Araştırma Makalesi/Original Article

TRANSLASYONEL ÇALIŞMALAR İÇİN İN VİTRO NÖROBLASTOMA SAĞALTIM MODELİ*

In Vitro Neuroblastoma Therapy Model for Translational Studies

Yasemin BASKIN[1], **Nur OLGUN**[2]

[1]Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, İzmir Hıfzıssıhha Enstitüsü Bölge Müdürlüğü, İZMİR

[2]Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, İZMİR

İletişim:
Yasemin BASKIN
Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı İzmir Hıfzıssıhha Enstitüsü Bölge Müdürlüğü
Göztepe, 35350, İZMİR
Tel: 0232 285 3162
Faks: 0232 224 5989
e-posta:

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı nöroblastomada yeni sağaltımların geliştirilmesi ya da uygulanan stratejilerin daha etkin kılınması için *in vitro* bir kanser sağaltım modeli oluşturmaktır.

Yöntem: *Kelly* ve *SHSY5Y* hücreleri; RPMI 1640 ve DMEM kültür ortamında üretilmiştir. Sağaltım modellerinin deneysel tasarımında; TPOG-NBL 2003 Protokolü ve apoptozu farklı yolaklardan uyardığı bilinen kimyasallar kullanılmıştır. Anti kanser maddelerin sitotoksisite etkileri XTT testi ile değerlendirilmiştir. Apoptotik hücre ölümü; Hoechst 33342 / Propidyum iyodid ile; moleküler düzeyde "TUNEL" tekniği kullanılarak; erken safhaları "Annexin V" işaretlemesi ve flüoresan mikroskobu ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: SHSY5Y hücrelerinin, *n-myc* sunumu nedeniyle kötü klinik gidiş beklenen Kelly hücrelerine göre VCR ve CARBO'ya daha az duyarlı olduğu, buna karşın DOX, ETOP ve CIS'e karşı daha duyarlı oldukları gösterilmiştir. Apoptoz yolağındaki etkileri tanımlanmış kimyasallardan DEX, ETOP, CAMP, ACD ve CYH' e karşı SHSY5Y hücreleri daha duyarlı bulunmuştur.

Sonuç: Kullanılan ilaç ve kimyasallara genetik özellikleri değişik hücrelerin tepkisi, farklı bulunmuştur. Bu ilaç ve kimyasalların etki yolakları ve hücrelerin genetik özelliklerini araştıran çalışmalar daha etkin ve kişiye özel sağaltımların gerçekleşmesini sağlayabilir. Translasyonel çalışmalar için klinikte kullanılan sağaltımların *in vitro* modellerinin oluşturulması çok önemli katkılar sunabilir.

Anahtar Sözcükler: Nöroblastoma, *in vitro* sağaltım modeli, translasyonel çalışmalar.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to create an in vitro cancer therapy model of neuroblastoma for more effective applications or for developing new therapies.

Method: Kelly and SHSY5Y cells were grown using RPMI 1640 and DMEM. In therapy model design, TPOG- NBL 2003 Protocol and chemicals, those which are known to induce the apoptosis in different pathways, were used. Cytotoxic effects of anticancer substances were evaluated by XTT test. Apoptotic cellular death was evaluated by Hoechst 33342 / propidium iodide and by "in situ TdT-mediated dUTP nick end labeling technique" technic (TUNEL), while early stage of apoptosis was evaluated by Annexin V labeling using fluorescent microscope.

Results: SHSY5Y cells were found to be less susceptible to VCR and CARBO than Kelly cells, which were expected to show a poor clinical progress due to their NMYC expression, but more susceptible to DOX, ETOP and CIS. SHSY5Y cells were more susceptible to ACD, DEX, ETOP, CAMP, and CYH; which are chemicals with known effects on the apoptotic pathway.

Conclusion: The reactions of cells having genetically different characterizations against drugs and chemicals are different. Future studies concerning the efficacy of these drugs and chemicals and genetic properties of cells might help to develop more effective and personalized therapies. Creating in vitro models for translational studies on clinical therapies could be a great importance.

