

T.C.  
İstanbul Üniversitesi  
Onkoloji Enstitüsü  
Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı

**ÇOCUKLUK ÇAĞI RABDOMYOSARKOMLARINDA  
P-170 GLİKOPROTEİN VARLIĞI ve TEDAVİ  
YANITI ile İLİŞKİSİ**

Pediatrik Onkoloji  
Uzmanlık Tezi

Uzm.Dr. Sema Doğan Vural  
Tez Danışmanı: Doç.Dr. İnci Ayan

İstanbul-1996



## *İÇİNDEKİLER*

	SAYFA
GİRİŞ.....	1
GENELBİLGİLER.....	3
HASTALAR ve YÖNTEM.....	24
BULGULAR.....	32
TARTIŞMA.....	39
ÖZET.....	46
KAYNAKLAR.....	48

## GİRİŞ

Tanı yöntemleri, anestezi, radyoterapi tekniklerindeki gelişmeler ve kemoterapi ajanlarının yoğun olarak kullanılması ile günümüzde birçok kanser hastası tedavi edilebilmektedir. Ancak, bazı kanser türleri tedaviye yanıt vermemekte, bazen de başlangıçta yanıtı olan bir tümör daha sonra dirençli olabilmektedir(54). Antikanser ilaçlara klinik direnç, çocukluk çağı kanserlerinde de tedavi başarısızlığının başlıca nedenidir. Akut lenfoblastik lösemi (ALL)'li çocuklar tek ilaçla tedavi edildiklerinde yarından azında remisyona ulaşır ve remisyona sağlayan ilaçlar ile tedavinin sürdürülmesine rağmen hemen tümü nüks eder (2). Lösemi, malign lenfoma gibi hematolojik maligniteler kazanılmış ilaç direncinin iyi birer örneğidir. Kazanılmış dirençtekinin tersine, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, kolon kanseri gibi bazı tümörlerde hastalık başında kemoterapi ilaçlarına rölatif olarak bir duyarsızlık vardır. Bu durum intrensek ilaç direnci olarak adlandırılır. İlaç direncinden bir çok mekanizma sorumlu tutulmuş olup, birden fazla ilaca aynı anda gelişen direncin en iyi tanımlanmış şekli klasik çok ilaç direnci (MDR: Multi Drug Resistance) sistemidir. Burada doğal kaynaklı tek bir sitotoksik ilaç ile karşılaşan memeli hücrelerinin seçilmiş ajanlara direnç geliştirmesi söz konusudur. İnsanda MDR1 geni tarafından kodlanan ve P-170 gp olarak adlandırılan 170 kDa ağırlığındaki bir plazma membran glikoproteininin artmış ekspresyonu MDR'in major mekanizmasını oluşturur. P-gp ilaç "efflux" pompası olarak görev yaparak bazı kanser ilaçlarının hücre içinde birikimini önler ve bu ilaçları etkisiz kılar(19). Yüksek P-gp düzeyi, kanserli bir hastada MDR tümör hücrelerinin varlığını gösteren değerli bir belirleyici olabilir. Kemoterapi başarısızlığının tek nedeni P-gp ekspresyonu olmasa da, bu konu kanser tedavisine yeni bir boyut getirebilir. P-gp ekspresyonunun hangi kanser türlerinde tedaviyi engellediğinin bilinmesi, klinik uygulamada direnç kırıcı ilaçların veya değişik tedavilerin kullanımını gündeme getirecektir.

Bu çalışmada çocukluk ağı rabdomyosarkomlarında tedavi ncesi P-gp varlığı (primer direnç) araştırılmış ve P-gp'in tedavi yanıtı ve sağ kalıma etkisi incelenmiştir.

## *GENEL BİLGİLER*

Kemoterapinin başarısız olmasına bir çok faktör katkıda bulunabilir. Verilen ilacın emilimi, dağılımı, metabolizması ve eliminasyonu başarılı bir kanser kemoterapisinin temel taşlarındandır. Bu farmakokinetik ve farmakodinamik faktörler ilacın kanser hücresine ulaşip ulaşmadığını belirler ve ilacın dozu, verilme şekli gibi bazı özelliklere dışarıdan müdahale edilebilir. Bu nedenle bu faktörlere bağlı direnç, geçici direnç olarak adlandırılır (19).

Son zamanlarda elde edilen kanıtlar, ilaç direnci şekillerinin çoğunun gelişiminde genetik bir temel olduğunu düşündürmektedir. Tümör hücrelerinin herediter genetik instabilitesi, mutasyon, delesyon, gen amplifikasyonu, translokasyon veya kromozomal yeniden düzenlenme sonucu ilaca dirençli genler gelişir(2). İlaç direncinin moleküler temeli anlaşıldıkça ilaca dirençli hastalar için yeni tedavi şekilleri oluşturulabilecektir.

Tümörün ilaca dirençli olmasına neden olan çeşitli biyokimyasal mekanizmalar vardır. İlacın taşınmasında veya tutulmasında bozukluk, ilaç metabolizmasındaki değişiklikler, hedef enzimlerin spesifitesindeki değişiklikler, alternatif biyokimyasal yollar, DNA onarımında artma ve gen amplifikasyonu bunlardan bazılarıdır(32).

Günümüzde pek çok çalışmaya konu olan ilaç dirençlerinden birisi de pleotropik ilaç direnci olup, birden çok ilaca karşı eş zamanlı olarak gelişen direnç olarak tanımlanır. Mekanizmaları:(32)

1) Glutasyon Sistemi: Bazı kemoterapi ilaçları glutatyon konjugasyon ile detoksifiye edilebilirler. Bu reaksiyonları glutatyon transferaz sistemi katalize eder. Bu sistemdeki değişiklikler alkilleyiciler, antrasiklinler ve sisplatine direnci etkileyebilir.

2) Atipik çok ilaç direnci (Multi drug resistance MDR): Topoizomeraz II enzimini kullanarak DNA hasarı oluşturarak sitotoksik etki gösteren ilaçlara karşı tanımlanan bir direnç mekanizmasıdır. Bu sistem ile hücreler antrasiklin ve epidofilotoksinlere direnç kazanırken, vinka alkaloidlerine dirençli olmazlar. Topoizomeraz II düzeyinde veya işlevindeki değişikliklerin bu tür sitotoksiklere dirençte rol oynadığı düşünülmektedir.

3) Düzenlenmiş direnç mekanizmaları: Sitotoksik bir ilaç ile karşılaşan hücreler birden fazla direnç mekanizmasını koordine olarak aktive edebilirler.

4) Çok sayıda somatik mutasyon: Bağımsız somatik mutasyonların oluşması, farklı ilaçlara karşı farklı direnç mekanizmaları gelişmesine neden olabilir.

5) Klasik MDR: Pleotropik ilaç direncinin en iyi tanımlanmış şeklidir. Doğal kaynaklı tek bir sitotoksik ilaç ile karşılaşan memeli hücreleri, seçilmiş ajanlara direnç geliştirebilirler. Bu fenomen MDR olarak adlandırılır. MDR tipi ilaçlar yapısal ve işlevsel olarak farklı lipofilik ajanlardır. Aralarındaki tek benzerlik, genellikle mantar veya bitkiler tarafından üretilen lipofilik bileşikler olmalarıdır. Ancak, mitoksantron gibi sentetik bileşimler ve trimetrekstat gibi bazı antimetabolitler de bu gruba dahil olabilirler(19). Tablo 1'de MDR tipi ilaçların listesi verilmiştir:

**Tablo 1. MDR dan etkilenen ilaçlar (19,40)**

<b>Antitümör antibiyotikler</b>	<b>Taksonlar</b>
Antrasiklinler	Taksol
Daunorubisin	Takster
Doksorubisin	<b>Bitki alkaloidleri</b>
İdarubisin	Vinka alkaloidleri
Aktinomisin-D	Vinkristin
Mitomisin	Vinblastin
Mitramisin	Navelbin
<b>Mitoksantron</b>	Podofilotoksinler
<b>Trimetrekstat</b>	Etoposid
	Teniposid

MDR sistemi platin bileşikler, antimetabolitler, alkilleyiciler ve bleomisin direncinde rol oynamaz (66).

### *MDR'da Temel Özellikler*

**Çapraz Direnç:** 1960' ların sonlarında fare lösemilerinde iki veya üç farklı doğal ürüne çapraz direnç gösterildi. Ayrıca, vinka alkaloidlerine dirençli hücrelerde daktinomisin birikiminin azalması, seçilmiş ilaçlara karşı direnç modelini düşündürdü. 1970 'lerde Biedler ve Riehm daktinomisin ve daunomisine dirençli Çin hamster akciğer hücrelerinde, yapısal ve biyokimyasal olarak farklı diğer doğal ilaçlara karşı çapraz doğal direnç tanımladılar. Radyootografik çalışmalarda ilacın hücre içine alınmasında azalma saptandı. Bu bulgu hem direnç hem de çapraz dirence yol açan bir mekanizma olarak yorumlandı ve plazma membranındaki bir değişime bağlı olarak geçirgenliğin arttığı düşünüldü. Çapraz direnç, membran geçirgenliğinde değişiklik gibi benzer bulgular, kolşisine dirençli Çin hamster over hücrelerinde de gösterildi(5).

Bu öncü çalışmaların sonuçlarını izleyen birçok çalışma ile kemiricilerde ve in vitro insan hücre sisteminde direnç ve çapraz direncin varlığı gösterildi, özellikleri belirlendi. Genellikle seçilmiş ajana karşı gelişen direnç düzeyi , diğer ajanlara olan çapraz dirençten daha yüksektir. Bununla birlikte, bazen tersi de olabilir. Bu umulmadık olayın altında çeşitli faktörler yatabilir(58).

**İlacın Taşınması:** MDR nin ikinci önemli özelliği ,enerjiye bağımlı ilaç "efflux"unda artma ile birlikte ilaç birikiminde olan azalmadır. İlk çalışmalarda , göreceli olarak yüksek molekül ağırlıklı ksenobiyotik ajanlara karşı gelişen bu direncin, hücre membran düzeyindeki ilaç taşınması ile ilgili değişikliklere bağlı olduğu düşünüldü. 1963'de HeLa hücrelerinde daktinomisinin hücreye alınmasında azalma olduğu gösterildi ve bu ajana karşı membran geçirgenliğinde bir değişiklik olduğu düşünüldü(30). Çin hamster hücrelerindeki değişik MDR çalışmaları da benzer yorumlar getirdi. Bununla birlikte, fare lösemi hücrelerindeki direnç, ilaç birikimindeki



bozulmaya bağlandı. Daunomisine dirençli Erlich asit tümör hücrelerinden elde edilen bilgiler ilacın dışarıya aktif olarak taşınmasının, daunomisinin hücreye alınmasındaki azalmayı açıklayabileceğini gösterdi. Böylece P-glikoprotein varlığından haberdar olunmaksızın ilaç "efflux" pompa varlığı düşünüldü(5).

*P-Glikoprotein:* 1976 yılında Victor Ling ve arkadaşları kolşisine dirençli Çin hamster over hücrelerinde yüksek molekül ağırlıklı bir plazma membran glikoproteini buldular ve direnç düzeyinin protein ekspresyonu ile ilişkili olduğunu gösterdiler. Membran geçirgenliğindeki rolü nedeniyle P glikoprotein (Permeability glycoprotein) adı verilen bu protein, MDR sisteminin üçüncü önemli bölümüdür. P glikoprotein (P-gp)'in membran glikoprotein özelliği, diğer MDR Çin hamster çalışmaları ile desteklenmiştir. Bu gözlemler insan hücrelerine de uzandı ve vinblastine dirençli lösemi dizilerinde 170-190 kilodaltonluk membran glikoproteini bulundu. Bunu izleyerek MDR insan ve kemirici hücre dizilerinde yüksek P-gp düzeyi belirlendi. Bu çalışmalarla MDR genetiği, biyokimyası ve moleküler biyolojisi hakkında yeni bilgiler sağlandı (5).

### *MDR Moleküler Genetiği*

*Gen amplifikasyon sitogenetiği:* Kompleks MDR fenotipinin gen analizleri ile açıklanabileceğine ilişkin ilk ipuçları, gen amplifikasyonlarıyla birlikte olan sitogenetik anomalilerin gözlenmesi ile elde edilmiştir. Bu kromozomal-sitogenetik anomaliler, mikroskopik olarak saptanabilen aberan kromozomal yapılarıdır. Bunlar; HSR (Homogeneous staining region), ABRs (Abnormally banding regions) veya küçük, çift, ekstrakromozomal kromatin cisimcikleri (DM:Double minutes)dir. HSR ve ABR ilk olarak dihidrofolat redüktaz (DHFR) geninin amplifiye olduğu antifolat-rezistant hücrelerde ve N-myc gen amplifikasyonu gösteren nöroblastom hücrelerinde gösterilmiştir. Metotreksata (MTX) dirençli fare hücrelerinde de DHFR'ı kodlayan genler için sinyal amplifikasyonuna rastlanmıştır. Yüksek düzeyde MDR gösteren hücre kültürlerinde bu tip kromozom yapı değişikliklerinin tanımlanması, MDR'de gen amplifikasyonlarının varlığının moleküler yaklaşımlarla araştırılmasına yol açmıştır(5).

