ARAŞTIRMA

Gülhane Tıp Derg 2012; 54: 263-266

© Gülhane Askeri Tıp Akademisi 2012
doi:10.5455/gulhane.12923

Gemsitabinin multipl myelom (RPMI-8226) ve Ig G plazma hücreli lösemi (ARH 77) hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi

Zehra Dilşad Çoban (*), Ferit Avcu (**), Ali Uğur Ural (**), Okan Kuzhan (***), Şefik Güran (*)

ÖZET

Gemsitabin DNA replikasyonu sırasında hücrede sitidin gibi bir nükleotidin yerine geçer, nükleozid analoğu olarak işlev görür. Böylece tümör hücresinde apopitozise neden olarak büyümeyi durdurur. Bu nedenle her tür kanser hücresine sistemik etkilidir. İlaç olarak küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, pankreas kanseri, mesane kanseri ve meme kanseri gibi birçok metastatik kanserde kullanılmaktadır. Çalışmada multipl myelom-PMI-8226 ve Ig G plazma hücreli lösemi ARH-77 hücre hatlarına farklı konsantrasyonlarda gemsitabin uygulanmış, ilacın sitotoksik etkisi XTT uygulaması ile değerlendirilmiştir. Gemsitabinin RPMI-8226 hücre hattında 400 µmol, ARH 77 hücre hattında 200 µmol konsantrasyonlarında letal doza eriştiği saptanmıştır. Sonuç gemsitabinin multipl myelom ve Ig G plazma hücreli lösemi tümör hücrelerinde sitotoksik etkisinin bulunduğunu ortaya koymaktadır. Ancak ilacın multipl myeloma ve Ig G plazma hücreli lösemi tedavisinde etkinliğinin bulunması için ileri deneylere gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: *Gemsitabin, RPMI-8226, ARH 77, nükleozid analoğu, multipl myelom, Ig G plazma hücreli lösemi*

SUMMARY

The sitotoxic effect of gemcitabine on multiple myeloma (RPMI-8226) and Ig G plasma cell leukemia (ARH 77) cell lines

Gemcitabine replaces one of the nucleic acids such as cytidine as a nucleoside analog during DNA replication. The process arrests tumor growth resulting in apoptosis. As a chemotherapeutic agent, gemcitabine has systemic effect on every tumor cells. So, it is used in various carcinomas: non-small cell lung cancer, pancreatic cancer, bladder cancer and breast cancer. Here, multiple myeloma-RPMI-8226 and Ig G plasma cell leukemia-ARH 77 cell lines were treated with gemcitabine in different concentrations. Cytotoxic effect of gemcitabine was detected by XTT assay in cell culture. In RPMI-8226 cell line, lethal effect was detected at the concentration of 400 µmol/L. In ARH-77 cell line, lethal effect was found at the concentration of 200 µmol/L. These results represent us the cytotoxic affect of gemcitabine on multiple myeloma and Ig G plasma cell leukemia tumor cells. It is needed to do further experiments for finding efficiency of multiple myeloma and plasma cell leukemia treatment with gemcitabine.

Key words: *Gemcitabine, RPMI-8226, ARH 77, nucleoside analog, multiple myeloma, Ig G plasma cell leukemia*

* GATA Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
** GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Araştırma ve Geliştirme Merkezi
*** GATA Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı

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

Makalenin geliş tarihi: 01.02.2012 • **Kabul tarihi:** 23.03.2012 • **Çevrim içi basım tarihi:** 27.12.2012

