

616.62-006:615.277.3

K 16 k



TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

KANSER KEMOTERAPİSİNDE KULLANILAN İLAÇLARIN
ETKİNLİĞİNİ VE UYGULANABİLİRLİĞİNİ

SAPTAMAYA YÖNELİK HIZLI

İN VİTRO TARAMA SİSTEMİ

PROJE NO: TAG-0913

TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA
KURUMU KÜTÜPHANESİ

1897-251

Tıp Araştırma Grubu

Medical Sciences Research Grant Committee

ÖNSÖZ

Seçmişle ilaçlar...
 616.62-006 : 615.277,3
 K 16 k

KANSER KEMOTERAPİSİNDE KULLANILAN İLAÇLARIN

ETKİNLİĞİNİ VE UYGULANABİLİRLİĞİNİ

SAPTAMAYA YÖNELİK HIZLI

IN VITRO TARAMA SİSTEMİ

PROJE NO: TAG-0913

**TÜRKİYE BİLİMSEL
 TEKNİK ARAŞTIRMA
 KURUMU KÜTÜPHANESİ**

1397-251

Prof. Dr. Atıf Akdaş

Yrd. Doç. Dr. N. Levent Türkeri

Prof. Dr. Ferruh Şimşek

Prof. Dr. Yalçın İkiser

Temmuz 1995

İstanbul

ÖNSÖZ

Geçmişte değişik kemoterapötik ajanların farklı malignitelere karşı klinik etkinliğini saptamak için ilaç duyarlılık testi geliştirmeye yönelik pek çok girişim olmuştur. Test edilen ilaçların küçük bir bölümünden klinik olarak fayda sağlanabildiğinden, tedaviye cevabı önceden belirleyebilecek in vitro sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu projenin konusu olan tarama sistemi ile antikanser ilaçları, ürogenital sistemin sık görülen bir neoplastik hastalığı olan mesane kanseri hücreleri ile laboratuvar şartlarında karşılaştırarak etkinliklerini saptamak ve böylece her hasta için en etkili ilacı bulmak amaçlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

	sayfa
I. ÖZ	3
II. ABSTRACT	4
I. GENEL BİLGİLER	5 -9
II. MATERYAL VE METOD	10 -15
III. BULGULAR	16-19
IV. TARTIŞMA	20 -23
V. KAYNAKLAR	24 - 26
VI. TABLO VE ŞEKİLLER	27 -36

Ek-1

Ek-2

ÖZ

Geçmişte değişik kemoterapötik ajanların farklı malignitelere karşı klinik etkinliğini saptamak için ilaç duyarlılık testi geliştirmeye yönelik pek çok girişim olmuştur. Test edilen ilaçların ancak çok az sayıda olanından klinik olarak fayda sağlanabildiğinden, tedaviye cevabı önceden belirleyebilecek in vitro sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu projenin konusu olan tarama sisteminin amacı, antikanser ilaçları, ürogenital sistemin sık görülen bir neoplastik hastalığı olan mesane kanseri hücreleri ile laboratuvar şartlarında karşılaştırarak etkinliklerini saptamak ve böylece her hasta için en etkili ilacı bulmaktır. Bu ise kanser hastalarının tedavisinde oldukça önemli gelişmeler sağlayabilir. Bu proje kapsamında gerçekleştirilen Trypan mavisi testi ile LDH testinin birbirleri ile olan uyumu araştırıldığında hastalarda her iki teste ait sonuçların anlamlı derecede korrelasyon gösterdiği görülmüştür ($p < 0.05$). Çalışma grubunda toplam 9 hastada (%47.4) 1 veya daha fazla ilaca karşı direnç saptanmıştır. İlaçlar tek tek incelendiğinde, Cis-platin e karşı 3 hastada (%15.8), Methotrexat a karşı 6 hastada (%31.6), Vinblastin e karşı 7 hastada (%36.8), Epirubicin e karşı 2 hastada (%10.5) ve Adriamycin e karşı 2 hastada (%10.5) direnç olduğu görülmüştür. Hastalar yüzeysel ve ileri evre tümör varlığına göre sınıflandırıldığında ilaç direncinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.005$). Sonuç olarak, her iki yöntem arasında belirgin bir korrelasyon olması nedeniyle, bu testler antineoplastik ilaçların farklı tümörler üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla kullanılabilirler. Ayrıca bu çalışma ile Türkiye'de ilk defa düzenli olarak kısa dönem mesane tümörü kültürlerinin başarılı bir şekilde yapılması gerçekleştirilmiş ve buna ait yöntem rutin olarak kullanılabilir hale getirilmiştir.

ABSTRACT

There has been an increased effort in order to develop an in vitro chemosensitivity test to predict the clinical efficacy of antineoplastic agents on various malignancies. Since, only a small number of drugs that are being tested will be beneficial clinically, there is a need to develop an in vitro system to predict the response to treatment. The aim of the screening system which is the subject of this study is to incubate the tumor cells from bladder cancer which is a very common malignancy of the urinary tractus, in the laboratory setting and define the most effective agent for each patient. This may provide a further step in the management of these patients. The Trypan blue and LDH cytotoxicity tests which were performed in this study showed a very good correlation ($p < 0.005$). There were 9 patients (47.4%) in the study group who displayed drug resistance to at least one agent. When the drugs are examined individually, there was resistance to Cis-platinum in 3 patients (15.8%), in 6 patients to Methotrexate (31.6%), 7 patients to Vinblastin (36.8%), 2 patients to Epirubicin and 2 patients to Adriamycin (10.5%). When the patients are stratified according to the stage of the tumor, statistically significant difference was found between the superficial and invasive tumors in drug resistance ($p < 0.05$). In conclusion, due to the good correlation between the two methods which were tested, they can be used to evaluate the effects of different antineoplastic agents on individual tumors. Also, a major contribution of this study is the development and establishment of a successful short term culture system for bladder tumors for the first time in Türkiye.

GENEL BİLGİLER

Kemoterapi günümüzde onkoloji biliminin kanser hastalığına karşı en etkili silahlarından birisidir ve önemi gün geçtikçe artmaktadır. Son yıllarda bazı neoplastik hastalıkların tedavisinde başarı ile uygulanan kemoterapi rejimleri geliştirilmiştir. Testis kanseri, bazı lösemiler, malign lenfomalar ve çocukluk çağı tümörleri bunlar arasında sayılabilir.

Her yıl pek çok yeni ilaç kanser tedavisi konusundaki etkileri saptanmak üzere test edilmektedir. Örneğin ABD'de Ulusal Kanser Enstitüsü'nde (NCI) her yıl 10.000 e yakın ilacın testleri yapılmaktadır (Bissery, 1993). Ancak bu ilaçların sadece ufak bir bölümü yapılan in vitro deneylerde etkili bulunmakta ve bunların da daha az bir bölümü klinik uygulamalarda başarılı sonuçlar vermektedir. Bütün bu deneysel çalışmalar ve testler oldukça uzun sürmekte, bu nedenle hastalar için son derece değerli ve kısıtlı olan zaman kaybedilmekte ve ayrıca ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır.

Tümör davranışını ve tedaviye cevabı önceden belirleyebilmek ve için gerçekleştirilen çok sayıda araştırma sonucunda malign transformasyon gösteren hücrelerin tedaviye yanıtını önceden belirleyebilmek için çeşitli parametreler belirlenmiştir. Bunlardan önemli bazıları tümörün morfometrik özellikleri (Wils J., 1988), ploidi (Friedlander M., 1988), DNA içeriği ve S fazı fraksiyonu (Erba E., 1989), mitotik indeks (Haapasalo H., 1989), timidin işaretleme indeksi (thymidine incorporation index) (Khoo SK., 1988), in vitro kemosenitivite (Volm M., 1985), onkogen ürünü ekspresyonu (Kakizoe T., 1992), büyüme faktörü yapımı ve reseptörü ekspresyonudur (Nakopoulou L., 1992). Son 20 yıl içerisinde malign tümörlerin kemoterapiye olan duyarlılıklarını doğru olarak saptayabilecek bir in vitro test geliştirilmesi amacıyla pek çok çalışma

yapılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda da bazı yöntemler geliştirilmiştir. Söz konusu testler iki ana başlık altında toplanabilir:

1. Non-klonojenik testler

- a. Vital boya atılımı yada kolorimetrik testler
- b. Floresans esasına dayanan testler
- c. Eksplant (organoid) kültürler
- d. Prekürsor inkorporasyonu
- e. Hücre içi ilaç konsantrasyonları
- f. Özel biyokimyasal ve moleküler belirleyicilerin saptanması

2. Klonojenik testler

Non klonojenik testler içerisinde en sık olarak kullanılanlar kolorimetrik testler, vital boya atılım testleri ve prekürsor inkorporasyon (^3H Thymidine) testleridir. ABD'de Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute) anti-kanser ilaçlar tarama programı çerçevesinde kolorimetrik bir test geliştirmiştir (Alley MC., 1988). Bu testin temelini canlı hücrelerin tetrazolium bazlı bileşikleri mavi formazan kristallerine dönüştürme yeteneği bulunmaktadır. Son yıllarda bu yöntem kullanılarak yapılmış duyarlılık testlerine ait raporlar yoğun olarak literatürde yer almaktadır. Bu yöntem ile çok sayıda örnek kolayca ve süratle incelenebilmektedir.