Yüksek MDR'a sahip Çin hamster hücreleri ilacın uzaklaştırıldığı ortamda düşük düzeyde P-gp gen amplifikasyonu ve bu amplifikasyon düzeyi ile uyumsuz düzeyde yüksek spesifik mRNA ve direnç kaybı gösterirler. Bununla birlikte, son dönemlerde insan tümörlerinde MDR ile ilişkili olarak gen amplifikasyonuna ait ne sitogenetik, ne de moleküler düzeyde kanıta rastlanmamıştır (5).

*Moleküler çalışmalar:* MDR'deki gen amplifikasyonunun sitogenetik kanıtı, amplifiye sekansların izolasyonu ve tanımlanması ile sağlandı. Kullanılan çeşitli yöntemler ile spesifik DNA sekanslarının amplifiye olduğunu ve amplifiye genlerin P-glikoproteini kodladığı kanıtlandı (63,5)

*P-Glikoprotein gen ailesi:* Rölatif olarak nonspesifik genomik veya tamamlayıcı DNA problemleri ile yapılan ilk çalışmalar P-gp'i kodlayan birden fazla gen olduğunu düşündürdü. Sonraki çalışmalarda küçük bir gen ailesinin varlığı gösterildi. İnsanlarda varlığı gösterilen MDR1 ve MDR2/3 arasında yapısal benzerlik olmasına karşın, işlevsel farklılıkları olduğu düşünülmekte ve ilaç direncinde MDR1'in daha etkin rol oynadığı sanılmaktadır (44,68).

*Amplifiye MDR genlerinin kromozomal organizasyonu:* Gen haritalama çalışmaları her iki insan MDR geninin kromozom 7q21.1'de bulunduğunu göstermiştir(5).

### ***P-glikoprotein Yapısı ve İşlevleri***

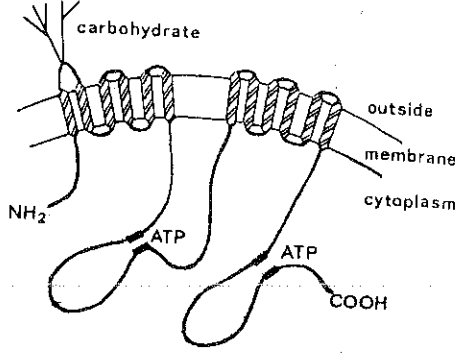
*Biyokimyasal ve işlevsel özellikler:* P-gp moleküllerinin farklı epitoplarını tanıyan monoklonal antikolar kullanılarak, bu proteinin biyokimyasal özelliklerini ve işlevini araştıran çalışmalar yapıldı(39,5). Primer gen ürününün en az 140kD moleküler ağırlıkta olup, daha sonra glikolizasyon ve fosforilizasyon ile daha büyük moleküler hacime ulaştığı gösterildi. Dışta yerleşmiş olan karbohidrat bölümünün ilaçların tanınması veya taşınmasına katılmadığı, fosforilizasyonun ise taşıyıcı

moleküllerin biyolojik aktivitesinde önemli bir rol oynadığı düşünülür. Dirençli hücrelerde monoklonal antikolar ile ayrılan iki P-gp'in bulunması, P-gp'in translasyon sonrası değişiminin diğer bir göstergesidir. Dış epitopu bağladığı düşünülen HYB-241 antikoru 180kD'luk örneği (P-180) tanır. Bu, genellikle ilaca duyarlı hücrelerde bulunur ve hepsinde olmasa da vinka alkaloidleri veya daktinomisin için seçilmiş insan hücre alt gruplarının bazısında artmış miktardadır. C219 antikoru ise, Çin hamster gen ürünlerinin tümünde ve insan MDR1 ile MDR2/3 gen ürünündeki yüksek oranda korunmuş iç epitopu bağlar ve P-180'e ek olarak 170kD'luk bir proteini (P-170) de tanır. P-170 genellikle ilaca duyarlı hücrelerde saptanmaz ve direnç gelişimi sırasında eksprese edilir. Araştırmaların başka bir kolunda da pürifiye P-gp'in ATPaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu, proteinin varsayılan ATP bağlayıcı kapasitesi ile uyumludur(5).

*İlaç efflux modeli:* İnsan, Çin hamster ve fare P-gp genlerinin nükleotidlerinin ve aminoasit dizilerinin analizi ile bu proteinin yapısı ve işlevi hakkında bilgi sağlanmıştır(5). P-gp, 170 kD'luk bir transmembran proteini olup 1280 aminoasitten oluşur. Birbirine benzer iki bölüm içerir. Proteinin her bir yarısında kısa hidrofilik amino-terminal segment, üç tane transmembran halka oluşturan altı membran kateden hidrofobik bölüm ile ATP bağlanması ve hidrolizden sorumlu olan nükleotid bağlayıcı bölgeler bulunur.(Şekil 1) Molekülün aminoterminalinin yanındaki ilk dış halkada potansiyel glikolizasyon alanları vardır. P-gp moleküllerindeki transmembranöz alanların kanal benzeri yapılar oluşturduğu ve diffüzyon ile hücreye giren ilaçların enerji kullanarak bu kanallardan dışarıya taşındıkları kabul edilir(40). Pürifiye P-gp ATPaz aktivitesine sahiptir ve ilaç birikiminde azalma dirençli hücrelerin değişmez bulgusudur. Radyoaktif işaretleme(37,44) veya floresan boyaması ile yapılan ilaç "up take" ve eliminasyon çalışmalarında P-gp'in pompa işlevi saptandı(44). Bütün bunlar P-gp sisteminin değişik ilaçlar için geniş spesifiklik gösteren, enerjiye bağımlı bir ilaç efflux pompası ve multidrug taşıyıcısı olarak çalıştığını gösterir(40). P-gp pompasının aktivasyonu toksik bileşiklerin hücre içinde birikimini azaltarak antitümör etkinin kaybolmasına neden olur. Ek olarak MDR hücrelere ilaç girişinin de azaldığı

gösterilmiş. Bu durum, P-gp'in ilaçları doğrudan plazma membranından alarak da çalışabileceğini düşündürmüştür(64,44).

**Şekil 1. P-gp modeli**



**Diğer Taşıyıcılar ile Benzerlik:** Pgp değişik bakteriyel taşıyıcılar ile benzerlik gösterir. Bunlar iyonlar, aminoasitler, peptitler veya şekerler gibi küçük moleküllerin hücreye alınması ile ilişkilidir (5).

#### **P-glikoproteininin MDR deki rolü**

İn vitro çalışmalarda MDR ile P-gp arasında anlamlı bir ilişki olduğuna dair kanıtlar elde edildi(21). P-gp cDNA'sının klonlanması ile daha sonra yapılan genetik analizler, MDR fenotipinin temel özelliklerinin nedeninin P-gp olduğunu gösterdi. Bu görüşü destekleyen bulgular tablo 2'de özetlenmiştir.

**Tablo 2. P-gp ve MDR ilişkisinin kanıtları(45)**

1. MDR hücrelerinde P-gp artmıştır. Ekspresyon miktarı ilaç direnci düzeyi ile ilişkilidir.
2. MDR hücre dizilerinde P-gp genleri sıklıkla amplifiye olmuştur.
3. P-gp genleri ve cDNA transfeksiyonu, P-gp ekspresyonunda artışa ve alıcı hücrede MDR' a neden olur.
4. Farklı P-gp veya mutant cDNA transfeksiyonu, farklı MDR fenotiplerinin ekspresyonu ile sonuçlanır.
5. P-gp enerjiye bağımlı membran taşıyıcı proteinlerinin yapısal özelliklerini taşır.
6. MDR fenotipindeki bir grup ilaç P-gp bağlar.

### *Normal İnsan Dokularında P-gp Ekspresyonu*

Çeşitli insan dokularında P gp ekspresyonunu aramak amacı ile çalışmalar yapılmıştır (13,73,26). İnsanlar arasındaki farklılık ve organ veya tümör içindeki heterojenite, verilerin değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. En yüksek düzeyler adrenal korteks, böbrek (proksimal tubulus), mide, duodenum, kolon ve plasentadır(40). Tablo 3'de çeşitli insan dokularındaki P gp ekspresyonu gösterilmiştir.

*Tablo 3 . İnsan dokularında P gp düzeyi(40)*

<i>Yüksek Düzey</i>	<i>Orta Düzey</i>	<i>Düşük Düzey/ Ekspresyon Yok</i>
Adrenal	Meme	Beyin
	Akciğer	Ösafagus
	GIS	Genital Sistem
	Mide	Over
	İnce Barsak	Testis
	Kolon	Lenfatik Sistem
	Rektum	Tonsil
	Karaciğer	Dalak
	Pankreas	Timus
	GÜS	Kemik İliği
	Böbrek	Kas
	Prostat	Kalp Kası
	Seminal Kese	Düz Kas
	Mesana	İskelet Kası
	Üreter	Deri
	Uterus	
	Plasenta	

P-gp'in dokuların lümen yüzeylerinde (kolon epitel hücrelerinin lüminal membranları, hepatosit membranlarının safra kanaliküler bölümleri, adrenal korteks ve medullanın yüzey hücreleri) yerleşimi, bu proteinin normal dokularda sekretuar işlevi olduğunu düşündürür (40). Merkezi sinir sistemi endotel hücrelerinde ve testislerde P-gp pozitifliği, kan-beyin ve kan- testis bariyeri ile ilişki kurulmasına neden olur(66,14).

Erken dönemdeki çalışmalarda kemik iliği ve periferik kanda yalnız düşük düzeylerde P-gp bulundu(44,26) veya hiç saptanmadı (50). Bununla birlikte, duyarlılığı yüksek teknikler kullanılarak normal kemik iliği ve kan hücrelerinin önemli bir bölümünde P-gp saptanabilir (12). P-gp'in kemik iliği kök hücrelerini toksik hasardan korumadaki olası rolü üstünde durulmaktadır (44).

### *İnsan Tümörlerinde P gp Ekspresyonu*

**Hematolojik Tümörler:** Hematolojik tümörlerin büyük bir bölümü ilk tanı aldıklarında kemoterapi ilaçlarının çoğuna duyarlıdır. Ancak, nüks sonrası tedavi yanıtının kötü olması MDR ile ilgili çalışmalara neden olmuştur(19).

**Akut lenfoblastik lösemi(ALL):** Tanı sırasında ALL blastlarda P-gp ekspresyonu sık değildir. Çeşitli çalışmalarda pozitiflik oranı %0-35 arasında bildirilmiştir (29,34,43,55). Bununla birlikte, özellikle erişkin nüks ALL vakalarında yaklaşık %50 oranında pozitifleşme saptanan çalışmalar vardır (19).

**Akut myeloblastik lösemi(AML):** AML'de MDR ekspresyonunu bildiren ilk yayınlardan(7,48) sonra yapılan çalışmaların çoğunda P-gp pozitifliğinin yanıtı olumsuz yönde etkilediği saptandı(61,49,6).

**Kronik lösemiler:** Kronik lenfositik lösemi (KLL) ve kronik myeloid lösemide (KML) %50-100 arasında P-gp pozitifliği bildirildi(19). KML'de MDR1 ekspresyonunun genellikle hastalığın terminal dönemindeki blastlara sınırlı olduğu(44,49) ve ekspresyonun kemoterapiye kötü yanıt ile birlikte olduğu bildirildi(42).

**Malign Lenfomalar:** Yeni tanı almış veya tedavi edilmemiş hastalarda nadiren P-gp ekspresyonu vardır. Nükste veya ilaca dirençli hastalarda P-gp artışı saptanabilir. P-gp, direnci açıklayan tek mekanizma olmasa da, diğer klinik ve patolojik

parametrelerle birlikte prognostik bir parametre olarak kullanılabilir gibi durmaktadır(19).

Multipl myelom: Çalışmaların çoğu, P-gp'in ilaç direnci ile ilgili olduğunu belirtir (20,23,19,33). Bu bulgular, kemosenstizer ilaçlar ile yapılan çalışmalarla da desteklenmiştir (59,67). Ancak tersini belirten bir çalışma da vardır(16). P-gp'den farklı mekanizmalar da MDR'da etkili olabilir (44).