Giriş

Multipl myelom (MM) kanda antikor üretmeden sorumlu olan plazma hücrelerinden köken alan bir kanser türüdür. Tüm kanserler arasında %1'lik, tüm hematolojik maligniteler arasında ise %10' luk bir görülme sıklığına sahiptir. Hastalık ileri yaşlarda sinsi bir şekilde başlar ve genellikle yavaş ilerleme gösterir(1,2). MM' da tıbbi tedavi olarak melfalan- prednizolon kombinasyon tedavisi halen kullanılmaktadır. Son yıllarda talidomit ve türevleri, arsenik trioksit, histon deasetilaz inhibitörleri ve proteozom inhibitörleri üzerinde yapılan çalışmalarla tedavide yeni aşamalar kaydedilmiştir(3). Ig G plazma hücreli lösemi (PHL) aynı MM gibi plazma hücresinden köken alan bir malignitedir. PHL olgularının %70' i primer (*de novo*) olarak gelişmektedir. Sekonder olan olguların çoğunlukla MM' dan köken aldığı bilinmektedir. Sekonder PHL olguları bu yönü ile terminal dönem MM' gibi kabul edilebilir. Hastalık MM' dan daha kötü prognoza sahiptir(4,5). Hastalığın tedavisinde siklofosfamid, doksorubisin, vinkristin ve prednizon kombinasyonları kullanılır. Olguların çoğunda tam remisyon sağlanmaktadır. Ancak tüm tedavi yaklaşımlarına rağmen bazı olgularında remisyonun idamesinde sorunlar olmaktadır. PHL' lerde klinik tablo MM' ya göre daha kötü seyirli olup, sağ kalım oranları oldukça düşüktür(6,7).

Gemsitabin, deoksisitizinin ikinci karbonundaki hidrojen atomlarını florin atomları ile değiştiren bir nükleozid analoğudur. Hücre replikasyonunda nükleik asit dizisindeki sitidin gibi yapıtaşlarının yerini alarak DNA replikasyonunu engeller. Ayrıca gemsitabin difosfat anoloğu ribonükleotid redüktaz (RNR) adı verilen enzime de bağlanarak onu inhibe eder. Her iki

yolla da hücre apopitozise gider. Bu yolla tümör büyümesi önlenir. Tüm tümör hücreleri üzerinde olan etkisinden dolayı farklı kanserlerde yaygın kullanımı vardır(8,9,10).

Çalışmamızda halen MM ve Ig G plazma hücreli lösemi tedavi protokolünde bulunmayan ancak sistemik etkisi nedeni ile bu hastalıklar üzerinde etkili olabileceğini düşündüğümüz gemsitabin, farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak multipl myelom hücre hattı (RPMI-8226) ve IgG plazma hücreli lösemi hücre hattı (ARH 77) üzerinde denenmiştir. Gemsitabinin RPMI-8226 ve ARH 77 hücre hatları üzerine olan sitotoksik etkisi XTT Assay yöntemi ile değerlendirilmiştir, elde edilen veriler yorumlanmıştır(11).

Gereç ve Yöntem

Gemsitabin (Gemzar®Lilly) temin edildikten sonra hücre kültürü için RPMI 1640'da (Sigma-Aldrich-R8758) son konsantrasyon 50-100-150-200-250-300-400-500-600 umol/L olacak şekilde hazırlanmış ve deneysel çalışmada kullanılmıştır.

MM RPMI-8226 [ATTC No: CCL-155-Human multiple myeloma] ve Ig G PHL ARH-77 [ATCC No: CRL-1621-Human Ig G plasma cell leukemia] hücre hatları 10%(v/v) fetal bovine serum (BiochromAG, Germany) ve 1%(v/v) gentamisin (Biological Industries, Israel) içeren RPMI 1640 (Sigma-Aldrich-R8758) ile 37 ºC' de, 5%CO_2' li ortamda Heraeus inkübatörde (Hanau, Germany) çoğaltılmıştır. Çoğalan hücreler XTT Assay (Cell Proliferation Kit, Biological Industries, Israel) için her kuyucukta 1x 10^6 hücre olacak şekilde 96'lık well-plate' lere dörderli gruplar halinde yerleştirilmiştir. Hücre hatları 24 saat "well-plate" e yapışma ve çoğalması için 37º C' de etüvde bekletilmiştir. 24 saatin sonunda her "well-plate" e Tablo 1' de belirtilen konsantrasyonlarda RPMI-1640 içinde çözülen gemsitabin ilave edilmiştir [medium (RPMI-1640), RPMI-1640 ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan gemsitabin, hücre hatları (RPMI-8226 ve ARH-77)]. Her deney grubu için medium (RPMI-1640) ve RPMI-8226/ARH 77 ile medium (RPMI-1640)' u içeren kontrol grupları oluşturulmuştur (Tablo 1).