Key Words: Neuroblastoma, *in vitro* therapy model, translational research.

*Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Desteği Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: **03.KB. SAĞ.001).**

GİRİŞ

Klinik çalışmalarda yapılan deneylerde yeni sağaltım stratejileri için genellikle deney hayvanları sıklıkla da fareler kullanılmakta ancak tür özgünlüğü nedeniyle bu çalışmalarda elde edilen veriler tartışılmaktadır. Bu açıdan insan sağlığını ilgilendiren temel bilim ve hastalıklarda çoğu karmaşık sorunun en iyi adresi insan hücreleridir. Yeni gelişen teknolojiler metabolik yolakların hızlıca izlenebilmesine olanak tanımaktadır. İnsan hücresinin temel yaşam süreçlerinde, yapısal modülasyonları sağlayan ve etkin olan proteinleri saptama olanağı vermektedir. Gelişimsel biyoloji ve hastalıklarda çok sayıda karmaşık yolak, hücresel ve moleküler bağlamda özgündür. Örneğin tümör gelişimi, hücrenin tipine özgün olarak farklı şekilde düzenlenir (1-3).

Var olan yasalar yeni sağaltıcı etkenlerin, kliniğe ilaç olarak gelene kadar ağır sitotoksik testlerden geçmesini öngörmektedir. Hayvan deneyleri yerine hücre kültür tekniklerinin geliştirilmesi birincil araştırmalara daha fazla şans tanınmasına yol açmıştır. *İn vitro* bir sitotoksisite, *in vivo* toksisite ile doğrudan bağlantılı olmasa da bileşiğin içeriği ile ilgili bir fikir vermekte, seçici bir model oluşturmaktadır (4-7). Sitotoksisite deneyleri, çalışmalarda kullanılan maddeler ile ilgili elde edilen bilgilere dayanmaktadır. Hücrenin çoğalması (^{3}H timidin bağlanması), hücre metabolizması (boyanın indirgenmesi), hücre canlılığı (boya bozulması, hücre sayımları) gibi birçok parametre araştırılabilmektedir (8).

Doku kültür teknikleri, tıp ve endüstrinin alışılagelmiş uygulama alanlarından biridir ve uzun zamandır kullanılmaktadır. Ancak gelişen teknoloji, hücre temelli yöntemlerin gelişimi, "omic" teknolojileri ile olası tanısal ve sağaltım hedeflerinin araştırılması, yeni ilaç araştırmaları ve kinetikleri için hastalık ve sağaltım modellerinin *in vitro* ortamda oluşturulması; önemini daha da arttırmaktadır. Doku kültür teknikleri hücresel aktivitenin izlenmesinde üstünlüğü olan bir tekniktir. Ancak bu yöntemin sınırlılıkları da önemle vurgulanmalıdır (8).

Gerek etik gerekçeler gerekse teknolojinin getirdiği uygulanabilirlik ve hız; klinik çalışmalarda yeni bir kavramı tanımlamıştır. Translasyonel çalışmalar olarak adlandırılan bu sistemde, her klinik kendi hasta grubu ve sağaltım sorunlarını, yine kendi grubu içinde oluşacak deneysel modellere aktararak çözmeye çalışmakta ve laboratuvar çalışmalarının sonuçları hızlıca klinik uygulamalara aktarılabilmektedir. Bu gerçeklik içinde; kliniğe uygulanabilir deney modelleri sunmak önemli bir çalışma alanı olarak tanımlanmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kelly; Human neuroblastoma (Nmyc+, : N myc in der (17) hsr x100 kez çoğaltılmış) ve *SHSY5Y; (Human neuroblastoma (Nmyc* -,SK N SN nöroepitelyoma hücre hatlarından elde edilmiş, metastatik nöroblastoma) hücre soyları (DSMZ, Germany) RPMI 1640, %10 FCS ve DMEM, %15 FCS kültür ortamında, 37°C'de % 5 CO_2'li nemlendirilmiş ortamda üretilmiştir.