Solid Tümörler: İnsan tümörlerindeki ilk çalışma 1985 yılında Bell ve arkadaşları tarafından over kanserinde yapıldı (4). Bu tarihten sonra solid tümörlerdeki MDR sıklığını belirlemek için değişik tümörlerde değişik yöntemler ile çeşitli çalışmalar yapılmış olup, en büyük seri Goldstein ve arkadaşlarına aittir. Bu çalışmada slot blot analizi ile 400 hastada MDR1 mRNA ekspresyonu arandı ve hastalar ekspresyon düzeyine göre gruplara ayrıldı (Tablo 4). Sonuç beklendiği gibi idi. Normalde yüksek düzeyde ekspresyon gösterdiği bilinen hücrelerden kaynaklanan tümörlerde sıklık daha fazla bulundu. Bunlardan en çok görülenler, tedavi edilmemiş kolon, böbrek kanseri, hepatom, adrenal kortikal karsinom, feokromasitom, pankreas adacık hücreli tümör ve karsinoid tümörlerdi (19).

Kolon kanseri: Bir çalışmada tümörlerin %67'sinde P-gp ekspresyonu saptanıp, ekspresyonun tümör agresifliği ile ilişkili olabileceğini düşünüldü (76).

Meme Kanseri: Ekspresyon düzeyi rölatif olarak düşük bulundu (19). Ancak, lokal ileri hastalıkta yapılan iki çalışmada hastalarda sık P-gp ekspresyonu ve bunun kemoterapiye kötü yanıt ile ilgisi olduğunu bildirildi (19,57).

Akciğer kanseri: Düşük düzeyde ve %0-60 oranında saptanan MDR1 gen ekspresyonunun klinik önemi tam olarak belirlenmemiştir (22,62).

Retinoblastom: Hücre dizilerinde saptanan MDR fenotipi, hücre dizilerinde ve tümörlerin kendisinde P-gp artışı ile korele bulundu (10,11).

Nöroblastom: Hem in vivo, hem de in vitro olarak MDR1 artışı gösterildi. Bazı çalışmalarda P-gp veya mRNA düzeyi, tedavi edilmemiş vakalarda(3,11), bazılarında ise tedavi edilmişlerde(8,11,31) yüksek bulundu. Ekspresyonunun kötü prognostik faktör olduğunu (8,11) gösteren çalışmaların yanında, prognozu olumlu yönde etkilediğini(11,3) ya da tedavi sonucunu belirlemede rolü olmadığını(24,53) bildiren çalışmalar da vardır.

Sarkomlar: Çeşitli sarkom tiplerinde değişik çalışmalar yapılmıştır. Kemik sarkomlarında yapılan çalışma sayısı fazla değildir. Ewing sarkomlu hastadalardaki çalışmalarda, P-gp ekspresyonunun tedavi başarısında önemli olduğu düşünüldü. Ancak, sayı yetersiz olduğu için pozitif ve negatif grup arasında istatistiksel fark bulunmadı(72,36). Osteosarkomlardaki az sayıda çalışmada, %23-90 oranında pozitiflik bildirildi ve pozitifliğin prognostik bir gösterge olabileceği düşünüldü (65,69).

Kemik ve yumuşak doku sarkomlarının birlikte ele alındığı çalışmalarda, MDR'in sarkomlarda önemli olabileceği, ancak ilaç direncini tek başına açıklayamayacağı sonucuna varıldı(28,74).

P-gp'in prognostik önemi ile ilgili belki de en önemli çalışmalar çocukluk çağı rabdomyosarkomları ve diferansiye edilmemiş sarkomlarda yapıldı. Çalışmaların birinde ileri hastalıkta pozitiflik daha fazla idi ve sağkalımı olumsuz yönde etkiledi (9). Diğer bir çalışmada ise P-gp pozitifliği ile sağ kalım ilişkili bulunmadı (41).



*Tablo 4. Tedavi edilmemiş solid tümörlerde MDR1 ekspresyonu (19)*

<i>Tümör cinsi</i>	<i>Örnek sayısı</i>	<i>Pozitiflikyüzdesi</i>
<i>Orta-yüksek ekspresyon gösteren tümörler</i>		
Kolon	41	85
Böbrek	50	80
Hepatoma	12	100
Adrenokortikal karsinom	9	77
Feokromasitoma	20	75
Adacık hücreli tm	4	50
Karsinoid	9	77
<i>Düşük ekspresyon gösteren tümörler</i>		
Meme	57	15
Mesane	6	16
Ösafageal	14	0
Gastrik	2	0
Baş ve boyun	14	0
Melanoma	3	0
Ovaryan	16	0
Prostat	3	0
Tiroid	4	0
Wilms' tümörü	20	0

#### *Klinik Örneklerde MDR'in Değerlendirilmesi*

#### *Değerlendirmeyi etkileyen faktörler(11):*

1) P-gp düzeyi ve MDR1 mRNA transkripsiyonu genellikle MDR derecesi ile uyumlu olsa da, mRNA düzeyi artmadan tümör hücrelerinde aşırı protein ekspresyonu gözlenebilir. Ya da, eksprese edilen protein translasyon sonrası olaylar ile değişebilir. Benzer olaylar in vivo da olabilir.

2) Özellikle solid tümör ve lösemilerde P-gp ekspresyonu hücreden hücreye değişkenlik gösterebilir.

3) Epitel kökenli tümörlerde, duyarlılığı az olan yöntemlerle bile belirlenebilen yüksek P-gp düzeyi vardır. Ancak, mezenkimal ve embriyonal kökenli çocuk tümörlerinde MDR1 ekspresyonu genellikle düşüktür ve başlangıçta pozitif hücre sayısı azdır. Bu nedenle duyarlılığı yüksek yöntemler kullanılmalıdır.

4) Tümör içindeki ve kemik iliğindeki lenfosit, granülosit ve CD34+ hematopoetik kök hücreler ile kan damarlarındaki endotel hücreleri gibi bazı normal hücreler, göreceli olarak yüksek MDR1 eksprese ederler. Bu da P-gp ölçümünde karışıklığa neden olabilir. Bu nedenle klinik örneklerde MDR1 ekspresyonunu saptayacak bir yöntem:

a) Düşük düzeydeki MDR'ını saptamak için duyarlı ve özgün olmalıdır. Çünkü bu düzeyler bile kemoterapi yanıtı ile ilgili olabilir.

b) Hücreler arasında olabilecek farklılığı değerlendirebilmelidir.

c) Tümör hücresi ile normal hücreyi ayırabilmelidir.

d) Tedavi sırasında alınacak küçük biyopsilerde çalışılabilir.

**MDR saptama yöntemleri:** Bu amaç için kullanılan yöntemler tablo 5'de gösterilmiştir.

**Tablo 5. MDR saptama yöntemleri (19)**

1) MDR gen amplifikasyonu için DNA analizi (Southern blot)
2) RNA analizi
Northern blot (NB)
Slot-blot (SB)
RNase protection assay
In situ hibridizasyon (ISH)
Polymerase change reaction (PCR)
3) Protein analizleri
Western blot (WB)
İmmunohistokimya (IHC)
Flow cytometry

MDR1 geninin amplifikasyonu tümör hücre dizilerinde gösterilmişse de, klinikte gen amplifikasyonu sık değildir ve MDR1 geninin aşırı ekspresyonu genellikle

gen amplifikasyonu ile birlikte olmaz. Araştırmacıların çoğu, MDR1 gen ürünü olan P-gp'i saptamaya yönelmişlerdir. Klinik ilaç direncinde P-gp'in rolünü değerlendirmek için MDR1 geni için spesifik ve çok az doku örneğinde çalışabilecek kadar duyarlı bir yöntem gereklidir (19).

İnsan tümör örneklerinde MDR1'in rolünü araştıran ilk çalışmalarda, büyük tümör dokularının biyokimyasal analizleri kullanıldı. Bell ve arkadaşları(4) ilk kez over kanserinde immunoblot analiz ile P-gp varlığını bildirdiler. Gerlach ve arkadaşları(28) benzer bir teknik ile sarkomlu hastalarda P-gp aradılar. Fojo ve arkadaşları(26), daha sonra da Goldstein ve arkadaşları tümör dokusundan total RNA'yı ekstrakte ederek ve gen spesifik problar ile kullanarak çeşitli tümörlerde başarıyla MDR1 RNA ölçümü yaptılar. Bu ilk alışmalar MDR1 spesifik olarak yorumlanmışsa da, yeterince duyarlı değildi ve normal-neoplastik doku ayırımını yapamıyordu(19).

Normal doku ve tümör dokusundaki MDR1 ekspresyonunu ayırmak için yöntemler geliştirildi. Doku kesitlerinde nükleik asit probları ile in situ hibridizasyon tekniği, tümör hücrelerindeki MDR mRNA'nın saptanmasını sağlar. Ancak, bu teknik oldukça zahmetlidir ve yorum güçlüğü olabilir. Buradaki güçlükler, araştırmaları monoklonal antikorlar ile immunhistokimyasal yöntemlere yöneltti (19).

İmmunohistokimyasal yöntemler(IHC): Klinik materyalde P-gp ölçümü için farklı duyarlılıkta IHC kullanılmıştır. Klinik örneklerde P-gp'in IHC ile saptanması, pratik uygulama kolaylığı nedeniyle ümit vericidir. Bu yöntemin primer avantajı, tek hücrede P-gp varlığını gösterebilmesi, bu sayede de küçük parçalarda çalışılabilmesi ve normal doku ile tümör dokusu arasında P-gp ayırımını yapabilmesidir(19).

Genellikle daha az duyarlı indirekt immunoperoksidaz, indirekt immunoalkalin fosfataz ile daha duyarlı peroksidaz-antiperoksidaz, alkalinfosfataz-antialkalin fosfataz ve avidin-biyotin immunoperoksidaz teknikleri ile hücre dizileri, normal insan epitel dokuları, kolon ve meme karsinomunda orta/yüksek düzeyde eksprese edilen P-gp kolaylıkla saptanabilir(11). Bununla birlikte, bu yöntemler MDR1 gen amplifikasyonu

göstermeyen hücre dizilerindeki veya çoğu çocukluk çağı tümöründeki düşük P-gp ekspresyonunu saptamakta yeterince duyarlı değildir (8,10,24,53).

P-gp'i saptamak için kullanılan antikorlar: Bu amaç için kullanılan çeşitli antikorlar vardır. Victor Ling ve arkadaşlarının geliştirdiği C219 monoklonal antikor ilk çıkan antikorlar arasındadır. Bu antikor immunoblot analizde ve IHC de kullanılır. Antikorum hücre içine girebilmesi için hücrelerin fikse edilmesi gerekmektedir. Bu antikorla ilgili spesifite sorunu da vardır. Çünkü antikor, P-gp'in MDR1 ve MDR3 izoformlarını tanır. C219 ile çizgili kas arasında çapraz reaksiyon gözlenmiştir (19).

C494 antikor MDR1 için spesifik olup MDR3 ile çapraz reaksiyon vermez. Bu antikor da sitoplazma içindeki bir epitopu tanır ve boyama öncesi fiksasyon gerektirir. Diğer bir monoklonal antikor olan JSB-1, sitoplazmada yüksek oranda birikmiş olan bir epitopu tanır. Bu epitop, C219'un tanıdığından farklıdır (6-24). C494 gibi JSB-1 de MDR1 P-gp için spesifiktir (19).

Tsuro ve arkadaşları MDR1'e yüksek afinitesi olan MRK-16 monoklonal antikorunu geliştirdiler. Diğerlerinden farklı olarak bu antikor, canlı hücrelerin plazma membranının dış yüzeyindeki bir dış epitopu tanır. Kullanım öncesi fiksasyon gerektirmez. Bu özellikler, canlı hücrelerde P-gp'i saptamada flow cytometry kullanımını sağlar. Daha yeni geliştirilen iki antikor HYB-241 ve HYB-612, MDR'nin dış epitoplarını tanır. Fakat bu tanıyış 180kD P-gp'e sınırlıdır. 170kD şeklini tanımaz. Bu özelliğin klinik kullanıma etkisi bilinmemektedir (19).

MDR'ı araştırmada kullanılan çok sayıda teknik, tümör tipine göre değişik sonuçlar verebilir. Araştırmacılar her bir yöntemin iyi ve zayıf yönlerini bilmelidir. IHC ve PCR gibi yöntemlerin birlikte kullanımı ile daha iyi sonuçlar alınabilir.

### *MDR'in Geri Döndürülmesi*

P-gp, MDR tipi kemoterapi ajanlarının yanısıra, düşük toksisiteli çok sayıda bileşiği de taşır(Tablo 6). Bu nedenle bu tür bileşikler, hücre dışına taşınmakta kemoterapi ilaçları ile yarışmaya girebilirler(44).