RPMI-8226 ve ARH 77 hücre hatlarının ilaç uygulamasından sonra oluşturduğu sitotoksititeyi 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. larının uygulamaları esas alınmıştır(12). İlk 24 saatin sonunda sitotoksik etkiyi ölçmek için her well-plate' e XTT solusyonu eklenmiştir. Sonuçlar 24 saat sonra 490 nm' de "ELISA reader" da okutularak elde edilmiştir(11). Çalışmada dörtlü tekrar grupları kullanılmıştır.

Bulgular

Çalışmamızda gemsitabinin artan dozlarda RPMI-8226 (MM) hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki Şekil 1 (a)'da, gemsitabinin artan dozlarda ARH-77 (Ig G PHL) hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etkisi Şekil 1 (b)' de ortaya konmaktadır. Sitotoksik etki artan dozlarda "well plate" içinde ölen ve sağ kalan hücrelerin oranına bakılarak bulunmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre gemsitabinin uygulanan dozlarda RPMI-8226 ve ARH-77 hücreleri üzerine etkisi belirgindir. Çalışma gemsitabinin RPMI-8226 hücre hattında 400 µmol konsantrasyonunda ve ARH-77 hücre hattında 200 µmol konsantrasyonunda letal doza eriştiğini ortaya koymaktadır. RPMI-8226 hücre hattında ARH-77 hücre hattına göre daha yüksek gemsitabin konsantrasyonunda letal doza erişilmiştir (Şekil 1 a ve b).

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

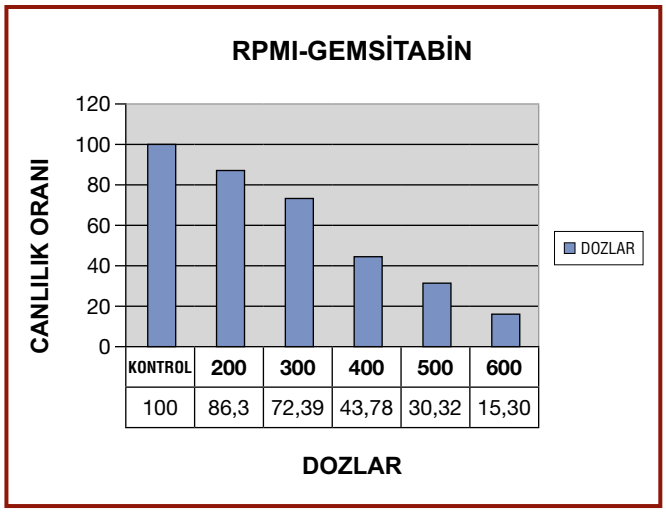
Medium (RPMI-1640)	*Medium (RPMI-1640)*
RPMI-8226 + Medium (RPMI-1640)	ARH-77 + Medium (RPMI-1640)
RPMI-8226 + Gemsitabin 200 µmol (*)	ARH-77 + Gemsitabin 100 µmol (*)
RPMI-8226 + Gemsitabin 300 µmol (*)	ARH-77 + Gemsitabin 150 µmol (*)
RPMI-8226 + Gemsitabin 400 µmol (*)	ARH-77 + Gemsitabin 200 µmol (*)
RPMI-8226 + Gemsitabin 500 µmol (*)	ARH-77 + Gemsitabin 250 µmol (*)
RPMI-8226 + Gemsitabin 600 µmol (*)	ARH-77 + Gemsitabin 300 µmol (*)

RPMI-8226: MM hücre hattı
ARH-77: Ig G PHL hücre hattı
(*) Gemsitabin farklı konsantrasyonlarda hazırlanırken RPMI-1640 içinde çözülmüştür.

