

Kemoterapötik ajan olarak dosetaksel'in multipl miyelom hücre hattı (RPMI-8226) üzerindeki sitotoksik etkisi

Zehra Dilşad Çoban (*), Ferit Avcu (**), Ali Uğur Ural (**), Mesut Akyol (***), Şefik Güran (*)

ÖZET

Hücrede mitotik içiğin oluşum aşamasında mikrotübül stabilizasyonuna neden olarak hücre bölünmesini durdurup hücrenin apoptoza gidişini sağlayan dosetaksel meme, prostat ve mesane kanserinde sık kullanılan bir ilaçtır. Bu çalışmada multipl miyelom hücre hattında [RPMI-8226 ("Human multiple myeloma") ATCC No: CCL-155] başka birçok kanserin tedavisinde ilaç olarak kullanılan dosetaksel ile ortaya çıkabilecek sitotoksik etki farklı dosetaksel konsantrasyonları kullanılarak incelenmiştir. Kontrol grubu olarak metastatik meme kanseri hücre hattı [MCF-7 ("human breast cancer") ATCC No: HTB-22] kullanılmıştır. RPMI-8226 ve MCF 7 hücre hatlarında hücre kültüründe artan dosetaksel konsantrasyonlarında oluşan sitotoksik etkiler XTT uygulaması ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda yer alan MCF-7 ("Human breast cancer") hücrelerinde dosetakselin oluşturduğu sitotoksik etki az olarak bulunmuştur. Buna karşın RPMI-8226 ("Human multiple myeloma") hücre hattında dosetakselin artan konsantrasyonlarında oluşturduğu sitotoksik etki ortaya konmuştur. Veriler dosetakselin 50 µmol konsantrasyonda RPMI-8226 hücreleri üzerinde letal doza eriştiğini göstermiştir. Kontrol grubunda dosetakselin etkinliğinin düşük olmasının tek sebebi olarak meme kanseri hücre hattının metastatik karakterde olması değerlendirilmiştir. Dosetakselin multipl miyelom hücre hattında etkin sitotoksik etkisi bu ilacın multipl miyelom tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ancak ilacın multipl miyeloma tedavisinde daha etkin olarak kullanımı için ileri hayvan deneylerine gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: MCF-7, mitoz inhibisyonu, multipl miyelom, dosetaksel, RPMI-8226

SUMMARY

Cytotoxic effect of docetaxel on multiple myeloma cell lines (RPMI-8226) as a chemotherapeutic agent

Docetaxel that causes microtubule stabilization during mitotic spindle organizing in cell and forces the cell to go apoptosis is a widely used drug in breast, prostate and bladder cancers. Cytotoxic effect of docetaxel which has been used in the treatment of many other cancers on multiple myeloma cell line (RPMI- ATCC No: CCL-155) was investigated with different drug concentrations. Metastatic breast cancer [MCF-7 (human breast cancer) ATCC No: HTB-22] (human breast cancer) cell line was used as the control group. Cytotoxic effects occurring with increasing docetaxel concentrations in cell cultures of RPMI-8226 and MCF 7 cell lines were evaluated by XTT assay. Cytotoxic effect caused by docetaxel was lower in MCF-7 (human breast cancer) cell lines of the control group. However cytotoxic effect with increasing docetaxel concentrations in RPMI-8226 (human multiple myeloma) cell lines was demonstrated. Data demonstrate that docetaxel with a concentration of 50 µmol reaches a lethal dose on RPMI-8226 cell lines. Low cytotoxic effect of docetaxel in the control group is only explained by the metastatic character of breast cancer cell line. Efficient cytotoxic effect of docetaxel in multiple myeloma cell line suggests that this drug may be used in the treatment of this disease. However further animal experiments are needed for the more efficient use of docetaxel in the treatment of multiple myeloma.