*Tablo 6. Çoklu ilaç taşıyıcıları ile ilgili maddeler (44)*

<b>Kemoterapi ilaçları (Tablo 1)</b>			
<b>Diğer toksik bileşikler</b>			
Kolşisin	Etidiyum bromid		
Emetin	Puromisin		
<b>Siklik veya lineer peptitler</b>			
Gramisidin	N-asetil-lösil-lösil-norlösin		
Valinomisin			
<b>Steroid hormonlar</b>			
Kortizon	Megesterol	Tamoksifen	Tromifin
Aldesteron	Progesteron	Deksametazon	
<b>Kalsiyum antagonistleri</b>			
Verapamil	Diltizem	Niguldipin	Nifedipin
R-Verapamil	Azidopin	Nikardipin	Bepridil
<b>Diğer kardiyovasküler ilaçlar</b>			
Kinidin			
Amiodaron			
<b>İmmunosupresifler</b>			
Siklosporin	SDZ PSC-883		
Rapamisin	FK506		
<b>Antibiyotikler ve antifungal ilaçlar</b>			
Sefaperazon	Seftriakson		
Eritromisin	Ketokonazol		
<b>Kalmolidin inhibitörleri</b>			
Flufenazin	Trifluperazin		
Flupentiksol			
<b>Antidepresanlar</b>			
Tiyoperidon			
<b>Antimalaryal ajanlar</b>			
Kinin	Kinakrin		

Kemosensitizerler in vitro ve hayvan deneylerinde kullanıldıklarında, hücre içi ilaç birikimini artırarak, dirençli tümör hücrelerinde antikanser ilaçların sitotoksik potansiyelini düzeltirler(11). Truso ve arkadaşlarının 1981 yılında, ilaç direncinin verapamil ile yenilebileceğini bildirmesi üzerine araştırmalar kemosenstizer ilaçların

belirlenmesi üzerine yoğunlaştı . Yapılan klinik çalışmalarda kemosenstizerlerin kemoterapiye katkısının yanısıra, bu ajanların intrensek olarak toksik olup olmadıkları ve kemoterapiye bağlı yan etkileri artırıp arttırmadıkları araştırılmaktadır (44,46,60,27,47,77,38).

*Yeni yaklaşımlar:* MDR'ı yenmek için diğer bir yaklaşım, ilaçların hazırlanış şeklini değiştirmektir. Bazı ilaçların aktiviteleri lipozom ile kaplandığında artabilir . Diğer bir strateji de, sitotoksik ilaçların modifiye edilerek P-gp maddesi olmasının önlenmesidir (44).

Preklinik çalışmalarda ilaç direncinin döndürülmesinde monoklonal antikorlar yararlı bulundu (52,25). Monoklonal antikorlar otolog nakil öncesi dirençli tümör hücrelerini kemik iliğinden temizlemekte de yararlı olabilir (44).

MDR hücreler doğrudan P-gp ile ilgili olmayan olaylarda da rol alır. Örneğin, P-gp'in aşırı ekspresyonunda sıklıkla LAK (Lenfokine activated killer) hücrelere duyarlılık artmıştır(44). Tümör nekrotizan faktör (TNF) gibi bazı sitokinler, MDR myelom hücrelerine karşı artmış aktiviteye sahiptir (59). Bir çalışmada nitrozüreye de duyarlılık bildirildi(44). Bu ve diğer in vitro gözlemler MDR neoplazmların tedavisinde yeni ufuklar açabilir.

### ***RABDOMYOSARKOM***

Primitif mezenkimal hücrelerden kaynaklanan malign solid tümörler sarkom olarak adlandırılır. Çocukluk çağının en sık karşılaşılan yumuşak doku sarkomu rabdomyosarkom (RMS)dur. RMS, çocukluk çağı kanserlerinin %5-8'ini oluşturur.(56) En sık 5-7 yaşlarında görülür . Beyaz ırkta biraz daha siktir ve erkek/kız oranı 1.7'dir (18,51).

*Patoloji:* Tümörün histolojik tanısı, tümör dokusundan alınan örneğin histopatolojik incelemesi ile konulur. Işık mikroskobu ile tanı konulamadığında,

elektron mikroskopu ve immunohistokimyasal çalışmalar yapılmalıdır. Tümörün histopatolojik sınıflandırılması prognostik önem taşır. Çocukluk çağında kabul edilen sınıflamaya göre RMS'lar dört alt gruba ayrılır (56):

1) Botrioid: Düz kas hücrelerini andıran iğsi hücreler ve fibroz dokudan oluşur. Prognoz iyidir.

2) Embriyonel: Stromadan zengin iğsi hücreler vardır ve alveoler histoloji saptanmaz. Prognoz orta derecededir.

3) Alveoler: Çoğunlukla yuvarlak ve dar eozinofilik sitoplazmalı hücrelerden oluşur. Prognoz kötüdür.

4) İndiferansiye: Mezenkimal kökenli olup miyogenez veya farklılaşma göstermeyen yuvarlak hücrelerden oluşur. En kötü-prognozu sahip olan gruptur.

*Yerleşim bölgeleri ve yayılma şekilleri:* RMS, mezenkimal hücrelerin olduğu her yerden çıkabilir. Tümörlerin %40'ı başboyun bölgesinden , %20'si genitouriner bölgeden, %20'si ekstremiteden, %10'u gövdeden, geri kalan %10'u da vücudun değişik bölgelerinden kaynaklanır(56).

RMS'lar bölgesel lenf nodlarına yayıldığı gibi, akciğer, kemik, nadiren de kemik iliği ve merkezi sinir sistemi gibi bölgelere uzak metastaz da yapabilir(56).

*Evreleme:* RMS'lar IRS (Intergroup Rhabdomyosarcoma Study) klinik gruplama (tablo 7) veya IRS modifiye TNM (Tümör, nod, metastaz) sistemine göre sınıflanabilir(56).

*Tablo 7. IRS'nin klinik gruplama sistemi:*

**Grup I**

A: Lokalize, tam çıkartılmış, kaynaklandığı dokunun dışına taşmamış tümör.

B: Lokalize, tam olarak çıkartılmış, kaynaklandığı dokunun dışına taşmış tümör.

**Grup II**

A: Lokalize, gross olarak çıkartılmış, mikroskopik kalıntı olan tümör.

B: Tam olarak çıkartılmış lenf nodu tutulumu olan reyonel hastalık.

C: Mikroskopik kalıntısı olan ve gross olarak çıkartılmış, lenf nodu tutulumu olan reyonel hastalık.

**Grup III**

A: Yalnız biyopsi alınmış olan lokal veya reyonel hastalık.

B: Primer tümörün %50'sinden fazlasının kaldığı hastalık.

**Grup IV**

Tanıda uzak metastaz.

**Tedavi:** Diğer malignitelerde olduğu gibi RMS'da da başarılı bir tedavi için ekip çalışması gerekmektedir. Tedavide cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi yer alır.

**Cerrahi :** Amaç, vital fonksiyonları ve dış görünüşü fazla bozmadan tümörün mümkün olduğunca çıkartılmasıdır. Baş-boyun gibi bazı yerleşim bölgelerinde, yaşamsal önemi olan damar veya sinirlere yakınlık ve/veya kozmetik nedenlerle tümörün tam olarak çıkartılması mümkün olmayabilir. Etkin kemoterapi ilaçlarının kullanımı ile radikal cerrahi yöntemler terk edilmektedir. RMS'da cerrahi olarak tam çıkartılabilirlik prognostik açıdan önemlidir(56). Primer cerrahi sonrası mikroskopik kalıntı varsa, diğer tedavilere başlamadan önce mümkünse tam rezeksiyon yapılmalıdır. Böyle vakalarda sağ kalımın arttığı bildirilmektedir (35). Başlangıçta tam çıkartılamayan tümörlerde, kemoterapi ve radyoterapi sonrası geç rezeksiyon yapılmaktadır. Metastatik vakalarda uygun olan metastaz odaklarının çıkartılması önerilir(18,56). Nüks eden vakalarda, radikal cerrahiyi izleyerek radyoterapi ve daha yoğun kemoterapi uygulanmalıdır(56).

**Radyoterapi(RT):** Tedavide önemli bir rolü olan RT ile cerrahın tam çıkartamadığı, özellikle baş-boyun ve pelvis yerleşimli tümörlerde lokal kontrol sağlanabilir. Yumuşak doku sarkomları çok infiltratif olduğu için, RT veya KT



eklenmeden yapılan geniş eksizyonda lokal nüks %75 kadardır. Tam olarak çıkartılmış iyi histolojili tümörler dışındaki tüm olgularda primer tümör veya metastazlara RT önerilir. Verilecek doz tümör bölgesine, evreye, yaşa göre 4140-5040 cGy olarak değişir(56).

**Kemoterapi (KT):** RMS'da hematojen ve lenfojen yayılımının sık olması, tam çıkartılan tümörlerde bile lokal nükslerin sık görülmesi, kemoterapinin önemini ortaya koyar. İlk KT denemeleri metastatik hastalarda tek ilaçlı olarak başladı. Daktinomisin, sitoksan, vinkristin, doksorubisin etkili bulundu. Wilbur ve arkadaşları kombine kemoterapi (VAC) ile iki yıllık %67 sağ kalım elde ettiler. IRS 1972-1986 arasında 2000 hastayı değerlendirdi. Cerrahi, RT, KT'den oluşan kombine tedaviye rağmen grup I'de %10, grup II'de %20, grup III'de %30, grup IV'de %70 lokorejyonal nüks ve uzak metastaz gelişmesi, IRS III'de nüks sonrası tedaviye rağmen bu hastaların %95'inin kaybedilmesi, yeni tedavi arayışlarına neden oldu(56).

Son dekatta değişik bir çok ilaç denendi. Nüks eden sarkomlarda tek ilaç olarak sisplatin ve etoposid ile %20, DTIC ile %15 yanıt alındı. Çocuklarda nüks yumuşak doku ve kemik sarkomlarında ifosfamid + etoposid ile iyi sonuçlar alındı. Tedavi arayışında diğer bir aday MTX.'tır. Çalışmalarda az sayıda hastada %50 yanıt bildirildi. Alkilleyici bir ajan olan melfalan ile farelerde iyi sonuçlar elde edildi (56). Ayrıca son yıllarda yüksek doz kemoterapi ve kemik iliği transplantasyonu denemektedir .

**Prognoz:** RMS'da multimodal tedavi ile 5 yıllık sağ kalım oranları Grup I'de %93, Grup II'de %81, Grup III'de %73, Grup IV'de %30 civarındadır(18). En önemli prognostik faktör, hastalığın klinik grubu ve yaygınlık derecesidir. Metastatik olan, cerrahi sonrası makroskopik veya mikroskopik kalıntısı bulunan hastaların prognozu daha kötü olmaktadır. Tümörün yerleşim bölgesi de önemli bir prognostik kriterdir. Yerleşim bölgesi, hem lenfatik ve hematojen metastazlara yatkınlık, hem cerrahiye uygunluk, hem de belirti ve bulguların ortaya çıkış süresi açısından önemlidir. Ayrıca, çevre dokuların RT dozlarına duyarlılığı da yerleşim yerinin önemini arttırmaktadır.

Orbita ve mesane-prostat dışı genitouriner sistem tümörlerinde prognozun diğer bölgelerden daha iyi olduğu gösterilmiştir. Diğer bir prognostik faktör, tümörün histopatolojik tipidir. Alveoler ve indiferansiye RMS'lar embriyonellerden daha kötü gidişlidir. Önemli prognostik faktörlerden biri de tedavi yanıtı olup, tam remisyona erken ulaşılan hastalarda prognoz çok daha iyi olmaktadır(56)

Moleküler biyolojideki gelişmelerle birlikte RMS'da yeni prognostik belirleyiciler gündeme geldi. Sitogenetik çalışmalar RMS'da karakteristik bir kromozom anomalisi ortaya koydu. Alveoler RMS'ların yaklaşık %70'inde t(2:13)(q37;q14) saptandı(15). DNA içeriği çalışmalarında, diploid tümörlerde prognoz daha kötü olduğu gösterildi. Diploid tümörlerin kötü prognostik lokalizasyon ve ileri TNM evresi ile birlikte olduğu, rekürren tümörlerde tümör ploidi anöploiden diploide döndüyse tedavi şansının çok azaldığı saptandı(75). Miyogenezisin genetik kontrolü olduğunun ortaya konmasıyla, bu konuda da çalışmalar başlatıldı. Bu alandaki buluşların gelecekte RMS tedavisinde veya prognoz tahmin edilmesinde yararlı olacağı düşünülmektedir. RMS'daki protoonkogen çalışmaları nükleer transkripsiyon faktörleri üzerinde yoğunlaşmış olup, alveoler histolojide n-myc amplifikasyonu dikkati çekti. Tümör supresör genlerden p53'ün mutant şekli RMS'ların önemli bir bölümünde saptandı. Bunun varlığının tedavi yanıtını olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir(15).

Kanser tedavisinde başarıyı önleyen faktörlerden biri olabileceği kabul edilen MDR, RMS'lar için de gündeme gelebilir. Bu konuda yapılan çalışma sayısı çok az olup, şimdiye kadar elde edilen verilerle, MDR'ın RMS prognozundaki rolü için kesin bir yargıya varmak mümkün değildir.

