

~~1995-00169~~



TÜBİTAK

TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

**Akciger Kanseri, Lenfoma, Multiple Myeloma ve
AML Hastalarında Kemorezistansın Tc-99m
SestaMIBI ile Görüntülenmesi; MDR1 Düzeyleri
ile Kemoterapötiklere Rezistans Gelişmesi
Arasındaki İlişkinin İmmunohistokimyasal,
Flow Sitometrik ve PCR Ölçümleriyle
Karşılaştırılması**

1997-301

SBAG - AYD. 82

Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu

Medical Sciences Research Committee

1995-00169

**Akciğer Kanseri, Lenfoma, Multiple Myeloma ve
AML Hastalarında Kemorezistansın Tc-99m
SestaMIBI ile Görüntülenmesi; MDR1 Düzeyleri
ile Kemoterapötiklere Rezistans Gelişmesi
Arasındaki İlişkinin İmmunohistokimyasal,
Flow Sitometrik ve PCR Ölçümleriyle
Karşılaştırılması**

1997-301

SBAG - AYD. 82

Doç. Dr. Lale Kostakoğlu
Yrd. Doç Dr. Dicle Güç
Bio. Hande Canpınar
Doç. Dr. Ayşe Kars
Prof. Dr. Şevket Ruacan
Prof. Ufuk Gündüz

? —

Say. 33

Ref. 29

Mayıs, 1997
Ankara

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Tablolar	1-5
Şekiller	6-8
Resimler	9-11
Önsöz	12
Öz	13
Abstract	14
Giriş	15-16
Gelişme	17-25
A. Materyal ve Metod	17-21
I. Hasta Grubu	17
II. Sintigrafi	17-19
III. Dokuların Elde Edilişi	19
IV. Akım Sitometri	20
V. Total RNA İzolasyonu	20
VI. RT-PCR ve PCR	20
VII. Immunohistokimya	20-21
VIII. İstatistiksel Değerlendirme	21
B. Bulgular	22-25
Hematolojik Malignansi Hastaları	22-23
Akciğer Kanseri Hastaları	24-25
Sonuç	26-30
Hematolojik Malignansi Hastaları	26-27
Akciğer Kanseri Hastaları	27-30
Sonuç ve Öneriler	30
Referanslar	31-33

Tablo 1: Hematolojik Malignansi Hastalarında MIBI ile Kalitatif Skorlama

Pt	Hum.	Omuz	Ster.	CIA	TM	SI	Femur	ORT.
1.	1	1	1	2	2	2	1-2	1.50 r
2.	2	2-3	3	3	3	2	3	2.62
3.	2	3	2	3	3	3	3	2.71 r
4.	2	3	2	3	2-3	3	3	2.62 r
5.	1	3	3	2-3	3	3	3	2.71
6.	1	2	1-2	1-2	2	2	2	1.67
7.	2	3	2-3	2	2-3	3	2-3	2.50
8.	2	3	2	2-3	2	2-3	2	2.33 r
9.	1	2	1-2	1-2	3	2	2-3	1.90
10.	1	1	2	2-3	2	2	1	1.75
11.	2	2-3	2-3	3	3	3	3	2.67
12.	2	3	3	3	3	3	2	2.71
13.	1	2	2	2-3	3	3	1-2	2.11
14.	1	2	1-2	2-3	2	2	2	1.88 r
15.	2	2-3	2	3	3	3	2-3	2.55
16.	1-2	2	2	2	2	3	2-3	2.11
17.	1	1-2	1-2	3	2	2-3	2	1.90 r
18.	1-2	2	2	2	2	2-3	2	2.00 r

Hum: Humerus
CIA: Crista iliaka anterior
SI: Sakroiliak eklemler
r: relaps ile gelen hastalar

Ster: Sternum
TM: Trochanter major
ORT: Ortalama

Tablo 2: Hematolojik Malignansi Hastalarında MIBI Tm/Bkg Oranları

Pt	Hum.	Omuz	Ster.	CIA	TM	SI	Femur	ORT.
1.	0.45	0.55	0.84	1.26	1.20	1.30	1.26	0.98 r
2.	0.80	1.10	1.38	1.93	1.82	1.65	1.61	1.46
3.	0.90	1.00	1.25	1.85	1.49	2.10	1.20	1.38 r
4.	0.80	1.00	1.20	1.66	1.67	2.10	1.30	1.38 r
5.	1.00	1.37	1.53	1.63	1.55	2.10	1.20	1.48
6.	0.50	0.85	0.90	1.00	1.30	1.45	1.12	1.01
7.	1.00	1.30	1.20	1.20	1.20	1.40	1.00	1.20
8.	1.00	1.00	1.00	1.45	1.30	1.55	1.20	1.21 r
9.	0.60	0.85	1.00	1.20	1.34	1.35	1.25	1.10
10.	0.45	0.57	1.16	1.43	1.20	1.00	0.85	0.95
11.	0.80	0.90	1.42	1.60	1.85	1.75	1.20	1.35
12.	1.00	1.60	1.45	1.95	1.82	2.05	1.30	1.59
13.	0.70	0.81	1.00	1.40	1.37	1.85	1.00	1.16
14.	0.70	0.80	0.90	1.20	1.20	1.30	1.00	1.01 r
15.	0.70	0.85	1.00	2.10	2.00	1.70	1.35	1.39
16.	0.69	1.00	1.11	1.30	1.20	1.90	1.16	1.19
17.	0.80	0.90	1.00	1.30	1.20	1.30	1.10	1.08 r
18.	0.65	0.81	1.00	1.48	1.30	1.55	1.10	1.15 r

Hum: Humerus
CIA: Crista iliaca anterior
SI: Sakroiliyak eklemler
r: relaps ile gelen hasta

Ster: Sternum
TM: Trochanter major
ORT: Ortalama

Tablo 3: MIBI Parametrelerinin, Akım Sitometri ve RT-PCR Sonuçları ile Karşılaştırması

Pt	MIBI Skoru	MIBI Tm/Bkg	AS		RT-PCR
			Ab1	Ab2	
1.	2.71	1.48	%12	%10	-
2.	1.90	1.15	%10	%12	NA
3.	2.62	1.46	%13		-
4.	2.11	1.19	%16	%10	+
5.	2.11	1.16	%24	%25	NA
6.	1.75	0.95	%32	%34	NA
7.	1.01	1.01	%26	%56	NA
8.	1.10	1.10	%74	%76	NA
9.	2.00	1.08	%83		+
10.	1.50	0.98	NA		+
11.	1.88	1.01	NA		+
1.	2.62	1.38	NA		-
2.	2.71	1.59	NA		-
3.	2.71	1.38	%8	%5	-
4.	2.33	1.21	%2	%3	-
5.	2.50	1.20	-	-	NA
6.	2.55	1.39	-	-	-
7.	2.67	1.35	-	-	NA

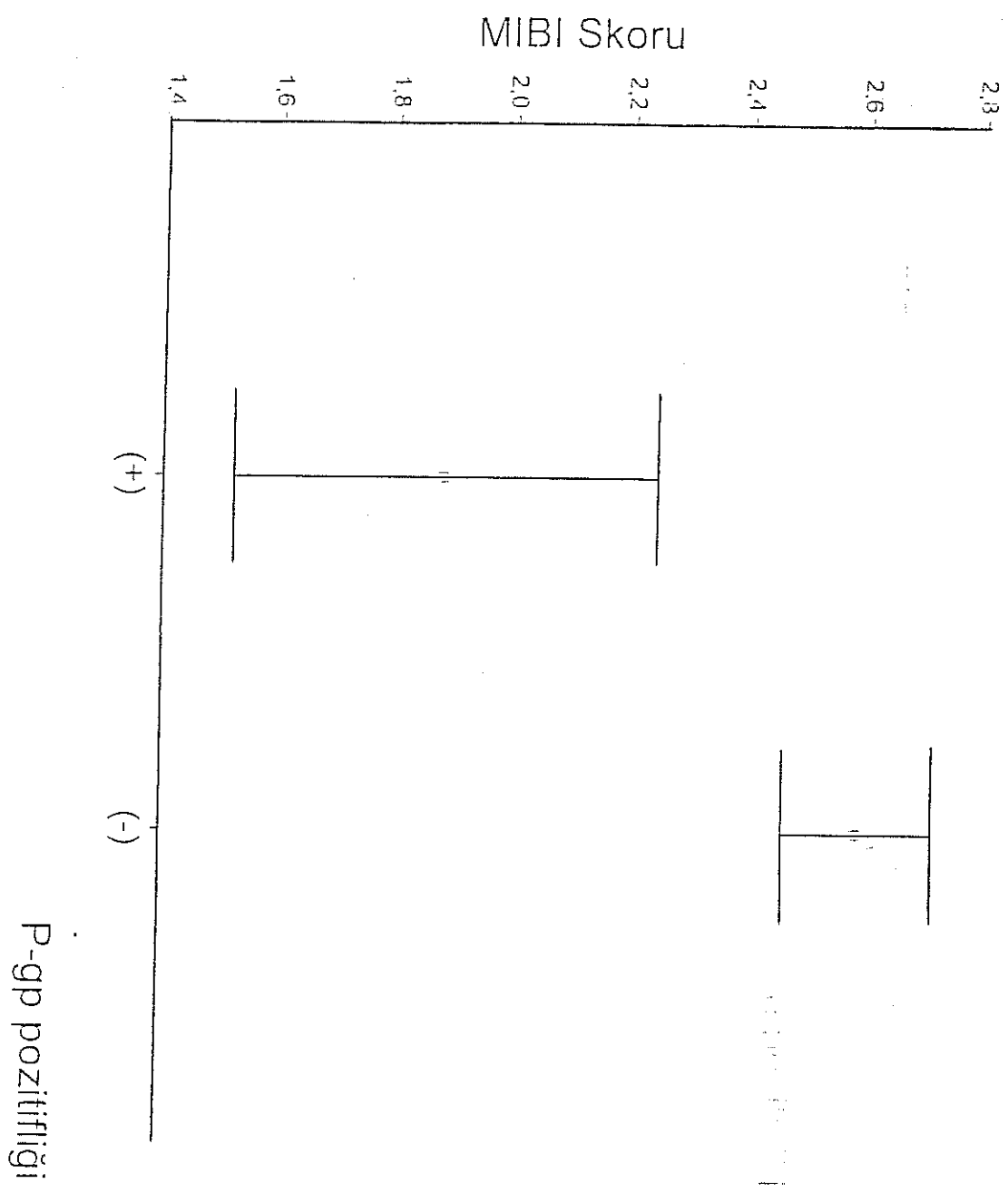
AS: Akım sitometri
Ab1:Antikor 1 - JSB1
Ab2:Antikor 2 - UIC2
NA: Yapılamadı