Key words: MCF-7, mitotic catastrophe, multiple myeloma, docetaxel, RPMI-8226

Giriş

Multipl miyelom (MM) tüm kanserler arasında %1'lik, hematolojik maligniteler arasında ise %10'luk bir orana sahiptir. Hastalık ileri yaşlarda sinsi bir şekilde başlar ve genellikle yavaş ilerleme gösterir (1). Plazma hücrelerinin kontrolsüz çoğalması sonucunda oluşan lezyonlar tek bir kemikle sınırlı ise hastalık plazmositom olarak adlandırılırken, bu hastalığın ileri bir formu olan MM'da kemik tutulumu yanında kemik iliği tutulumu da mevcuttur. Hastalık radyografide "zımba deliği gibi litik alanlar" ile karakterizedir (2). Hastalığın kesin tanısı için kemik iliği ve kemik biyopsisinin patolojik değerlendirilmesi, serumda artmış M proteini tespiti ve kemik iliği sitogenetik analizi yapılır (3,4). MM'da tıbbi tedavide melfalan-prednizolon kombinasyon tedavisi halen kullanılmaktadır. Son yıllarda talidomid ve türevleri, arsenik trioksit, histon deasetilaz inhibitörleri ve proteozom inhibitörleri üzerinde yapılan çalışmalarla tedavide yeni aşamalar kaydedilmiştir. Olgularda tüm tedavi yaklaşımlarına rağmen birçok olguda tam tedavi çoğu kez mümkün olmamaktadır (5). Dosetaksel, taksanlar grubundan mikrotübül stabilize edici bir ajandır. Mitozda önemli olan tübülün molekülüne yüksek afinite ile bağlanır. Böylece mitoz gerçekleşemez. Proliferasyon durur ve hücre apoptoza gider (6). Hem in vitro, hem de in vivo çalışmalarda hücre içine alımının hızlı olmasına bağlı olarak dosetakselin birçok hücre grubunda anti-neoplastik aktivite gösterdiği bulunmuştur (7,8). Dosetakselin farklı sitotoksik ajanlarla kombine edilebileceğini destekleyen yayınlar mevcuttur (9).

Çalışmamızda halen MM tedavi protokolünde bulunmayan, ancak sistemik etkisi nedeni ile MM üzerinde etkili olabileceğini düşündüğümüz dosetaksel, farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak multipl miyelom hücre hattı (RPMI-8226) üzerinde denenmiştir. Dosetakselin RPMI hücre hattı üzerine olan sitotoksik etkisi XTT Assay yöntemi ile değerlendirilmiş ve elde edilen veriler yorumlanmıştır (10).

* GATF Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

** GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Araştırma ve Geliştirme Merkezi

***GATF Biyoistatistik Bilim Dalı

Ayrı basım isteği: Dr. Şefik Güran, GATF Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Etlik-06018, Ankara, Türkiye
E-mail: sefguran@yahoo.com

Makalenin geliş tarihi: 07.07.2011 • **Kabul tarihi:** 02.08.2011

Gereç ve Yöntem

Dosetaksel konsantrasyonlarının hazırlanması: Deneysel amaçla kullanılan dosetaksel (Doxel® Mustafa Nevzat İlaç) temin edildikten sonra farklı konsantrasyonlarda hazırlanmasında Morse ve ark. nın protokolüne uyulmuştur (6). Dosetaksel hücre ortamı olarak RPMI 1640'da (Sigma-Aldrich-R8758) 0.1-1-10-50-100 µmol/L olacak şekilde dilüsyonlarla hazırlanarak deneysel çalışmada kullanılmıştır.

Hücre kültürü: Bu çalışmada multipl miyelom RPMI 8226 [ATTC No: CCL-155-Human multiple myeloma] hücre hattı ve kontrol grubu olarak MCF-7 [ATCC No: HTB-22-Human breast cancer] hücre hattı kullanılmıştır. Her iki hücre hattı %10 (v/v) fetal bovine serum (Biochrom AG, Germany) ve %1 (v/v) gentamisin (Biological Industries, Israel) içeren RPMI 1640 (Sigma-Aldrich-R8758) ile 37 °C' de, %5 CO₂'li ortamda Heraeus inkübatörü (Hanau, Germany) içerisinde çoğaltılmıştır (11). Tüm hücreler XTT Assay (Cell Proliferation Kit, Biological Industries, Israel) için her kuyucukta 1x10⁶ hücre olacak şekilde 96'lık "well-plate"lere dört grup halinde yerleştirilmiştir. Hücre hatları 24 saat "well-plate"e yapışma ve çoğalması için 37 °C'de etüvde bekletilmiştir. 24 saatin sonunda her "well-plate"e Tablo I'de olduğu gibi belirtilen konsantrasyonlardaki ilaç derişimleri hücreler üzerine ilave edilip, her deney grubunda kontrol grubu (boş mediyum ve mediyum+hücre) oluşturulmuştur (Tablo I).