## HASTALAR VE YÖNTEM

*Hastaların seçimi:* Çeşitli merkezlerden sevk edilen veya doğrudan onkoloji polikliniğine baş vuran ve tedavileri İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Pediatrik Onkoloji Bölümünde başlatılan hastalar bu çalışmaya alındı.

*Tedavi öncesi değerlendirme:* Rabdomyosarkom tanısı, ışık mikroskobu ile rutin histopatolojik inceleme ve immunohistokimyasal boyalar ile konuldu. Farklı merkezlerden gelen tümör dokularının hepsi İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı tarafından da değerlendirildi. Hastalık yaygınlığını değerlendirmek için her hastaya tümör bölgesinin bilgisayarlı tomografi (BT) ve/veya manyetik rezonans, akciğer BT, kemik sintigrafisi, ileri evrelerde kemik iliği aspirasyon veya biyopsisi yapıldı. Evreleme için IRS klinik gruplama sistemi (56) kullanıldı.

*Tedavi protokolü:* Cerrahi girişimi (biyopsi veya rezeksiyon) izleyerek hastalar kemoterapi ve radyoterapi açısından değerlendirildiler. Enstitümüzde uygulanan tedavi protokolü şekil 2'de gösterilmiştir.

*Tedavi yanıtının değerlendirilmesi:* Protokollere uygun olarak 16-20 haftalarda yapılan ara değerlendirmede konvansiyonel yanıt kriterleri kullanıldı(51). Yanıt değerlendirmesi yapılan hastaların 19'u değerlendirme sırasında radyoterapilerini tamamlamışlardı. Diğer hastalar radyoterapi almadı.

*İmmunohistokimyasal yöntem:* P-gp varlığını tümör dokularında araştırmadan önce yapılan pilot çalışmada pozitif kontrol dokuları hazırlandı ve bu dokularda en iyi sonucu sağlayan immunohistokimyasal çalışma parametreleri belirlendi. Bu çalışmada, böbrek adenokarsinomu ve berrak hücreli karsinom nedeni ile nefrektomi yapılan iki olgu ile Hodgkin hastalığı nedeni ile evreleme laparotomisi sırasında karaciğer

biyopsisi alınan bir olguya ait materyal kullanıldı. Her üç olguda da, daha önce kemo/radyoterapi kullanılmamıştı. Nefrektomi materyalinde tümör dışı kortikal alanlardan doku örnekleri ve karaciğer biyopsi materyalinin tamamı %10'luk tamponlu formalin içine alındı. Dokular +4 °C'de altı saat süre ile tespit edildi. Tespitli dokular Histokinett marka otomatik takip makinasında 12 saat standart parafin blok takibine alındı (Bancroft). Elde edilen parafin bloklardan 5µm kalınlığında kesitler poly-l-lysine (Sigma P8920) ile kaplanmış lamlara alındı. Kesitler +40 °C'lik etüvde bir gece bekletilerek kurutuldu ve lama yapışması sağlandı. +55 °C'lik etüvde bir saat inkübasyondan sonra ksilenlerden geçirilerek deparafinize edilen kesitler, derecesi düşen etanol serilerinden suya getirilerek hidrate edildi. Her bloktan elde edilen çok sayıda kesitin yarısı, mikrodalga ışınlama yöntemi uygulandıktan sonra immunohistokimyasal boyamaya alınırken, diğer yarısına mikrodalga ışınlama işlemi uygulanmadı. "Antigen unmasking" yöntemi olarak da bilinen mikrodalga ışınlama yönteminde (41) kesitler 50ml sitrat tampon (2.1gr sitrik asit, 1L distile su, PH 6) içinde 2x5 dk süre ile mikrodalga fırında (Boch, Gourmet 2010) maksimum enerji düzeyinde ışınıldı. İkinci ışınlama sonrası kesitler 20dk sıcak tampon içinde bekletildi, distile suya alındı. Mikrodalga ışınlama uygulanan ve uygulanmayan tüm kesitler PBS içine alındıktan sonra immunohistokimyasal boyamaya geçildi. Kısaca şu aşamalar sırası ile oda sıcaklığında uygulandı: %3 v/v H2O2 çözeltisi 20 dk, nonspesifik protein blok çözeltisi (Biogenex, AA005m.kit) 20dk, değişik sulandırma oranlarında (1/10,1/50,1/100) olmak üzere "monoklonal mouse, anti multi drug resistance marker" P-gp antikor (Biogenex, MU1740894 clone JSB1) 60dk, biotinli antimouse sekonder antikor (Biogenex, AA0005m kit) 30dk, fast red kromojen sistemi (Biogenex, AA0005m kit) 15dk süre ile uygulandı. Yıkama işlemlerinde PBS kullanıldı. Mayer hematoksilen ile 3dk'lık nüklear zıt boya uygulanan preparatlar suda eriyebilen kaplama maddesi ile kapatıldı. Böylece her bir bloktan elde edilen kesitler mikrodalgalı ve mikrodalgasız olmak üzere ve ayrıca primer antikor sulandırma oranları 1/10, 1/50, 1/100 olmak üzere altı farklı boyama sistemi ile boyanmış oldu. Negatif kontrol testlerinde primer antikor yerine 'nonimmune mouse' serumu kullanıldı. Tüm kesitler ışık mikroskopunda değerlendirildi. Hem test , hem de negatif kontrol preparatlarında böbrek distal tubulus ve toplayıcı kanal epitel hücrelerinin

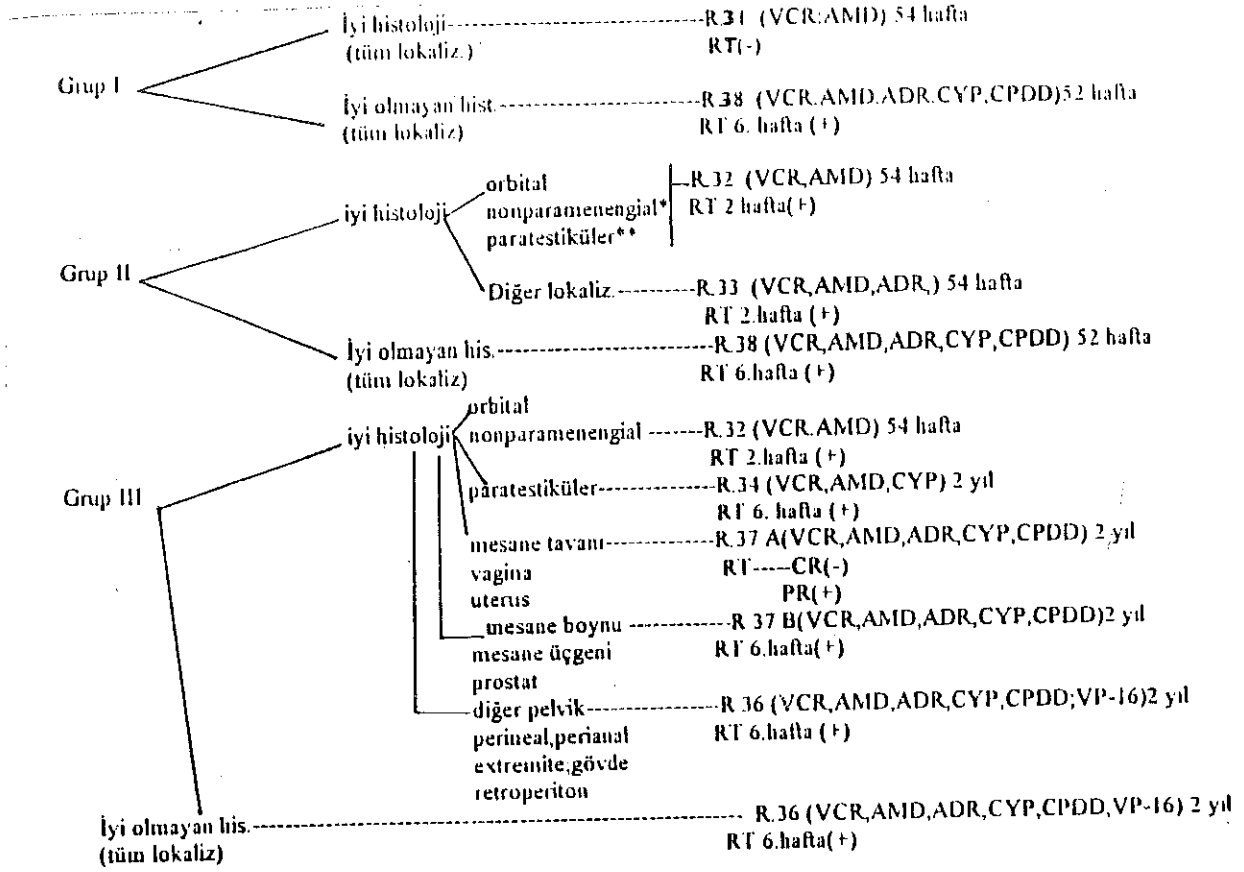
apikal kenarlarında, kullanılan antikor konsantrasyonlarına bağlı olmaksızın, mikrodalga ışınlama preparatlarında daha belirgin olmak üzere pozitif boyanmalar görüldü. Bu boyanmaların negatif kontrol preparatlarında da görülmesi ve levamisol blok sistemi kullanımı ile kaybolması nedeniyle, endojen alkali fosfataz aktivitesinden kaynaklandığı düşünöldü. Primer antikor kullanılan test preparatlarında böbrek proksimal tubulus epitelinin sitoplazma ve membranında, karaciğer hepatositlerinin safra yollarına bakan membranlarında pozitif boyanmalar görüldü (Resim 1,2,3). Bu lokalizasyonlarda negatif kontrol preparatlarında boyanma görülmediğı için bu boyanmaların, P-gp ile primer antikor reaksiyonuna bağılı spesifik boyanmalar olduğı sonucuna varıldı. Spesifik boyanmaların 1/50 ve 1/100 primer antikor sulandırma testlerinde bulunmadığı görüldü. 1/10'luk antikor-sulandırmalarında ise mikrodalgasız preparatlarda spesifik boyanma zayıf iken, mikrodalga uygulanmış preparatlarda belirgin olarak arttığı görüldü. Mikrodalgasız preparatlarda spesifik immunreaktivitenin zayıf olması ve çalışma grubunu oluşturan materyalde antijen korunumunun heterojen oluşu göz önüne alınarak, tümör grubuna ait çalışmada mikrodalga ışınlama işleminin kullanılmasına karar verildi.

Tümör olgularına ait arşiv bloklarından elde edilen hematoksilen eozin boyalı preparatlar histopatolojik olarak ele alındı. Her olgudan immunohistokimyasal çalışmaya en uygun 1-3 adet parafin doku bloğı seçildi. Zemin boyanmasına yol açabilecek nekrotik ve nekrobiyotik değışikliklerin en az; bağı dokusu gelişimi ve inflamasyonun belirsiz; tümörün hücreden zengin olduğı doku blokları tercih edildi. Bu bloklardan elde edilen parafin blok kesitlerine pilot çalışma sonucu belirlenen ve ayrıntıları yukarıda belirtilen immunohistokimyasal çalışma uygulandı. Bu çalışmada, mikrodalga ışınlama ile "antigen unmasking" aşamasından sonra 1/10 sulandırma oranındaki primer antikorun 60dk uygulandığı yöntem kullanıldı. Negatif kontrol kesitlerinde primer antikor yerine nonimmun mouse serumu , pozitif kontrol dokusu olarak pilot çalışmada elde edilen böbrek ve karaciğer dokuları kullanıldı. Sonuçlar ışık mikroskopunda değılendirildi. Her olguda en yaygın ve en yoğun immunreaktivite gösteren alanlar belirlenerek bu alanlarda her olgu için toplam 100 tümör hücresi değılendirildi. Her bir hücreye gösterdiği immunoreaktivite şiddetine göre 0 (hiç

boyanma yok), 1(çok zayıf-interstisyel alanla, zeminle benzer şiddette- boyanma ,2 (orta derecede sitoplazmik ve/veya membranöz boyanma), 3 (kuvvetli sitoplazmik ve/veya membranöz boyanma) değerleri verildi. 1 pozitif boyanmalar gerçek, anlamlı immunreaktivite olarak kabul edilmeyip, nonspesifik reaksiyonlara bağlı olabileceği düşünüldü. 2 ve 3 pozitif hücre sayılarının toplamı %10 ve üstünde olan olgular P-gp immunreaktivitesi açısından pozitif kabul edildi (41). Pozitif vakalara ait kesitler resim 4 ve 5'te gösterilmiştir.