NCI çalışmalarında kullanılan MTT testinin eşdeğeri olan, aynı ilkeye sahip başka testler de geliştirilmiştir. Kotoh ve arkadaşlarının in vitro cisplatin sensitivite testi olarak kullandıkları süksinat dehidrogenaz inhibisyon (SDI) ve laktatdehidrogenaz (LDH) sitotoksosite testi, NCI çalışmalarında kullanılan Nitrobluetetrazolium (MTT) testi ile aynı prensiplere sahiptir (Kotoh S., 1994). SDI, MTT yada LDH sitotoksosite testleri, basit, hızlı ve pahalı olmayan metodlar olup, yüksek uygulanabilirliğe sahiptir. Ayrıca

diğer in vitro ve in vivo duyarlılık testleri ile korrelasyon gösterdikleri de saptanmıştır (Anai H., 1987, Carmichael J., 1987). Bizim projemizde kullanılmış olan CytoTox 96 TM (Promega Inc. Madison, WI, USA), ^{51}Cr serbest kalım sitotoksosite testinin radyoaktif olmayan eşdeğeridir. Kolorimetrik bir yöntem içeren bu testte, stabil bir sitozolik enzim olan laktat dehidrogenaz (LDH) in hücre lizisi ile serbest kalan bölümü kantitatif olarak tayin edilmektedir. Serbest kalarak kültür süpernatantına geçen LDH, 30 dakikalık bir enzimatik işlem sonucu tetrazolium tuzlarının kırmızı formazan ürününe çevrilmesi ile ölçülür. Oluşan rengin yoğunluğu parçalanmış hücre miktarı ile doğru orantılıdır. Görülebilen dalga boyunda plak-okuyucular ile absorbans verileri elde edilir ve buna göre LDH miktarı belirlenir. LDH testinin ^{51}Cr sitotoksosite testi ile aynı prensibe sahip olması ve aynı derecede etkili bulunmasının yanında önemli bazı diğer avantajları da vardır. Bunlar; 1. Hedef hücrelerin sitotoksiste testinden önce radyoaktif izotop ile işaretlenmesine gerek yoktur, 2. Radyoizotop masrafları ve radyasyon güvenliği ile ilgili problemlerin olmaması, 3. Verilerin standart bir ELISA okuyucusunda değerlendirilebilir olmasıdır.

Trypan mavisi atılım testi ise vital boya testlerine örnek olarak verilebilir (Kao JW-Y., 1989).

Klonojenik testlerin temelini ilk kez Hamburger ve Salmon tarafından tanımlanan çift tabaka yumuşak agar metodu oluşturmaktadır (Hamburger AW., 1977). Bu gün "klonojenik yöntem" olarak adlandırılan bu test yoğun olarak incelenmiş ve yapılan retrospektif çalışmalara göre in vivo ilaç duyarlılığını %50-70 ve in vivo direnci %85 in üzerinde bir doğruluk oranı ile öngörebileceği belirtilmiştir (Von Hoff DD., 1983). Semisolid bir ortamda klonojenik büyüme kanser hücrelerinin malignitesine bağlı bir olaydır (Dittrich C., 1991). Bu nedenle in vitro olarak klonojenik büyümenin varlığının incelenmesi tümör hücrelerinin davranışlarını saptamaya yönelik bir yöntem olarak

kullanılmaktadır. Bütün bu sonuçlara karşın hala yõteme ilişkin şüphe ve eleştiriler mevcuttur. Söz konusu eleştirilere temel oluşturan mevcut problemler kültürde düşük çoğalma etkinliği, ilaç yoğunlukları ve kültürlere uygulanış biçimlerinin ve koloni sayım şekillerinin standardize edilmemiş olması olarak belirtilmektedir (Bertelsen CA., 1984).

Bu projenin araştırma konusu olan mesane kanseri, görülme sıklığı açısından ürogenital sistemde prostat kanserinden sonra 2. sırada yer almaktadır. Bu tümörlerin yaklaşık olarak % 30 u ilk tanı konulduğunda ileri evre tümörlerdir. (Catalona WJ., 1992). Radikal sistektomi ve bilateral pelvik lenfadenektomi yada yüksek doz radyoterapiye rağmen, lokal olarak ilerlemiş, non-metastatik mesane kanserinde genel yaşam oranı %20-50 düzeyinde kalmaktadır (Prout GR. 1977). Bu hastaların çoğu sonuçta uzak metastazlar nedeniyle ölmektedirler. Bu olay açık olarak hastalığın ilk tanısı konulduğunda henüz tesbit edilememiş mikrometastatik odakların mevcut olduğunu göstermektedir. Metastatik transizyonel hücreli karsinomanın tedavisinde Cisplatin içeren kemoterapi, özellikle M-VAC kemoterapisi (Methotrexate, Vinblastine, Adriamycin, Cisplatin) ile elde edilen umut verici sonuçlar, neoadjuvan kemoterapinin kullanıldığı klinik çalışmaları ortaya çıkarmıştır (Sternberg CN., 1990). ABD'de Memorial Sloan Kettering kanser Merkezinde kas invazyonu gösteren mesane kanseri olan 87 hastaya M-VAC ile neoadjuvan tedavi verilmiş ve bunlardan 60 tanesine radikal sistektomi ameliyatı yapılmıştır. Hastaların %64 ü ameliyat öncesi yapılan değerlendirmede "evre düşüşü (down-staging)" göstermişler ve ameliyat edilen 60 hastanın %23 ünde hiç tümöre rastlanılmamıştır (Scher Hl., 1989). Benzer şekilde, CUETO grubu çalışmasında hastaların %44 ünde, Mayo Klinik çalışmasında da %72 sinde evre düşüşü olmuş, %25 hastada tümör tamamen kaybolmuştur (Zincke H., 1988, Fair WR., 1991).

Bütün bu bulgular, bir kısım tümörlerin uygulanan antineoplastik ilaçlara duyarlı olduğunu, diğer bölümünün ise direnç gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Geçmişte değişik kemoterapötik ajanların farklı malignitelere karşı klinik etkinliğini saptamak için ilaç duyarlılık testi geliştirmeye yönelik pek çok girişim olmuştur. Test edilen ilaçların ancak çok ufak bir bölümü klinik uygulamada faydalı bulunduğu ve in vivo duyarlılık testleri uygulaması güç ve zaman gerektiren işlemler olduğundan, yeni ilaçlardan etkili olanların saptanmasında kullanılacak in vitro sistemlerin geliştirilmesi konusunda yoğun bir ilgi ve araştırma vardır (Kao JW-Y.,1989). Eğer bu testler ile kemoterapiye cevap önceden güvenilir bir biçimde saptanabilirse, hastalar hem kullanılacak ilaçlardan en üst düzeyde fayda sağlar, hem de gereksiz ilaçların kullanımına bağlı toksisiteden kurtulmuş olurlar (Schadendorf D., 1994).

Bu projenin konusu olan tarama sisteminin amacı, antikanser ilaçların hastalara ait tümör hücreleri ile laboratuvar şartlarında karşılaştırılarak etkinliklerini saptamak ve böylece her hasta için en etkili ilacı bulmaktır. Bu ise kanser hastalarının tedavisinde oldukça önemli gelişmeler sağlayabilir.

Bu çalışma kapsamında, ilk olarak, mesane tümör hücre kültürleri, in vitro ortamında kullanılmaya başlanarak, bu hücrelerin ilaçlara duyarlılıkları araştırılmaktadır.

MESANE TÜMÖRÜ HÜCRE KÜLTÜRLERİ

Mesane tümörü, dünya genelinde en yaygın görülen kanser türüdür.

Bu çalışmada, mesane tümörü hücre kültürleri, in vitro ortamında kullanılmaya başlanarak, bu hücrelerin ilaçlara duyarlılıkları araştırılmaktadır.

Bu çalışmada, mesane tümörü hücre kültürleri, in vitro ortamında kullanılmaya başlanarak, bu hücrelerin ilaçlara duyarlılıkları araştırılmaktadır.

Bu çalışmada, mesane tümörü hücre kültürleri, in vitro ortamında kullanılmaya başlanarak, bu hücrelerin ilaçlara duyarlılıkları araştırılmaktadır.

Bu çalışmada, mesane tümörü hücre kültürleri, in vitro ortamında kullanılmaya başlanarak, bu hücrelerin ilaçlara duyarlılıkları araştırılmaktadır.

MATERYAL VE METOD

HASTALAR

Bu araştırmaya Ekim 1992- Mayıs 1995 tarihleri arasında, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda mesane tümörü tanısı ile tedavi edilen 30 hasta dahil edilmiştir. Bu hastalardan 11 tanesi, hücre kültürlerinde yeterli çoğalma olmadığı için değerlendirme dışı bırakılmıştır. Hastalara cerrahi girişim öncesinde rutin klinik tanısal işlemler (kan ve idrar tetkikleri, akciğer grafisi, böbrek-mesane ultrasonografisi ve/veya intravenöz piyelografi, per-operatuvar transüretal ultrasonografi) uygulanmıştır. Patolojik inceleme sonucunda ileri evre mesane kanseri ($\geq$ pT2) tanısı alan hastalarda klinik evreyi tamamlamak üzere kompüterize tomografi ve gereken durumlarda kemik sintigrafisi ile metastaz olup olmadığı araştırılmıştır. Daha sonra hastalara, hastalığın evresine göre, geçerlilikleri bilimsel olarak ispat edilmiş klinik tedavi protokolleri uygulanmış (yüzeyel tümörler için intrakaviter tedavi, invazif tümörler için radikal cerrahi ve /veya kemoterapi yada radyoterapi), tedaviyi takiben hastalar düzenli olarak izlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında kullanılan ilaçlar, klinik çalışmalarda mesane kanseri tedavisinde kullanılmış olan ve halen kullanılmakta olan ilaçlar arasından seçilmiştir.