XTT (Cell proliferation assay kit) testi: RPMI-8226 ve MCF 7 hücre hatlarının ilaç uygulamasından sonra oluşturduğu sitotoksiteyi ölçmek için XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) uygulamasında üretici firmanın protokolü ile Mutlu ve ark.nın uygulamaları esas alınmıştır (12). İlk 24 saatin sonunda 24 saatlik etkiyi ölçmek için belirli iki "well-plate"e XTT solüsyonu eklenmiş, 24

saat sonra ise 490 nm'de XTT protokolüne "ELISA reader"da okutularak her deney grubunda bulunan hücrelerin canlılıkları analiz edilmiştir (13). Aynı işlem ilk 48 saatin sonunda 48 saatlik etkiyi ölçmek için belirlenmiş iki "well-plate" için de yapılmış ve hücrelerin canlılıkları analiz edilmiştir. Böylece çalışma sonucunda 24 ve 48 saatlerdeki yaşayan hücreler ile ölü hücrelerin yüzdelarını elde ettiğimiz hücre canlılığını gösteren XTT çıktıları elde edilmiştir. Çalışmada dörtlü tekrar grupları kullanılmıştır. Dosetakselin artan dozlarda MCF-7 ("human breast cancer") hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki Şekil 1'de, dosetakselin artan dozlarda RPMI 8226 ("human multiple myeloma") hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki Şekil 2'de gösterilmiştir.

Kültür kaplarındaki hücre hatlarından ölçülen değerlerin normal dağılıma uygunlukları grafiksel olarak ve Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Sonuçta hiçbir ölçüm değerinin normal dağılıma uymadığı görüldü. Tanımlayıcı istatistiklerin gösteriminde ortanca ve Çeyreklikler Arası Genişlik (ÇAG, "Interquartile Range"-IQR) değerleri kullanıldı. Çalışma grupları arasında MCF-7 ve RPMI-8226 hücre hattı ölçümleri arasındaki farklılıkları araştırmak için Kruskal-Wallis non-parametrik "varyans" analizi kullanıldı. Farklılık bulunduğunda hangi gruptan kaynaklandığını belirleyebilmek için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi ile "post-hoc" ikili karşılaştırmalar yapıldı. MCF-7 ve RPMI-8226 hücre hattı 24. saat ve 48. saat ortancalarını karşılaştırmak amacı ile Wilcoxon işaretli sıralılar testine başvuruldu. Kullanılan ilacın MCF-7 ve RPMI-8226 hücre hatları üzerindeki etkisini belirleyebilmek için Mann-Whitney testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analiz ve hesaplamalar için MS-Excel 2003 ve "SPSS for Windows Ver. 15.0" (SPSS Inc., Chicago, IL., USA) paket programları kullanıldı. İstatistiksel kararlarda (Bonferroni düzeltmesi yapılan

Tablo I. Dosetakselin 96'lık "well-plate"lerde hücre hatları üzerine uygulanması

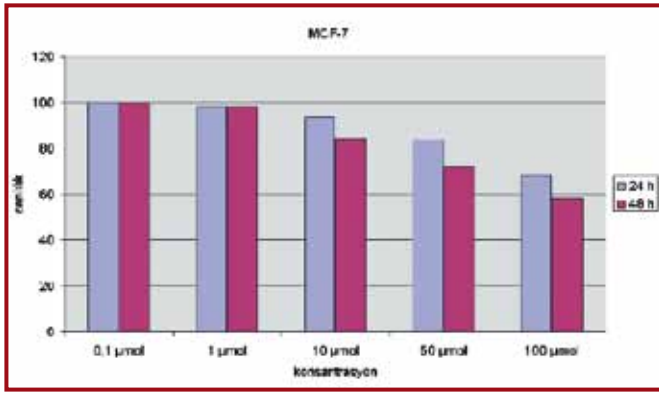
Kontrol	Kontrol	Deney 1	Kontrol	Deney 2	Zaman
M	M+RPMI	RPMI+D-0.1	M+MCF-7	MCF-7+D-0.1	24 saat
M	M+RPMI	RPMI+D-1	M+MCF-7	MCF-7+D-1	24 saat
M	M+RPMI	RPMI+D-10	M+MCF-7	MCF-7+D-10	24 saat
M	M+RPMI	RPMI+D-50	M+MCF-7	MCF-7+D-50	24 saat
M	M+RPMI	RPMI+D-100	M+MCF-7	MCF-7+D-100	24 saat
M	M+RPMI	RPMI+D-0.1	M+MCF-7	MCF-7+D-0.1	48 saat
M	M+RPMI	RPMI+D-1	M+MCF-7	MCF-7+D-1	48 saat
M	M+RPMI	RPMI+D-10	M+MCF-7	MCF-7+D-10	48 saat
M	M+RPMI	RPMI+D-50	M+MCF-7	MCF-7+D-50	48 saat
M	M+RPMI	RPMI+D-100	M+MCF-7	MCF-7+D-100	48 saat

M: Medya (RPMI 1640)

