17432-36.
- Pastan I, Gottesman MM, Ueda K, Lovelance E, Rutherford AV. A retrovirus carrying a MDRI-cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of p-glycoprotein in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:4486-90.
- Goldstein IJ, Galski H, Fojo A, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst* 1989; 8(2): 116-24.
- Dalton WS, Salmon SE. Drug resistance in myeloma: mechanisms and approaches to circumvention. *Hematol Oncol Clin* 1992; 6(2):383-93.
- Holmes JA, Jacobs A, Carter G, Whittaker JA, Bently DP, Padma RA. Is the mdrl gene relevant in chronic lymphocytic leukemia? *Leukemia* 1990; 4(3):216-8.
- Beksac M, Akan H, Koç H, İlhan O, Ertürk Ş, Güneşli A, İkizünel Y, Şardaş OS. P-glycoprotein expression in refractory hematological neoplasms and circumvention of resistance with verapamil or cyclosporine A containing regimens. *Medical Oncol Tumor Pharmacotherapy* 1992; 9(2):101-5.
- List AF, Spier CM, Cline A, Dorlall DC, Garewal H, Morgan R, Sandberg AA. Expression of the multidrug resistance gene product in myelodysplasia is associated with a stem cell phenotype. *Br J Haematol* 1991; 78:28-34.
- Marie JP, Zittoun R, Sikic BI. Multidrug resistance gene expression in adult acute leukemia; correlations with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood* 1991; 78(3):586-92.
- Campos L, Guyotat D, Archimbaud E, Calmard-Orid P, Tsuruo T, Troncy J, Treille D, Fiere D. Clinical significance of multidrug resistance pgp expression of acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood* 1992; 79(2):473-6.
- Tsuruo T, hda H, Tsukagoshi S, et al. Overcoming of vincristine resistance in p388 leukemia in vivo and in vitro through enhancing cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 1981; 41:1967-72.
- Fojo AT. Multidrug resistance. *Advances in Internal Medicine* 1991; 25:195-218.
- Marie JP, Bastie JN, Coloma, Just-Candi S, Filleul A, Catakin J, Zittoun R. A phase I-II trial of cyclosporine A with etoposide and mitoxantrone in advanced acute leukemia. *Proceed ASCO* 1992; 11:275.
- Proceedings of American Society of clinical oncology meeting. March 1992, Abstract Book, abstract no:260, 263, 278, 281.