MESANE TÜMÖRÜ HÜCRE KÜLTÜRLERİ

Mesane tümörü nedeniyle Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda opere edilen hastalardan alınan tümör örnekleri steril şartlarda +4°C da Ringer laktat/gentamisin solüsyonu içerisinde laboratuvara ulaştırılmış ve hücre kültürleri yapılana kadar materyal +4°C da saklanmıştır. Tümör dokuları operasyondan sonraki 3 saat içerisinde kültür işlemine tabii tutulmuştur. Projenin ilk safhasında tek

hücre süspansiyonları elde edilmiş ve bunların kültürleri yapılmıştır. Bu amaçla tümör dokusu çok ince parçalar halinde kesildikten sonra bir çelik mesh ile ezilip %0.5 trypsin solüsyonu içinde 1 saat 37°C da inkübe edilmiştir. Oluşan hücre süspansiyonu 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra hücreler 2mM L-glutamin, %10 fetal kalf serumu ve penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 (kültür solüsyonu) içinde süspansiyon haline getirildikten sonra 12 hazneli doku kültür plaklarına her bir haznede 2 milyon hücre olacak şekilde yerleştirilmiştir. Hücreler 37°C da nemli ve %5 CO² içeren bir ortamda inkübe edilmişlerdir. Ancak bu işlem sonrası yeterli sayıda canlı hücre elde edilmesi konusunda belirgin güçlük olmuştur. Bu işlem ile elde edilen hücrelerin trypan mavisi testi sonucunda büyük bölümünün canlı olmadığı saptanmış, bu nedenle ilaçlar ile yapılacak testler için yeterince hücre olmadığı saptanmıştır. Bunun üzerine kültür protokolünde değişikliğe gidilmiştir. Yapılan literatür araştırması sonucu tek hücre süspansiyonu hazırlanması yerine mikroorgan kültürü hazırlanmasının daha iyi sonuçlar verdiğini gösteren çalışmalar (Rustum YM., 1987) doğrultusunda bu protokol adapte edilmiş ve hücre kültürlerindeki canlılık oranının belirgin derecede arttığı izlenmiştir. Bu amaçla, hastalardan alınan tümör dokuları PBS içinde yıkandıktan sonra 1 mm³ boyutlarında ufak parçalara ayrıldıktan sonra bunlar doku kültür plaklarına yerleştirilmiş ve yaklaşık 5 dakika süre ile doku parçalarının tabana yapışması beklenmiş ve ardından 2.5 ml kültür solüsyonu ortama eklenmiştir. Bu işlemi takip eden 48 saat boyunca tümörün yerinden ayrılmasını engellemek amacı ile kültür plaklarına hiç dokunulmamış ve hareket ettirilmemiştir. Bu süre sonunda tümör hücrelerinin eksplanttan dışarı doğru ilerlediği ve monolayer halini aldığı ve bunların çoğunun canlı olduğu saptanmıştır (Şekil 1).

SİTOTOKSİSİTE TESTLERİ

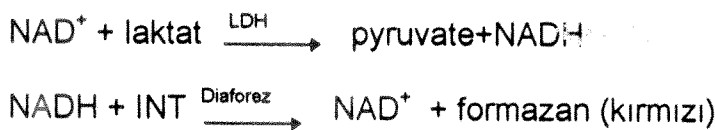
Kültür plaklarının tabanında monolayer haline gelmiş kültürlerde, kısa süreli bir tripsinizasyon ile (%0.5 Trypsin/EDTA, 60 saniye) hücreler yerlerinden ayrılmış ve kültür solüsyonu ile yıkanarak toplanmış, daha sonra da, 24 kuyucuklu kültür plaklarına her bir kuyuda 1 milyon hücre/ml olacak şekilde yerleştirilmişlerdir. Kültürlerin 24. saatinde değişik antineoplastik ilaçlardan hazırlanan ve -20oC da saklanan stok çözeltilerden 5 µl kültür ortamına ilave edilmiştir. İlaçların stok çözeltileri, kültüre 5 µl eklendiğinde nihai yoğunluk 5 µg/ml olacak şekilde PBS ile hazırlanmış ve kullanılabilecek kadar -20°C da saklanmıştır..

İnkübasyonun 48. saatinde hücreler kuyucuklardan kısa süreli tripsinizasyon ile toplanıp trypan mavisi ile sitotoksosite testi ve LDH sitotoksosite testleri yapılmıştır.

LAKTİK DEHİDROGENAZ KOLORİMETRİK TESTİ (CytoTox 96™)

Antineoplastik ilaçları ile inkübe edilen hücreler 250 g de 4 dakika santrifüje edildikten sonra, 50 µl süpernatant 96 kuyucuklu plaklara aktarılmıştır. Her bir kültürden 3 ayrı örnek alınarak çalışılmıştır. Substrat karışımı kit ile birlikte gelen tampon çözelti ile sulandırıldıktan sonra bu solüsyonun 50 µl si örneklerin üzerine ilave edilmiş ve ışık geçirmeyen bir ortamda 30 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra örneklerle 50µl reaksiyonu durdurma çözeltisi eklenmiş ve plaklar 490nm dalga boyunda otomatik bir ELISA plak okuyucusunda okunmuştur.

LDH (CytoTox 96™) testinin genel kimyasal reaksiyonu aşağıdaki gibidir:



Elde edilen veriler kullanılarak aşağıdaki formüle göre % sitotoksisite değerleri saptanmıştır:

ditmiş ve inkübasyona 24 ± 30

$$\% \text{ Sitotoksisite} : \frac{\text{Tedavi grubu} - \text{Kontrol grubu}}{\text{Kontrol grubu}} \times 100$$

u süresinin sonunda 1.0 ml'lik kültür ortamından

bu hücre oranları yapılarak 1:1 oranında 10 ml'lik kültür ortamına

TRYPAN MAVİSİ TESTİ

Antineoplastik ilaçlara karşı duyarlılığı değerlendirmede kullanılan ikinci yöntem trypan mavisi testidir. Bu yöntem de tripsinizasyon ile toplanan hücreler 1:1 (v/v) oranında %0.4 Trypan mavisi solüsyonu ile karıştırılmış ve 5 dk. inkübasyondan sonra mikroskop altında incelenerek, boya tutmayan canlı hücreler ile mavi boyanmış olan ölü hücreler sayılmış (Şekil 1a), mm³ de ölü hücre sayısı saptandıktan sonra sitotoksisite oranı (%):

$$\frac{\text{Tedavi grubu} - \text{Kontrol grubu}}{\text{Kontrol grubu}} \times 100$$

Apoptotik hücreler (%): 100 x (Toplam apoptotik hücre sayısı / Toplam hücre sayısı)
formülüne göre saptanmıştır.

Akimi sitometrisi

Akimi sitometrisi için hücreler defans tabakasına edilmis izotoksik PBS (pH 7.2) ile PBS (PBS) yıkandıktan sonra sırasıyla 14, 17, 22 numaralı görelilikler ile yıkama, yıkama, testin diğer testler ile uyumlu olup olmadığı araştırılmıştır. Bu çalışma için hormona olarak parçalanmış, ardından 30 µm naylon ağızgeçerden geçtikten sonra 400 µm dirençli prostat kanseri hücrelerinden oluşan PC3 hücre kültürleri kullanılmıştır. Hücre hücre çekirdekleri ayrılmıştır. Daha sonra %0.5 detur (10 µl / 20 µl) hücre kültürleri rutin olarak, %10 fetal kalf serumu, L-Glutamin (son konsantrasyon 2mM) ve çekirdekleri PBS ile 2 kez yıkandı. Daha sonra 10 µl / 20 µl hücre kültürleri 10 µl / 20 µl antibiyotikler (penislin/streptomisin) ilave edilmiş RPMI 1640 (Sebak) besi yerinde inkübe edilmiştir. İki kez 10 µl / 20 µl PBS ile yıkandıktan sonra 10 µl / 20 µl hücre kültürleri yapılmıştır. Besi yerlerinde %60-80 konflüen hale gelen hücreler, 12 kuyucuklu kültür ile 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir.

plaklarına, her bir kuyuda 10^6 hücre/ml olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat süre ile 37°C da ve %5 CO_2 li ortamda inkübe edilmişlerdir. Daha sonra bu kültürler vinblastin, verapamil ve diltiazem her biri 5 $\mu\text{g/ml}$ nihai konsantrasyonda olacak şekilde ilave edilmiş ve inkübasyona 24 ve 36 saat daha devam edilmiştir.

Trypan mavisi testi

Bu sürenin sonunda hücreler kültür ortamından alınarak trypan mavisi testi ile canlı ve ölü hücre oranları saptanmış, cytopspin yöntemi ile hazırlanan preparatlar hematoksilin eosin boyası ile boyanarak morfolojik yönden ortaya çıkan değişiklikler apoptozis açısından değerlendirilmiştir. Ayrıca akım sitometrisi ile hücreler incelenmiştir.