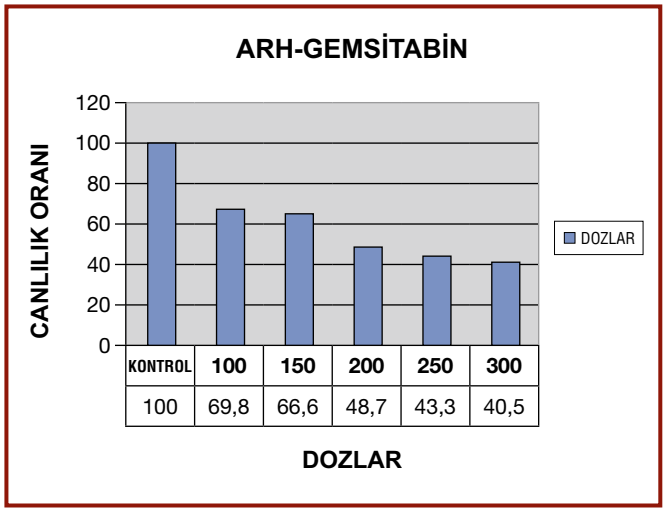
Tartışma

MM kronik seyirli sinsi bir hastalıktır. Genelde ileri yaşlarda tanı konulan hastalarda klinik ilerleme yavaş olur(1). MM tedavisinde mitotik döngüyü etkileyen birçok ilaç denenmektedir. Bilindiği gibi MM hücrelerinin büyüme hızları düşüktür. Tümör hücrelerinin yaşam süreleri uzun olup hastalığın klinik gidişi kronik bir seyir gösterir(11). Bu nedenle mitozu inhibe eden, hücre ölümünü aktifleyen, hücreyi apopitoza yönlendiren ilaçlar denenmektedir(14). Ig G plazma hücreli lösemi yine kronik seyirli bir hastalıktır. PHL genellikle primer (*de novo*) olarak ortaya çıkar. Bazı olgularda MM' dan sekonder olarak da gelişebilmektedir(4). MM' ya benzer klinik gösterdiğinden Ig G PHL tedavisinde de hücreyi apopitozise sokan ilaçlar denenmektedir(6).

Çalışmamızda kullandığımız gemsitabin nükleozid analoğu olarak DNA replikasyonunu inhibe eder ve bunun sonucunda tümör hücresinin büyümesini engeller. Hücreler apopitozise gider(8). Gemsitabin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, pankreas kanseri, mesane kanseri ve meme kanseri gibi birçok kanser türünde sıklıkla kullanılmaktadır. Gemsitabinin sistemik etkisinden dolayı farklı kanserlerde ilaç olarak kullanımına ait çalışmalar sürmektedir(15). Kret ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada MM tedavisinde tüm nüklezid analogları kullanılmış ve etkin dozları araştırılmıştır. Sonuçta tüm bu grup içinde yer alan ilaçlardan sadece gemsitabinin MM tedavisinde rolü olabileceğini rapor edilmiştir. Tedaviye dirençli MM olgularında gemsitabin ile elde edilen sonuçlar gemsitabinin özellikle relaps MM olgularında denenebileceğini düşündürmektedir(16). Celia ve arkadaşları yüksek dozda ortaya çıkabilecek yan etkileri ortadan kaldırmak için gemsitabini MM' hücre hatlarına lipozom içinde vermişlerdir. Bu yolla hücre hattı bazında daha küçük gemsitabin dozlarında sitotoksik etki oluşturmayı başarmışlardır (17). Gazzit ve arkadaşları relaps evresindeki MM olgularında gemsitabin/paklitaksel kombinasyonunun yararlı olduğunu gösteren faz II çalışmalarına başlamışlardır(18). Sonuçta gemsitabin tedaviye dirençli MM olgularında klinik olarak denenme aşamasına gelen bir ilaç grubundadır(18,19). MM ve PHL hücre hatlarını içeren bir başka çalışma gemsitabinin hangi yolakları kullanarak hücreyi apopitoza soktuğunu ortaya koymaktadır. Burada birçok genin ekspresyon profili ortaya konarak hangi genlerin etkilendiği ortaya çıkarılmıştır(9). Bu nedenlerle çalışmamızda plazma hücresinden köken alan iki kanser modelinde birden gemsitabinin letal doz düzeyleri ortaya konmuştur.