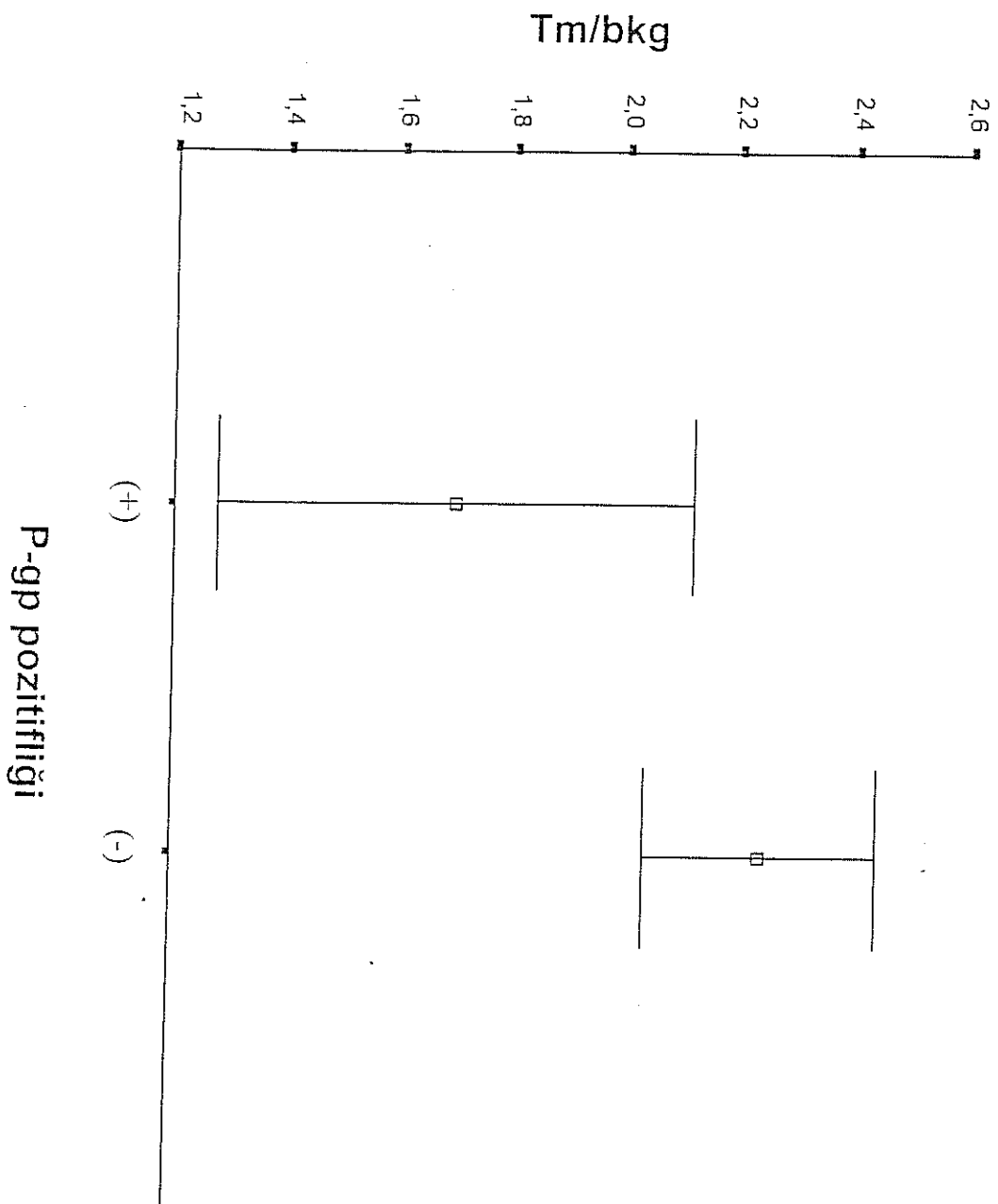
Tablo 4: Hematolojik Malignansi Hastalarında P-gp Saptanmasında MLBI'nin İstatistiksel Değerleri

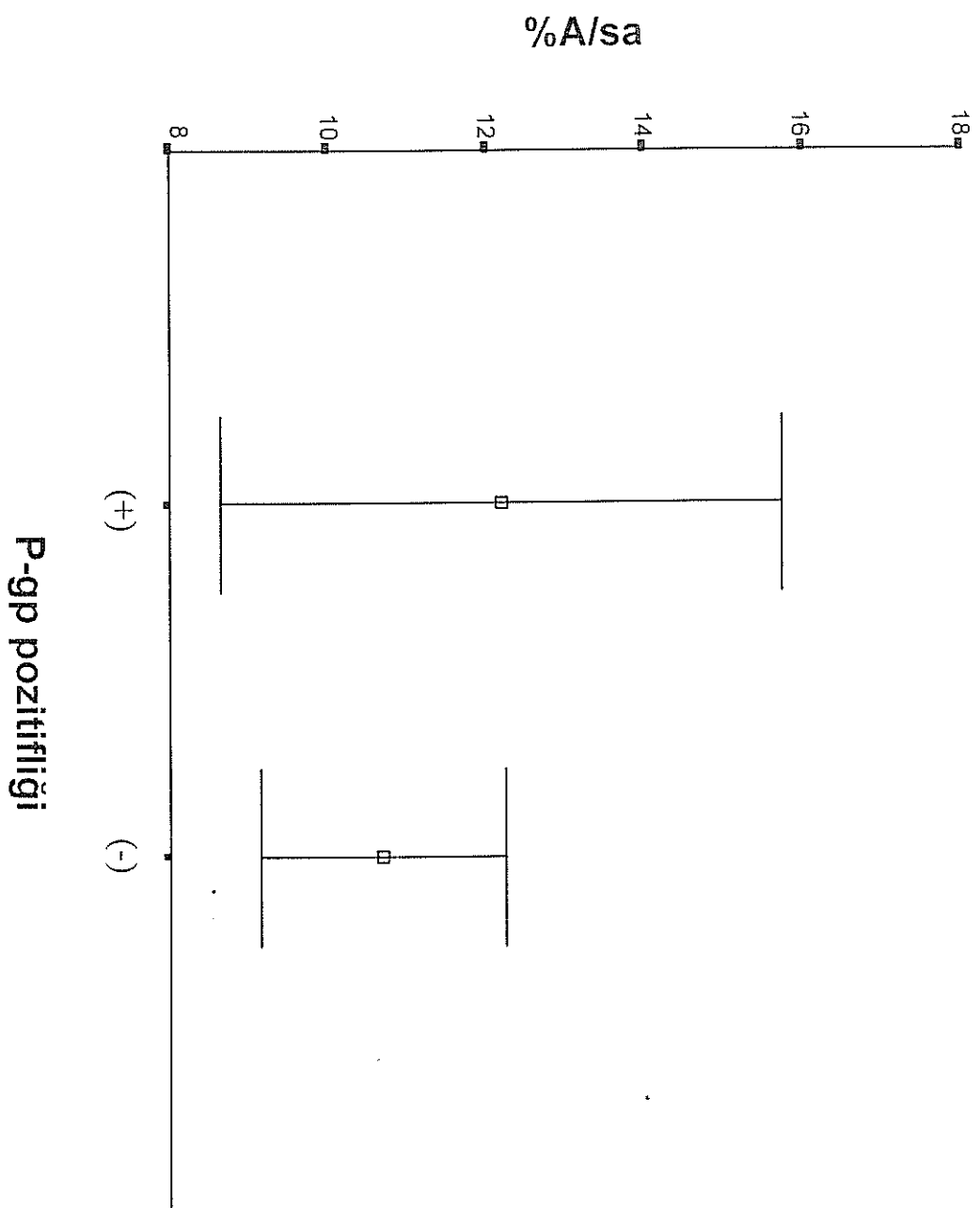
	Hassasiyet	Spesifisite	PPV	NPV
Eşik %10				
Kalitatif	81.8	100	100	77.8
Kantitatif	81.8	100	100	77.8
Eşik %25				
Kalitatif	100	81.8	77.8	100
Kantitatif	100	91.9	87.5	100

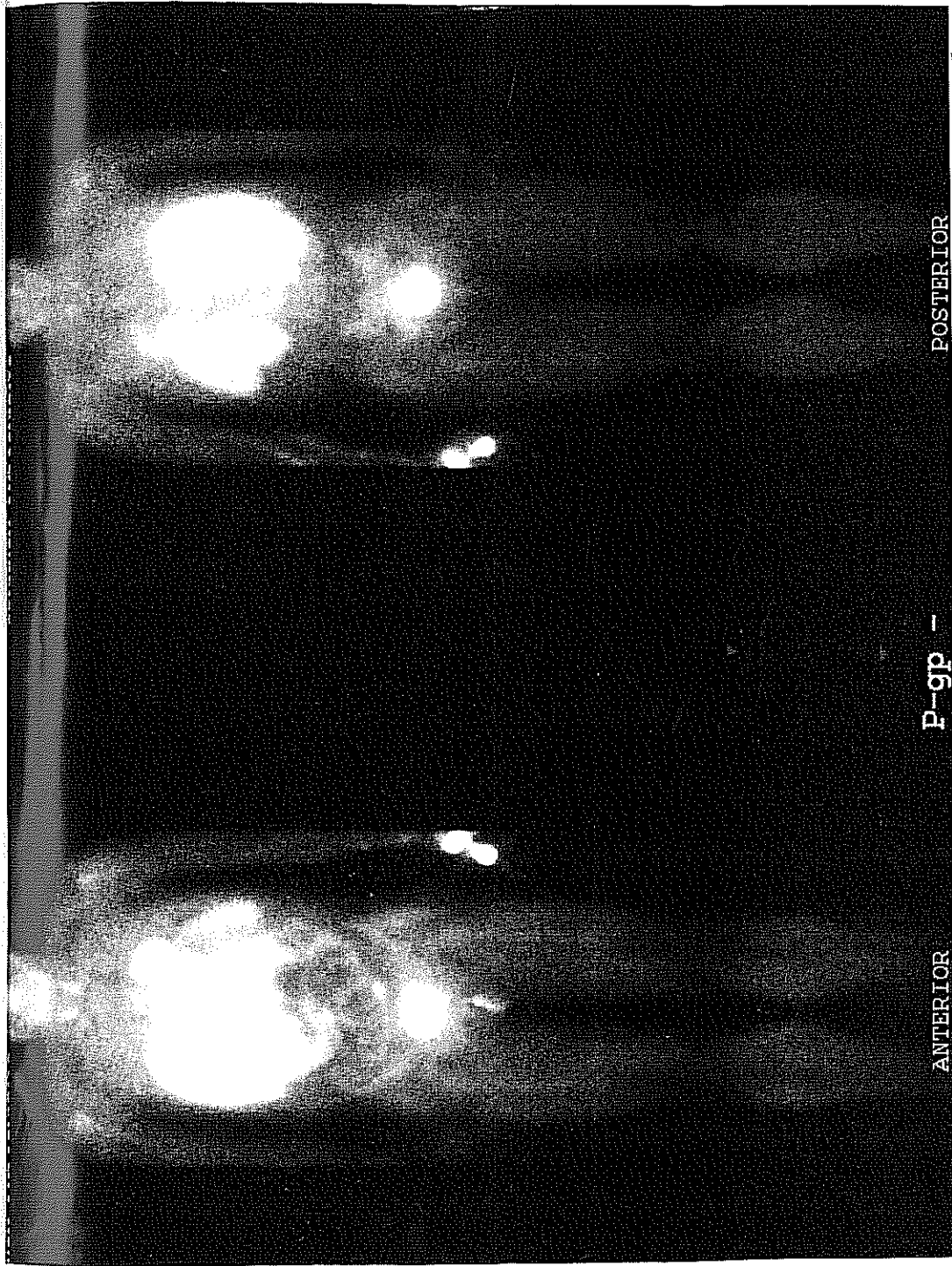
Tablo 5: Akciğer Kanseri Hastalarında MIBI Parametreleri, Immunohistokimya ve RT-PCR Sonuçları

Pt	Tm/Bkg	Tm %A/sa	ND %A/sa	P-gp(H)	P-gp(PCR)	Tip	Boyut (cm)
1.	1.3	10	10.5	+	NA	Epid	3.0
2.	1.4	9.0	10	+	+	Epid	2.0
3.	2.1	16	16	+	NA	SCLC	2.5
4.	1.9	12	12	+	NA	Epid	2.0
5.	1.7 nek	16	9.5	+	+	Epid	6.5
6.	1.8	14	12	+	NA	SCLC	2.5
7.	2.0	11	13	-	-	Epid	4.0
8.	1.8 nek	11	12	-	-	Epid	5.0
9.	2.5	7.0	8.0	-	-	Epid	2.5
10.	2.3	9.0	9.0	-	-	SCLC	2.8
11.	1.9 nek	16	15	-	-	Epid	4.5
12.	2.7	11	12	-	-	SCLC	1.8
13.	2.1	15	13	-	-	SCLC	2.6
14.	1.9	11	9.0	-	-	Epid	3.7
15.	2.3	10	11	-	-	Epid	2.8
16.	2.0	12	11	-	-	SCLC	3.0
17.	2.6	9.0	11	-	NA	SCLC	2.5
18.	1.5 nek	13	11	-	NA	SCLC	4.5
19.	1.5 nek	14	12	-	-	SCLC	9.5
20.	2.0	12	10	-	-	SCLC	3.0