Apoptozis

Apoptozis varlığı daha önceden literatürde bildirilen şekilde saptanmıştır (Oberhammer F., 1993). Kısaca şu kriterlerin varlığı araştırılmıştır: 1) Hücre çekirdeği ve sitoplazmik kondensasyon 2) Membranda düzensizlik 3) Apoptotik cisimcikler (hücre membranı ile sarılmış çekirdek parçaları). Her bir grup için ortalama olarak 400 hücre sayılmış ve apoptotik indeks aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

Apoptotik indeks (%): $100 \times (\text{Toplam apoptotik hücre sayısı}) / (\text{Toplam hücre sayısı})$

Akım sitometrisi

Akım sitometrisi için hücreler fosfatla tampon edilmiş izotonik bir solüsyon içinde (PBS) yıkandıktan sonra sırasıyla 14, 17, 22 numara iğnelerden geçirilerek mekanik olarak parçalanmış, ardından 30 μm naylon süzgeçlerden geçirilerek filtre edilerek hücre çekirdekleri ayrılmıştır. Daha sonra % 0.5 pepsin ile inkübe edilen hücre çekirdekleri PBS ile 2 kez yıkanıp oda ısısında 20 dakika süre ile % 0.1 lik RNAaz ile inkübe edilmişlerdir. İki kez daha PBS ile yıkanan çekirdekler hipotonik Propidium Iodid ile 30 dakika süreyle inkübe edilmişlerdir.

Akım sitometrisi Becton-Dickinson marka FACscan flow cytometer de 480 nm lazer eksitasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi Cell Fit 2.0 software (Becton-Dickinson) ile yapılmıştır.

Hücrelerin proliferatif indeksi (PI) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$PI: 100 (S + G_2 + M) / (G_{0-1} + S + G_2 + M)$$

Istatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Ki-kare , ANOVA, Oranların Karşılaştırılması ve lineer regresyon testleri ile yapılmıştır.

BULGULAR

Stimulating Factor ve

Hastalardan kültür sonuçları başarılı bulunarak testleri yapılanlara ait demografik özellikler tablo 1 de, girişim sonucu elde edilen tümör materyallerine ait patolojik bulgular tablo 2 de verilmiştir. Hasta grubunda ortalama izlem süresi 6.4 ay olup en kısa izlem 1 ay, en uzun izlem süresi ise 18 aydır.

Verapamil kontrol grubu

Trypan mavisi testinin geçerliliğinin saptanması:

PC3 hücre kültürlerinde Vinblastin tedavisini takiben hücrelerin proliferatif indeksinde 24. belirgin bir artış saptanmış (kontrol grubu % 43.1, vlb grubu %79.1) ancak bunu 36. saatte dramatik bir azalma izlemiştir (kontrol grubu %54.9, vlb grubu %17.8). KKB lerin ortama eklenmesi ile 24 saat sonunda PI %60.8 (verapamil +vlb) ve %68.6 (diltiazem +vlb) olarak saptanmıştır. G0/G1 fazındaki hücrelerin oranı 24. saatte kontrol grubu için %56.9, vlb grubu için %20.9 ve kalsiyum kanal blokeri eklenen kültürler için de %39.8 (verapamil) ve %31.4 (diltiazem) olarak bulunmuştur. Vinblastinli kültürlerle KKB lerin eklenmesi ile 36. saatte PI verapamil ile %17.8 den %97.2 e ve diltiazem ile %93.1 e yükselmiştir (Tablo 3, Şekil 2.). G0/G1 fazında bulunan hücre oranları bu dönemde kontrol grubu için %45.1, vlb grubu için %82.1 ve kalsiyum kanal blokerleri için %2.9 (verapamil) ve %7 (diltiazem) olarak saptanmıştır. Hücrelerin histomorfolojik olarak değerlendirilmesi sonucu bu dönemde vlb ile karşılaşan hücrelerin %44.4 nün apoptotik olduğu ve trypan mavisi ile bu grupta ölü hücre oranının %26.1 olduğu saptanmıştır (kontrol grubu %12.1 apoptozis ve %8.7 trypan mavisi). Aynı dönemde apoptotik indeks verapamil ve diltiazem ilave edilen kültürlerde sırasıyla %18.3 ve %17.8 olarak bulunmuştur (vlb grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.001$) . Aynı gruplarda trypan mavisi ile hücre ölüm yüzdeleri sırasıyla % 9.6 ve 7 olarak saptanmıştır (Tablo 4, Şekil 3).

Kültür ortamına hematopoietik koloni stimulan faktörlerin (Granulocyte Colony Stimulating Factor ve Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) eklenmesi ile KKB ler ile elde edilenlere çok yakın veriler elde edilmiştir (Tablo 3,4). Bu çalışma sonuçlarına göre, vinblastin tedavisi ile 24. saatte ortaya çıkan ve metafaz öncesi bir yığılmayı işaret eden S ve G2+M fazı hücre oranındaki artış hücrelerin apoptozis ile ölümü sonucu 36. saatte yerini büyük oranda G1 safhasındaki durağan hücrelere bırakmaktadır (kontrol grubu % 45.1, vlb grubu % 82.1). Apoptotik indeks bu aşamada kontrol grubunun yaklaşık 4 katına çıkmakta ve bu olay PI de çok belirgin derecede bir azalma ile birlikte görülmektedir. Aynı korrelasyon trypan mavisi testi sonucunda saptanan hücre ölüm yüzdeleri ile de görülmektedir. Bu test sonucunda vlb grubunda hücrelerde ölüm yüzdesi kontrol grubunun 3 katına çıkmaktadır (kontrol %8.7, vlb %26.1). PC3 hücre kültürlerine vinblastin ile birlikte verapamil yada diltiazem eklenmesi özellikle 36. saatte hücrelerin proliferatif indekslerini büyük ölçüde artırmaktadır (verapamil %97.2 ve diltiazem %93.1). Ayrıca bu değişikliğe apoptotik indeks ve trypan mavisi testinde hücre ölüm yüzdelerinde belirgin derecede bir düşüş eşlik etmektedir (Tablo 4) . Söz konusu bulgular, trypan mavisi testinin in vitro bir sistem içerisinde, değişik tedavilere hücrelerin verdiği viabilite yanıtını belirlemede diğer testler ile tamamen uyum içerisinde olduğunu göstermiştir.

Artış direnci görülmüş, 19/30

Trypan mavisi testi (Hasta grubu)

Elde edilen tümör dokularından hazırlanan kültürlerin %63.3 ü (19/30) başarılı olmuş ve yeterli hücre çoğalması elde edilmiştir. Başarısız olan yada hücre çoğalması istenen düzeye ulaşmayan 11 kültür ilk yapılan ve tek hücre süspansiyonu tekniği ile gerçekleştirilen kültürlerdir. Yöntemde sonradan yapılan değişiklikler ile kısa süreli (7-14 gün) hücre kültürleri başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve sitotoksosite testleri için

yeterli hücre sayısına rahatlıkla ulaşılmıştır. Trypan mavisi testi ile yapılan sitotoksiste testlerinin değişik ilaçlar ve ilaç grupları ile elde edilen sonuçları tablo 5 de gösterilmiştir. Antineoplastik ilaçların kombinasyonu etkinliği belirgin şekilde arttırmış ve en yüksek sitotoksiste oranı Cisplatin-Methotrexate-Vinblastin kombinasyonu ile elde edilmiştir. Tek tek ilaçlar göz önüne alındığında en yüksek etkinlik Cis-platin ve Methotrexate ile elde edilmiş (sırasıyla %46 ve %57.7 sitotoksiste) ve bu iki ilaç etkinliği arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır ($p = 0.79$, ANOVA)

LDH testi (Hasta grubu)

Bu test ile gerçekleştirilen sitotoksiste çalışmalarının sonuçları tablo 6 da verilmiştir. Benzer şekilde en etkili sonuç Cis-platin-Methotrexate-Vinblastin kombinasyonu ile elde edilmiş (%55 sitotoksiste), bunu tek başına Cis-platin ve Methotrexate izlemiştir (% 29 ve %27, $p = 0.85$). Trypan mavisi testi ile LDH testinin birbirleri ile olan uyumu araştırıldığında hastalarda her iki teste ait sonuçların anlamlı derecede uyumlu olduğu görülmüştür ($p < 0.05$, Tablo 7, Şekil 4).

Çalışma grubunda toplam 9 hastada (%47.4) 1 veya daha fazla ilaca karşı direnç saptanmıştır (hiç sitotoksiste görülmemesi). Bunlardan iki hastada kullanılan 5 ilaca karşı direnç görülmüş, 3 hastada 2 ilaca karşı, 4 hastada ise tek bir ilaca karşı direnç olduğu saptanmıştır. İlaçlar tek tek incelendiğinde, Cis-platin e karşı 3 hastada (%15.8), Methotrexat a karşı 6 hastada (%31.6), Vinblastin e karşı 7 hastada (%36.8), Epirubicin e karşı 2 hastada (%10.5) ve Adriamycin e karşı 2 hastada (%10.5) direnç olduğu görülmüştür. Hastalar yüzeysel ve ileri evre tümör varlığına göre sınıflandırıldığında ileri evre tümörü olan hastaların tümünde (%100) en az bir ilaca karşı direncin bulunduğu,

buna karşın yüzeysel tümörlü hastalarda aynı durumun 5 hastada (%33.3) görüldüğü saptanmıştır. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.005$).

Yüzeysel tümörü bulunan hasta grubunda 1 hastada (%6.6) nüks görülmüş, ileri evre tümörü olan hastalardan bir tanesi (%25) tümör progresyonu ve metastazlar nedeniyle 4 aylık izlem sonucunda exitus olmuştur. İleri evre tümör grubunda diğer 3 hastadan 2 tanesi (%50) halen hastalıklı olarak yaşamaktadırlar. Bunlardan bir tanesi radikal radyoterapi diğeri radikal sistektomi ile tedavi edilmiştir. Söz konusu bu 3 hastadan 2 tanesinde (%50) en az 1 ilaca karşı kültürlerde direnç olduğu gözlenmiştir. Yüzeysel mesane tümörlü 15 hastadan şu ana kadar yalnızca 1 tanesinde nüks görülmüş, ancak bu hastanın kültürlerinde ilaçlara karşı direnç saptanmamıştır.