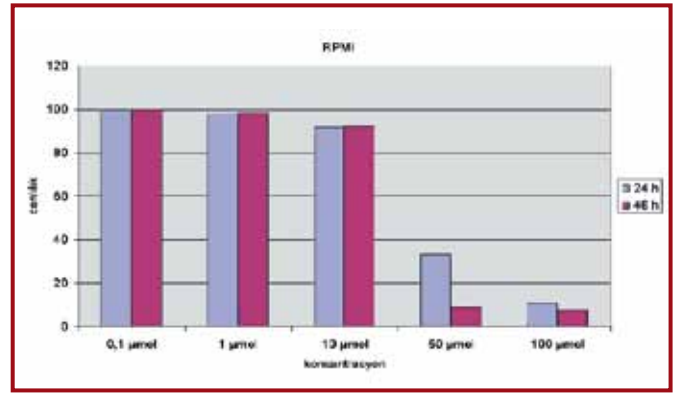
RPMI: Multipl miyelom hücre hattı ("Human multiple myeloma cell line") ATCC: CCL-155

MCF-7: Meme kanseri hücre hattı ("Human breast cancer cell line") ATCC: HTB-22

D: Dosetaksel



Şekil 1. Dosetakselin artan dozlarda MCF-7 ("human breast cancer") hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki



Şekil 2. Dosetakselin artan dozlarda RPMI 8226 ("human multiple myeloma") hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki

analizler hariç) $p < 0.05$ düzeyi anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi. Tüm bu istatistiksel veriler MCF-7 hücre hattı için (24 ve 48 saat ölçümlerinde) Tablo II'de, bu değerler için "post-hoc" ikili karşılaştırma sonuçları Tablo III'de verilmiştir. RPMI-8226 hücre hattı için 24. ve 48. saat ölçümleri Tablo IV'de, bu değerler için "post-hoc" ikili karşılaştırma sonuçları Tablo V'de verilmiştir.

Bulgular

Çalışmamızda dosetakselin artan dozlarda MCF-7 ("human breast cancer") hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etkisi Şekil 1'de, dosetakselin artan dozlarda RPMI 8226 ("human multiple myeloma") hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki Şekil 2'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre dosetakselin uygulanan dozlarda MCF-7 hücreleri üzerine etkisi tam olarak ortaya konamazken, RPMI 8226 hücreleri üzerine etkisi belirgindir.

Kontrol olarak alınan MCF-7 hücre hattının XTT assay 24. saat değerleri kontrol grubunda 0.284 ile 0.306 arasında değişirken, deney grubunda 2.000–3.780 aralığında bulunmuştur (Tablo II). Kontrol ile karşılaştırıldığında XTT assay sonucunda deney grubunda hücrelerin canlılığı belirgin olarak azalmıştır.

Tablo II incelendiğinde 24. saat ortancalarının çalışma gruplarından en az birisinde istatistiksel olarak diğerlerinden farklı ($\chi^2=39.692$; $p < 0.001$) olduğu görülmektedir. Farklılığın hangi çalışma grubundan kaynaklandığı incelendiğinde ise, kontrol grubunun Sham ve deney grubundan daha düşük ortancaya sahip olduğu ($p < 0.001$), Sham ve deney grupları arasındaki farklılığın ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($Z=1.059$, $p=0.296$) bulunmuştur (Tablo III). Sham ile deney grubu arasında farklılığın anlamlı olmaması 24 saatlik süre sonunda dosetakselin MCF-7 hücre hattı üzerine belirgin etkiye sahip olmadığını göstermektedir.

Tablo II. MCF-7 hücre hattı 24 ve 48 saat ölçümleri

Grup	24 Saat		48 Saat		24 saate karşı 48 saat	
	En az–En Çok	Ortanca (ÇAG)	En az–En Çok	Ortanca (ÇAG)	Z	p
Kontrol	0.284–0.306	0.295 (0.021)	0.215–0.232	0.220 (0.015)	3.948	<0.001 ↑
Sham	2.925–3.337	3.195 (0.373)	3.531–3.926	3.761 (0.295)	3.923	<0.001 ↓
Deney	2.000–3.780	3.068 (1.042)	1.860–3.263	2.975 (0.658)	1.008	0.313 ↔
Gruplar arası	$\chi^2=39.692$	$p < 0.001$	$\chi^2=49.879$	$p < 0.001$		
↑: 24 saat < 48 saat ↓: 24 saat > 48 saat ↔: 24 saat ≈ 48 saat						

Tablo III. MCF-7 hücre hattı 24 ve 48 saat ölçümleri "post-hoc" ikili karşılaştırma sonuçları

