

GLIAL TÜMÖRLERİN KEMOTERAPİSİNDE KULLANILACAK İLACIN SEÇİMİNDE GELİŞTİRİLMİŞ MİKROTİTRASYON METODU VE OTOFLOGRAFI*

Dr. Fahrettin ÇELİK**

Glial tümörlerinin tedavisinde seçilecek ilacın tayininde invitro mikrotitrasyon metodu uygulandı. Altı ayrı ilaç kullanıldı ve mikrotitrasyon metodunun diğer metodlara üstünlüğü tartışıldı.

Bu gün malign tümör tedavisinde kullanılacak ilacın seçiminde çeşitli metodlar kullanılmaktadır. Doku kültürü tekniklerinin gelişmesi ile in vitro testler bu konuda kullanılır hale gelmiştir. Bu gün için malign tümörlerin kemoterapisi sonuçları birkaç tümör hariç yüzgüldürücü değilsede bu in vitro testler geliştirilmeye devam edilmektedir. Yine burada itiraf edilmelidir ki in vitro metodlarla yapılan ilaç hassasiyet deneylerinin sonuçları halen kliniğe güvenilir bir şekilde tavsiye edilecek düzeyde değildir. Yani in vitro ve in vivo sonuçlar arasında tam bir paralellik sağlanmış değildir. İn vitro testlerle saptanan ilaçlar hastalara uygulandığında bazı hastalarda yararlı olmuş fakat aynı histopatolojik yapıda tümörü olan diğer hastalarda ise etkisiz kalmıştır. Bu durum tümör biyolojisi ile ilgili olup, şahıstan şahısa farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle ilaç seçiminde her hastaya uygulanacak ilaçtan ziyade her şahsın kendi tümörüne uygun ilacın seçilmesi zorunluluğu vardır. İşte bu amaçla geliştirilen in vitro testlerden birisi de mikrotitrasyon metodudur.

Doku kültürü tekniklerinin ilerlemesiyle birlikte normal glia hücreleri ve glial tümör hücreleri de bu sahada kullanılmaya başlandı. Normal beyinden hazırlanan kültürlerde normal glia hücreleri yaşamları boyunca 20-30 defa bölünebilirler. Fakat gliomalardan hazırlanan hücre kültürlerinin % 20 si tek tabaka olarak üreyen ve çoğalma kabiliyetinde doku kültürleri verirler. Bu sayı temporoparietal

* Çalışma Beatson Cancer Research Institute Glasgow Scotland'da yapılmıştır.
** Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Bilim Dalı Doçenti.

lob tümörlerinden alınan örneklerde % 50 ye kadar yükselebilir. Normal glia ve endotel hücreleri kültürde sınırlı bir yaşam süresine sahip olduğu halde neoplastik hücrelerin bir kısmı uzun yaşam süresine sahiptir.

Gliomalar 6 ayı aşan bir süreyle üretilip çok sayıda pasajları yapılabilmektedir. Gliomalardan hazırlanan saf kültürler korunabilirse bu kültürler ilaç hassasiyet testleri için kullanılabilir. Bu tip korelasyonlar değişik solid tümörler için araştırılmıştır (1). Astrositomlar kültürde çok iyi üreyen tümörler olmasına karşın medulloblastoma ile yapılan çalışmalarda olumlu sonuç alınamamıştır. İlaçların etkisi hücre solunumu, glikoliz, DNA, RNA ve protein sentezi gibi çeşitli faktörlere etkisiyle sağlanır. İlaç tedavisini takiben ilaç geriye alındıktan sonra hem hücre proliferasyonu, hem de hücre canlılığının doğrudan doğruya ölçülmesi daha kolaydır. Hücre proliferasyonu daha anlamlı olmasına rağmen bunun ölçülmesi hücre sayımına ihtiyaç gösterir ki hücre sayımı ile canlı ve ölü hücreleri birbirinden ayırdetmek mümkün değildir.

Gliomalarda ilaç hassasiyeti ölçmek için organ kültürü çalışmaları Tchao (2) ve Saez (3), mikrotitrasyon çalışmaları Kornblith, Szytko (4) ve Morgan (5) tarafından yapılmıştır.