POSTERIOR

P-9p -

ANTERIOR

ONE PARAMETER STATISTICS
% IN INTERVAL 4.62

512

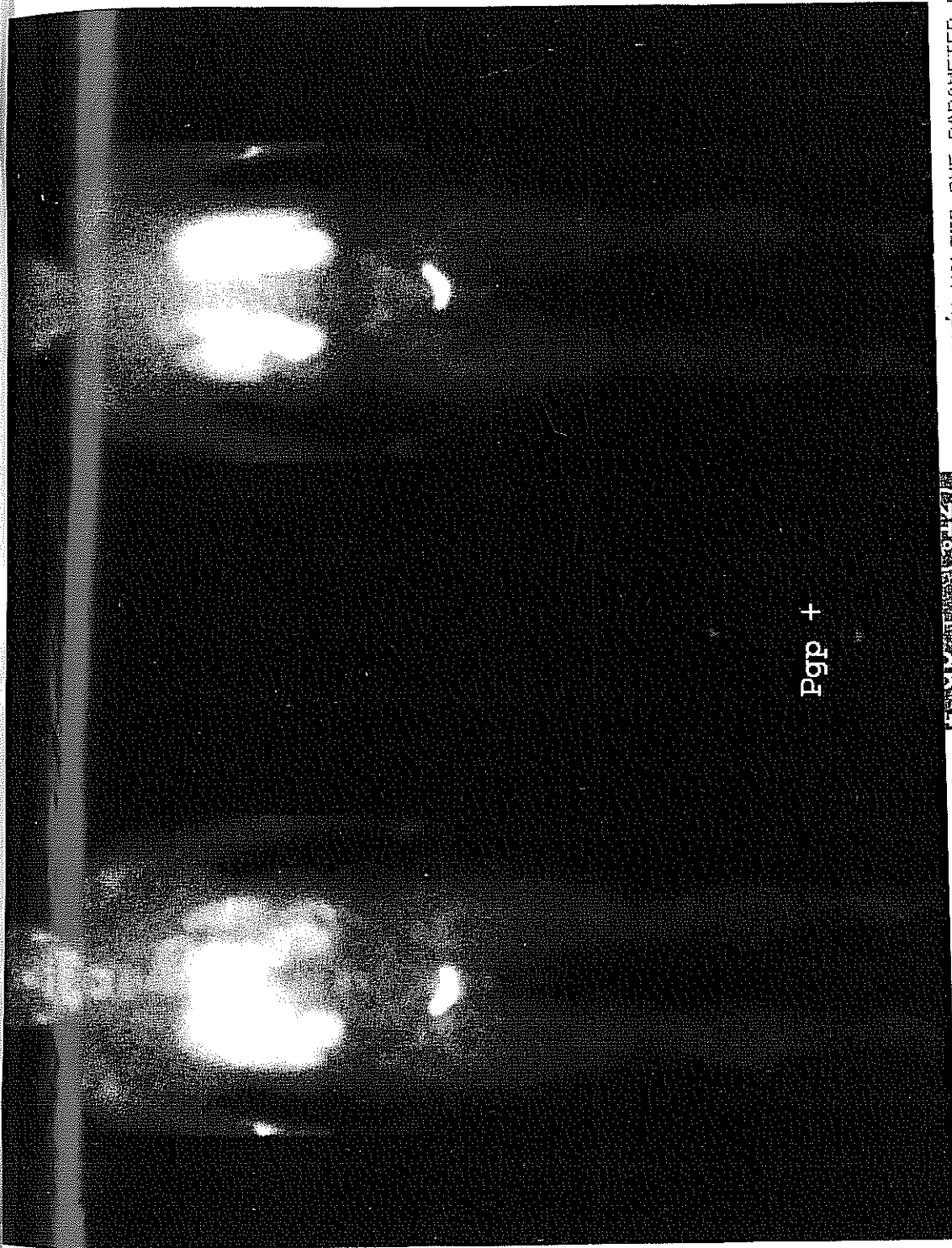
MEAN 14.44
SD 2.83
CV 19.34
LCV 0.00
RCV 0.07
HCV 37.56

9

ONE PARAMETER STATISTICS
% IN INTERVAL 4.83

512

MEAN 14.16
SD 2.62
CV 18.51
LCV 0.00
RCV 0.07
HCV 37.56



Egg + II

ONE PARAMETER STATISTICS
% IN INTERVAL 12.42

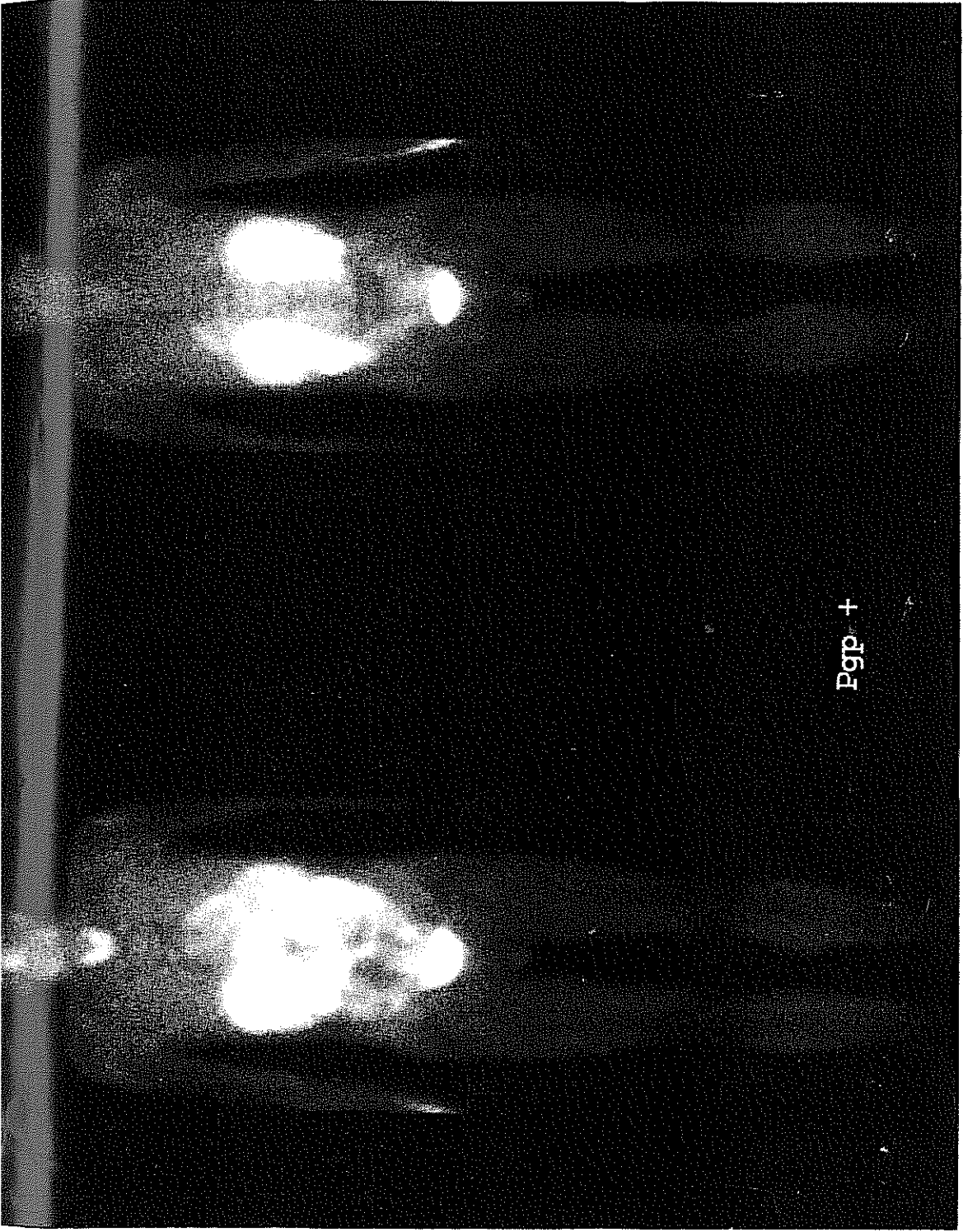
1024

MEAN	21.84
SD	12.94
CV	59.27
LCV	25.40
RCV	106.79
HCV	14.36

ACCUMULATION HALTED ONE PARAMETER STATISTICS
2048
% IN INTERVAL 9.86

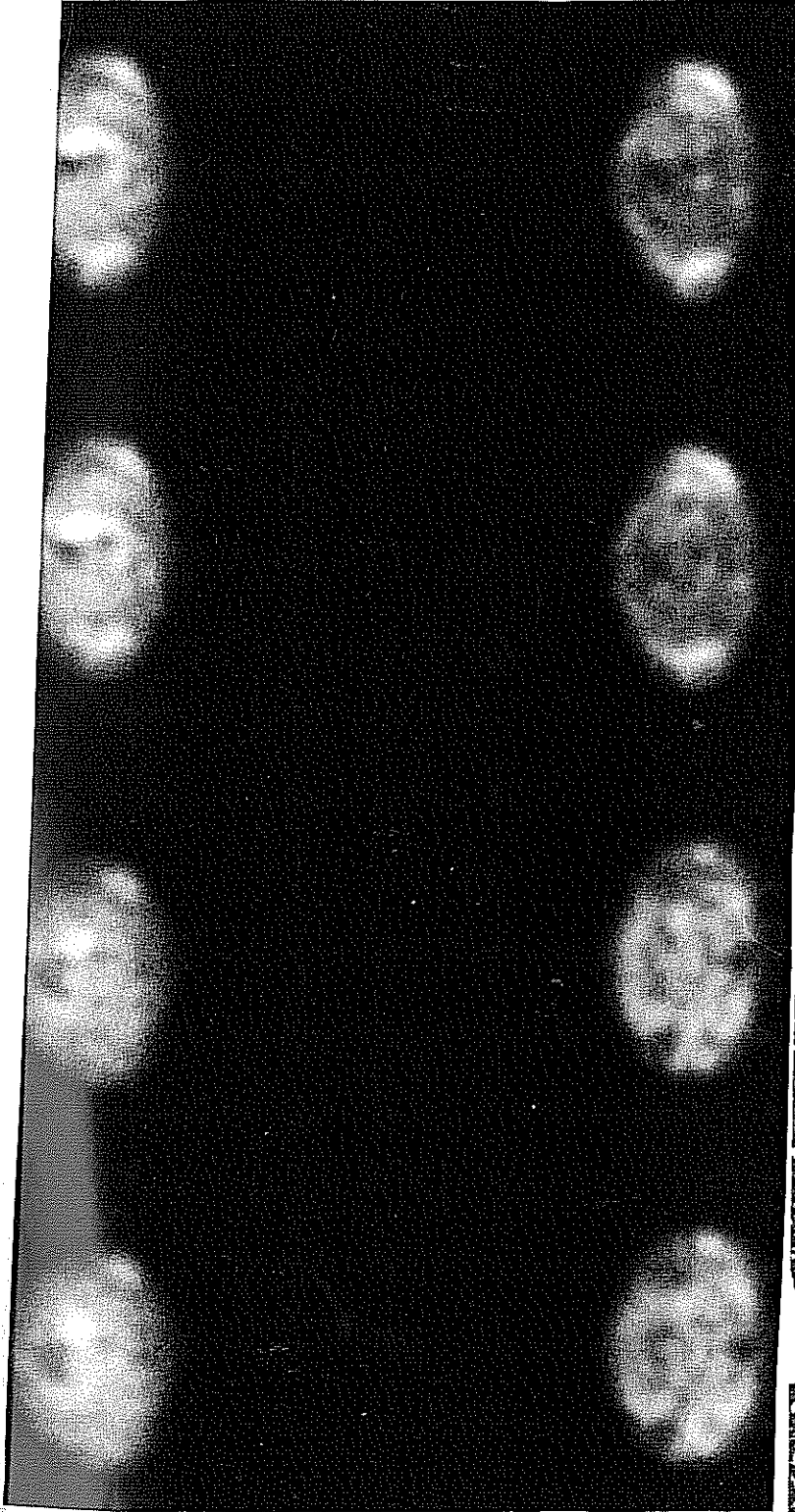
MEAN	17.58
SD	10.76
CV	61.23
LCV	0
RCV	268.11
HCV	97.40