Grup	24 Saat		48 Saat	
	Sham	Deney	Sham	Deney
Kontrol	Z=5.451, $p < 0.001^{\dagger}$	Z=5.360, $p < 0.001^{\ddagger}$	Z=5.440, $p < 0.001^{\dagger}$	Z=5.206, $p < 0.001^{\ddagger}$
Sham		Z=1.059, $p=0.296$		Z=5.192, $p < 0.001^{\Psi}$
$\dagger$: Sham > Kontrol $\ddagger$: Deney > Kontrol Ψ : Sham > Deney				

Tablo II’de MCF-7 hücre hattına uygulanan dosetakselin etkisinin incelendiği deneylerde 48. saat ortancalarına göre de çalışma gruplarından en az birisi istatistiksel olarak diğerlerinden anlamlı farklılık ($\chi^2=39.692$; $p<0.001$) göstermektedir. Farklılığın hangi çalışma grubundan kaynaklandığı incelendiğinde ise, tüm grupların birbirlerinden farklı oldukları bulunmuştur ($p<0.001$). Ortancalarına göre küçükten büyüğe doğru sıralama kontrol, deney ve Sham grubu şeklindedir (Tablo III). Burada Sham grubunda kullanılan MCF-7 hücre hattı ile dosetakselle muamele edilmiş deney grubu karşılaştırıldığında, deney grubunun canlılık oranınının Sham grubuna göre daha az olduğu belirgindir. Bu da dosetakselin MCF-7 hücre hattı üzerine sitotoksik olduğunu göstermektedir.

MCF-7 hücre hattına uygulanan dosetakselin etkisinin incelendiği deneylerde 24. saat ortancası ile 48. saat ortancaları da karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlara göre kontrol grubundaki kültürlerin tamamının (%100) 48 saat ölçümlerinin 24 saat ölçümlerine göre arttığı, Sham grubunun tamamının azaldığı ve deney grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın oluşmadığı görülmüştür (Tablo II ve III). Bu istatistiksel analizlere göre dosetakselin MCF-7 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi belirgindir, ancak 24 saat ve 48 saatlik ölçümlerde bu etki belirgin olarak değişmiş bulunmamıştır. Çalışmamızda dosetakselin etkisinin MCF-7 hücre hattı üzerine beklenen düzeyde olmadığı, hücrelerin %50’sini öldüren sitotoksik doza çalışmada kullanılan dozlarda ulaşmadığını belirledik.

Dosetaksel uygulanan MM özelliği gösteren RPMI-8226 hücre hattı üzerindeki etkisini ortaya koyan XTT assay sonuçları incelendiğinde, ilk 24 saatlik kontrol grubunda 0.271 ile 0.296 arasında değerler bulunurken, deney grubunda 0.253 ile 2.289 arasında değerler bulunmuştur. Sham grubunda ise değerler 2.163-2.284 aralığında değişmektedir.

Çalışma gruplarına göre RPMI-8226 hücre hattı 24 ve 48 saat ölçümleri Tablo IV’de verilmiştir.

Tablo IV incelendiğinde 24. saat ortancalarının çalışma gruplarından en az birisinde istatistiksel ola-

rak diğerlerinden farklı ($\chi^2=37.558$; $p<0.001$) olduğu görülmektedir. Farklılığın hangi çalışma grubundan kaynaklandığı incelendiğinde ise, tüm grupların birbirinden farklı oldukları bulunmuştur ($p<0.001$). Ortancalarına göre büyüktan küçüğe doğru sıralama Sham, deney ve kontrol grubu şeklindedir (Tablo IV). Çalışmanın sonucunda dosetakselin RPMI-8226 hücre hattı üzerine sitotoksik olduğu belirlenmiştir. Sham grubuna göre deney grubundaki hücrelerin daha yüksek oranda öldüğü ve canlılık oranlarının daha düşük olduğu gözlemlenmiştir.

48. saat ortancalarına göre de çalışma gruplarından en az birisi istatistiksel olarak diğerlerinden anlamlı farklılık ($\chi^2=39.209$, $p<0.001$) göstermektedir (Tablo IV). Farklılığın hangi çalışma grubundan kaynaklandığı incelendiğinde ise, kontrol grubunun Sham ve deney gruplarından daha düşük ortancaya sahip olduğu ($p<0.001$), Sham ve deney grupları arasındaki farklılığın ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($Z=1.691$, $p=0.095$) bulundu (Tablo V). Çalışmamızda 48 saat sonunda hücrelerin dosetakselin letal doza (“lethal dose”) ulaştığı gözlemlenmiştir.