TARTIŞMA

Aynı histolojik özelliklere sahip olmalarına karşın, bu çalışma sonuçlarının da gösterdiği gibi bireysel olarak tümörler antineoplastik ilaçlara farklı yanıtlar vermektedirler.

Kullanılan deneysel yöntem ne olursa olsun in vitro sitotoksosite testlerinin bazı dezavantajları vardır. Bunlardan birincisi kullanılan ilaç yoğunluklarının standardize olmamasıdır. Hangi dozun klinik durumu en ideal biçimde yansıttığı kesin değildir. İkincisi bu testlerin tümör içi ve tümörler arası heterojeniteyi değerlendirmede sınırlı bir yeteneğe sahip olmalarıdır. Üçüncüsü deneysel koşulların tümör hücrelerinin fizyolojik mikro-ortamlarını değişikliğe uğratarak bir çeşit seleksiyona neden olmalarıdır ve bu durumu kontrol etmek son derece güçtür.

Sitotoksosite testlerinde kullanılan ilaçların dozlarına bakıldığında, literatürde bu konuda geniş bir spektrum içerisinde uygulama yapıldığı görülmektedir (Tablo 8). Bu çalışmada, belirli bir standardizasyon sağlamak amacı ile bütün ilaçlar için 5 µg/ml nihai konsantrasyonda kullanılmıştır. Trypan mavisi testi ile elde edilen sonuçlar, LDH sitotoksiste sonuçları ile anlamlı derecede korrelasyon göstermektedir (şekil 4). LDH testinin avantajı bu yöntemin otomatize olması ve nisbeten kısa bir süre içerisinde birden fazla hastaya ait sonuçların elde edilebilmesidir. Buna karşılık Trypan mavisi ile hücrelerin sayılması son derece emek yoğun bir çalışmadır. Ayrıca bu yöntemde, değerlendirmeye ait subjektivite, farklı gözlemciler ile az da olsa birbirinden farklı sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Ancak bu test özellikle ülkemiz koşullarında LDH tesine göre daha ucuzdur.

In vitro testler sırasında ortaya çıkan en önemli zorluklardan bir tanesi kültürde yeterince hücre çoğalmasının her zaman mümkün olmamasıdır. Von Hoff ve

arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 168 hastadan elde edilen tümör materyalinden ancak 75 tanesinde klonojenik testte büyüme saptanabilmiş (%44.6), 93 tümörde kültürler başarısız kalmıştır (von Hoff DD., 1991). Schadendorf ve arkadaşları malign melanom tümör dokularından elde ettikleri kültürlerde yaptıkları çalışmada 26 tümörden 24 tanesinde yeterli çoğalma saptamışlardır (%92) (Schadendorf D., 1994). Bertelsen ve arkadaşları 30 hastane ve 50 hekim tarafından refere edilen 1500den fazla tümör dokusunda gerçekleştirdikleri klonojenik testlerde, yeterli hücre çoğalmasını kültürlerin %59 unda sağlayabilmişlerdir (Bertelsen CA, 1984). Bizim çalışmamızda da modifiye metoda başarı oranı %63.3 olarak bulunmuştur. Görülmektedir ki, in vivo olarak kontrolsüz bir büyüme potansiyeline sahip neoplastik hücreler, in vitro koşullarda bu özelliklerini değiştirmekte, ve oldukça fragil hücre toplulukları haline gelmektedirler. Bunun en önemli nedeni, in vivo ortamda var olan tümör oluşturan ve destekleyen koşulların in vitro ortamda aynı şekilde sağlanamamasıdır. Ayrıca in vitro kültür ortamında belirli bir seleksiyon olup olmadığı ve sonuçta çoğalan hücrelerin tümörlerde sık olarak karşılaşılan intrarümöral heterojeniteyi ne ölçüde yansıttığı da tartışmalıdır.

Tetrazolium tuzlarının formazan kristallerine dönüştürülmesi esasına dayanan in vitro ilaç duyarlılık testleri farklı tümör örnekleri için kullanılmıştır. Ancak mesane tümörlerinde bu çalışmalar son derece azdır. Pieters ve arkadaşları çocukluk çağı lösemilerinde MTT testi ile vital boya atılım testleri arasında son derece anlamlı bir korrelasyon olduğunu bildirmişlerdir (Pieters R., 1989). Hongo ve arkadaşları tetrazolium esaslı MTT testi ile akut lenfositik lösemi ve akut nonlenfoblastik lösemi vakalarında in vitro ve in vivo ilaç duyarlılığını araştırdıkları çalışmalarında olgularının %74.4 ünde doğru olarak etkili ilacı saptayabildiklerini ancak teste ait gerçek negatif ve özgüllük değerlerinin nisbeten düşük olması sebebiyle (%57.1 ve %36.4) etkili olmayan ilaçların saptanmasının problem yarattığını bildirmişlerdir (Hongo T., 1990). Klonojenik

bir yöntemle Bertelsen ve arkadaşları 1500 den fazla solid tümör üzerinde %30-86 arasında değişen doğruluk oranları saptamışlardır (Bertelsen C.A., 1984).

Bizim çalışmamızda her iki yöntem arasında belirgin bir korrelasyon olması nedeniyle, bu testler antineoplastik ilaçların farklı tümörler üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla kullanılabilirler. Ancak in vitro olarak elde edilen cevapların klinik uygulama sonuçlarını öngörmeye ne kadar etkili olabileceğini anlamak için hastaların daha uzun süreli izlenmesi gerekmektedir. Bizim hasta popülasyonumuzda ortalama izlem süresi, henüz risk altındaki hasta grubunda sonuçları vermek için yeterince zaman geçmediğini göstermektedir. Daha uzun izlem ile tedavi nüks ve progresyon gösteren hasta sayısında teorik olarak bir artış olması beklenmektedir. Bu bilgiler elde edildikten sonra bu araştırmanın konusu olan testlerin klinik sonuçları ne doğrulukta tahmin ettiğini saptamak mümkün olacaktır. Yine de bu çalışmanın verilerinden ortaya çıkan önemli bazı ipuçları vardır. Çalışma grubundaki mesane tümörlerinde ilaçlara karşı direnç, tümör evresi ile yakın ilişkili görünmektedir. İleri evre tümörlerin hepsinde en az bir ilaca karşı in vitro direnç varken, bu oran yüzeysel tümörler için %30 civarındadır ($p < 0.005$). Bu gözlem, ileri evre mesane tümörlerinde her türlü tedaviye rağmen neden hastaların yaklaşık olarak %50 sinin hastalığa yenik düşüp hayatını kaybettiğini, buna karşın yüzeysel tümörlerin genellikle intravezikal tedaviye iyi yanıt verdiğini ve hastaların ancak ufak bir kısmının ileri evre tümör haline geldiğini açıklamaya yardımcı olabilir.

Bu çalışmanın en önemli sonuçlarından birisi Türkiye'de ilk defa düzenli olarak kısa dönem mesane tümörü kültürlerinin başarılı bir şekilde yapılmış olmasıdır. Yönteme ilişkin modifikasyonlar ile başarı şansının artırılmış olması, mesane kanseri ile ilgili olarak bundan sonra yapılacak çalışmalar için etkinliği gösterilmiş bir model sağlaması açısından son derece önemlidir.

GERÇEKLEŞTİRİLEMEYEN ÇALIŞMALAR

İlk proje önerisinde yer alan ^{51}Cr serbest kalım testi, radyoaktif maddenin temininde karşılaşılan güçlükler ve radyoaktif maddenin taşınması ve saklanmasıyla ortaya çıkması muhtemel fizik sınırlamalar nedeniyle yapılamamıştır. Bunun yerine, ^{51}Cr testi gibi radyoaktif metodlar kadar başarılı sonuç veren, temel olarak aynı mekanizma üzerine kurulmuş non-radyoaktif bir yöntem olan MTT testinin eşdeğeri LDH sitotoksikite testi kullanılmıştır (Kotoh S., 1994).

KAYNAKLAR

- Alley MC., Scudiero DA., Monks A. et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, 48: 589-601 (1988).
- Anai H., Maehara Y., Kusumoto H and Sugimachi K. Comparison between succinate dehydrogenase inhibition test and subrenal capsul assay for chemosensitivity testing. *Oncology*, 44: 115-118, (1987).
- Bertelsen CA., Sondak VK., Mann BD., Korn EL., and Kern DH. Chemosensitivity testing of human solid tumors: A review of 1582 assays with 258 clinical correlations. *Cancer*, 53: 1240-1245, (1984).
- Bissery MC., Armand JP. Pre-clinical in vitro screening of chemothreapeutic agents. In *Handbook of Chemotherapy in Clinical Oncology*. (eds) E. Cvitkovic, J.P. Droz, J.P. Armand, S. Khoury. 2nd edition, Scientific Communication Int., Jersey, Channel Islands, (1993), pp. 50-57.
- Carmichael J., DeGraff WG., Gazdar AF., Minna JD and Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay : Assesment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, 47: 936-940, (1987).
- Catalona WJ. Urothelial tumors of the urinary tract. In *Campbell's Urology*. (eds) P.C. Walsh, A.B. Retik, T.A. Stamey, Vaughan E.D. W.B. Saunders Company, Philadelphia, (1992) ,pp. 1094-1158.
- Dittrich C., Dittrich E., Sevelde P., Hudec M., Salzer H., Grunt T, and Eliason J. Clonogenic growth in vitro: An independent biologic prognostic factor in ovarian carcinoma. *J Clin Oncol*, 9:381-388, (1991).
- Erba E., Ubezio P., Pepe S., et al. Flow cytometric analysis of DNA content in human ovarian cancers. *Br J Cancer*, 60: 45-50, (1989).
- Fair WR. Neoadjuvant therapy in invasive bladder cancer: problems and Pitfalls. *Urol Clin North Amer.*, 18: 539-542, (1991).
- Friedlander ML., Hedley DW., Swanson C. et al. Prediction of long term survival by flow cytometric analysis of cellular DNA content in patients with advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol.*, 6:282-290, (1988).
- Haapasalo H., Collan Y., Atkin NB. et al. Prognosis of ovarian carcinomas: Prediction by histoquantitative methods. *Histopathology*, 15: 167-178, (1989).