*İstatistik:* P-gp pozitif ve negatif grupların tedavi yanıtı ve sağ kalımları karşılaştırıldı. Sağ kalım süresi olarak, tanıdan ölüm veya son kontrole kadar geçen süre alındı. Sağ kalım hesaplarında Kaplan-Meier yöntemi kullanıldı. İki grubun sağ kalımları log rank testi ile karşılaştırıldı. RMS'un klinik özellikleri ile P-gp pozitifliği; hastaların son durumu ile diğer parametreler arasındaki ilişki ki kare testiyle Yates düzeltmesi yapılarak araştırıldı. Parametrelerden beşten az elemanı olanlar değerlendirildiğinde Fischer'in kesin ki kare testi seçildi. P-gp pozitif ve negatif grupların yaş ortalamaları arasında fark olup olmadığını belirlemek için Mann - Whitney U testi, grubun median yaşı olan 7 yaşın altında ve üstünde yer alan hastaların P-gp değerlerini karşılaştırmak için de ki kare testi kullanıldı.

**Şekil 2. RMS'larda tedavi protokolü özeti**



\* Mayıs 1993'den sonra ileri evre ve alveoler histolojili olgularda yüksek doz endoxanlı VAC protokolü (Vinkristin 1.5 mg/m<sup>2</sup>, Act D 0:015 mg/m<sup>2</sup>x5, Endoxan 1.2-2 g/m<sup>2</sup>) uygulanmıştır.

*Resim1 Normal böbrek proksimal tubulus epitel hücrelerinde sitoplazmik P-170 gp immunoreaktivitesi (Fast red kromojeni, x310).*

*Resim2 Normal böbrek proksimal tubulus epitel hücrelerinde sitoplazmik P-170 gp immunoreaktivitesi (Fast red kromojen, x500).*



*Resim3 Normal hepatositlerde safra kanaliküllerine bakan yüzlerde membranöz P-170-gp-immunoreaktivitesi (Alkali fosfataz kromojeni, x500).*

*Resim4 Tümör hücre sitoplazmalarında sitoplazmik P-170 gp immunreaktivitesi  
(Fast red kromojeni,x125).*

*Resim5 Tümör hücre sitoplazmalarında sitoplazmik p-170 gp immunreaktivitesi  
(Fast red kromojeni,x500).*

## **BULGULAR**

*Hastaların özellikleri:* İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Pediatrik Onkoloji Bilim Dalında 1989-1996 arasında tedavi görmüş olan 22 rabdomyosarkomlu hasta çalışmaya alındı. Yaşları 2-18 arasında değişen (median 7 yaş) 22 hastanın 11'i erkek 11'i kızdı (E/K=1). Tümörlerin dördü erken evre (Grup I - II), 18'i ileri evre (Grup III - IV) olup; dokuz tanesi pelvis ve genitoüriner sistem (dört pelvik, iki vagen, bir paratestiküler, bir mesane, bir perine), sekizi baş-boyun (beş parameningeal, biri orbita olmak üzere üç nonparameningeal baş-boyun), dördü ekstremitte, biri gövde yerleşimli idi. RMS tanısı alan tümörler histolojik tiplerine göre ayrıldı (Onbeşi embriyonel, beşi alveoler, ikisi indiferansiye idi). Kemoterapi olarak ileri evre ve alveoler histolojili vakaların on altısına yüksek doz VAC, birine rejim 33, birine rejim 36, birine rejim 37; erken evre ve iyi histolojili (embriyonel) hastaların birine rejim 31, birine rejim 32, birine rejim 36 kullanıldı. Grup I ve iyi histolojili bir hasta ve tedaviyi terk eden iki hasta dışındaki tüm hastalara RT uygulandı. Tablo 8'de hastaların özellikleri belirtilmiştir

**Tablo 8. Hastaların özellikleri ve P-gp sonuçları**

No	Cins	Yaş	Hist	Bölge	IRS Grup	KT	RT	Ara Yanıt	Son Durum	İzlem Süresi	P-gp
1.	Kız	18	A	Ekst.	II	VAC	+	CCR	CR	11 ay	-
2	Erkek	5	E	PM BB	III	VAC	+	PR	Ex	5 ay	-
3	Erkek	14	E	PT	II	R32	+	CCR	CR	18 ay	-
4	Kız	2	E	Ekst.	III	VAC	-	PD	Ex	8 ay	+
5	Erkek	11	E	PM BB	IV	VAC	+	PR	PR	6 ay	-
6	Erkek	12	E	BB	III	VAC	+	NR	NR	5 ay	+
7	Kız	4	E	Ekst.	III	VAC	+	PR	CR	14 ay	-
8	Kız	6	A	Gövde	III	VAC	+	PR	PR	6 ay	-
9	Kız	6	E	BB	III	VAC	-	PR	Terk	5 ay	-
10	Erkek	2	E	PM BB	III	VAC	+	PD	Ex	7 ay	-
11	Kız	3	A	Vajen	III	VAC	+	PR	CR	27 ay	-
12	Kız	5	E	Göz	III	VAC	+	PD	Ex	11 ay	+
13	Kız	14	A	Vulva	IV	R36	+	CR	Ex	26 ay	+
14	Kız	2	E	Pelvis	II	R36	+	CCR	Ex	49 ay	-
15	Kız	12	I	PM BB	III	VAC	+	PR	CR	18 ay	-
16	Erkek	2	E	Ekst	III	R33	+	PR	CR	70 ay	+
17	Erkek	2	E	Mesane	III	R37	+	PD	Ex	3 ay	+
18	Erkek	10	I	Pelvis	IV	VAC	+	PD	Ex	8 ay	+
19	Erkek	18	A	PM BB	III	VAC	+	PD	Ex	10 ay	+
20	Erkek	9	E	Pelvis	III	VAC	+	PR	PR	23 ay	-
21	Kız	12	E	Vajen	I	R31	-	CCR	CR	38 ay	-
22	Erkek	8	E	Pelvis	IV	VAC	+	PD	Ex	25 ay	-

Hist=Histoloji      A=Alveoler    E=Embriyonel      I=İndiferansiye  
 Ekst=Ekstremiteler    PM BB=Parameningeal baş-boyun    PT=Paratestiküler  
 BB=Baş-boyun      KT=Kemoterapi      RT=Radoterapi  
 CCR=Devam eden tam yanıt      CR=Tam yanıt      PR=Kısmi yanıt  
 NR=Yanıtsız      PD= Progresif hastalık

**İmmunohistokimyasal çalışma sonuçları:** IHC uygulanan 22 RMS'lu hastanın sekizi (% 36) P-gp pozitif olarak değerlendirildi.

**Klinik Özellikler ile P-gp ilişkisi:** P-gp pozitifliği ile cinsiyet, yaş, histolojik tip, bölge ve IRS klinik grup arasındaki ilişki araştırıldı. Bu parametrelerin hiç birinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. (Tablo 9) P-gp pozitif ve negatif grupların yaş ortalamaları arasında da fark yoktu. (Mann-Whitney U testi ile p=.86).

Tedavi yanıtı için 16-20. haftalarda yapılan ara değerlendirmede, cerrahi sonrası makroskopik tümörü kalmamış olan grup I ve II dört hasta dışında kalan 18 hastada objektif yanıt değerlendirildi. Yanıtlı (CR ve PR) olan on hastanın ikisinde (%20),

yanıtsız (NR,PD) sekiz hastanın ise altısında (%75) P-gp pozitif bulundu. (Tablo 9) Bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p= .03$ ).

**Tablo 9 . Klinik özellik P-gp ilişkisi.**

	<i>n</i>	<i>P-gp (+)</i>	<i>P-gp (-)</i>	<i>P değeri</i>
<b>Yaş</b>				
7 yaş ve altı	11	4	7	1
7 yaş üstü	11	4	7	
<b>Cinsiyet</b>				.66
Kız	11	3	8	
Erkek	11	5	6	
<b>Bölge</b>				1
İ	4	1	3	
K	18	7	11	
<b>IRS Grup</b>				.27
I-II	4	0	4	
III-IV	18	8	10	
<b>Histoloji</b>				1
İyi	15	5	10	
Kötü	7	3	4	
<b>Ara Yanıt</b>				.03
CR+PR	10	2	8	
NR+PD	8	6	2	

İ=İyi prognostik (göz, mesane-prostat dışı genito-üriner sistem)

K=Kötü prognostik (diğer) İyi=Embriyonel Kötü=Alveoler ve indiferansiye

CR=Tam yanıt PR=Kısmi yanıt NR=Yanıtsız PR=Progresif hastalık

P-gp sağ kalım ilişkisi: Tüm gruptaki 22 hastanın 10'u hastalık nedeni ile öldü. Median izlem süresi 26 ay idi. Kaplan-Meier ile yapılan sağ kalım hesaplarında tüm grubun 1 ve 2 yıllık sağ kalım oranı %62 bulundu. Erken hastalıklı (IRS grup I - II) dört hastanın biri 49. ayda lokal nüks ile kaybedildi. Bu gruptaki sağ kalım analizinde 1 ve 2 yıllık sağ kalım %100 olarak bulunmuşsa da, sayı az olduğu için bu değer çok anlamlı değildir. İleri hastalıklı (Grup III - V) 18 hastanın dokuzu öldü. Bir ve iki yıllık sağ kalım %51 olarak hesaplandı ( $p=.15$ ).

Kötü prognozlu (alveoler ve indiferansiye) histolojik gruptaki yedi hastanın üçü, iyi prognostik(embriyonel) gruptaki 15 hastanın ise yedisi kaybedildi. Kötü histolojili grupta 1 ve 2 yıllık sağ kalım %66, iyi histolojili grupta ise %60 olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=.85$ ).

İyi prognostik lokalizasyonlu (orbita,mesane-prostat dışı genito-üriner sistem) gruptaki dört hastanın biri öldü. Bu grupta bir ve iki yıllık sağ kalım %75 olarak hesaplandı. Ancak hasta sayısı yeterli değildi. Diğer lokalizasyonlu 18 hastanın dokuzu kaybedildi. Bir ve iki yıllık sağ kalımlar %59 bulundu ( $p=.25$ ).

Ara değerlendirmede, cerrahi sonrası tam yanıt elde edilen grup I ve II dört hastada tam yanıt sürüyordu (CCR). Geri kalan on sekiz hastanın onunda CR ve PR sağlandı. Bu hastaların ikisi öldü. Bir ve iki yıllık sağ kalım %90 bulundu. Yanıtsız olan (NR,PR) sekiz hastanın yedisi kaybedildi. Bu grupta bir yıllık sağ kalım %14 olup iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p=.003$ ).

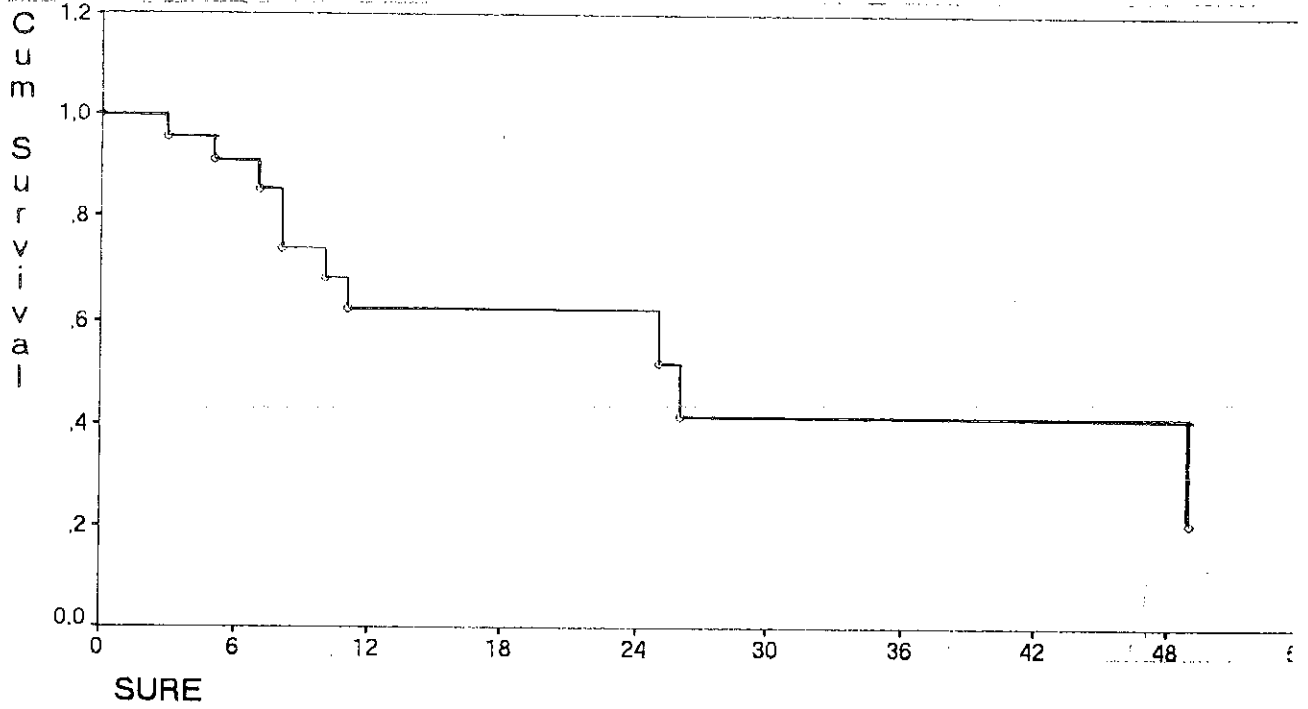
P-gp pozitif gruptaki sekiz hastanın altısı öldü. Bir ve iki yıllık sağ kalım %29 bulundu. P-gp negatif olan 14 hastanın ise dördü kaybedildi. Bir ve iki yıllık sağ kalım %83 olarak hesaplandı. Aradaki sayısal fark büyük olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=.11$ ). P-gp'i pozitif olup yaşayan bir hasta en uzun izlem süresine (70 ay) sahiptir. Bu hastanın izlem süresi, tüm grubun median izlem süresi olan 26 ay olarak alındığında iki grup arasındaki sağ kalım değerleri arasındaki fark

anlamli olmaktadır (p=.04). Klinik ozellikler ve P-gp değerinin sağ kalım ile ilişkisi tablo 10'da gosterilmiştir.