24. saat ortancası ile 48. saat ortancaları karşılaştırıldığında ise tüm çalışma gruplarında kültürlerin tamamının (%100) 48 saat ölçümlerinin 24 saat ölçümlerine göre azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu ($p<0.001$) görülmüştür (Tablo V). Çalışmamızın sonucunda Sham grubunu oluşturan RPMI-8226 hücreleri ile deney grubunu oluşturan dosetaksel ile muamele edilmiş RPMI-8226 hücreleri karşılaştırıldığında dosetakselin beklenen letal doza çalışmada kullanılan değer aralıkları içerisinde ulaştığı, 50 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonunda hem 24 saatlik, hem de 48 saatlik deney gruplarında canlılık oranını %50’den daha az konsantrasyonlara düşürdüğü gözlemlenmiştir.

Bu sonuçların ışığında deney grubunda kullanılan ilacın MCF-7 ve RPMI-8226 hücre hatları üzerindeki etkisi incelendiğinde, hem 24 saat hem de 48 saat ölçümlerinde RPMI-8226 hücre hattı üzerinde MCF-7 hücre hattına göre daha yüksek etkiye sahip olduğu görüldü (sırasıyla $Z=4.537$, $p<0.001$ ve $Z=4.791$, $p<0.001$) Çalışmanın hedefi olan dosetakselin RPMI-

Tablo IV. RPMI-8226 hücre hattı 24 ve 48 saat ölçümleri

Grup	24 Saat		48 Saat		24 saate karşı 48 saat	
	En az–En Çok	Ortanca (ÇAG)	En az–En Çok	Ortanca (ÇAG)	Z	p
Kontrol	0.271–0.296	0.277 (0.016)	0.039–0.043	0.041 (0.003)	3.939	<0.001
Sham	2.163–2.284	2.211 (0.056)	1.387–1.765	1.399 (0.291)	3.920	<0.001
Deney	0.253–2.289	1.493 (1.715)	0.172–1.956	0.727 (1.505)	3.516	<0.001
Gruplar arası	$\chi^2=37.558$	$p<0.001$	$\chi^2=39.209$	$p<0.001$		

↓: 24 saat > 48 saat

Tablo V. RPMI-8226 hücre hattı 24 ve 48 saat ölçümleri “post-hoc” ikili karşılaştırma sonuçları

24 Saat			48 Saat	
Grup	Sham	Deney	Sham	Deney
Kontrol	Z=5.425, p<0.001†	Z=3.479, p<0.001‡	Z=5.434, p<0.001†	Z=5.113, p<0.001‡
Sham		Z=3.890, p<0.001Ψ		Z=1.691, p=0.095
†: Sham > Kontrol		‡: Deney > Kontrol		Ψ: Sham > Deney

8226 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisinin olduğu sonucu belirgin bir şekilde görülmüştür.

Tartışma

Hücre hatları üzerinde uygulanan ilaçlara verilen yanıt bu ilaçların etki mekanizmasına, uygulama dozlarına olduğu kadar kullanılan hücrelerin köken aldığı dokuya, kanser hücresinin özelliklerine ve onların genetik değişikliklerine bağlıdır (6). Çalışmamızda kullandığımız dosetaksel, hücrelerde mitotik iğciğin oluşumunda görevli mikrotübüllerin stabilizasyonuna neden olmaktadır. Bunun sonucunda hücre proliferasyonu engellenmekte ve hücreler apoptoza gitmektedir (14). Dosetakselin özellikle meme, prostat, mesane ve akciğer kanserinde yaygın kullanımı vardır (7). Sistemik etkisinden dolayı farklı kanserlerde ilaç olarak kullanımına ait çalışmalar sürmektedir. Metastatik meme kanserinin yanı sıra küçük hücreli akciğer kanseri, over kanseri, prostat, mide ve mesane kanseri gibi birçok kanser türünde birinci basamak tedavide, yerine göre cerrahi öncesi ve sonrası tedavide kullanımı araştırılmaktadır (15-17). Ancak ileri evre kanser olgularında dosetakselin tek başına kullanımı yetersiz kalabilmektedir (18).