- Hamburger AW., Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197: 461-463, (1977).
- Hongo T., Fujii Y., and Igarashi Y. An in vitro chemosensitivity test for the screening of anti-cancer drugs in childhood leukemia. *Cancer*, 65: 1263-1272, (1990).
- Kakizoe T., Fujimoto K., Terada M. Oncogenes and molecular genetics of bladder cancer. In *Oncogenes and Molecular Genetics of Urological Tumors*. (ed) C.A. Olsson. Churchill Livingstone, Edinburgh, (1992) , pp. 23-28.
- Kao JW-Y., and Collins JL. A rapid in vitro screening system for the identification and evaluation of anticancer drugs. *Cancer Invest.*, 7(4): 303-311, (1984).
- Khoo SK., Hurst T., Webb MJ. et al. Measurement of tumor cell activity in short term primary culture. *Cancer*, 61: 1579-1586, (1988).
- Kotoh S., Naito S., Sakamoto N., Goto K. and Kumazawa J. Metallothionein expression is correlated with cisplatin resistance in transitional cell carcinoma of the urinary tract. *J Urol.*, 152: 1267-1270, (1994).
- Nakopoulou L., Zervas A., Zolota V., Filaktopoulos D., Dimopoulos C. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor and proto-oncogene erbB-2 in transitional cell carcinoma of the bladder. In *Oncogenes and Molecular Genetics of Urological Tumors*. (ed) C.A. Olsson. Churchill Livingstone, Edinburgh, (1992), pp. 113-120.
- Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M. Apoptotic death in epithelial cells: Cleavage of DNA to 300 and/or 50kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J*, 12: 3679-3682, (1993).
- Pieters R., Huismans DR., Leyva A., Veerman AJP. Comparison of the rapid automated MTT-assay with a dye exclusion assay for chemosensitivity testing in childhood leukemia. *Br. J. Cancer*, 59: 217-220, (1989).
- Prout GR. The role of surgery in the potentially curative treatment of bladder carcinoma. *Cancer Res*, 37: 2764-2770, (1977).
- Rustum YM., Slocum HK. Evidence for cellular heterogeneity of prostatic carcinoma. Implication for tumor response to chemotherapy. In *New Trends in Diagnosis and Treatment of Prostatic Cancer*. (eds) L. Giuliani, F. Boccardo, L. Santi, Pescatore D. Acta Medica, Roma, (1987), pp. 1-12.

- Schadendorf D., Worm M., Algermissen ., Kohlbus CM., and Czarnetzki BM. Chemosensitivity testing of human malignant melanoma: A retrospective analysis of clinical response and in vitro drug sensitivity. *Cancer*, 73: 103-108, (1994).
- Scher HI., Herry H., Sternberg CI., et al. Neoadjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer: Experience with the M-VAC regimen. *Br. J. Urol.*, 64: 250-256, (1989).
- Sternberg CN. Neoadjuvant M-VAC (Methotrexate, Vinblastine, Adriamycin, and Cisplatin) for infiltrating bladder cancer: Initial results in Italy. In Splinter TAW., Scher HI. (eds): *Neoadjuvant Chemotherapy and Invasive Bladder Cancer*. New York, Wylie-Liss, (1990) , pp: 143-152
- Volm M., Brüggemann A., Günther M. et al. Prognostic relevance of ploidy, proliferation, and resistance-predictive tests in ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 45:5180-5185, (1985).
- Von Hoff DD., Clarg GM., Stogdill BJ et al. Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. *Cancer Res.*, 43: 1926-1931, (1983).
- Von Hoff DD., Kronmal R., Salmon SE., et al. A Southwest Oncology Group study on the use of of a human tumor cloning assay for predicting response in patients with ovarian cancer. *Cancer*, 67: 20-27, (1991).
- Wils J., van Geuns H., Baak J. Proposal for therapeutic approach based on prognostic factors including morphometric and flow-cytometric features in stage III-IV ovarian cancer. *Cancer*, 61: 1920-1925, (1988).
- Zincke H., Sen SE., Hahn RG. et al. Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced transitional cell carcinoma of the bladder. Do local findings suggest a potential for bladder salvage? *Mayo Clin. Proc.*, 63: 16-22, (1988).

Tablo 1: Hastalara (Doku kültürü sonuçları başarılı olanlar) ait demografik özellikler

Yaş(yıl)
ortalama: 69 sınır (26-90)
cinsiyet
erkek hasta: 13 kadın hasta: 6

Tablo 2: Tümörlere ait histopatolojik değerlendirme sonuçları

Hastalar	Evre	Grade
NŞ	T1	3
NA	T1	3
İA	T1	2
SZ	T1	3
KÖ	T1	2
BA	T1	3
DT	T1	2
BE	T1	1
ZÖ	T3NxM2	3
KA	T1	3
FŞ	T1	3
MÖ	T1	2
HS	T1	2
FT	T1	2
İG	T1	3
NY	T1	2
NŞ	T3N2M0	3
MA	T2	3
YÇ	T2	3

Tablo 3: PC3 hücre kültürlerinde farklı ilaçlarla 24 ve 36. saatlerde elde edilen proelde edil

	Proliferatif İndeks (24. saat)	Proliferatif İndeks (36. saat)
Kontrol	43.1	54.9
Vinblastin (vlb)	79.1	17.8*
Vlb+Verapamil	60.3	97.2
Vlb+Diltiazem	68.6	93.1
Vlb+G-CSF	69.4	88.3
Vlb+GM-CSF	80.2	87.5

Tablo 4: Trypan mavisi testi ve apoptotik indeks sonuçları

	Trypan mavisi Hücre ölümü (%)	Apoptotik İndeks
Kontrol	8.7	12.1
Vinblastin (vlb)	26.1	44.4
Vlb+Verapamil	9.6	18.3
Vlb+Diltiazem	7.0	17.8
Vlb+G-CSF	13.7	24.5
Vlb+GM-CSF	16.8	16

Tablo 5: Trypan mavisi ile sitotoksisite test sonuçları

İlaç Adı	% sitotoksisite
Cisplatinum (C)	46 ± 18
Methotrexate (M)	57.7 ± 42
Vinblastin (V)	24.9 ± 9.7
CM	39.1 ± 22
CMV	74.4 ± 34
Epirubicin (E)	30.1 ± 23
Adriamycin (A)	12.2 ± 10
M-VEC	4.7 ± 2.6
M-VAC	14 ± 6.5

Tablo 6: LDH ile sitotoksisite sonuçları

İlaç Adı	% sitotoksisite
Cisplatinum (C)	29 ± 15
Methotrexate (M)	27 ± 13
Vinblastin (V)	16 ± 20
CM	35 ± 18
CMV	55 ± 28
Epirubicin (E)	7.5 ± 3.0
Adriamycin (A)	7.5 ± 2.6
M-VEC	6.4 ± 2.7
M-VAC	8 ± 3.8

Tablo 7: Trypan mavisi testi ile LDH sitotoksisite testleri arasındaki uyumu saptamak için yapılan lineer regresyon analizi sonuçları.