İşlem Basamakları

Nöroblastoma hücre dizilerinde, sağaltım modellerinin deneysel tasarımında; Türk Pediatrik Onkoloji Grubu'nun "Nöroblastoma Sağaltım Protokolü" (TPOG-NBL 2003; Koordinatörler, Dr. Nur Olgun, Dr. Savaş Kansoy, Dr. Serap Aksoylar, Dr. Kamer Uysal) temel alınarak *in vitro* ortama uyarlanmıştır (9). Bu amaçla; Vinkristin (Vincrisrine-VCR Mayne Pharma Pty Ltd.Victoria, Avutralya) [30.00-0.23 nM], Etoposit (Etoposide-ETOP EBEWE Pharma Ges. m.b. H. N AUSTRIA) [17.20.13 µM], Sisplatin (Cisplatin-CIS David Bull Laboratories, Victoria, Avustralya) [160-1.25 µM], Doksorubisin (Doxorubicin-DOXO Pharmacia Upjohn, Milano, İtalya) [6.00-0.125nM], Karboplatin (Carboplatin - CARBO David Bull Laboratories, Victoria, Avustralya) [16.00-0.125 nM]; konsantrasyon aralıklarında, sekiz farklı konsantrasyonda uygulanarak her deney ortamında tüm yoğunluklar en az üçer kez yinelenmiştir. Her bir yoğunluk için en az üç farklı deney ortamında testler yinelenmiştir. Apoptozu farklı mekanizmalarla uyardığı bilinen kimyasallardan (Alexis Ldt, Nottingham, UK); Aktinomisin-D

(ACD-Actinomycin D) [100- 0.05µM], Kamptotesin (CAMP-Camptothecin) [20- 0.03 µM], Siklohekzimit (CYH-Cycloheximide) [1.00mM-0.4 µM], Deksametazon (DEX-Dexamethasone) [1000.05 µM], Etoposit (ETOP-Etoposide) [4000.2 µM]; yoğunluk aralıklarında, sekiz farklı konsantrasyonda uygulanmıştır. Her deney ortamında tüm yoğunluklar en az üçer kez yinelenmiştir ve her bir yoğunluk için en az üç farklı deney ortamında testler yinelenmiştir.