Dosetaksel, hücrede mitotik süreçte oluşan mikrotübül oluşumunu stabilize ederek hücrenin proliferasyonunu durdurur ve hücrenin apoptoza gidişine sebep olur (6). Hücre hatları üzerine uygulanan ilaçlara verilen yanıt sadece ilaç konsantrasyonuna, ya da ilacın etki mekanizmasına değil, aynı zamanda hücrenin yapısal ve genetik özelliklerine bağlıdır (6). Bir meme kanser hücresi olan MCF-7 hücre hattı birçok yapısal ve genetik anomalilere sahiptir (3). Meme kanseri hücreleri erken dönemde mitoz oranı hızlı olduğundan dosetakselin etkisine açıktır. Ancak ileri dönem metastatik meme kanser hücreleri apoptoza dirençli olduğundan, dosetakselin etkisine direnç kazanır. MCF-7 hücre hattı yaklaşık 80 kromozom içerir ve genomunda sayılamayacak kadar çok moleküler değişiklik vardır (19). Tüm bu nedenler ve metastatik özelliklerinden dolayı MCF-7 hücre hattı genellikle birçok ilaca dirençlidir (“Multi-drug-resistance”; MDR) (20). Çalışmamızda bu nedenlerden dolayı MCF-7 hücre hattında dosetakselle direnç gelişmiş,

dosetakselin etkinliği beklenenden az çıkmıştır (Şekil 1). MCF-7 hücre hattı üzerine dosetakselin etkisi vardır ancak çalışmada kullanılan ilaç dozları hücrelerin %50’sini öldüren letal doza erişememiştir (Tablo II ve III).

Normalde meme kanserinin tedavi protokolünde kullanılan dosetakselin burada etkinliğinin az olarak bulunması, ileri dönem meme kanseri olgularında aynı ilacın etkisinin az olmasını açıklar niteliktedir. Bu bulgu yaklaşık her on kadından birinin etkilendiği meme kanserinde ileri tümöral olgularda yeni tedavi yaklaşımlarına olan gereksinimi göstermektedir (21). Dosetaksel ile kullanılabilecek farklı ilaç kombinasyonlarının bulunması önem kazanmaktadır.

MM kronik seyirli sinsi bir hastalıktır. Genelde ileri yaşlarda tanı konulan hastalarda klinik progresyon yavaş ilerler. Toplumda tüm kanserler arasında %1 oranında görülürken, hematolojik maligniteler arasında %10 sıklıkla görülür (1). MM tedavisinde mitotik döngüyü etkileyen birçok ilaç denenmektedir. Bilindiği gibi MM hücreleri hızlı büyüme paterni göstermezler, ancak yaşam süreleri uzundur ve klinik gidiş kronik bir seyir gösterir (22). Bu nedenle mitozu inhibe eden, hücre ölümünü aktifleyen ve apoptozisi indüklemeyi amaçlayan ilaçlar sıklıkla denenmektedir (23,24). Çalışmamızda dosetakseli farklı konsantrasyonlarda MM hücre hattı olan RPMI-8226 hücre hattı hücreleri üzerinde kullanarak ilacın toksisitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu konuda MM hücreleri ile yapılan daha önceki çalışmalarda dosetakselin hücre içinde çeşitli yollara etki ederek hücrenin ölüme gidişini indüklediği belirlenmiştir (20,25). Ancak bu çalışmalarda özel bir takım gen ekspresyonları bakılmış olup, genel toksisite deneyleri nispeten azdır (10). Üzerinde çalışma yapılan multipl miyeloma hücre hattı (RPMI-8226) insan periferik kanından elde edilmiş lenfoblast karakterindedir (26). Elde edilen sonuçlar, dosetakselin uygun dozlarda RPMI-8226 hücreleri üzerine toksik etkisini göstermiştir (Tablo IV ve V). Yavaş bir progresyon gösteren MM’de dosetaksel ile mitozun inhibe edilmesi bu ilacın multipl miyelom tedavisinde kullanılabildiğini göstermiştir. RPMI-8226 hücre hattı üzerine dosetakselin sitotoksik etkisini araştırmak amaçlı yaptığımız çalışmada kullanılan

doz aralığında dosetakselin bu hücreler üzerine etkili olduğu ve 50 µmol/L konsantrasyonunda letal doza eriştiği gözlemlenmiştir (Şekil 2) (27).

Ancak her ilaç geliştirme çalışmasında olduğu gibi dosetakselin etkin dozunun bulunması ve olası yan etkilerinin ortaya konabilmesi için başta başka MM hücre hatları ve hayvan deneyleri olmak üzere ileri deneylere ihtiyaç vardır (18). Birçok çalışmada ortaya konduğu gibi, bu ilacın farklı ilaç kombinasyonlarında denenmesinin de önemli olabileceği değerlendirilmektedir (12,28). Dosetakselin relapstaki ya da refrakter multipl miyelom olgularında tek başına etkisiz olduğunu gösteren hasta bazlı çalışmalar da kombinasyon tedavilerini destekler niteliktedir (29).