MATERYEL, METOD

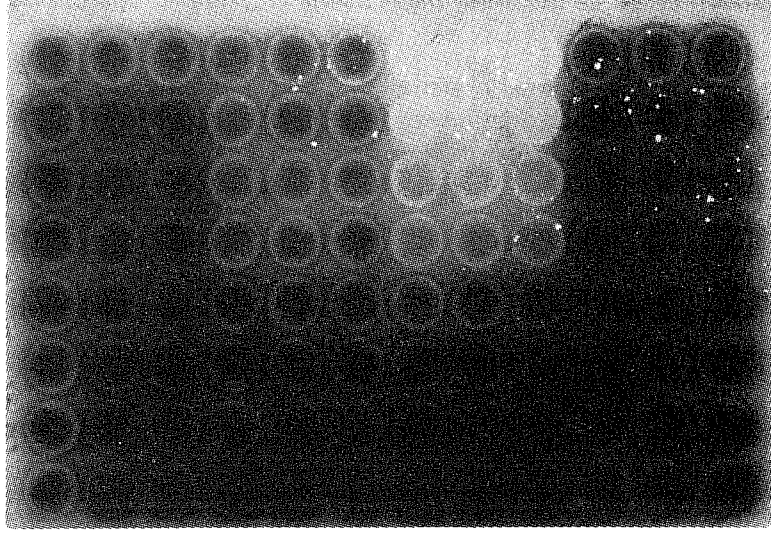
Bu çalışma Glasgow Beatson Cancer Research Institute de yapılmıştır. Çalışmada 96 adet silindirik boşluğu bulunan ve tabanı hücrelerin çoğalmasına uygun olan mikrotitrasyon plato'ü kullanıldı. Tripsinize edilerek süspansiyon haline getirilen hücrelerden her bir boşluğa compu-pet cihazı yardımıyla 2000 adet 0.1 ml. vasat içinde konuldu. Bu şekilde 3 plate hazırlandı. Plate'ler % 2 lik CO₂ inkübatöründe 30 dakika bırakıldıktan sonra dışarı alınarak üzerleri özel kapakları ile kapatıldı ve 3 gün süreyle 37 dereceye bırakıldı. Bu süre içinde hücreler dibe yapışıp bölünmeye başladılar. 3 gün sonra hücrelerin 6 ayrı ilaçla tedavisine başlandı. Kullanılan ilaçlar methyl-CCNU, 5-Fluorouracil, vincristine, bleomycin, mithramycin, VM26 (semisentetic podophyllotoxin) dir. Hazırlanan 3 mikrotitrasyon plate'inden 2 si ilaç hassasiyetini ölçmek için, bir tanesi ile tümör hücrelerinin ilaç tedavisi yapılmaksızın üreme hızlarını ölçmek için kullanıldı. Bu sonuncu plate'de her gün vasat değiştirildi ve bu plate'de 3 günde bir hücre sayımı yapıldı. Normal olarak beklenen her hücre sayımında hücre sayısının giderek artmasıdır. Şayet böyle bir art-

ma izlenemez ise o tümörün hücreleriyle yapılan ilaç hassasiyet testlerinin sonuçları doğru olarak kabul edilemez.