II



Pgp +

ŞEKİL IV

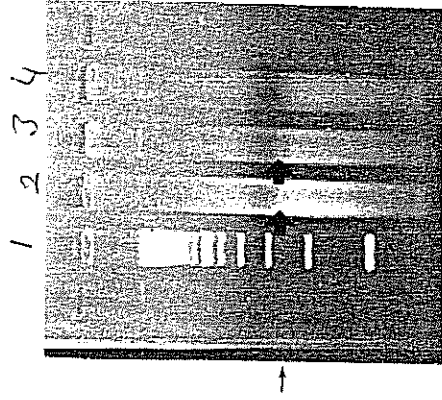


P-9p -

P-9p ++



ŞEKİL V



ÖNSÖZ

P-gp'nin tedavi sırasında ya da tedaviden önce saptanması kanser hastalarının prognozunda gelişmelere yol açabilecektir. P-gp 170 kD ağırlığında hücre zarında yerleşen, ATP'e bağımlı bir transport proteindir. Çoklu ilaç direnç fenotipini gösteren hücrelerde P-gp sentezi artarak ilacın hücre dışına atılmasına ve hücre içinde ilaç konsantrasyonunun yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Yapılan çalışmalara göre, technetium-99m ile işaretli lipofilik yapılı bir katyon olan hexakis(2-methoxyisobutylisonitrile) organoteknesyum kompleksinin - MIBI- hücredeki P-gp tarafından bir transport substratı olarak tanındığı saptanmıştır. Normalde görüntülenmesi beklenen tümör dokusu kemoterapötiklere direnç gelişmesi durumunda MIBI ile görüntülenemeyecek bu da direnç konusunda non-invazif yolla elde edilen bilgiyle hastaya en uygun kemoterapötik protokolünün uygulanmasını mümkün kılacaktır. Bu çalışmada amacımız, hematolojik malignansi ve akciğer kanseri hastalarında P-gp düzeyleri ile tümördeki MIBI tutulum derecesi arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak ve alınan sonuçları akım sitometri ve RT-PCR sonuçlarıyla karşılaştırarak invazif olmayan bir görüntüleme tekniği ile moleküler düzeyde yapılan çalışmalar arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

Bu araştırma projesi TÜBİTAK kapsamında bulunan "Araştırma Altyapısını Destekleme Programı" tarafından desteklenmiştir (No: SBAG-AYD-82).

ÖZ

Amacımız, hematolojik malignansi ve akciğer kanseri hastalarında tümördeki P-gp düzeyleri ile Tc-99m-Sestamibi (MIBI) tutulum derecesi arasındaki ilişkiyi araştırmak ve sonuçları akım sitometri ve RT-PCR sonuçlarıyla karşılaştırarak, görüntüleme tekniği ile moleküler düzeyde yapılan çalışmalar arasındaki ilişkiyi belirlemektir.

Çalışma kapsamına toplam 38 doku (18 hematolojik malignansi ve 20 akciğer kanseri) alındı. Otuzbir hasta ilk tanı anında ve 7 hasta tedavi sonrası relaps sırasında incelendi. Hastaların yaşları 22 ve 50 arasında değişmekteydi (Ort±SD:35±9.8). MIBI sintigrafileri çekildikten sonra hastalardan akım sitometri, RT-PCR ve immunohistokimya incelemeleri için bronkoskopik biopsi ya da kemik iliği aspirasyonu ya da periferik kan örnekleri alındı. Akım sitometri 2 farklı antikor kullanarak yapıldı. MIBI görüntüleri ADAC çift detektörlü gama kamera sistemi kullanılarak alındı. 15 mCi MIBI enjeksiyonunu takiben akciğer kanseri hastalarında toraks SPECT ve spot, hematolojik malignansi hastalarında da tüm vücut planar ve pelvis spot görüntüleri elde edildi. Hedef organ (kemik iliği ya da akciğer tümörü) ve referans organdaki (en yakın yumuşak doku tutulumu) radyoaktif madde tutulumlarının birbirlerine göre karşılaştırmalı olarak, kalitatif skorlama sistemi ve tm/bkg oranları ile değerlendirildi. Akciğer kanseri hastalarında MIBI'nin tümörden ve normal dokulardan atım hızı (%A/sa) hesaplandı.

Her iki kanser türü için, hem kalitatif (skorlama) hem de kantitatif (tm/bkg oranları) değerlendirme sonuçları ile P-gp düzeyleri arasında ters bir orantı olduğu bulundu. Tm/bkg oranları P-gp “-” ve P-gp “+” hastalar için birbirinden istatistiksel olarak farklıydı (akciğer kanseri:p=0.014 ve hematolojik malignansi:p<0.016). Akciğer kanseri için MIBI %A/sa değerleri için tümör ve normal dokular arasında hiçbir fark bulunamadı (p=0.81). Tümör %A/sa değerleri ve P-gp düzeyi arasında bir ilişki saptanmadı (p=0.35).

Sonuç olarak MIBI fonksiyonel görüntülemesi ile P-gp varlığı non-invazif olarak saptanabilmektedir ancak hasta sayısı artırılarak yapılacak çalışmalarla, bu ön çalışmanın sonuçlarının doğrulanması gerekmektedir.

Anahtar sözcükler: P-glikoproteini, MIBI, Çoklu ilaç direnci, RT-PCR, Akım sitometri

ABSTRACT

Our aim was to ascertain the relationship between the degree of MIBI uptake and the level of P-gp in tumors in comparison with flow cytometry and RT-PCR in patients with hematologic malignancy or lung cancer.

A total of 38 tissues (18 hematologic malignancy and 20 lung cancer) were studied. Thirty-one patients were included in the study at the time of initial diagnosis and 7 during relaps after therapy. The patients' ages ranged from 22 to 50 (mean $\pm$ SD:35 $\pm$ 9.8). Following MIBI imaging the patients underwent either bronchoscopic biopsy or bone marrow aspiration for RT-PCR and/or flow cytometric or immunohistochemical analyses. Flow cytometry was performed using two different antibodies. Images were obtained using a dual-head gamma camera system. After injection of 15 mCi of MIBI, thorax SPECT and spot images (lung cancer) or whole-body and pelvic spot images (hematologic malignancy) were acquired. Target tissue (either bone marrow or lung tumor) to background (nearest soft tissueuptake) evaluation was done using both qualitative (scoring system) and quantitative (tm/bkg ratios) analyses. In addition, in patients with lung cancer wash-out rates of MIBI from the tumor and normal tissues were calculated (%W-O/hr).

For both patient groups there was an inverse correlation between the presence of P-gp and the degree of MIBI uptake. Tm/bkg ratios were statistically different for P-gp "+" and P-gp "-" patients (lung cancer:p=0.014 and hematologic malignancy:p<0.016). There was no difference between tümör and normal tissues in values of %W-O/hr (p=0.81). There was no correlation between values of %W-O/hr and the level of P-gp (p=0.35).

As a result, functional imaging agent MIBI could non-invasively detect presence of P-gp. However, the results of our preliminary study should be supported by other studies with expanded number of patients.

Key words: P-glycoprotein, MIBI, multidrug resistance, RT-PCR, flow cytometry.

GİRİŞ

Kanser hastalarında uygulanabilecek tedavi protokollerinin belirlenmesi ve hasta prognozunun iyileştirilmesinde ilaç rezistansı varlığının saptanması en önemli belirleyicilerden birini oluşturur. Kemoterapiye yanıtızlığın nedenleri çok çeşitli olabildiğinden tedaviden önce ya da tedavi sırasında ilaç rezistansını saptayabilecek spesifik belirleyicilerin ortaya çıkarılması bir çok hastada prognoz açısından olumlu gelişmelere yol açabilecektir. Kemoterapötiklere karşı geliştirilen direnç mekanizmaları çeşitli olup malign hastalıklar tedaviye yanıt açısından üç gruba ayrılabilir:

1. İntrensik olarak ilaca duyarlı tümörler,
2. Başlangıçta tedaviye iyi yanıt veren ve daha sonra refrakter olan tümörler,
3. İntrensek olarak kemoterapötiklere dirençli tümörler.

Bunun yanında kemoterapiye direnci açıklayan farklı mekanizmalar tanımlanmıştır;

- ◆İlacın hücre içi konsantrasyonunun azalması.
Hücre dışına atımının artması (P-gp'ye bağlı direnç)
Hücre zarından transportun bozulması
- ◆İlacın aktivasyonunun bozulması.
- ◆İlacın katabolizmasının hızlanması.
- ◆Hücre içinde hedef enzimlerin konsantrasyonunun artması veya yapısal değişikliğe uğramaları(topoizomeras, dihidrofolat redüktaz)
- ◆Enzimatik olarak hücresel hasarın tamir mekanizmalarının hızlanması (glutatyon-s-transferaz, glutatyon peroksidaz).

Şimdiye kadar üzerinde en kapsamlı olarak çalışılmış olan direnç mekanizması hücre yüzeyinde yer alan P-glikoproteininin (P-gp) yüksek düzeylerde bulunmasına bağlı olan "klasik çoklu ilaç direnci'dir (MDR). P-gp 170 kD ağırlığında, hücre zarında yerleşimli ve ATP'ye bağımlı bir transmembran transport proteindir (1). Bu protein MDR1 geni tarafından kodlanır ve MDR ile ilişkili ilaçlar için enerjiye bağımlı dışarı atım pompası olarak görev görür. Çoklu ilaç direnci fenotipi gösteren hücrelerde P-gp sentezi artarak ilacın hücre dışına atılmasına ve hücre içinde konsantrasyonunun yetersiz kalmasına neden olmaktadır (2-3). P-gp'nin fizyolojik düzeylerin üzerine çıkması, spesifik antikörlerle yapılan immunohistokimya yöntemleri ya da moleküler düzeyde dokudan mRNA izolasyonu ile

gerçekleştirilen RT-PCR, Northern blot analizleri ya da akım sitometri ile saptanmaktadır. Ancak bu yöntemlerin spesifik değerleri her zaman yüksek olmamakta ve doku örnekleri gerektirdikleri için de invazif sayılmaktadırlar. Şimdiye kadar tamamlanmış geniş kapsamlı çalışmalara karşın MDR hücrelerindeki ilaç transportunun nasıl gerçekleştiğine ilişkin kesin bilgi edinilememiştir. MDR tarafından etkilenen her ilacın hücre içindeki bağlanma mekanizması, metabolizması ve dışa atımı safhalarının hepsi ilacın hücredeki azalmış birikimine katkıda bulunur. Ancak, ilacın hücreye alımındaki azalma ve hücre dışına atımındaki artma iki farklı parametre olarak kabul edilirse, her iki parametrenin P-gp mekanizmasını hangi derecelerde etkilediği halen devam etmekte olan bazı araştırmaların inceleme konusunu oluşturmaktadır (4).

Diğer yandan tümör görüntüleme ajanı olarak klinikte çok yoğun olarak kullanılan lipofilik ve katyonik yapıdaki Tc-99m-Sestamibi (MIBI)'nin son yıllarda bir P-gp substratı olduğu kanıtlanmıştır (5, 6). P-gp'nin dokularda üst düzeyde varlığının permeabilitede değişikliğe yol açması ve substratlarının hücre içi birikimini beklenenden çok daha alt düzeylere inmesini sağlaması sonucu MIBI'nin de tümöral tutulumu alt düzeylere inmektedir (5-7). Bu yüzden MIBI görüntülemesi sonucu elde edilecek veriler kemoterapötiklere dirençli hastaların önceden saptanmasını sağlayarak klinikte değişik tedavi protokollerinin ve çoklu ilaç rezistans modülatörlerinin uygulamasına önderlik edebilecektir. Ancak bu konuda şimdiye kadar yapılan çalışmalar yetersiz düzeyde olduğu için MIBI görüntülemesi henüz invazif yöntemlerin yerini alamamıştır.