Şekil 1a. Gemsitabinin artan dozlarda RPMI-8226 (human multiple myeloma) hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki



Şekil 1b. Gemsitabinin artan dozlarda ARH 77 (human Ig G plasma cell leukemia) hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki

Elde edilen sonuçlar gemsitabinin tedaviye dirençli MM ve PHL olgularında kullanılabileceğini destekler niteliktedir (Şekil 1 a ve b). PHL' ye ait hücre hattında MM' ya ait hücre hattından daha küçük konsantrasyonlarda letal dozun saptanması ARH-77 hücre hattının RPMI-8226 hücre hattına göre gemsitabine daha duyarlı olduğunun göstergesi olarak yorumlanabilir (Şekil 1 a ve b). Bu çalışmaların ışığında gemsitabinin özellikle PCL olgularında etkisinin ortaya konması önemlidir. Ancak her ilaç geliştirme çalışmasında olduğu gibi gemsitabinin etkin dozunun daha geniş hücre hattı panelinde denenmesi ve elde edilen verilerin canlı sistemlere uyarlanması gereklidir(20).

Kaynaklar

1. Kyle RA and 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. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. N Engl J Med. 2011; 364:1046-1060.
4. Sher T, Miller KC, Deeb G, Lee K, Chanan-Khan A. Plasma cell leukaemia and other aggressive plasma cell malignancies. Br J Haematol. 2010;150: 418-427.
5. Jimenez-Zepeda VH, Dominguez-Martinez VJ. Plasma cell leukemia: a highly aggressive monoclonal gammopathy with a very poor prognosis. Int J Hematol. 2009; 89: 259-268.
6. Bird JM, Owen RG, D'Sa S, et al. Haemato-oncology Task Force of British Committee for Standards in Haematology (BCSH) and UK Myeloma Forum. Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma 2011.Br J Haematol. 2011; 154: 32-75.
7. Albarracin F, Fonseca R. Plasma cell leukemia. Blood Rev. 2011; 25: 107-112.
8. Assifi MM, Hines OJ. Anti-angiogenic agents in pancreatic cancer: a review. Anticancer Agents Med Chem. 2011; 11: 464-469.
9. Stathopoulos GP. Liposomal cisplatin: a new cisplatin formulation. Anticancer Drugs. 2010; 21: 732-6.
10. Rapkin L, Qayed M, Brill P, et al. Gemcitabine and docetaxel (GEMDOX) for the treatment of relapsed and refractory pediatric sarcomas. Pediatr Blood Cancer. 2012 Feb 2. doi: 10.1002/pbc.24101.
11. Donmez Y, Gunduz U. Reversal of multidrugresistance by small interfering RNA (siRNA) in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells. Biomedicine &Pharmacotherapy. 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 Biology International 2011; 35: 721–725
13. 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
14. 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.
15. Oettle H, Post S, Neuhaus P, et al. "Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial". JAMA 2007; 297: 267–77.
16. Krett NL, Ayres M, Nabhan C, et al. In vitro assessment of nucleoside analogs in multiple myeloma. Cancer Chemother Pharmacol. 2004; 54: 113-121.
17. Celia C, Malara N, Terracciano R, et al. Liposomal delivery improves the growth-inhibitory and apoptotic activity of low doses of gemcitabine in multiple myeloma cancer cells. Nanomedicine. 2008; 4: 155-166.
18. Gazitt Y, Shaughnessy P, Rothenberg ML. A phase II trial with gemcitabine and paclitaxel for the treatment of refractory and relapsed multiple myeloma patients. Oncol Rep. 2006; 16: 877-884.
19. Leleu X, Troncy J, Bouafia F, Michallet M, Facon T, Dumontet C. Evaluation of gemcitabine in relapsed or refractory multiple myeloma. Haematologica. 2004 Nov; 89 (11) : ELT15.
20. Swaby RF, Bhalla KN. Importance of rational pre-clinical development: gemcitabine comes of age. Cancer Biol Ther. 2005; 4: 872-873.