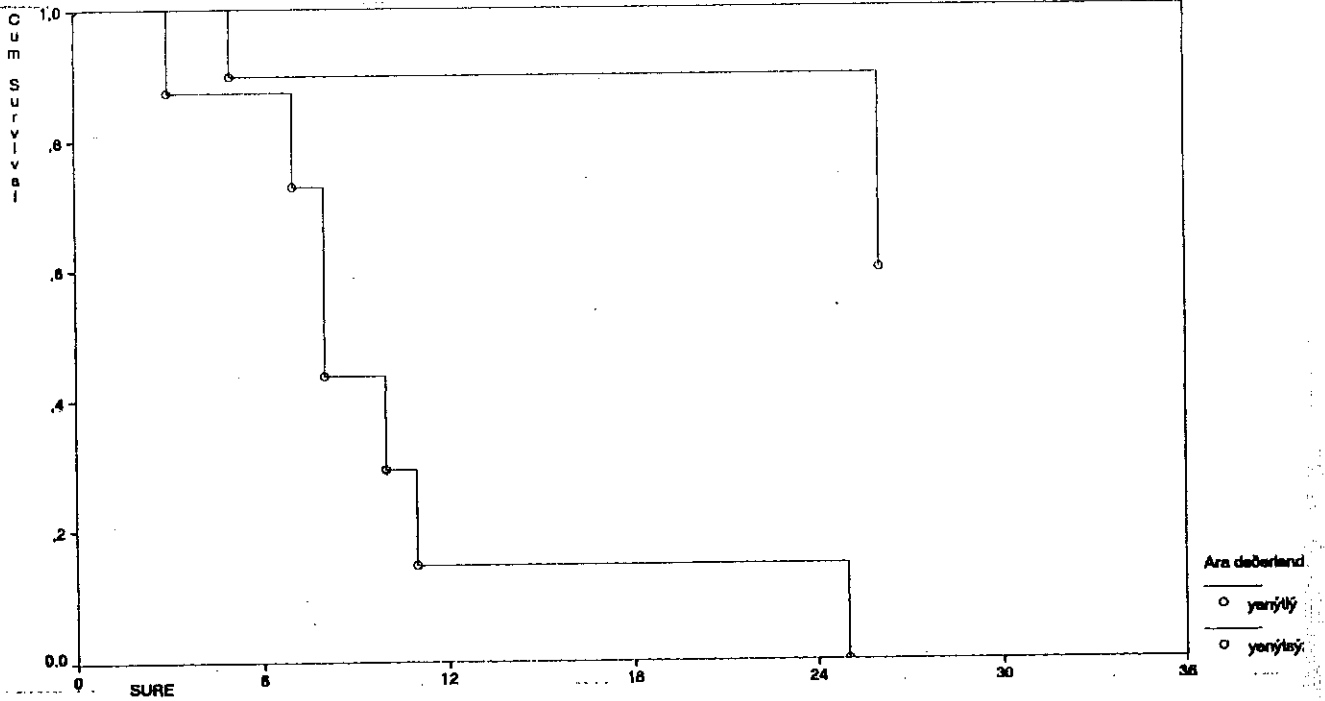
**Tablo 10. Klinik ozelliklerle P-gp'e gore son durum ve sağ kalım ilişkisi**

Faktör	n	Son	Durum		1Yıllık Sağ kalım	P değeri
		Yaşayan	Ölen	p		
<b>Cinsiyet</b>				.33		.18
<i>Kız</i>	11	7	4		%77	
<i>Erkek</i>	11	5	6		%46	
<b>Yaş</b>				.33		.54
<i>7ve altı</i>	11	5	6		%46	
<i>7 yaş üstü</i>	11	7	4		%77	
<b>Bölge</b>				.37		.25
<i>İyi</i>	4	3	1		%75	
<i>Kötü</i>	18	9	9		%59	
<b>IRS grup</b>				.37		.15
<i>I-II</i>	4	3	1		%100	
<i>III-IV</i>	18	9	9		%51	
<b>Histoloji</b>				.61		.85
<i>İyi</i>	15	8	7		%60	
<i>Kötü</i>	7	4	3		%66	
<b>Ara yanıt</b>				.007		.003
<i>Yanıtlı</i>	10	8	2		%90	
<i>Yanıtsız</i>	8	1	7		%14	
<b>P-gp</b>				.047		.11
<i>Pozitif</i>	8	2	6		%29	
<i>Negatif</i>	14	10	4		%83	

Tüm grubun genel sağ kalımı, ara değerlendirme-sağ kalım, P-gp -sağ kalım eğrileri şekil 3,4 ve 5'de gösterilmiştir.

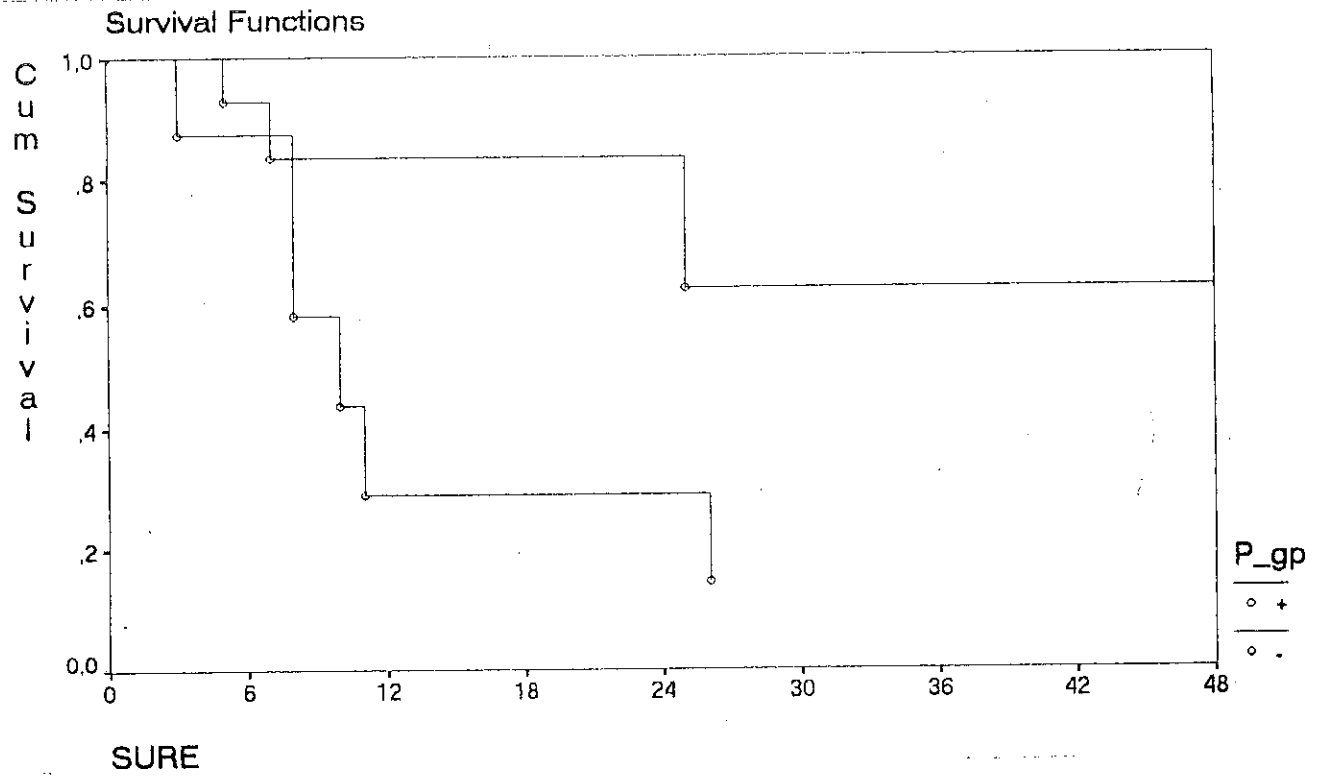


Şekil 3. Tüm grubun sağ kalım eğrisi



Şekil 4. Ara değerlendirmede yanıtlı ve yanıtсыz grupların sağ kalım eğrileri





**Şekil 5. P-gp pozitif ve negatif grupların sağ kalım eğrileri**

## TARTIŞMA

Çocukluk çağı RMS'larında primer ilaç direncinin önemini araştırmak amacı ile yaptığımız çalışmamızda, 22 çocukluk çağı RMS vakası tedavi öncesinde P-gp varlığı yönünden araştırılıp, P-gp pozitifliğinin kemoterapi yanıtı ve sağ kalım üzerine etkisi incelendi. P-gp'in saptanması için IHC kullanıldı ve antikor olarak JSB1 monoklonal antikor seçildi. Vakaların %36'sında P-gp pozitifliği saptandı. Hastalarımızın tümü tedavi görmeden çalışmaya alındığı için bulunan değer primer ilaç direncini yansıtmaktadır. Serimizde P-gp pozitifliği ile ara yanıt arasında ilişki bulundu. Tedavi yanıtını değerlendirmek için 16-20. haftalar arasında yapılan ara değerlendirmede P-gp negatif olanlardaki objektif yanıt oranı, P-gp pozitif olanlardakinden belirgin şekilde daha yüksekti. P-gp pozitif hastalardan ölenler daha fazla olmakla beraber, sağ kalım hesaplarında istatistiksel fark bulunmadı. Hasta sayısı ve izlem süresi arttıktan sonra P-gp'in sağ kalıma etkisi için daha iyi yorum yapılabilir.

P-gp'in varlığı ve prognostik önemi ile ilgili en önemli çalışmalardan biri olan Chan ve arkadaşlarının çalışmasında(9), çocukluk çağındaki 30 hastada (22 RMS, sekiz diferansiye edilmemiş sarkom) IHC ile C219 ve C494 antikorları kullanılarak 62 tane formalinle fikse edilmiş örnekte çalışıldı. Hastalık başlangıcında ve seyri sırasında P-gp ekspresyonu araştırıldı. Primer direnç hastaların %10'unda saptandı. Tedavi sırasında bakılan örneklerle pozitiflik oranı %30'a çıktı. P-gp negatif olan grupta yanıt oranı, rölapsiz ve toplam sağ kalım oranları P-gp pozitif olan gruba göre belirgin olarak daha iyi idi. Evre, bölge gibi prognostik faktörlere göre değerlendirme yapıldığında da P-gp'in sonuca etkisi anlamını korudu. Bizim çalışmamızda tedavi yanıtı P-gp varlığından etkilenirken, sağ kalım oranı etkilenmedi. Chan ve arkadaşlarının çalışması tek başına RMS'ları içermiyordu. Kullanılan yöntem aynı olmakla birlikte, seçilen antikor farklı idi. Ayrıca, IHC yalnızca tedavi öncesi değil, tedavinin herhangi bir aşamasında da yapılmıştı. Yani, burada hem primer hem de

kazanılmış ilaç direncinin sağ kalıma etkisi incelendi. Bizim çalışmamızda ise yalnız tedavi öncesi P-gp varlığı araştırıldı ve primer direncin ara yanıtı etkilediği saptandı. Her vakanın tedavi sırasındaki doku örneklerine ulaşamadığı için kazanılmış direnç araştırılmadı. Ayrıca bu çalışmada izlem süresi bizimkinden daha uzundu.