Kısaca, literatürde P-gp düzeyleri ile tümördeki MIBI tutulum derecesi ve MIBI atım hızı arasındaki ilişkiyi inceleyen kapsamlı klinik çalışmaların olmaması bu çalışmayı planlamamıza neden olmuştur. Çalışmamızda hematolojik malignansi ve akciğer kanseri hastalarını kullanmamızın nedeni P-gp'nin bu grup kanserlerde daha fazla tanımlanmış olmasıdır. İncelemeye alınan tümör tiplerinin stromal eleman içermemeleri böylelikle doku kontaminasyonunu minimal düzeye indirdiğinden deneysel kolaylık sağlayacağı düşünülmüş ve çalışmada RT-PCR ile solid tümör grubunun çalışılabilme potansiyelini araştırılmıştır. Bu çalışmada;

- a. Hematolojik malignansi hastalarında P-gp düzeyleri ile tümördeki MIBI tutulumu ve
- b. Akciğer kanseri hastalarında P-gp düzeyleri ile tümördeki MIBI tutulum derecesi ve tümörden MIBI atım hızı arasında bir ilişki olup olmadığı konusunun incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu araştırma projesi TÜBİTAK kapsamında bulunan "Araştırma Altyapısını Destekleme Programı" tarafından onaylanarak desteklenmiştir (No: SBAG-AYD-82).

GELİŞME

A. MATERYAL VE METOD

I. HASTA GRUBU: Çalışma kapsamına 16 hematolojik malignansi ve 20 akciğer kanseri tanısı almış 26'si erkek ve 10'u kadın olmak üzere toplam 36 hasta alındı. Hastaların yaşları 22 ve 50 arasında değişmekteydi ($Ort \pm SD: 35 \pm 9.8$). Akciğer kanseri hastaları tedavi öncesi değerlendirmeye alındı. Hematolojik malignansi grubundan 11 hasta ilk tanı döneminde ve 5 hasta tedavi sonrası relaps sırasında incelendi. Ayrıca ilk tanı döneminde çalışmaya alınan iki hastanın çalışmaları tedavi bitiminde de tekrarlandı (Tablo 1, 2 ve 3). Tüm hastalarda MIBI sintigrafisi uygulandı. MIBI ile sintigrafileri çekildikten sonra hastalardan akım sitometri, RT-PCR ve immunohistokimya incelemeleri için doku, kemik iliği aspirasyonu ya da periferik kan örnekleri alındı. Kemoterapiye yanıtızlığın nedenleri çok çeşitli olabildiğinden tedaviden önce ya da tedavi sırasında ilaç rezistansını saptayabilecek spesifik belirleyicilerin ortaya çıkarılması bir çok hastada prognoz açısından olumlu gelişmelere yol açabilecektir.

Hematolojik Malignansi: Bu gruptaki hastaların 7'si AML, 8'i ALL ve 1'i lenfoma tanısı almıştı (Tablo 3). Onaltı hastadan ikisinde tedavi bitiminde çalışmalar tekrarlandı. Böylece toplam 18 çalışma materyali elde edilmiş oldu (Tablo 3). Toplam 18 materyalden 7'sinde sadece *akım sitometri*, 4'ünde sadece *RT-PCR* ve 7'sinde de hem akım sitometri hem de RT-PCR analizi yapıldı. Dört hastada akım sitometri, akım sitometri cihazının geçici süreli arızalanmasına bağlı olarak yapılamadı. Yedi hastada RT-PCR büyük olasılıkla uzun süreli saklama ve transportasyondaki güçlükler nedeniyle mRNA'nın degradasyonuna sekonder olarak yapılamadı. Toplam 12 hastada akım sitometri 2 farklı antikor kullanarak yapıldı böylece tek antikora bağlı ortaya çıkabilecek "yanlış-pozitif" ya da "yanlış-negatif" olasılıkları büyük ölçüde azaltılmaya çalışıldı. Bu hastalar sadece akım sitometri yapılan 7 hastayı ve hem akım sitometri hem de RT-PCR yapılan 5 hastayı kapsıyordu.

Akciğer Kanseri: Bu gruptaki hastaların 10'u küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve 10'u epidermoid akciğer kanseri tanısı almıştı. Tümör varlığı CT ya da x-ray ile teyid edildi. Tüm hastalardan MIBI görüntülemesi sonrası bronkoskopik biopsi alındı. MIBI görüntüleme bulguları tüm hastalarda *immunohistokimyasal* inceleme ve 14 hastada hem immunohistokimya hem de *RT-PCR* sonuçları ile karşılaştırıldı (Tablo 5). Beş hastada RT-

PCR dokunun yetersiz olması ve büyük olasılıkla uzun süreli saklama ve ulaşımındaki güçlükler nedeniyle mRNA'nın degradasyonuna sekonder olarak yapılamadı.

II. SİNTİGRAFI: a. Sintigrafik Verilerin Elde Edilmesi: Tüm görüntüler ADAC çift detektörlü gama kamera sistemi (dual-head ADAC Genesys kamera, Pegasys SP10, IP8 komputer sistemi, ADAC Lab. CA, USA), düşük enerji ve yüksek rezolüsyonlu kolimatör kullanılarak alındı. 15 mCi MIBI enjeksiyonunu takiben 20.-30. dakikalarda hematolojik malignansi hastalarında tüm vücut planar ve pelvis spot, akciğer kanseri hastalarında toraks SPECT ve spot görüntüleri alındı. Ayrıca akciğer kanseri hastalarında MIBI'nin tümör ve normal dokulardan atım hızını karşılaştırmalı olarak hesaplayabilmek için 3. saat geç toraks spot görüntüler de elde edildi. Atım hızı, solid tümörlerde tek bir tümör odağı olduğu için daha kolay ve standardize olarak hesaplanabildiğinden dolayı sadece akciğer kanseri hastalarında hesaplandı. Tüm spot görüntüler 10 dakika boyunca elde edildi. SPECT görüntüleri herbiri 30'ar saniyelik adımlarla 64 adımda 64x64x16 matriks kullanarak alındı. Tüm "framelere" ışınların dokular tarafından absorbe olan değerinin (atenüasyon) düzeltilmesi uygulandı. Kullanılan teknik parametreler aşağıda belirtilmiştir.

Doz (mCi)	15
Başlama süresi (dk.)*	20-30
Kolimatör	LEHR
Rekonstrüksiyon	Butterworth
kesilme frekansı / kuvveti	0.35/6

b. Sintigrafik Verilerin Değerlendirilmesi: MIBI görüntülerinde kullanılan değerlendirme parametreleri aşağıda belirtilmiştir;

◆ Hematolojik malignansi hastaları için hedef organ (kemik iliği) ve referans organdaki (vücudun proximali için fizyolojik akciğer tutulumuyla ve distal kısımlarındaki tutulum en yakın yumuşak doku tutulumu) radyoaktif madde tutulumlarının birbirlerine göre karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi, a. skorum sistemi kullanarak (Tablo 1) ve b. tm/bkg oranlarının hesaplanması ile yapıldı (Tablo 2). Skorum aşağıdaki sisteme uyularak yapıldı;

- ◆ Hedef organ tutulumu < referans organ= 1,
- ◆ Hedef organ tutulumu = referans organ= 2,
- ◆ Hedef organ tutulumu > referans organ= 3 olarak skorlandı (Tablo 1).

◆ Akciğer kanseri hastalarının değerlendirilmesi; a. tm/bkg oranları, ve b. tümör ve normal dokulardan MIBI'nin saatteki atım hızı (%A/sa) hesaplanarak yapıldı (Tablo 5).

Hematolojik malignansi hastaları için kalitatif ve kantitatif değerlendirme; humerus, omuz eklemi, sternum, crista iliaca anterior, trochanter major, sakroiliak eklemler ve femur alanlarında ayrı ayrı yapıldı. Tüm değerler simetrik organlar için ayrı ayrı elde edildi. Elde edilen skorların ve tm/bkg oranlarının ortalamaları belirlendi (Tablo 1, 2). MIBI'nın böbrek ve barsaktan atılımı ve kalpteki yoğun tutulumu nedeniyle bu alanlara süperpoze olup yanlış sonuçlar verebileceğinden dolayı vertebral kolon değerlendirme dışı bırakıldı.

Akciğer kanseri hastaları için SPECT transvers kesitlerinde tümör volümünün tümünü içine alacak şekilde tümör etrafında ve karşı tarafta çizilen ilgi alanları içindeki ortalama sayımların birbirine oranı hesaplandı. Tümör ve normal doku MIBI atım hızları erken (20-30 dk.) ve geç (3 sa.) fazlarda çekilen spot görüntüler kullanılarak hesaplandı. (Tablo 5) Hem erken hem de geç spotlar için aynı ilgi alanları kullanılarak "pixel" sayısının sabit kalması ve böylece atım hızlarının standardize edilmiş bir yöntemle hesaplanması sağlandı. Tc-99m için fiziksel yıkım düzeltilmesi yapılarak ilgi alanları içindeki ortalama sayımlar kullanılarak aşağıdaki formülle hem tümör hem de normal dokular için MIBI atım hızı hesaplandı;

$$\%A/sa = \frac{N(\text{erken}) - DN(\text{geç})}{N(\text{erken}) \times T} \times 100$$

N (erken): erken spot (20-30 dk.) görüntülerde var olan ortalama sayım, **DN (geç):** geç spot (3 sa.) görüntülerde Tc-99m'in fizik-yıkım düzeltilmesi yapıldıktan sonra elde edilen ortalama sayım ve **T:** erken ve geç görüntüler arasında saat olarak geçen süre.

MIBI sintigrafileri birbirinden ve hastanın hem klinik hem de laboratuvar bilgilerinden habersiz üç Nükleer Tıp uzmanı tarafından değerlendirilerek ortak karar elde edildi. Elde edilen tm/bkg oranları ve %A/sa değerleri immunohistokimya ve RT-PCR sonuçları ile karşılaştırıldı (Tablo 5).

III. DOKULARIN ELDE EDİLMESİ

Hematolojik malignansi hastalarında görüntülemeyi takiben kemik iliği aspirasyon örnekleri alındı ve aynı gün akım sitometri ve RT-PCR analizleri için uygun işlemlerden geçirildi.

Akciğer kanseri hastalarına görüntülemeyi takiben bronkoskopik biopsi yapıldı ve biopsi örneklerinden bir bölümü bir tübe konarak buz içinde RT-PCR analizi için total

RNA'ları ayrılmak üzere hemen "Moleküler Biyoloji Laboratuvarına" ulaştırıldı. Dokular RT-PCR incelemesine alınincaya kadar sıvı nitrojende saklandı. Diğer biopsi örneği de immunohistokimyasal ve histolojik çalışmalar için patolojik incelemeye alındı.

IV. AKIM SİTOMETRİ

Akut lenfositler lösemi (ALL) ve akut myelositer lösemi (AML) hastalarından periferik kan ya da kemik iliği aspirasyon örnekleri heparinli enjektörle alındı. Mononükleer hücreler, Ficoll-Hypaque kullanılarak elde edildi. Mililitrede 1×10^6 hücre olacak şekilde hücre sayımı yapıldı. Tümör hücrelerinde P-gp varlığı, bu proteinin internal epitopuna karşı geliştirilmiş özgün monoklonal antikorlar olan JSB-1 ve eksternal epitopuna karşı geliştirilmiş UIC2 kullanarak akım sitometri cihazında (EPICS 541, Coulter) değerlendirildi. Bu inceleme 10.000 hücre sayılarak yapıldı. Akım sitometrik analiz ile %10'un üzerinde P-gp pozitif olarak saptanan doku örnekleri "pozitif" olarak değerlendirildi. Belirtilen eşik değeri bu konuda yayınlanmış literatürden yararlanarak belirlendi (8).

V. TOTAL RNA İZOLASYONU

Periferik kan veya kemik iliği aspirasyon örneklerinden Ficoll kullanılarak ayrılan lösemik blastlar PBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine $0.2 \text{ ml}/10^6$ hücre ve Trizol ilave edildi. Hücre lizatının üzerine 1/10 volüm kloroform ilave edilip karışım 15 dk buz üzerinde bırakıldıktan sonra 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Üst kısımdaki renksiz faz toplandı ve üzerine İsoopropanol eklenip bir saat 20°C 'de bekletildikten sonra 15 dk santrifüj edilip %75'lik Etanol ile yıkandı. Örnekler kullanıncaya kadar -20°C 'de Etanol içinde saklandı. Sıvı nitrojende saklanan akciğer doku örnekleri de benzer şekilde işleme tabi tutuldu.