Hücre Ölümünü Değerlendiren Yöntemler

Antikanser maddelerin sitotoksisite etkileri sodyum 3'-[1-(fenilaminokarbonil)-3,4-tetrazolyum] -bis(4-metoksi-6-nitro) benzen sulfonik asid hidrat (XTT) testi ile değerlendirilmiştir. XTT hücre üreme kiti II işaretleme ayracı, (1mg/ml ,RPMI 1640 içinde (fenol kırmızısı eklenmemiş), steril) ve elektron-çiftleme ayracı taze olarak hazırlanmıştır (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Hücre kültürleri 37°C ve % 5 CO_2'li ortamda 24 ila 48 saat tutulmuş; XTT işaretleme karışımından 50µl eklenerek 18 saat inkübasyon sürdürülmüştür. Spektrofotometrik optik yoğunluk daha önce tanımlandığı gibi ölçülmüştür. Apoptotik hücre ölümü; Hoechst 33342 / Propidyum iyodid çekirdek boyaması ve flüoresan mikroskobu kullanarak morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Hücre ölümünün değerlendirilmesi ve niceliksel durumunun ortaya konması, klasik morfolojik ölçütler ve bunlarla birlikte işlevsel yaşamsal boyalar kullanılarak gerçekleştirmiştir. Hoechst 33342 (bisbenzimide H 33342, Sigma), çift sarmallı DNA'nın AT'den zengin bölgelerine özgü bir boyadır. Bu yöntem, canlı, ölü ve apoptotik hücrelerin hücre zarlarının iki DNA boyası; propidyum iyodid (Sigma) ve Hoechst 33342'e geçirgenliklerinin arasındaki farklılıklara dayanır. Hücreler oda sıcaklığında 20 dakikada fosfat tuzlu solüsyon (phosphate buffer saline-PBS) içindeki % 1-3'lük formaldehit içinde tespit edilmiş, tespit çözeltisi çekilerek, soğuk % 100 metanol eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında bırakılmıştır. Metanol çekilerek, PBS ile 3 kez yıkanan hücreler 37°C'de 15 dakika Hoechst 33342 boyasında tutulmuş (5 g/mL PBS), üç kez PBS ile yıkanarak *Propidium iodide* (50g/mL PBS) eklenmiştir. Hücreler Olympus BHZ, floresan ışık kaynağında, eksitasyon dalga boyu 330 nm ve engel filtresi 420 nm olan RFCA mikroskopu (Japan) ile değerlendirilmiştir. Apoptozun, tek bir hücrede moleküler düzeyde ölçülmesi amacıyla "in situ TdT-mediated dUTP nick end labeling technique" (TUNEL tekniği) kullanılmıştır. Metanolde % 3 H_2O_2 ve % 4 paraformaldehit, tespit edilen hücreler, % 0,1 sodyum sitrat içinde % 0,1 Triton X100, geçirgenleştirmiş, nemlendirilmiş ortamda (portatif inkübatör, Milipore Corporation Bredford, Massachusetts, USA), in situ cell death detection kit (Roche Applied Science) ile işaretlenerek, eksitasyon dalga boyu 450500 nm ve tarama dalga boyu 515565 nm olmak üzere floresan mikroskopunda (Olympus BHZ, RFCA Japan) değerlendirilmiştir. Apoptozun erken safhaları "Annexin V" işaretlemesi kullanılarak değerlendirilmiştir. Apoptozun erken döneminde değişiklikler hücrenin yüzeyinde oluşmaktadır. Plazma zarındaki değişikliklerden biri plazma zarının iç bölümünden dışına fosfatidilserinin (FS) translokasyonudur. Böylece FS, hücrenin dış yüzeyinde sergilenir hale gelir. "Annexin V", Ca^{2+}'a bağımlı bir fosfolipit bağlayan protein olup, FS'ye karşı yüksek ilgi gösterir. Böylece bu protein, FS'nin hücre yüzeyindeki varlığını göstermekte duyarlı bir prop olarak kullanılır. Metanolde % 3 H_2O_2 ve % 4 paraformaldehit, tespit edilen hücreler, % 0.1 sodyum sitrat içinde % 0.1 Triton X100, geçirgenleştirilmiş, nemlendirilmiş ortamda (portatif inkübatör, Cat No. XX63 000 000 Milipore Corporation Bredford, Massachusetts, USA), Annexin-V-Fluorescein ve Propidiyum iyodid (Roche Diagnostics GmbH, Germany) ile işaretlenerek eksitasyon dalga boyu 450500 nm ve tarama dalga boyu 515565 nm olmak üzere floresan mikroskopunda (Olympus BHZ, RFCA Japan) sayılmıştır.

İstatistik

Sitotoksik deneylerde ilaçların sekiz ayrı yoğunlukta etkileri, kontrol hücreleri ile karşılaştırılmıştır. Her deney değişkeni için en az sekiz kuyucuk kullanılmış ve üç farklı günde deneyler tekrarlanarak ortalama sonuçlar kullanılmıştır. Apop-

totik yöntemlerde, her deney değişkeni için üç farklı kuyucuk ve üç ayrı günde yapılan deneylerin ortalaması kullanılmıştır. Farklı gruplar arasındaki anlamlılık için örnek sayısı otuzdan küçük olan deneylerde Mann-Whitney U; örnek sayısı otuzdan fazla olan deneylerde Student's t testi ($p<0,05$) yapılmıştır.