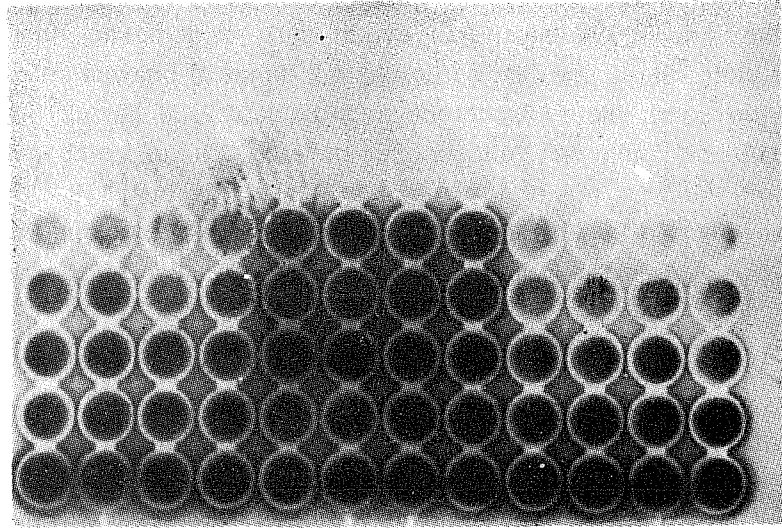
İlaç testi için kullanılan plate'lerden birinde hücreler 3'er sıra methyl-CCNU, 5-Fu, vincristine ve 3 sıra da kontrol olarak % 10 EtOH ile tedavi edildi. Kullanılan ilaç konsantrasyonları arasında insan plazmasındaki konsantrasyonları da kullanıldı. Hücreler 3 gün süreyle ilaçla tedavi edildi ve bu süre içinde her gün ilaç ve vasat değiştirildi. 3 günün sonunda ilaç tamamen geriye alındı ve hücreler 4 gün süreyle iyileşmeye bırakıldı. Bu arada yine her gün vasat değiştirildi. 4 gün sonra plate'deki her bir boşluğa 0.1 ml. vasat içinde 1 mikroküri³⁵ s-methionine (izotop) konuldu. Hücreler izotop ilavesinden sonra 3 saat süreyle % 2 lik CO₂ inkübatöründe bırakıldı. Sonra plate BSS (Hank's balanced salt solution without bicarbonate) ile yıkandı. Sonra hücreler saf metanol ile fikse edildi. Plate kurutulduktan sonra 3 kez, soğutulmuş % 10 luk trichloroacetic acid ile bütün boşluklar doldurulup boşaltıldı. Plate tekrar metanol ile yıkanıp kurutuldu. Plate'in her boşluğuna 50 mikrolitre toluene based scintillator konuldu. Plate dakikada 800 devirde bir saat süreyle santrifüje edildi. Böylece toluene'nin plate zemininde kuruyup bir tabaka yapması sağlandı. Bunun nedeni bir sonraki safha olan izotopun filminin çekilmesi için uygun şartı sağlamaktır. Karanlık odada plate alt yüzüne film sarılarak, ışık almasını önleyici önlemler alındıktan sonra plate - 70 dereceye bırakıldı. 1,2,4,8 günlük filmler alındı. Alınan filmlerden autoscanner aleti ile tutulan izotop miktarını grafi kolarak göstermek mümkün oldu. Kullanılan ilaç konsantrasyonlarına uygun olarak hazırlanan okuma kartlarından yararlanılarak ID₅₀ (yüzde elli inhibisyon dozu) ölçüldü.

BULGULAR

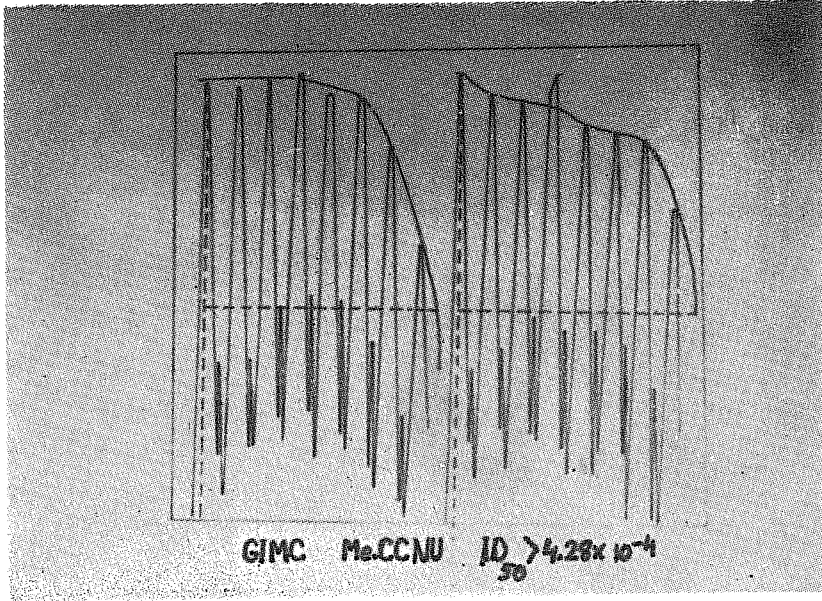
Resim 1 de ilk 3 sıra methyl-CCNU, ikinci 3 sıra 5-Fu, üçüncü 3 sıra vincristine, dördüncü 3 sıra : 10 EtOH ile Resim 2 de ilk 4 sıra bleomycin, ikinci 4 sıra mithramycin, üçüncü 4 sıra VM26 ile tedavi edilen sıralardaki hücrelerin proteinine bağlanan izotop görülmektedir. Resim 3, 4, 5, 6, 7, 8 de her bir ilaca ait otoflorografi grafiklerinden birer örnek görülmektedir.