VI. RT-PCR ve PCR

Total RNA örnekleri uygun oranda su ile çözüldükten sonra miktarları saptandı. Daha sonra bir tüpe M-MUL reverse transcriptase ($200 \text{ U}/\mu\text{l}$) RNase'in ($40 \text{ U}/\mu\text{l}$), RNA ($5 \text{ mg}/\mu\text{l}$) ve dNTP'ler (10 mM) ilave edilerek 37°C 'da bir saat inkübe edilerek cDNA reaksiyonu gerçekleştirildi. Daha sonra örnek 75°C 'da 5 dk ısıtılıp buz üzerinde soğutuldu. Tüpten alınan $20 \mu\text{l}$ 'lik örnek daha sonra spesifik primerlerle 94°C 'de 1', 55°C 'de 30 sn ve 72°C 'de 2 dk'lık programlama ile 30 siklus amplifiye edildi. Örnekler %1'lik agaraz jelde kontrol edilerek fotoğrafları çekildi.

VII. IMMUNOHİSTOKİMYA

Formalinde fixe edilmiş, parafinize, 5 mikron kalınlığında doku örnekleri poly-L-lysine ile kaplı slaydlara kondu (Sigma, St. Louis, MO). İmmun boyama için avidin-biotin-peroksidaz işlemi uygulandı. Deparafinizasyondan ve rehidrasyondan sonra, kesitler normal at serumu (Vector, Burlingame, CA) ile 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra da primer antikor olan JSB-1 (Novocastro Lab, UK) ile 2 saat, 4°C'de, 1:20 dilüsyonda inkübe edildi. Bunu takiben doku örnekleri sekonder biotin ile anti-fare antikor ve avidin-biotin-peroksidaz kompleksi ile (Vector) inkübe edildi. Son olarak 0.03 % diaminobenzidin'e (Sigma) maruz tutulan doku örnekleri incelemeye alındı. Negatif kontrol bir örneğin sekonder antikorla boyanmasıyla elde edildi. İmmün boyama sonuçları sintigrafi sonuçlarından habersiz, deneyimli bir patolog tarafından değerlendirildi. Tümörler P-gp varlığının derecesine göre 2 gruba ayrıldı.

Grup 1. P-gp boyanması hiç saptanmayan tümörler negatif "-" olarak (Resim 1),

Grup 2. Fokal ya da difüz pozitiflik (Tüm doku örneğinin %10'dan daha az bir kısmında fokal P-gp varlığı) "+" olarak skorlandı (Resim 2).

VIII. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Hematolojik malignansi hastalarından P-gp "+" ve P-gp "-" olanların MIBI kalitatif ve kantitatif değerleri arasındaki fark Mann-Whitney U testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı. MIBI değerlerinin P-gp pozitifliğini saptamada kullanılan eşik değerleri ROC (Receiver Operator Characteristics) eğri analizi ile bulundu. Bu eşik değerlere göre sensitivite ve spesifisite hesapları P-gp pozitifliği sınırı %10 ve %25 olmak üzere iki ayrı şekilde hesaplandı. Kullanılan iki antikor arası uyum Spearman testi ile incelendi. Akciğer kanseri hastalarında da P-gp "+" ve P-gp "-" hastaların MIBI değerleri Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılırken hastaların tümör ve normal doku MIBI değerleri Wilcoxon testi ile analiz edildi. Tümör büyüklüğü ile tm/bkg oranları arasındaki uyum Spearman testi ile incelendi.

B. BULGULAR

Hematolojik Malignansi Hastaları:

I. *Akım Sitometri Sonuçları:* Onaltı hastadan elde edilen toplam 18 dokunun 14'ünde akım sitometrik inceleme yapıldı. Çalışılan bu 14 dokunun 2'si tek antikor (JBS-1) ve 12'si de iki antikor kullanarak incelendi (JSB-1 ve UIC2) (Tablo 3). Değerlendirmede %0-%10 düzeyleri arası P-gp için negatif (normal popülasyonda var olan düzeyler, 8) ve %10 ve üzeri pozitif kabul edildi. Bu sonuçlara göre 14 dokunun 9'unda %10 ile %83 arasında değişen düzeylerde P-gp pozitifliği saptanırken 5 dokuda P-gp negatif olarak bulundu (Tablo 3). Bu grup içinde tekrarlı çalışılan iki hastadan birinde tedavi öncesi P-gp'nin negatif olması ve tedavi sonrası pozitifleşmesi kemoterapiye karşı gelişmiş MDR ile uyumluydu (Tablo 3, 9. hasta).

İki antikor arası uyum P-gp varlığı açısından sayısal olarak değerlendirildiğinde $r=0.928$ ($p=0.0003$; Spearman testi) ve akım sitometrik ölçümlerle elde edilen eşik değer %10'un altı ve üzeri olmak üzere iki grup halinde değerlendirildiğinde $r=100$ olarak bulundu (Tablo 3).

II. *RT-PCR Sonuçları:* Toplam 18 dokunun ancak 11'inde RT-PCR analizi yapılabildi. Geri kalan hastalarda mRNA izolasyonu yapıldığı halde dokuların dayanıksızlığına bağlı olarak mRNA'ların kırılması sonucu RT-PCR analizine elverişli olmadıkları saptandı. RT-PCR sonuçlarına göre dokuların 4'ünde P-gp pozitifken, 7 dokuda P-gp varlığına rastlanmadı. Hem RT-PCR hem de akım sitometrik çalışması yapılan 7 dokunun 5'inde her iki tekniğin sonuçları birbiriyle uyumlu bulundu ancak dokuların 2'sinde P-gp varlığı için RT-PCR sonuçları negatifken, akım sitometri sonuçları her iki antikor için de pozitif (Tablo 3, 1. ve 3. hastalar). RT-PCR ve akım sitometri sonuçları birbiriyle uyumsuz çıkan bu iki hastada pozitif olan ve iki antikorla da teyid edilen akım sitometri sonuçları "pozitif" olarak kabul edildi. RT-PCR sonuçları uygun kolonun elde edilememesi nedeniyle HPLC ile kantitatif olarak ölçülemedi.

III. *MIBI Sonuçlarının Akım Sitometri ve RT-PCR Sonuçları ile ilişkisi:* Hem kalitatif (skorlama) hem de kantitatif (tm/bkg oranları) değerlendirme sonuçları ile P-gp düzeyleri arasında ters bir orantı olduğu bulundu (Şekil 1). Akım sitometrik ölçümlerde bulunan P-gp pozitifliği yüzdesi ile MIBI görüntülemesinin kalitatif ve kantitatif bulguları, P-gp pozitifliği için

eşik 1. %10 kabul edilerek, ve 2. %25 kabul edilerek iki ayrı şekilde değerlendirildi. Bu incelemenin amacı MIBI görüntülemesinin hassasiyetinin dokuda artan P-gp yüzdesi ile orantılı olup olmadığını değerlendirmektir.

1. P-gp pozitifliği için eşik %10 kabul edilerek yapılan MIBI görüntülerinin Mann-Whitney U testi ile değerlendirmesinde;

Kalitatif skorların ortalama değerleri:

•Pgp pozitif hastalarda 1.88 ± 0.54 ve •P-gp negatif hastalarda 2.58 ± 0.14 olarak bulundu. Bu değerler arasında istatistiksel fark vardı ($p=0.0084$, range:1.01-2.71, medyan:1.90) (Resim 2).

Kantitatif hesaplanan tm/bkg ortalama değerleri:

•P-gp pozitif hastalarda 1.14 ± 0.18 ve •P-gp negatif hastalarda 1.36 ± 0.13 olarak bulundu. Bu değerler arasında istatistiksel olarak fark vardı ($p=0.016$, range:0.95-1.48, medyan:1.10) (Resim 1).

P-gp "+" olan grupta pozitiflik düzeyleri %10 ila %13 arasında değişen değerlerde bulunan iki hastada MIBI parametreleri bu grup için saptanan ortalamadan belirgin ölçüde farklıydı (Resim 3);

kalitatif skorlar - 2.71 ve 2.62'a karşın $\text{ort}=1.88 \pm 0.54$,

kantitatif oranlar - 1.48 ve 1.462a karşın $\text{ort}=1.14 \pm 0.18$.

2. P-gp pozitifliği için eşik %25 kabul edilerek yapılan MIBI görüntülerinin Mann-Whitney U testi ile değerlendirmesinde;

Kalitatif skorların ortalama değerleri,

•Pgp pozitif hastalarda 1.62 ± 0.43 ve •P-gp negatif hastalarda 2.49 ± 0.27 olarak bulundu. Bu değerler arasında istatistiksel fark vardı ($p=0.0011$, range:2.33-2.71, medyan:2.62).

Kantitatif hesaplanan tm/bkg ortalama değerleri,

•P-gp pozitif hastalarda 1.04 ± 0.07 ve •P-gp negatif hastalarda 1.34 ± 0.14 olarak bulundu. Bu değerler arasında istatistiksel olarak fark vardı ($p=0.0007$, range:1.20-1.59, medyan:1.38).

Yukarıdaki sonuçlar gözönüne alındığında eşik %10 ve %25 olarak hesaplanan her iki değerlendirme için hesaplanan hassasiyet ve spesifisite değerleri Tablo 4'de gösterilmiştir. Buna göre eşik %10 iken spesifisitenin (%100) ve eşik %25 iken hassasiyetin (%100) en yüksek değerlere ulaştığı gözlenmiştir.

Akciğer Kanseri Hastaları:

I. *Immunohistokimya Sonuçları:* 20 hastanın, 14'ünde immunohistokimyasal yöntemle P-gp varlığını belirleyen boyanma izlenmedi. Sadece 6 hastada boyanma saptandı ve bunların ancak iki tanesi difüz ve 4 tanesi fokal boyanmaydı (Table 5). Hasta sayısının yetersizliği nedeniyle istatistiksel anlamlılık sağlamak için fokal ya da difüz boyanma gösteren hastalar aynı grupta incelendi. Böylece immunohistokimyasal değerlendirmede P-gp varlığına göre hastalar 2 gruba ayrıldı;

- Grup 1. Tamamen negatif P-gp (14 hasta) (Resim 4),
- Grup 2. Fokal ya da difüz pozitif P-gp (6 hasta) (Resim 4).

Çalışma grubumuzda P-gp pozitifliği açısından SCLC ve epidermoid tümörler arasında fark izlenmedi (Tablo 5). Ayrıca stromal P-gp varlığı bronkoskopik biyopside dokunun çok küçük olmasına bağlı olarak tam değerlendirilemediği için tümöre eşlik edebilecek stromal P-gp varlığının sonuçlara etkisi incelenemedi.

II. *RT-PCR Sonuçları ve Immunohistokimya ile İlişkisi:* 14 hastada P-gp varlığı RT-PCR ile de incelendi. Bu sonuçlara göre 12 hastada P-gp negatifken 2 hastada pozitif. Bu sonuçlar immunohistokimya sonuçları ile tam bir uyumluluk içindeydi ($r=100\%$) (Tablo 5).

III. *MIBI Sonuçlarının Immunohistokimya ve RT-PCR ile İlişkisi:* MIBI Tm/bkg oranları ve %A/sa değerleri immunohistokimya ve RT-PCR sonuçlarıyla karşılaştırmalı olarak Tablo 5'de özetlenmiştir.

Tm/Bkg Oranları: Nekrotik dokulardaki transport özellikleri değişebileceğinden dolayı değerlendirmede radyolojik ya da histolojik olarak nekroz saptanan tüm tümörler ayrı değerlendirmeye alındı. Tm/bkg oranları Grup 1 (P-gp "-") ve Grup 2 (P-gp "+") için sırasıyla, 2.20 ± 0.28 ve 1.80 ± 0.34 olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak farklıydı ($p=0.014$; Mann-Whitney U testi) (Tablo 5, Şekil 2, Resim 4).

Tümör Dokusu ve Normal Dokuların MIBI %A/sa Değerleri: Tümör ve normal dokular arasında MIBI atım hızları açısından hiçbir fark bulunamadı ($p=0.81$; Wilcoxon testi) (Tablo 5). Tümör %A/sa değerleri ve P-gp düzeyi arasında bir ilişki bulunamadı ($p=0.35$; Mann-Whitney U testi) (Şekil 3).