BULGULAR

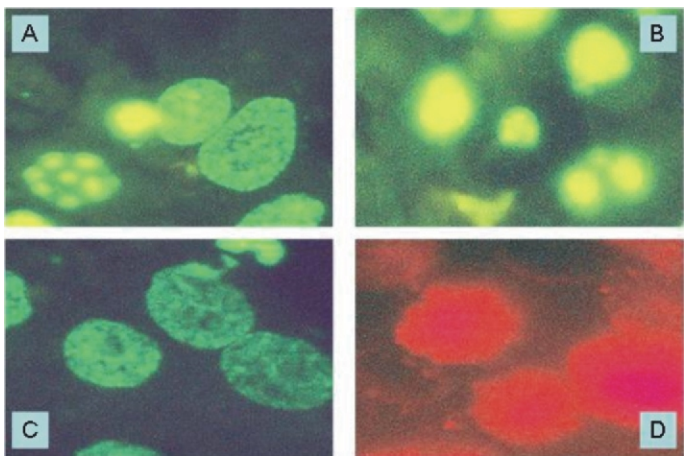
Antikanser Maddelerin Neden Olduğu Apoptozun Morfolojik Özellikleri

Canlı hücreler, Hoechst 33342 ve Propidium Iodid (HOE/PI) ile boyandıklarında, çekirdekleri olağan, mavi/yeşil soluk boya almış düzenli kromatin yapıları olan bir morfoloji sergilerler (Şekil 1A). Apoptotik sürecin erken evresindeki hücrelerin çekirdek ve sitoplâzma zarları sağlamdır. Ancak çekirdek içinde kromatin yoğunlaşması gözlenir. Hücreler apoptozun geç evrelerinde (Şekil 1B), sitoplazmik bir zar ile çevrilmiş küçük çekirdeksel yapılar olarak tanımlanan çekirdeksel parçalanmalar gösterirler. Anti kanser ilaçlarla 24 saat süresince bekletilen nöroblastoma hücrelerinde, morfolojik değişimler gözlenir (Şekil 1C). Nekrotik hücreler; canlı hücrelere karşın daha küçük bir sitoplâzma; tamamen sağlam bir çekirdek ile hasarlı bir sitoplâzma zarı olarak belirgin bir hücre morfolojisi sergilerler (Şekil 1D).

Apoptozun erken döneminde plazma zarındaki değişikliklerdinden biri, plazma zarının iç bölümünden dışına fosfatidilserinin (FS) translokasyonudur. Böylece FS, hücrenin dış yüzeyinde sergilenir hale gelir ve işaretleyici annexin V nedeniyle dış yüzeyinde yeşil fluoresans verirler. Apoptoza girmeyen hücreler yalnızca ikinci boyama ile belirlenir ve PI nedeniyle kırmızı fluoresans verirler (Şekil 2A). Apoptozun erken döneminde olup etkilenen hücreler yeşil flüoresans vermektedirler (Şekil 2B). Apoptoz ile uyarılmış hücrelerde, kırılan DNA dizilerine işaretli nükleotidlerin in situ yerleştirilmesi sonucu yeşil flüoresans verirlerken apoptoza girmeyen hücreler için ikinci bir boyama PI ile yapılmıştır ve kırmızı flüoresans verirler (Şekil 2C). TUNEL pozitif apoptotik hücreler yeşil flüoresans ile görülmektedirler (Şekil 2D).

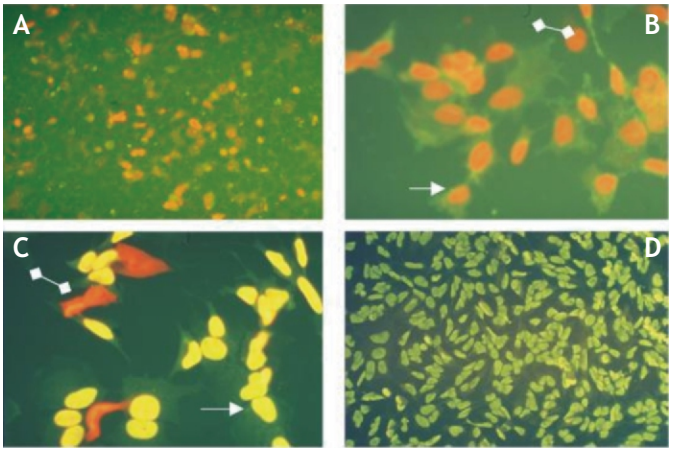
Nöroblastoma Sağaltımında Yaygın Olarak Kullanılan İlaçların SHSY5Y Ve Kelly Hücre Hatlarında İn Vitro Hücre Ölümü Üzerine Etkileri

Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) 2003 nöroblastoma protokolünde yer alan ve bu hastalığın sağaltımında temel olarak kullanılan antikanser ilaçlar etoposit (ETOP-EBEWE), vinkristin (VCR), karboplatin (CARBO), doksorubisin (DOXO) ve sisplatinin (CIS) farklı dozları in vitro olarak hücre hatlarına uygulanmış ve doz-yanıt eğrileri çizilmiştir.



Şekil 1. Neuroblastoma hücrelerinde görülen morfolojik değişimler.

Hücre morfolojilerindeki özellikler;
(A): geç evre apoptotik hücre;
(B): erken evre apoptotik hücre;
(C): normal yaşayan hücre;
(D): geç evre nekrotik hücre olarak tanımlanmıştır (x40 büyütme). Neuroblastoma hücreleri % 5 temel besleyici ortamda (C); 6 saat antikanser madde ile (B); 24 saat antikanser madde ile (A); 48 saat antikanser madde ile (D) tutulan hücreler sabitlenip Hoechst 33342 ve PI ile boyanmıştır (yöntemlerde ayrıntılı olarak tanımlanmıştır).



Şekil 2. Nöroblastoma hücrelerinde Etoposit'in neden olduğu apoptozun morfolojik özellikleri.

10 µM etoposit ile uyarılan nöroblastoma hücreleri 4 saat sonra Annexin V ile boyanmış ve 24 saat sonra TUNEL yöntemi ile değerlendirilmiştir.
Beyaz ok apoptotik; köşeli ok normal hücreleri sergiler.
A) kontrol,
B) Annexin V ve PI ile boyalı etkilenmiş hücreler,
C) TUNEL ve PI ile boyanmış etkilenmiş hücreler,
D) Yalnızca TUNEL ile boyanmış etkilenmiş hücreleri göstermektedir.

SHSY5Y hücrelerinin artışını % 50 durduran ilaç yoğunlukları VCR, DOXO, CIS, ETOP, CARBO için sırasıyla; 1.62, 27.58,4160, 3900 ve 1.1 nM olarak saptanmıştır. Aynı deney ortamlarında Kelly hücrelerinde sırasıyla 1.40, 28.57, 4600, 32000 ve 0.77 nM olarak bulunmuştur. Nöroblastoma hücrelerinin IC_{50} dozları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Apoptozu Farklı Mekanizmalarla Uyardığı Bilinen Kimyasallarla Etkilenen Nöroblastoma Hücrelerinin Doza Bağlı Yaşayabilirlikleri

Apoptoz üzerine etki yolları tanımlanmış olan kimyasallardan antienflamatuvar etkisi bilinen ve glukokortikoid reseptörlerini etkinleştirerek apoptoza yol açan deksametazon (DEX), Nükleik asid baskılayıcı aktinomisin D (ACD), topoizomeraz 1 baskılayıcı kamptotesin (CAMP), protein sentez baskılayıcı siklohekzimit (CYH), topoizomeraz II baskılayıcı etoposit (ETOP); uygulanan SHSY5Y ve Kelly hücrelerinin doza bağlı olarak artan hücre ölüm yanıtları olmuştur. SHSY5Y hücrelerinin artışını % 50 durduran ilaç yoğunlukları DEX, ETOP, CAMP, CYH, ACD için sırasıyla; 0.97, 4.9, 0.25, 2.90 ve 0.13 µM olarak saptanmıştır. Aynı deney ortamlarında Kelly hücrelerinde sırasıyla 2.11, 29.4, 0.53, 9.68 ve 0.40 µM olarak bulunmuştur.