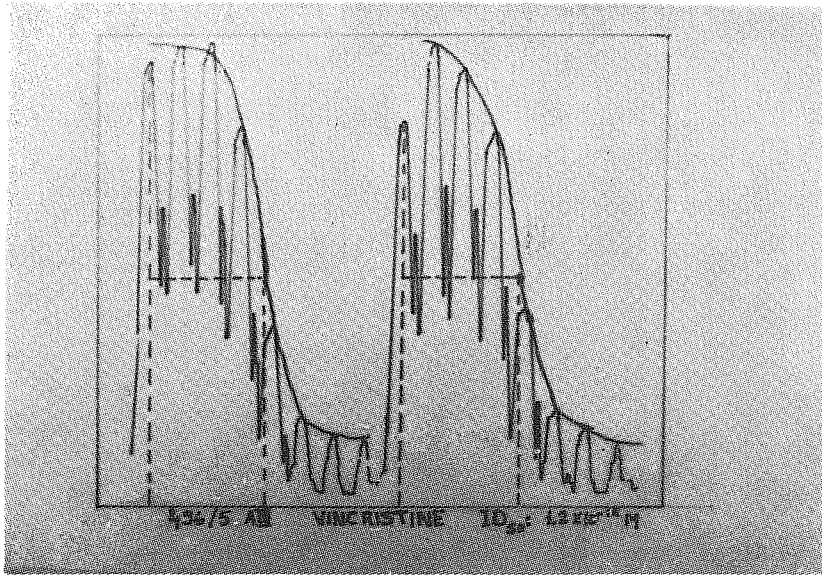
Resim 1 : İlk üç sıra Me-CCNU, ikinci 3 sıra 5-FU, üçüncü 3 sıra vincristine, dördüncü 3 sıra % 10 EtOH ile tedavi edilmiş hücrelerin izotop tutuşunu göstermektedir.
(Bir autofluorography filmi)



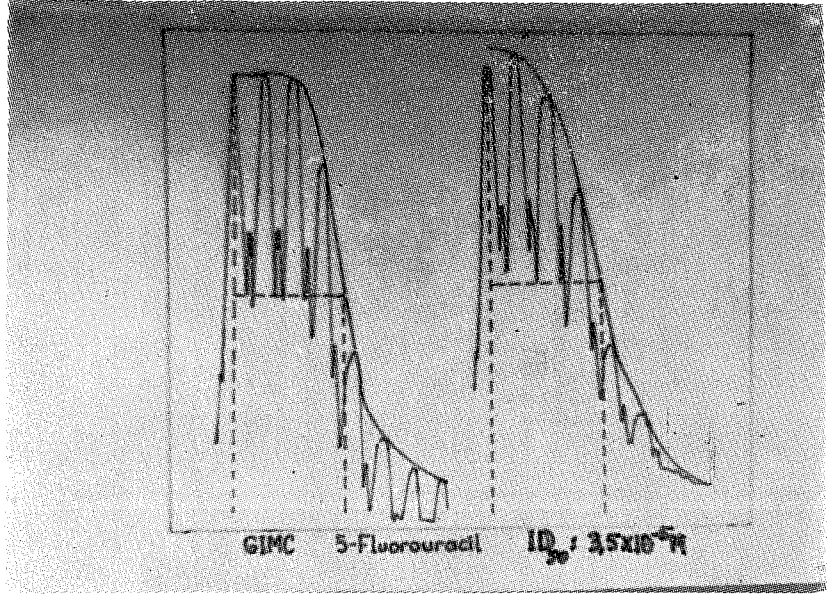
Resim 2 : İlk 4 sıra Bleomycin, ikinci 4 sıra Mithramycin, üçüncü 4 sıra VM 26 ile tedavi edilmiş hücrelerin izotop tutuşunu göstermektedir.
(Bir autofluorography filmi)