Tümör büyüklükleri nekrotik tümörler grup dışı bırakıldığında, 1.8 cm ve 4.0 cm arasında değişti ($\text{ort} \pm \text{SD}: 2.70 \pm 0.59$). Tm/bkg oranları ve tümör büyüklüğü arasında bir ilişki saptanamadı ($p=0.278$; $r=0.1805$; Spearman testi) Tm/bkg oranları açısından epidermoid

tümörler ve SCLC arasında fark bulunamadı (sırasıyla, $\text{ort} \pm \text{SD}: 1.90 \pm 0.43$ ve 2.20 ± 0.31), ($p=0.89$; Mann-Whitney U testi) (Tablo 5).

Nekrotik Tümörler: Beş tümörde CT ya da histolojik olarak nekroz saptandı (Tablo 5). İstatistiksel olarak tm/bkg oranlarında, kuvvetli P-gp pozitivitesi olan hastalar grup dışı bırakılınca, nekrotik tümörlerle nekrotik olmayan tümörler arasında fark vardı; sırasıyla, $\text{ort} \pm \text{SD}: 1.70 \pm 0.18$, range: 1.50-1.90, medyan: 1.70 **karşın** $\text{ort} \pm \text{SD}: 2.06 \pm 0.39$, range: 1.30-2.70, medyan: 2.00 (Tablo 5).

Nekrotik tümörlerde MIBI atım hızları nekrotik olmayanlarda elde edilen değerlerden farklıydı, sırasıyla; $\text{ort} \pm \text{SD}: 14 \pm 2.12$, range: 11-16, medyan: 14 **karşın** $\text{ort} \pm \text{SD}: 11.2 \pm 2.43$, range: 7-16, medyan: 11 olarak bulundu.

Nekrotik tümörlerin büyüklükleri 4.5 cm ile 9.5 cm arasında değişti ($\text{ort} \pm \text{SD}: 6 \pm 2.12$). Tümör büyüklükleri ve tm/bkg oranları arasında bir ilişki saptanamadı ($p=0.475$; $r=0.1375$; Spearman testi) (Tablo 5).

Bu çalışmada her iki grup hasta için hasta sayımızın azlığına bağlı olarak prognoz ve P-gp düzeyi arasında bulunan ilişkiyi inceleme olanağımız olmadı.

SONUÇ

Çoklu ilaç direncinden sorumlu olan P-gp'nin tanımlanması hem RNA hem de protein düzeyinde yapılabilmektedir. RNA düzeyinde northern blot, slot blot RT-PCR ya da *in situ* hibridizasyon ile yapılabilmektedir. Ancak şimdiye kadar yapılmış çalışmalarda ortaya çıkan tutarsızlıklar, bu tekniklerin doku örnekleri gerektirmeleri yani invazif olmaları, tümöral doku dışında kalan normal dokuların tümör örneklerine kontaminasyonu kullanılan bu yöntemlerin en önemli dezavantajlarını oluşturur (9-11). Protein düzeyinde ise spesifik antikorlarla yapılan immunohistokimya, western blot ve akım sitometri teknikleri kullanılmaktadır. Ayrıca proteinin varlığı ve aktivitesi arasında bazı durumlarda direk bir ilişki bulunamadığından rodamin-123 kullanarak proteinin dışa atım fonksiyonu da ölçülebilmektedir (12). Değerlendirme sırasında, protein düzeyini belirleyen bu *in situ* metodlar RNA düzeyini belirleyen metodlardan daha sübjektif olsa da P-gp pozitif hücrelerin yüzdesi, tümöral hücrelerde ve çevre normal dokularda dağılımı hakkında bilgi verdiği için değerlidirler. Güncel olan diğer bir yöntem ise fonksiyonel görüntüleme ajanı olan MIBI'nin P-gp mekanizması tarafından bir transport substratı olarak tanınması ve invazif yöntemlere baş vurulmadan P-gp varlığı hakkında *in vivo* bilgi verme olanağını sağlayabileceğidir (6, 7). Ancak bu güne kadar yapılmış kapsamlı *in vitro* çalışmalara karşın MIBI'nin klinikte kullanım değeri yapılan çalışmaların yetersiz olmasına bağlı olarak saptanamamıştır (6, 7, 13-15).

Yaptığımız bu çalışmada daha önce yapılmış *in vitro* ve *in vivo* diğer çalışmalarla benzer sonuçlar alınmış ve elde etmiş olduğumuz kalitatif ve kantitatif sonuçların beklentilerimizle uyumlu olarak P-gp düzeyleri ile ters orantılı olduğu bulunmuştur. (Şekil 1 ve 2) (6, 7, 13, 15).

Hematolojik malignansi hastalarında İlginç olarak akım sitometrik değerlendirmede P-gp pozitifliği için eşik düzey %10 olarak alındığında MIBI'nin spesifikliğı %100 bulunurken hassasiyeti %81.8 idi. P-gp "+" olan grupta pozitiflik düzeyleri %10 ila %13 arasında değişen değerlerde bulunan iki hastada MIBI parametreleri bu grup için saptanan ortalamadan farklıydı (Resim 3). Gama kameranın rezolüsyon limitleri ve P-gp dağılımındaki heterojenite göz önüne alındığında P-gp düzeyi arttıkça görüntüleme ile elde edilen sonuçların hassasiyetinin artacağı varsayılarak eşik düzeyler % 25'e çıkarılarak bir değerlendirme daha yapıldı. Bu durumda beklendiğı şekilde hassasiyet %100'e ulaşırken spesifisite %81.8'e düştü (Tablo 4). Burada akla gelen diğer bir açıklama da P-gp varlığı moleküler düzeyde saptansa da pompa sisteminin yeterli etkinlikte bulunamayabileceğidir. P-gp aktivitesini

ölçebilmek için rhodamine 123 dışa atım testi kullanılmaktadır. (12, 16). Yapılan çalışmalara göre P-gp aktivitesi ve rodamin-123 atımı arasında direk bir ilişki olduğu ve tedavi edilmemiş hastalarda, edilenlere göre bu boyanın hücre dışına atımının daha düşük düzeylerde olduğu bulunmuştur (12, 16). AML hastaları arasında tedaviye yanıtızlığın ortaya çıkması için blast populasyonunun %36'sından fazlasında P-gp ekspresyonunun olması gerektiği belirlenmiştir (17). Ancak daha önceki çalışmalara göre bu eşiğin %10 ile %36 arasında değiştiği rapor edilmiştir (16, 18). Bu farklılıklar P-gp'nin transport kapasitesinde matürasyona bağlı farklılıklarla açıklanabilir. CD34'ün P-gp ile beraber bulunması pompanın aktivitesini arttırmakta, yokluğu ise aktiviteyi minimale indirmektedir (19). Bu sonuçlara göre P-gp eksprese eden myeloblastların ilaç dışa atım kapasitelerinde farklılıklar olduğunu ve bu özelliğin de büyük ölçüde matürasyon fenotipi ile birlikteliğini düşündürmektedir. Tüm bu veriler bizim hasta grubumuzda aykırılık gösteren iki hastanın bulgularını bir ölçüde açıklık getirebilir.

Akciğer kanseri hastalarında da hematolojik malignansi hastalarından elde edilen sonuçlara benzer veriler elde edilmiştir. P-gp düzeyi negatif ve pozitif hastalar arasında Tm/bkg oranları açısından istatistiksel bir farklılık bulunmuştur ($p=0.014$) (Şekil 2). Ancak MIBI atım hızı ile P-gp düzeyleri arasında bir ilişki saptanamamıştır (Şekil 3).

P-gp ATP'ye bağımlı çalışan bir atım pompasıdır. MDR eksprese eden hücrelerde ATP'nin hücrelere nasıl bağlandığı ve bu enerjinin ilaç birikimini nasıl etkilediği açık olarak bilinmese de hücre içi azalmış ilaç konsantrasyonlarının, a. "steady state" ilaç birikiminin azalması ve, b. substrat dışa atımında artma sonucu olduğu düşünülmektedir. Literatürde bu iki özellik hakkında çelişkilerin varlığı her iki faktörün P-gp mekanizmasına ne boyutta etkide bulunduğuna ilişkin ileri çalışmaların gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Pgp'nin ilaç dışa atımını sağlayan taşıyıcı bir mekanizma olduğu düşünülürse, P-gp düzeyleri ve artmış dışa atımın berabebr varlığı söz konusudur. Tam tersine, bazı araştırmacılar P-gp düzeyleri yüksek ve dirençli hücre kültürlerinde azalmış ilaç konsantrasyonu ve aktif dışa atım mekanizması arasında bir ilişki bulamamışlardır (4, 20, 21). Buna benzer şekilde, bu ön çalışmada, P-gp pozitif hastalarda MIBI'nin tümörden atım hızı ve P-gp düzeyleri arasında bir ilişki bulunamamıştır. Sonuçlarımızda izlendiği gibi, P-gp'nin "flipase" olarak fonksiyon gördüğü hipotezi ile direkt olarak proteine bağlanan ilacın lipid tabakasında iç tabakadan dışa atımı sonucu hücre içi ilaç konsantrasyonları düşük kalmaktadır (22). Bu bağlamda, ilacın membranla ilişkisini kaybettiği anda dışa atım hızlarının dramatik olarak değişmesini gerektirmemektedir. Hücre içi tutulumunun 2 saat süresince lineer kaldığı ve hücresel hiç bir atımın saptanmadığı, sitoplazmadaki tubülin'e sıkıca bağlanan Kolşisinde (4), negatif membran potansiyeline bağlı olarak mitokondrilere sekestre

olan MIBI P-gp pompasının dışı atım fonksiyonundan etkilenmeyebilir. Diğer bir açıklama da, P-gp efflux pompası dengeye hızla ve kısa sürede varabilen bir mekanizmaya sahip olabilir. Bu durumda bizim enjeksiyondan sonra beklediğimiz ortalama süre olan 30 dk'da atım belli bir dengeye ulaşarak tümör ve normal doku atım hızları birbirlerine eşit düzeye erişebilmektedir. Diğer sözü edilmesi gereken bir konu da bulgularımız gama kameranın görüntüleyebilme eşikleri ile kısıtlı olmasıdır. Bu durumda transport kinetiğinde ortaya çıkabilecek birbirinden çok farklı olmayan belli belirsiz farklar saptanamayabilir ancak belirtilmesi gereken bir konu da değişik alanlarda yapılan tümörden atım çalışmalarının diğer tümör çalışmalarında başarıyla sürdürülüyor olmasıdır. Yine de P-gp'nin tümörde heterojen olarak dağılımı gözlemlediğimiz değişen düzeylerde ve tutarsız atım hızlarını elde etmemize neden olmuş olabilir. Yalnız bu konu tümör kesitinin tümü çalışılmadığı sürece, diğer RNA ve protein düzeylerinde yapılan tüm çalışmaların da hassasiyetini düşüren bir faktör olarak göz önünde tutulmalıdır.

Temel prensip olarak radyoaktif maddelerin hücre içine taşınması da diğer difüzyon özelliği gösteren moleküller gibi biyolojik özelliklere de bağlıdır. Benzer şekilde, bu çalışmada nekrotik tümörlerde tm/bkg oranları nekrotik olmayanlara göre anlamlı bir düzeyde düşük bulunmuştur ($p < 0.0001$). Bu bulgu da büyük olasılıkla tümör vaskülarizasyonunun zayıflaması ve bazı bölgelerde olmaması sonucu maddenin kötü penetrasyon ve dağılımına bağlıdır. Ek olarak, büyük olasılıkla maddenin içine sekestre olabileceği canlı mitokondri sayısının yetersizliğine ve değişik farmakokinetik özelliklere bağlı olarak, nekrotik tümörlerden atım hızları nekrotik olmayanlardan daha yüksek bulunmuştur ($p = 0.0173$) (Tablo 5). Bu bulguya dayanarak, nekrotik tümörü olan hastalarda P-gp açısından değerlendirme, yanlış pozitif sonuçlara yol açabileceğinden, büyük bir dikkatle yapılmalıdır.