%95 Güvenilirlik aralığı

alt sınır: 0.059

üst sınır: 0.19

Korrelasyon katsayısı (r): 0.51

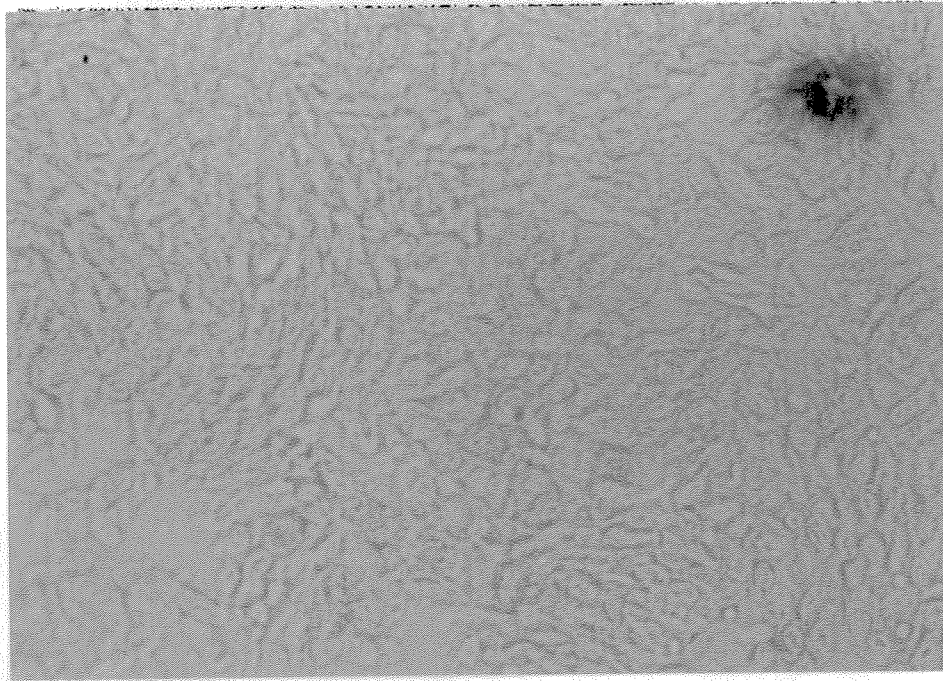
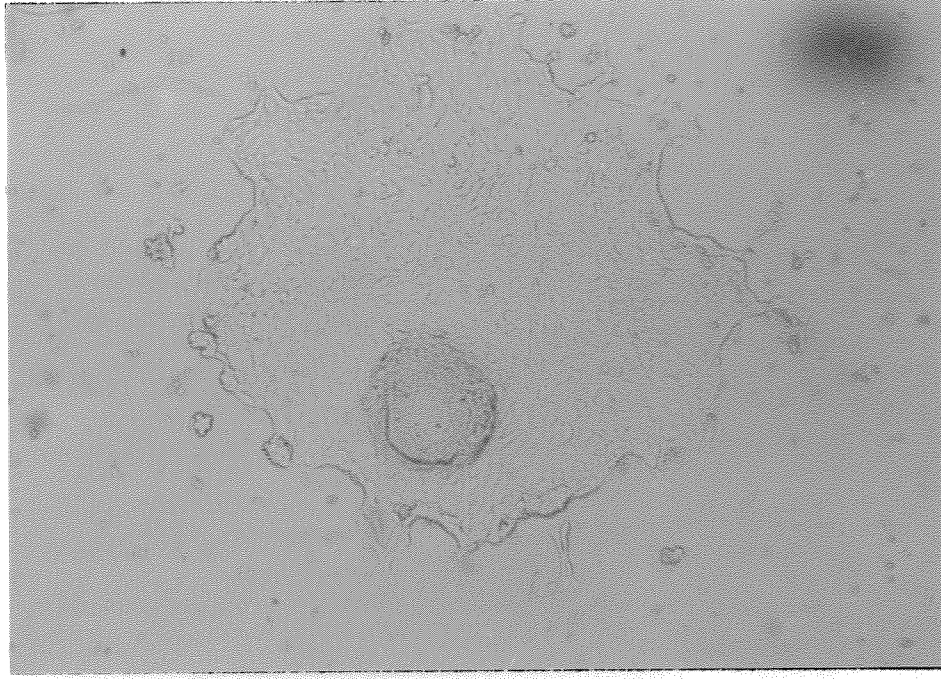
F: 14.42

p < 0.005

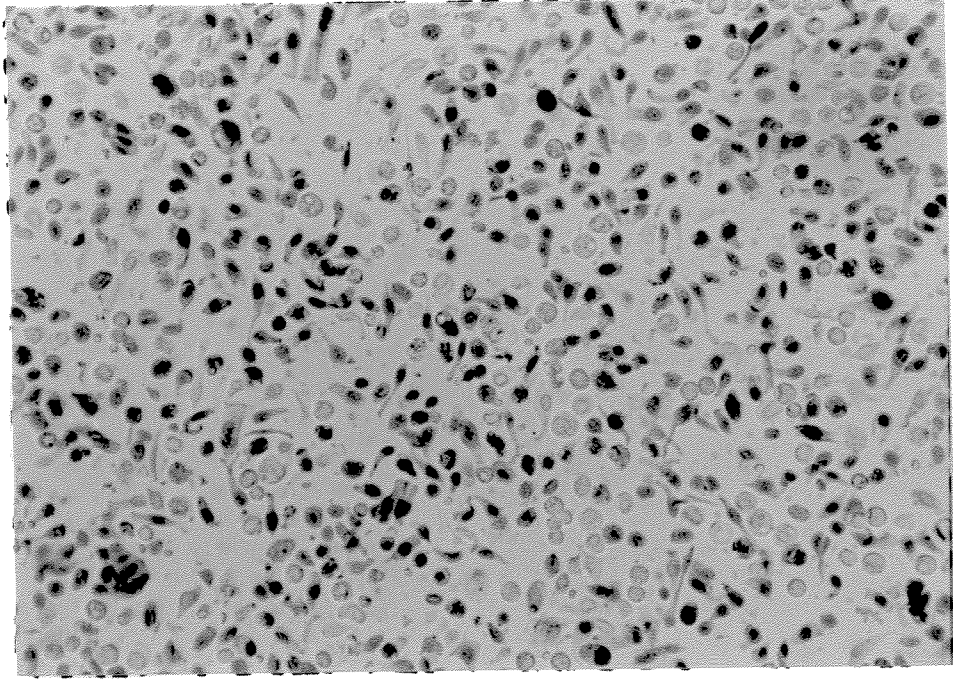
Tablo 8 : Değişik çalışmalarda kullanılmış olan ilaç yoğunlukları

	İlaçlar					Kaynak
	Cisplatin	Methotrexate	Vinblastin	Epirubicin	Adriamycin	
yoğunluk (µg/ml)	2.0	4.0	5.0			Bertelsen,94
	1.7	0.16-500	10.0	0.8	0.8	Hongo,90
	40	5.0			20.0	Schadendorf,94
	0.2-1.0	0.3-1.0	0.05-0.1		0.04-1.0	VonHoff,91
	0.92		0.28		2.3	Sanfilippo,86
	0.06-16.0	0.00025-2500	0.001-1000		0.004-12.5	Kao,89

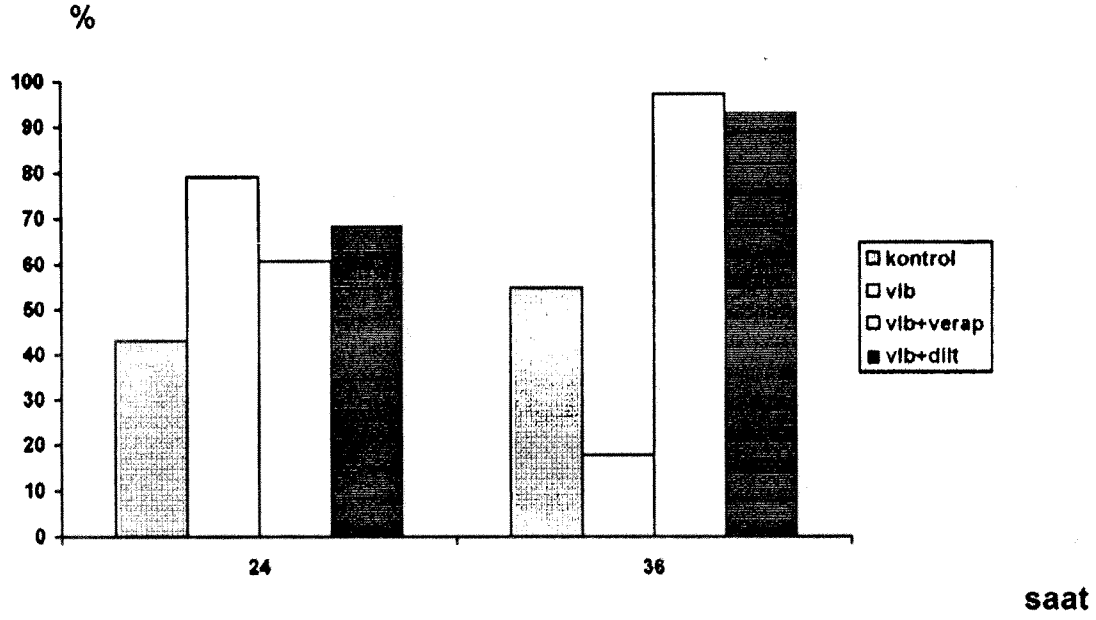
Şekil 1: Mesane tümörü doku kültürü. Yaklaşık 1 mm çapındaki tümör adacığından dışarı doğru yayılmakta olan tümör hücreleri etrafta bir monolayer oluşturmaktadırlar.



Şekil 1a: Trypan mavisi testi. Canlı hücreler vital boyayı tutmazken, ölü hücreler mavi olarak boyanmaktadır.