Yüksek doz etkilerinde göze çarpan önemli bir özellik de SHSY5Y ile Kelly hücreleri arasındaki duyarlılık farkının belirli bir dozdan sonra tersine değişmesi olmuştur. ETOP için 44 µM, CAMP için 2.2 µM, CYH için 111 µM, ACD için 3.7 µM ve DEX için 11.1 µM ve daha yüksek yoğunluklarda SHSY5Y hücreleri, Kelly hücrelerinden hücresel ölüme daha dirençli ve bu değerlerden daha düşük dozlarda tersine SHSY5Y hücreleri Kelly hücrelerinden daha duyarlı bulunmuştur. Bu durum, literatürdeki ve bizim çalışmamızdaki apoptotik yanıt dozlarında da gözlediğimiz bir olgudur. İlgili kimyasalların nöroblastoma hücrelerindeki IC_{50} dozları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Sağaltım bileşenlerinin SHSY5Y ve Kelly hücrelerinindeki IC_{50} dozları

Sağaltım bileşenlerinin SHSY5Y ve Kelly hücrelerinindeki IC_{50} dozları*		
Etken	**Sitotoksik IC_{50} dozları (nM)**	
	SHSY5Y	**Kelly**
VCR	1.62	1.40
DOXO	27.58	28.57
CIS	4160	4600
ETOP (EBEWE)	3900	32000
CARBO	1.10	0.77

* Etkenlerin yoğunluğuna karşı yaşayan hücrelerin yüzdesi (% yaşayan hücre) olarak grafiklenen her bir değer en az üç ölçüm sonucunda türetilmiştir. Kontrol hücrelerine karşı, hücresel proliferasyonu % 50 durduran etken yoğunluğu (nM) sitotoksik (IC_{50}) dozu olarak kaydedilmiştir.

Tablo 2. Apoptotik kimyasal bileşenlerin SHSY5Y ve Kelly hücrelerinindeki IC_{50} dozları

Apoptotik kimyasal bileşenlerinin SHSY5Y ve Kelly hücrelerinindeki IC_{50} dozları*		
Etken	**Sitotoksik IC_{50} dozları (µM)**	
	SHSY5Y	**Kelly**
DEX	0.97	2.11
ETOP	4.9	29.4
CAMP	0.25	0.53
CHY	2.90	9.68
ACD	0.13	0.40

* Etkenlerin yoğunluğuna karşı yaşayan hücrelerin yüzdesi (% yaşayan hücre) olarak grafiklenen her bir değer en az üç ölçüm sonucunda türetilmiştir. Kontrol hücrelerine karşı, hücresel proliferasyonu % 50 durduran etken yoğunluğu (µM) sitotoksik (IC_{50}) dozu olarak kaydedilmiştir.

TARTIŞMA

Nöroblastoma çocukluk çağının en sık görülen ekstrakraniyal solid tümörüdür. Nöral krestten kaynaklanan bu tümörler biyolojik ve klinik olarak farklı özellik göstermektedirler. İyi prognostik özellik taşıyan grupta TrkA ekspresyonu, hiperdiploidi, iyi histoloji görülür; differansiyasyon ve apoptoza yatkındır. Kötü prognostik özellik gösteren grupta, MYCN amplifikasyonu, 1p delesyonu, TrkB ekspresyonu egemendir; metastaz ve kötü prognoz sıklıkla gözlenmektedir (10).

Nöroblastoma, doğal olarak spontan regresyona gidebilir. Bu süreçte diferansiyasyon ve/veya programlanmış hücre ölüm yolaklarının rolü olabileceği tartışılmaktadır (11, 12). Ancak kanserlerde görülen spontan regresyonların doğası henüz anlaşılamamıştır. Buna karşın nöroblastomada tanımlanan, büyüme faktörleri, retinoidler gibi mikroçevre bileşenlerinin, hücre yüzey reseptörlerinin kompozisyonunu değiştirerek (Trk A,B,C) hücrenin diferansiyasyon, apoptoz ya da proliferasyon yolaklarından birine geçişini düzenledikleri gösterilmiştir (13).