SCLC genellikle kemoterapiye progresif yanıtızsızlık gösteren bir kanser olsa da biz çalışmamızda P-gp düzeylerinin 10 hastanın 8'inde negatif olduğunu ve epidermoid kanserle P-gp varlığı açısından bir fark olmadığını izledik. Yine de bu bulgu daha önce yapılmış çalışmalar bazında çok şaşırtıcı bir bulgu olmamaktadır. SCLC'da P-gp'ye bağlı olmayan çoklu ilaç direnç mekanizmasından söz edilmiştir (23, 24). Hatta çeşitli araştırmacılar hem SCLC hem de diğer akciğer kanseri hastalarında MDR1 mRNA varlığının minimal düzeylerde saptandığını bildirmişlerdir (23, 25, 26). P-gp ATP bağlayan kaset taşıyıcıların bir üst ailesini oluşturmaktadır ve son yıllarda bu ailenin yeni bir üyesi olan ve insan akciğer kanseri hücre kültürlerinden klonlanan "multidrug resistance-associated protein (MRP) - çoklu ilaç direnciyle ilişkili protein" tanımlanmıştır. Bu nedenle, MRP geni varlığı akciğer kanserinde kemoterapiye yanıtızsızlığı açıklayabilir (27). Önceki çalışmalarla aynı bağlamda olarak bizim çalışmamızda da P-gp hastaların ancak %10'da (2 hasta) kuvvetli ve %20'sinde de

(4 hasta) fokal olarak saptanmıştır. MRP geni taşıyan hücreler genellikle substratların yani kemoterapötiklerin azalmış hücre içi konsantrasyonu özelliğini göstermezler (26-29) böylece grubumuzdaki çoğu hastada gözlenebilir birikim defektlerinin ve atım hızı değişikliklerinin olmaması akciğer kanseri hastalarında MRP geni varlığının MDR geni varlığından daha anlamlı olduğu hipotezini destekler niteliktedir (28, 29).

Sonuç ve Öneriler: Çalıştığımız hasta gruplarında P-gp pozitifliği ve tümöral MIBI tutulumunun birbiriyle ters orantılı iki parametre olduğunu gözlemledik. Ancak bu çalışma yine de bir ön çalışma olarak kabul edilip hasta sayısı artırılıp bulgularımız doğrulanmadan kesin bir kanaata varılmamalıdır. Ayrıca toplam 38 dokunun ancak 25 tanesinde RT-PCR analizi mevcut olduğundan tüm akım sitometrik sonuçlarının ve MIBI bulgularının PCR ile doğrulanıp HPLC ile kantifiye edilmesi daha kapsamlı bir çalışmanın gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Bu ön çalışmada MIBI'nın MDR genini saptamada kullanılacak non-invazif bir yöntem olduğunu çıkarsamaktayız. Bu da ileride kemoterapi protokollerinin değiştirilmesinde ve MDR modölatörlerinin klinik uygulamada kullanılmasında MIBI ile görüntülemenin bize yön gösterici olabileceğini göstermektedir. Ancak, solid tümörlerde nekrotik komponentin varlığı P-gp açısından değerlendirmede dikkat edilmesi gereken önemli bir konudur.

REFERANSLAR

1. Endicott JA , Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem*, 1989;58:137-171.
2. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, and Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987;84:265-269.
3. Biedler J. Genetic aspects of multidrug resistance. *Cancer*, 1992;70:1799-1809.
4. Nielsen D, Skovsgaard T. P-glycoprotein as multidrug transporter:a critical review of current multidrug resistant cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992;1139:169-183.
5. Chiu ML, Kronauge JF, Piwnica-Worms D. Effect of mitochondrial and plasma membrane potentials on accumulation of hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile) technetium(I) in cultured mouse fibroblasts. *J Nucl Med*, 1990;31:1646-1653.
6. Piwnica-Worms D, Chiu ML, Budding M, Kronauge JF, Kramer RA, Croop JM. Functional imaging of multidrug-resistant P-gp with an organotechnetium complex. *Cancer Res*, 1993;53: 977-984.
7. Rao VV, Chiu ML, Kronauge JF, Piwnica-Worms D. Expression of recombinant human multidrug resistance P-glycoprotein in insect cells confers decreased accumulation of technetium-99m-sestamibi. *J Nucl Med*, 1994;35:510-515.
8. Nüssler V, Pelka-Fleisher R, Zwierzina H, et al. P-glycoprotein expression in patients with acute leukemia-clinical relevance. *Leukemia*, 1996;10 (suppl): 23-31.
8. Ross DD, Thompson BW, Ordonez JV, and Joneckis CC. Improvement of flow-cytometric detection of multidrug-resistant cells by cell-volume normalization of intracellular daunorubicin content. *Cytometry*, 1989;10:185-191.
9. Epstein J, Xiao H, Oba BK. P-glycoprotein expression in plasma cell myeloma is associated with resistance to VAD. *Blood*, 1989;74: 913-917.
10. Mae J-P, Zittoun R, Sikic BI. Multidrug resistance (mdr1) gene expression in adult acute leukemias:Correlation with treatment outcome and invitro drug sensitivity. *Blood*, 1991;78: 586-592.
11. Nooter K, Herweijer H. Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer. *Br J Cancer*, 1991;63: 663-669.

12. Ludescher C, Hilbe W, Eisterer W, et al. Activity of P-glycoprotein in B-cell chronic lymphocytic leukemia determined by a flow cytometric assay. *J Natl Cancer Inst*, 1993;85: 1751-1758.
13. Duran Cordobes M, Starzes A, Delmon-Moingeon L, et al. Technetium-99m- uptake by human benign and malignant breast tumor cells:correlation with *mdr* gene expression. *J Nucl Med*, 1996;37: 286-289.
14. Del Vecchio S, Ciarmiello A, Potena MI, et al. In vivo detection of multidru-resistant (MDR1) phenotype by technetium-99m-sestamibi scan in untreated breast cancer patients. *Eur J Nucl Med*, 1997;24:150-159.
15. Kostakoglu L, Elahi N, Kiratlı P et al. Clinical validation of influence P-glycoprotein on the uptake of Tc-99m-Sestamibi in patients with malignant tumors. *J Nucl Med*, 1997 (in press).
16. Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump in human hematopoietic stem cells. *Cell*, 1991;66:85-94.
17. List AF. The role of multidrug resistance and its pharmacologic modulation in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 1996;10:46-51.
18. te Boekhorst PAW, Lowenberg B, vanKapel J, Nooter K, Sonneveld P. Multidrug resistant cells with high proliferative capacity determine response to therapy in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 1995;9,:1025-1031.
19. Leith CP, Kopecky KJ, Chen I-M et al. Multidrug resistance (MDR1) expression and function in acute myeloid leukemia (AML) in the elderly:MDR1 and secondary AML status are independent predictors of complete remission (CR). *Leukemia*, 9, 535 (abs), (1995).
20. Ramu A, Pollard HB and Rosario LM. Doxorubicin resistance in P388 leukemia-evidence for reduced drug influx. *Int J Cancer*, 1989;44: 539-547.
21. Deffie AM, Alam T, Seneviratne C, et al. Multifactorial resistance to adriamycin: relationship of DNA repair, glutathione transferase activity, drug efflux and P-glycoprotein in cloned cell lines of adriamycin-sensitive and resistant P388 leukemia. *Cancer Res*, 1988;48:3595-3602.
22. Chin K-V, Pastan I, Gottesman MM. Function and regulation of the human multidrug resistance gene. *Adv Cancer Res*, 1993;60:157-180.
23. Lai SL, Goldstein LJ, Gottesman MM, et al. MDR1 gene expression in lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1989;81:1144-1150.
24. Binaschi M, Supino R, Gambetta RA et al. MRP gene overexpression in human doxorubicin-resistant SCLC cell line;alterations in cellular pharmacokinetics and in pattern of cross-resistance. *Int J Cancer*, 1995;62:84-89.

25. Goldstein LJ, Gaski H, Fojo A, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst*, 1989;81:116-124.
26. Eijdemans, De Haas M, Coco-Martin JM et al. Mechanisms of MRP over-expression in four human lung-cancer cell lines and analysis of the MRP amplicon. *Int J Cancer*, 1995;60:676-684.
27. Thomas GA, Barrand MA, Steward S, Rabbitts PH, Williams ED, Twentyman PR. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human lung tumors and normal tissue as determined by in situ hybridisation. *Eur J Cancer*, 1994;30A:1705-1709.
28. Giaccone G van Ark Otte, Rubio GJ et al MRP is frequently expressed in human lung cancer cell lines in non-small-cell lung cancer and in normal lungs. *Int J Cancer*, 1996;66:760-767.
29. Sugawara I, Yamada H, Nakamura H et al. Preferential expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in adenocarcinoma of the lung. *Int J Cancer*, 1995;64:322-325.

RESİMLERİN AÇIKLAMALARI

Şekil 1. AML tanısı konan hastanın anterior ve posterior MIBI görüntülerinde, kemik iliği, omuz ekleminde, pelviste ve her iki femur başında belirgin olarak izlenmektedir. Hastanın kemik iliği aspirasyon örneğinde yapılan akım sitometrik analizde P-gp düzeyinin her iki antikora da (JSB-1 ve UIC2) düşük olduğu saptanmıştır (<%10). İki antikora yapılan akım sitometrik analiz eğrileri resimde sintigrafik görüntülerin altında gösterilmektedir. Bu hastada MIBI görüntülemesi P-gp'nin negatif olduğunu ön görmemizde non-invazif bir teknik olarak bize yardımcı olmuştur.

Şekil 2. ALL tanısı konan hastanın anterior ve posterior MIBI görüntülerinde, kemik iliği belirgin olarak izlenmemektedir. Hastanın kemik iliği aspirasyon örneğinde yapılan akım sitometrik analizde P-gp düzeyinin her iki antikora da (JSB-1 ve UIC2) yüksek olduğu saptanmıştır (>%10). İki antikora yapılan akım sitometrik analiz eğrileri resimde sintigrafik görüntülerin altında gösterilmektedir. Bu hastada MIBI görüntülemesi P-gp'nin pozitif olduğunu ön görmemizde non-invazif bir teknik olarak bize yardımcı olmuştur.

Şekil 3. AML tanısı konan hastanın anterior ve posterior MIBI görüntülerinde, kemik omuz ekleminde, pelviste ve her iki femur başında belirgin olarak izlenmektedir. Hastanın kemik iliği aspirasyon örneğinde yapılan akım sitometrik analizde P-gp düzeyinin her iki antikora da (JSB-1 ve UIC2) düşük olduğu saptanmıştır (<%10). İki antikora yapılan akım sitometrik analiz eğrileri resimde sintigrafik görüntülerin altında gösterilmektedir. Bu hastada MIBI görüntülemesi ile flow sitometri sonuçları birbirleriyle uyum teşkil etmemekle birlikte P-gp'nin düşük oranlarda pozitif olması (%12.4 ve 9.8) MIBI görüntülerinde belli bir eşik değerin üzerine çıkmadan görüntülemenin güvenilir olamayacağını düşündürmektedir.

Şekil 4. Toraks SPECT çalışması transverse kesitlerinde sol hiler bölgede izlenen artmış radyoaktif madde tutulumu, sağ üst panelde izlenen, SCLC tanısı konan ve immunohistokimyasal olarak P-gp "-" olan (sağ alt panel) hastanın sağ akciğer bölgesinde izlenen artmış madde tutulumu ile karşılaştırıldığında belirgin ölçüde azdır. İki hastanın tümöral tutulumlarındaki bu fark P-gp dışı atım pompasının MIBI'nin hücrel tutulumunu suboptimal düzeye indirmesi ile açıklanabilir.

Şekil 5. 2% agaroz jel electroporezi ile MDR1'e spesifik PCR ürünleri gösterilmektedir (Lane 2, 3 and 4). Lane 2 ve 3'de MDR1 geni pozitif olan bir hastada MDR1 geninin (167kb) spesifik ürün bandı ve lane 4'de de MDR1 geni olmayan bir hastada bu genin amplifiye olmadığı izlenmektedir. Lane 1'de DNA özel olarak hazırlanmış 50 kb'lik bandı 100kb'lik bantların izlediği DNA ladder'ı izlenmektedir (Gibco, Freiburg, Almanya)