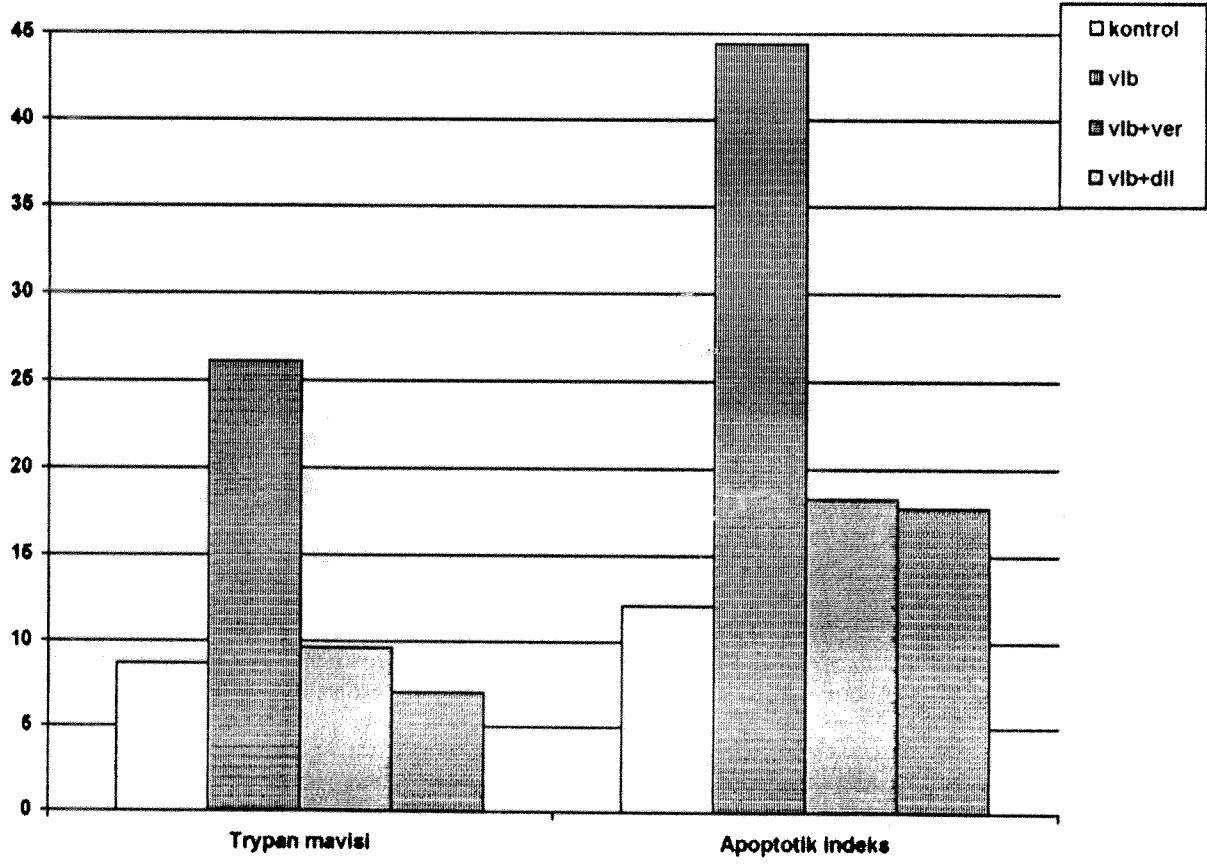


Şekil 2: PC3 hücre kültürlerinde 24. ve 36. saatlerde farklı tedavi gruplarında elde edilen sonuçlar

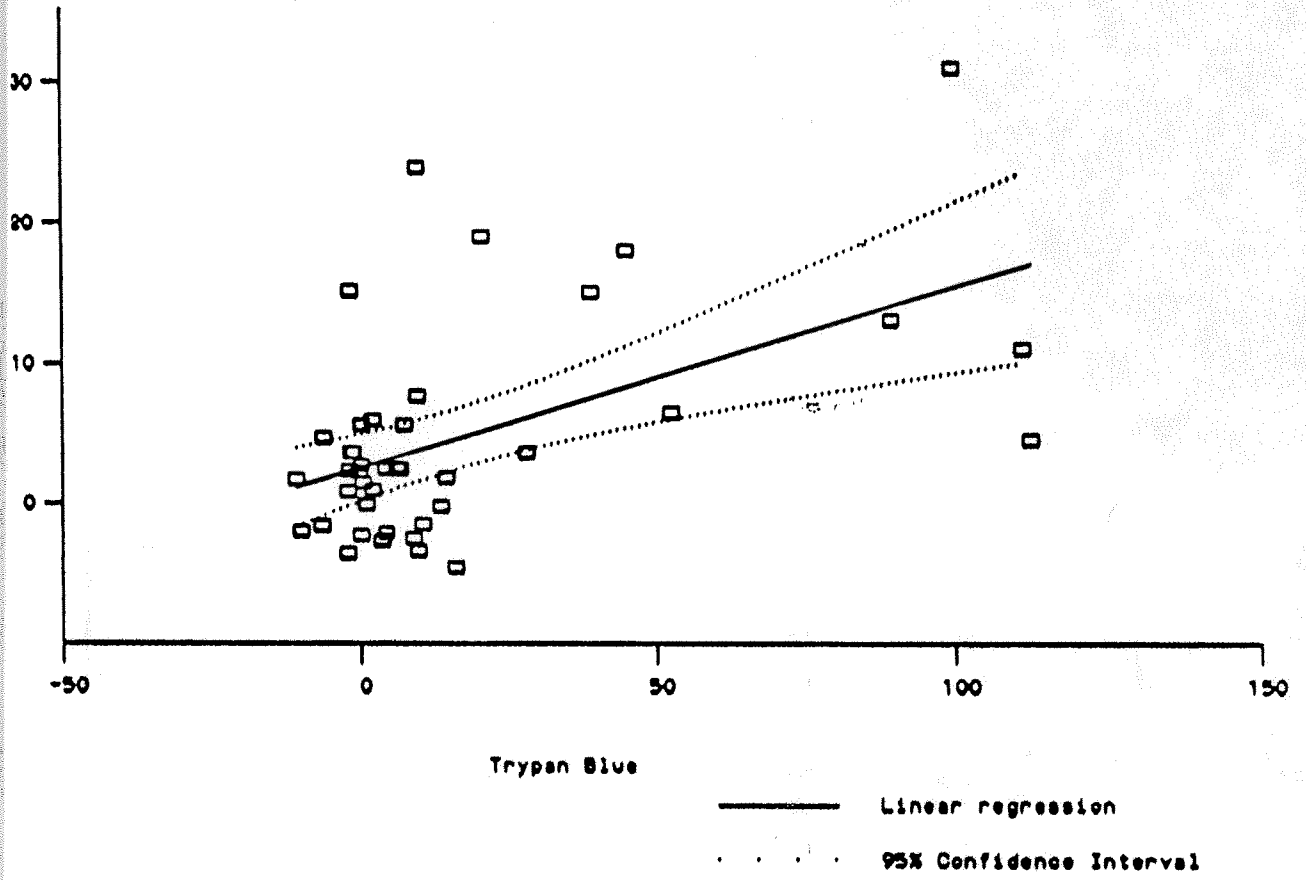


Şekil 3: PC3 hücre kültürlerinde değişik tedaviler sonucunda Trypan mavisi testi sonuçları ve apoptotik indeksleri

%



Şekil 4: Trypan mavisi ve LDH sitotoksosite testlerine ait korrelasyon grafiği



BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU	
1- Proje No: TAG-0913	2-Rapor Tarihi: 27.7.1995
3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: Temmuz 1992 -Temmuz 1995	
4- Projenin Adı: KANSEF KEMOTERAPİSİNDE KULLANILAN İLAÇLARIN ETKİNLİĞİNİ VE UYGULANABİLİRLİĞİNİ SAPTAMAYA YÖNELİK HIZLI İN VİTRO TARAMA SİSTEMİ	
5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Prof. Dr. Atıf Akdaş Yrd. Doç. Dr. Levent Türkeri, Prof. Dr. Ferruh Şimşek, Prof. Dr. Yalçın İlker	
6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Üroloji Anabilim Dalı, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi , İstanbul	
7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: -	
8- Öz (Abstract): Geçmişte değişik kemoterapötik ajanların farklı malignitelere karşı klinik etkinliğini saptamak için ilaç duyarlılık testi geliştirmeye yönelik pek çok girişim olmuştur. Test edilen ilaçların ancak çok az sayıda olanından klinik olarak fayda sağlanabildiğinden, tedaviye cevabı önceden belirleyebilecek in vitro sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu projenin konusu olan tarama sisteminin amacı, antikanser ilaçları, ürogenital sistemin sık görülen bir neoplastik hastalığı olan mesane kanseri hücreleri ile laboratuvar şartlarında karşılaştırarak etkinliklerini saptamak ve böylece her hasta için en etkili ilacı bulmaktır. Bu ise kanser hastalarının tedavisinde oldukça önemli gelişmeler sağlayabilir. Bu proje kapsamında gerçekleştirilen Trypan mavisi testi ile LDH testinin birbirleri ile olan uyumu araştırıldığında hastalarda her iki teste ait sonuçların anlamlı derecede korrelasyon gösterdiği görülmüştür ($p < 0.05$). Çalışma grubunda toplam 9 hastada (%47.4) 1 veya daha fazla ilaca karşı direnç saptanmıştır. İlaçlar tek tek incelendiğinde, Cis-platin e karşı 3 hastada (%15.8), Methotrexat a karşı 6 hastada (%31.6), Vinblastin e karşı 7 hastada (%36.8), Epirubicin e karşı 2 hastada (%10.5) ve Adriamycin e karşı 2 hastada (%10.5) direnç olduğu görülmüştür. Hastalar yüzeyel ve ileri evre tümör varlığına göre sınıflandırıldığında ilaç direncinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.005$). Sonuç olarak, her iki yöntem arasında belirgin bir korrelasyon olması nedeniyle, bu testler antineoplastik ilaçların farklı tümörler üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla kullanılabilirler. Ayrıca bu çalışma ile Türkiye'de ilk defa düzenli olarak kısa dönem mesane tümörü kültürlerinin başarılı bir şekilde yapılması gerçekleştirilmiş ve buna ait yöntem rutin olarak kullanılabilir hale getirilmiştir. Anahtar Kelimeler: Kanser, kemoterapi, in vitro test	
9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler: 1. Üroloji Bülteni (Yayın, Ek-1) 2. XI. Ulusal kanser Kongresi (Tebliğ, Ek-2)	
10-Bilim Dalı: Üroloji Doçentlik B. Dalı Kodu: ISIC Kodu: Uzmanlık Alanı Kodu:	
11- Dağıtım (*): ☐ Sınırlı ☒ Sınırsız	
12- Raporun Gizlilik Durumu: ☐ Gizli ☒ Gizli Değil	