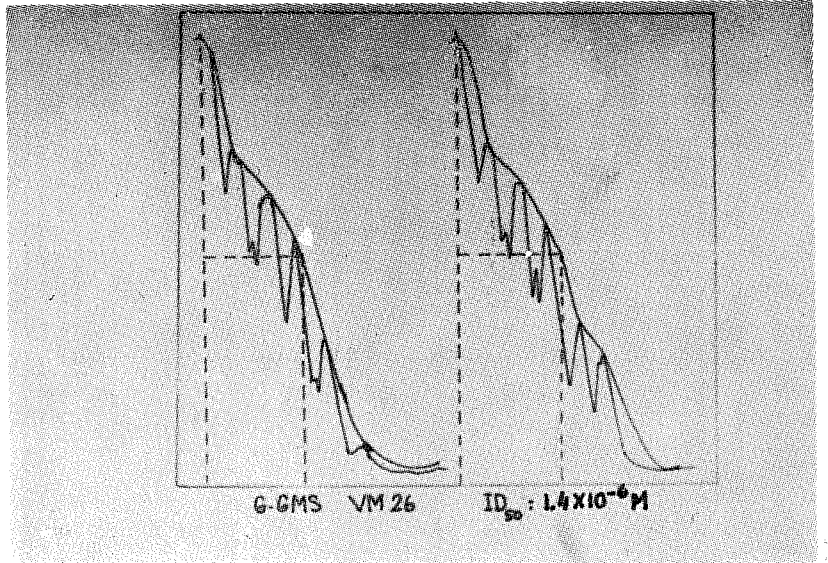
Resim 3 : Me-CCNU ile elde edilen bir otoflorografi grafiği



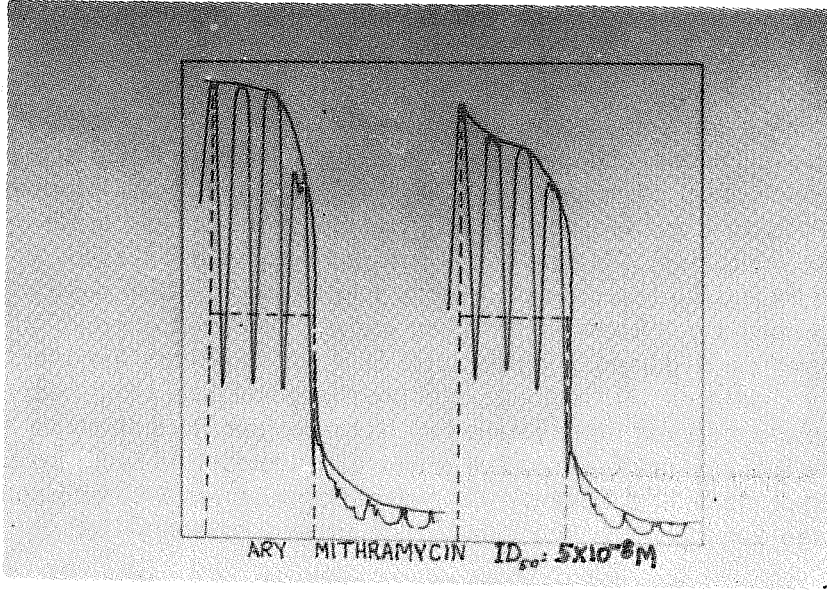
Resim 4 : Vincristine ile elde edilen bir otoflorografi grafiği