Bulgularımız, SHSY5Y hücrelerinin, NMYC sunumu nedeniyle kötü klinik gidiş beklenen Kelly hücrelerine göre VCR ve CARBO' ya daha az duyarlı olduğunu, buna karşın DOX, ETOP ve CIS'e karşı daha duyarlı olduklarını göstermiştir. Apoptoz yolağındaki etkileri tanımlanmış kimyasallardan DEX, ETOP, CAMP, ACD ve CYH'e karşı SHSY5Y hücreleri daha duyarlı bulunmuştur. Bu açıdan sağaltıma dirençli olgularda özellikle ETOP ve CYH etkisinde gözlenen farklılık açısında önemli bir hedef olarak görülmektedir.

Kullanılan ilaç ve kimyasallara, genetik özellikleri farklı hücrelerin tepkisi farklı bulunmuştur. Bu ilaç ve kimyasalların etki yolakları ve hücrelerin genetik özelliklerini araştıran çalışmalar daha etkin ve kişiye özel sağaltımların gerçekleşmesini sağlayabilir.

Nöroblastoma sağaltım modelinde, apoptotik yolak, etkili hedef molekülün (gen/protein) saptanması, etki mekanizmasının açıklanması ve sağaltımsal yeni hedeflerin belirlenmesinde katkı sağlayacaktır. Translasyonel çalışmalar için klinikte kullanılan sağaltımların *in vitro* modellerinin oluşturulması çok önemli katkılar sağlayabilir. Bu şekilde bilgiler klinikten laboratuvara ve yeniden kliniğe daha etkin dönebilir.

KAYNAKLAR

1. Kim TK. Chemical genomics and medicinal systems biology: chemical control of genomic Networks in human systems biology for innovative medicine. Journal Of Biochemistry And Molecular Biology 2004; 37 (1): 53-58.
2. Strausberg R and Schreiber S. From knowing to controlling: A path from genomics to drugs using small molecule probes. Science 2003; 300:294295.
3. Swedlow, J, Goldberg, I, Brauner, E, and Sorger P. Informatics and Quantitative Analysis in Biological Imaging. Science 2003; 300: 100-102.
4. Fic M, Podhorska-Okolow M, Dziegiel P, Gebarowska E, Wysocka T, Drag-Zalesinska M, Zabel M. Effect of melatonin on cytotoxicity of doxorubicin toward selected cell lines (human keratinocytes, lung cancer cell line A-549, laryngeal cancer cell line Hep-2). In Vivo, 2007; 21(3): 513-521.
5. Fassler C, Gill CI, Arrigoni E, Rowland I, Amado R. Fermentation of resistant starches: influence of in vitro models on colon carcinogenesis. Nutr Cancer. 2007;58(1):85-92.

6. Zhang Y, Chen W, Zhang J, Liu J, Chen G, Pope C. In vitro and in vivo toxicity of CdTe nanoparticles. J Nanosci Nanotechnol. 2007; 7(2): 497-503.
7. Stroncek DF, Jin P, Wang E, Jett B. Potency analysis of cellular therapies: the emerging role of molecular assays. J Transl Med. 2007;5: 24-24.
8. Celis JE. Cell Biology a Laboratory Handbook. First Ed. California: Academic Pres,1994: 680.
9. Olgun N, Kansoy S, Aksoylar S et al. Experience of the İzmir Pediatric Oncology Group on neuroblastoma IPOG-NBL92 Protocol. Pediatric Heamatology and Oncology 2003; 20 (3): 211-219.
10. Ho R, Eggert A, Hishiki T et al. Advances in brief resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas1. Cancer Research 2002; 62: 6462-6466.
11. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. Lancet. 2007; 369 (9579): 2106-2120.
12. Warnat P, Oberthuer A, Fischer M, Westermann F, Eils R, Brors B. Cross-study analysis of gene expression data for intermediate neuroblastoma identifies two biological subtypes. BMC Cancer. 2007; 7(1): 89-100.
13. Evans AE. Neuroblastoma: A historical perspective 18641998, In Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Vaute PA eds. Neuroblastoma. Amsterdam: Elsevier Science BV, 2000: 10-15.