Kaynaklar

1. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2004; 351: 1860-1873.
2. Hideshima T, Anderson KC. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 927-937.
3. Hervé AL, Florence M, Philippe M, et al. Molecular heterogeneity of multiple myeloma: pathogenesis, prognosis, and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1893-1897.
4. Greipp PR, Trendle MC, Leong T, et al. Is flow cytometric DNA content hypodiploidy prognostic in multiple myeloma? *Leuk Lymphoma* 1999; 35: 83-89.
5. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2011; 364: 1046-1060.
6. Morse DL, Gray H, Payne CM, Gillies RJ. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 1495-1504.
7. Lyseng-Williamson KA, Fenton C. Docetaxel: a review of its use in metastatic breast cancer. *Drugs* 2005; 65: 2513-2531.
8. Karampeazis A, Vamvakas L, Agelidou A, et al. Docetaxel vs. vinorelbine in elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer: A Hellenic Oncology Research Group Randomized Phase III Study. *Clin Lung Cancer* 2011; 12: 155-160.
9. Gregory WM, Richards MA, Malpas JS. Combination chemotherapy versus melphalan and prednisone in the treatment of multiple myeloma: an overview of published trials. *J Clin Oncol* 1992; 10: 334-342.
10. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988; 48: 4827-4833.
11. Donmez Y, Gunduz U. Reversal of multidrug resistance by small interfering RNA (siRNA) in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Biomed Pharmacother* 2011; 65: 85-89.
12. Mutlu PK, Baran Y, Ural AU, et al. Effect of cobalt-60 (gamma radiation) on multidrug resistant multiple myeloma cell lines. *Cell Biol Int* 2011; 35: 721-725.
13. Karabulut B, Erten C, Gul MK. Docetaxel/zoledronic acid combination triggers apoptosis synergistically through downregulating antiapoptotic Bcl-2 protein level in hormone-refractory prostate cancer cells. *Cell Biol Int* 2009; 33: 239-346.
14. Morgan C, Lewis PD, Jones RM. The in vitro anti-tumour activity of zoledronic acid and docetaxel at clinically achievable concentrations in prostate cancer. *Acta Oncol* 2007; 46: 669-677.
15. Fury MG, Pfister DG. Current recommendations for systemic therapy of recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2011; 9: 681-689.
16. Grimer R, Judson I, Peake D, Seddon B. Guidelines for the management of soft tissue sarcomas. *Sarcoma* 2010; 2010: 506182.
17. Fabbri F, Amadori D, Carloni S, et al. Mitotic catastrophe and apoptosis induced by docetaxel in hormone-refractory prostate cancer cells. *J Cell Physiol* 2008; 217: 494-501.
18. Cortes JE, Pazdur R. Docetaxel. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2643-2655.
19. Mark HF, Naram R, Santoro K, Bland KI. A study of induced genotoxicity in MCF-7 cells. *Cytobios* 1995; 84: 171-177.
20. Vickers PJ, Dickson RB, Shoemaker R, Cowan KH. A multidrug-resistant MCF-7 human breast cancer cell line which exhibits cross-resistance to antiestrogens and hormone-independent tumor growth in vivo. *Mol Endocrinol* 1988; 2: 886-892.
21. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.
22. Yosifov DY, Konstantinov SM, Berger MR. Erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium shows substantial cytotoxicity in multiple myeloma cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1171: 350-358.
23. Mahaffey CM, Davies AM, Lara PN Jr, et al. Schedule-dependent apoptosis in K-ras mutant non-small-cell lung cancer cell lines treated with docetaxel and erlotinib: rationale for pharmacodynamic separation. *Clin Lung Cancer* 2007; 8: 548-553.
24. Ke B, Qin Y, Zhao F, Qu Y. Synthesis and biological evaluation of novel 3'-N-tert-butylsulfonyl analogues of docetaxel. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18: 4783-4785.
25. Mediavilla-Varela M, Pacheco FJ, Almaguel F, et al. Docetaxel-induced prostate cancer cell death involves concomitant activation of caspase and lysosomal pathways and is attenuated by LEDGF/p75. *Mol Cancer* 2009; 8: 68.
26. Matsui W, Huff CA, Wang Q, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 2004; 103: 2332-2336.
27. Uysal Y, Ural AU, Avcu F ve ark. Meme kanseri (MCF-7) ve Burkitt lenfoma (Raji) hücre dizileri üzerine in vitro ortamda hiperisin ile fotodinamik tedavi araştırma sonuçları. *Gülhane Tıp Derg* 2007; 49: 147-152.
28. Clerc D, Femand JP, Mariette X. Treatment of multiple myeloma. *Joint Bone Spine* 2003; 70: 175-186.
29. Friedenbergr WR, Graham D, Greipp P, Blood E, Winston RD. The treatment of multiple myeloma with docetaxel. *Leuk Res* 2003; 27: 751-754.