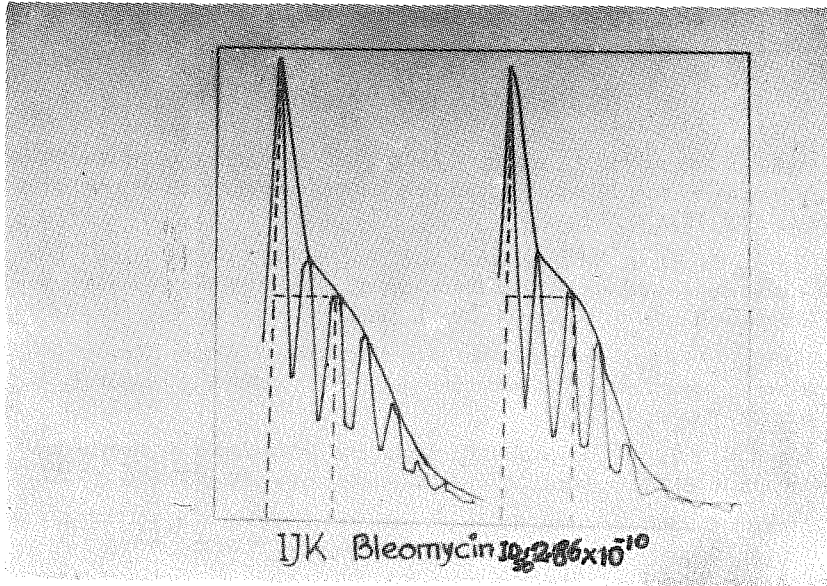
Resim 5 : 5-FU ile elde edilen bir otoflorografi grafiği



Resim 6 : VM 26 ile elde edilen bir otoflorografi grafiği



Resim 7 : Mithramycin ile elde edilen bir otoflorografi grafiği



Resim 8 : Bleomycin ile elde edilen bir otoflorografi grafiği

TARTIŞMA

Bu metodun diğerlerinden en belirgin farkı, uzamış tedavi süresinin ve uzamış iyileşme devresinin oluşu ve otoflorografi tekniğinin kullanılmış olmasıdır (6). Daha önce yapılan mikrotitrasyon çalışmalarında ilaçla tedavi süresi çok kısa tutuluyordu. (Kornblith ve Szytko) Oysa Freshney tarafından yapılan çalışmalar göstermiştir ki, maksimum ID_{50} elde etmek için tedavi süresinin 4-5 gün olmasına ihtiyaç vardır. Hatta bazı ilaçlar için tedavi süresinin daha uzun tutulmasına gerek vardır. Yine ilaç geriye alındıktan sonraki iyileşme devresi uygulandığında ilaçların etkisinden kurtulan tümörler tanınamamaktadır. Bu methodda otoflorografi tekniği ile canlı hücrelerin protein sentez etme yetenekleri izotop yardımıyla sıhhatli bir şekilde ölçülebilmekte, en küçük hücre dansitesinde bir ilacın etkisini ölçmek mümkün olmaktadır. Bu methodla ameliyattan 6-8 hafta sonra kliniğe kemoterapide kullanılacak ilaç tavsiye edilebilmektedir.

SUMMARY

In vitro microtitration technique was employed for determining the effective drug for treatment of glial tumours. Six different drugs were used and superiority of the microtitration technique to the others was discussed.

KAYNAKLAR

1. Mattern., Kaufmann. M., Wayss. K., and Volm. M., Clinical correlates of invitro effect of adramycin on advanced lung carcinoma Klinische Wochenschrift 54: 665-670, 1971.
2. Tchao, R., Easty. G.C., Ambrose. E.J., Raven. R.V., Bloom, H.J.G., Effect of chemotherapeutic agents and hormones on organ cultures of human tumours, European Journal of Cancer, 4: 39-44, 1968.
3. Saez. J.J. Ruben., Campbell Jean R and Edwards, R. Laws. : Chemotherapeutic trials on human malignant astrocytomas in organ culture, J. Neurosurg. 46: pp. 320-327 March 1977.
4. Kornlith, P.L., and Ezytko, P.E.: Variations in response of human brain tumours to BCNU in vitro, Journal of Neurosurgery, 48: 580-586, 1978.
5. Morgan. D., and Freshney. R.I. in vitro predictive testing of astrocytoma. B.A.C.R 20 th. Annual General Meeting, Oral Papers pp. 303-304, 1978.
6. Morgan, D., Freshney, R.I.: Screening samples of human astrocytoma for drug sensitivity by scintillation autofluorography, British J. Cancer, 37: 476, 1978.