Bu konuda yapılmış en büyük çalışma olan Kuttesch ve arkadaşlarının çalışmasında(41) ise, bizim serimizde olduğu gibi, yalnız tedavi görmemiş hastalar incelendi. C219, C494, JSB1 antikoru ile 76 hastada çalışıldı. İmmun alkalin fosfataz tekniği kullanıldığında C219 antikoru ile 76 hastanın 32'sinde (%42), C494 ile 59 hastanın 38'inde (%64), JSB1 ile 58 hastanın 37'sinde (%64); immün peroksidaz yönteminde C219 ile 48 hastanın 6'sında (%13), JSB1 ile 48 hastanın 20'sinde (%42) pozitiflik saptandı. Bizim çalışmamızda JSB1 antikoru ile alkalin fosfataz tekniği kullanıldı. Primer pozitiflik oranı Kuttesch ve arkadaşlarınınkine göre daha düşük bulundu (%36). Kuttesch ve arkadaşlarının çalışmasında her bir antikor tek tek ele alındığında, P-gp pozitifliğinin prognozu etkilemediği belirlendi. Her üç antikorla birden pozitif boyananlarda ise sağ kalım negatif olan gruptan daha yüksek bulundu. Bizim çalışmamızdan farklı olarak, P-gp pozitifliği tedaviye ara yanıtı etkilemedi.

Çocukluk çağı RMS'larındaki bu iki önemli çalışma ve bizim çalışmamızda elde edilen primer direnç oranları farklılık göstermektedir. Chan ve arkadaşlarının kullandıkları antikor farklı olduğu için bu oranları karşılaştırmak doğru değildir. Kuttesch ve arkadaşlarının çalışmasında kullanılan antikorlardan biri bizim kullandığımız antikor olmasına rağmen sonuçlar oldukça farklıdır. Burada IHC yöntemlerinin standardizasyonu tartışılabilir. Bir doku örneğinin fiksasyona alınma ve fiksasyonda kalma süresi, fiksatorün tipi, takipte uygulanan işlemler her merkeze göre farklılık göstermektedir. Kuttesch ve arkadaşlarının çalışmasında vakaların bir bölümünde B-5 fiksasyonu kullanılmıştır. Bu sistem antijeni daha iyi koruyan bir sistemdir ve pozitifliğin artmasına neden olmuş olabilir. Çalışmamızdaki preparatlar değişik merkezlerden gelmiş olup, fiksasyon için formaldehid kullanılmaktadır. Ayrıca her merkezin fiksasyon ve takip işlemlerinde olabilecek farklılıklar antijen korunmasını

etkilemiş olabilir. Karşılaştırma yapılan çalışmaların teknik koşulları aynı olmadıkça sağlıklı bir yorum yapmak güçleşecektir.

Literatür incelendiğinde, sarkomlardaki diğer çalışmalar birden çok sarkom tipini içermektedir. Gerlach ve arkadaşları(28) 25 sarkomlu hastada (Bir adenosarkom, bir kordoma, bir fibrohistiyositom, iki hemanjiyoperisitom, yedi leyomyosarkom, dört liposarkom, bir mezenkimal, üç nörojenik, iki osteojenik, bir iğsi hücreli, iki sınıflanmamış sarkom) IHC ve immunoblotting ile P-gp ekspresyonu araştırdılar. Üç tanesi daha önce tedavi almamış (Nörojenik sarkom, liposarkom, iğsi hücreli sarkom), üçü almış (İndiferansiye sarkom, leyomyosarkom, nörojenik sarkom) olmak üzere toplam altı hastada pozitiflik buldular. Pozitif olan hastaların hiç biri kemoterapiye yanıt vermedi. Negatif gruptan yalnız bir hastada remisyon sağlandı. Aynı çalışmada sarkom dışı diğer 35 tümör örneğinin hiç birinde ekspresyon saptanmadı.

Verginer ve arkadaşları(74) klinik olarak ilaca dirençli 22 sarkomlu hastada (Beş Ewing sarkom, üç malign fibroz histiyositom, üç leyomyosarkom, iki RMS, iki liposarkom, iki kordoid sarkom, bir iğsi hücreli, bir diferansiye edilememiş, bir anjiyo, bir epiteloid, bir dermatofibro sarkom) northern blot, dot blot, in situ hibridizasyon ile mRNA; MRK16, JSB1, C219 monoklonal antikörlerinin kullanıldığı IHC ile P-gp aradılar. Tüm grupta yalnız Ewing sarkomlu bir hastada hem artmış mRNA düzeyi, hem de kullanılan üç ayrı antikor ile P-gp belirlendi. Yedi tanesi tedavi görmüş olan on iki hastada da MRK16 antikoruna ile P-gp saptandı. Bu çalışmada, insan sarkomlarında MDR1 aşırı ekspresyonunun olabileceği, ancak bunun ilaç direncinin asıl mekanizması olmadığı düşünüldü.

Stein ve arkadaşları(69) erişkinlerde slot blot ve northern analiz ile dört rabdomyosarkomun ikisinde, dokuz malign fibroz histiyositomun (MFH) üçünde, iki leyomyosarkomun hepsinde, üç sinovyal sarkomun ikisinde, sekiz nörofibrosarkomun yedisinde, diğer altı yumuşak doku sarkomunun beşinde olmak üzere toplam 32 yumuşak doku sarkomunun 21'inde (%66); onbir osteosarkomun onunda, dört MFH'un birinde, yedi kondrosarkomun beşinde, üç Ewing sarkomun ikisinde, dört diğer kemik

tümörünün üçünde olmak üzere toplam 29 kemik sarkomunun 21'inde (%72) MDR1 pozitifliği saptadılar. Yüksek MDR1 ekspresyon düzeyi daha çok osteosarkomlarda; orta ekspresyon kondrosarkom, Ewing sarkom, RMS, leyomyosarkom, sinovyal sarkom, nörofibrosarkom, MFH'da saptandı. Histopatolojik grad, metastaz eğilimi, kemoterapi sonrası tümör nekroz oranı, kemik tümörlerinde kemoterapi öncesi ve sonrası serum alkalin fosfataz düzeyleri gibi klinik parametreler ile MDR1 pozitifliği ilişkili değildi. Sağ kalım süresi MDR1 pozitif ve negatif gruplar arasında istatistiksel fark göstermedi.

Osteosarkomdaki diğer çalışmalarda Wunder ve arkadaşları onbeş osteosarkomun dokuzunda MDR1 ekspresyonu gösterdiler(65). Ekspresyon saptanan grup kötü prognozlu olma eğiliminde idi. Baldini ve arkadaşları(1) 92 osteosarkom vakasında C219, MRK-16, JSB-1 antikorlarını kullanarak IHC uyguladılar. Vakaların 28'inde (%30) P-gp düzeyinde artış saptandı. P-gp artışı olan hastalarda olaysız sağ kalım düşük bulundu. Ameliyat öncesi yapılan kemoterapiden sonra belirlenen tümör nekrozu yaygınlığı ile P-gp düzeyi arasında ilişki yoktu. Sera ve arkadaşları(65) 79'u primer, 26'sı metastatik toplam 105 osteosarkomda immunofloresan yöntem kullanarak P-gp ekspresyonunu değerlendirdiler. Primer vakaların %23'ünde, metastatiklerin ise %50'sinde aşırı ekspresyon bulundu. Aynı tedaviyi gören ve median en az 24 ay izlenen 38 hastada P-gp'in aşırı ekspresyonu, yüksek nüks oranı ve daha kötü prognoz ile birlikte olma eğiliminde idi. Bu bulgular osteosarkomda P-gp'in prognostik bir gösterge olabileceğini, ancak sağlıklı yorum için daha büyük serilerde yapılacak yeni çalışmalar gerektiğini düşündürdü.

Hijazi ve arkadaşları(36) Ewing sarkom ve PNET'li 35 hastada C219 ve JSB-1 antikorları ile P-gp aradılar. Onbeş hastanın preparatları hem tedavi öncesi, hem de sonrasında değerlendirildi. Tedavi öncesi pozitif olan yedi hastanın yalnız birinde tedavi sonrası negatiflik bulundu. Tedavi öncesi negatif olan sekiz hastanın dördü nükste pozitifleşti. Hastaların 20'sinde tek örnekte çalışılabilindi. Tedavi öncesi bakılan ondört hastanın dokuzu, tedavi sonrası bakılan altı hastanın üçü pozitif idi. P-gp pozitifliği ile rölapssız sağ kalım arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı. Ancak

sağlıklı bir değerlendirme için hasta sayısı yeterli değil. Primer tümörlerde pozitifliğin yüksek olması, Ewing sarkom ve PNET'te P-gp ekspresyonunun intrinsek olabileceğini düşündürdü.

Tawa (70) ve arkadaşları dört yaşında, karaciğerde diferansiye edilememiş sarkomu olan bir çocukta dot blot hibridizasyon tekniği ile MDR1 gen düzeyi baktılar. Başlangıç düzeyine göre birinci nükste yedi, ikinci nükste ise onbir kat artış belirlendi.

Şimdiye kadar yapılan çalışmaların hiç biri standart koşulları içermemektedir. Kullanılan yöntem, hasta seçimi, tedavi protokolleri her çalışmada farklıdır. MDR'ı belirlemede farklı yöntemler kullanılabilir. Birden fazla yöntemin aynı vakalarda kullanılıp yorumlandığı çalışma sayısı çok değildir. AML'deki bir çalışmada slot blot analizi kullanılarak IHC den daha yüksek oranda pozitiflik saptandı(44). Merkezi sinir sistemindeki PNET'lerde western blot ile P-gp ekspresyonu, PCR ile MDR1 mRNA pozitifliği saptanırken, southern blot ile hiç bir tümörde MDR1 gen amplifikasyonu belirlenemedi(71). Sarkomlarda yapılan bir çalışmada DB ve ISH metodları ile MDR1 mRNA ve üç antikorun kullandığı IHC ile P-gp arandı. Yirmi iki vakanın yalnız birinde mRNA ekspresyonu saptandı. Aynı vakada tümör hücrelerinin %100'ü kullanılan üç monoklonal antikorun her biri ile spesifik boyandı. MRK16 antikoru ile on iki vaka pozitif bulundu. C219 ve JSB1 antikorları ile birer, MRK16 ile yedi vakada stromal hücreler boyandı. Çalışma sonunda DB ve ISH yöntemleri arasında uyum gözlemlendi. ISH'un duyarlılığının biraz daha iyi olduğu, ancak her iki yöntemin de düşük düzeydeki mRNA ekspresyonunu belirleyemeyeceği sonucuna varıldı. Bu tür vakalarda PCR gibi daha duyarlı yöntemlere gerek olduğu belirtildi(74). Sarkomlarda yapılan diğer bir çalışmada 92 vakanın 70'inde PCR ile MDR1 mRNA saptanırken SB ile hiç pozitiflik bulunmadı. PCR 'ın bu derecedeki duyarlılığı, sonuçlar klinik dirençle ilişkili olursa değerli olacaktır. Bu çalışmada IHC panelindeki üç antikor farklı boyanmalar verdi. Özellikle MRK16 monoklonal antikorunun sonuçları C219 ve JSB1'inkilerden farklıydı. Yirmi iki sarkomun onikisi yalnız MRK16 ile boyandı ve bu vakalarda DB ve ISH ile mRNA ekspresyonu saptanmadı. C219 ile bir, MRK16 ile sekiz vakada stromal hücrelerde immun reaksiyon belirlendi. Bu durum daha önce

meme kanserindeki bir çalışmada stromal hücrelerde ve çoğunluğunu lenfomaların oluşturduğu çeşitli tümörlerdeki bir çalışmada da stromal hücreler ile makrofajlarda bildirilmiştir(74). Bu tür bir reaksiyon JSB1 antikoru ile hiç bildirilmemiştir. Bizim çalışmamızda JSB1 antikoru kullanılmış ve stromal boyanma saptanmamıştır. Bu tür sonuçlar, IHC çalışmaların, özellikle de MRK1 ile yapılanın, MDR1 mRNA ekspresyonunu belirleyen yöntemlere göre daha az spesifik veya daha sensitif olduğunu gösterebilir mi? Genellikle önerilen, farklı epitoplara yönelik antikoların kullanılması ve pozitif sonuçların mRNA ekspresyonunu saptayan yöntemler ile doğrulanmasıdır. Çalışmamızda ekonomik ve teknik olanaksızlıklar nedeni ile tek antikor kullanılmıştır.

Bir tümör tipinde MDR'in önemini gösterebilmek ve bunu bir prognostik faktör olarak kabul edebilmek için çok sayıda hastada standardize edilmiş çalışmalar yapılmalıdır. Günümüze kadar yapılmış çalışmalar bu koşulları içermemektedir. Aynı yöntemi, örneğin IHC kullanan çalışmalarda bile, hasta seçimi, dokuların hazırlanması, depolanması, kullanılan antikor, boyama ve değerlendirme yöntemleri farklıdır. Bu nedenle, yapılan çalışmaları birbirleri ile karşılaştırıp yorum getirmek pek mümkün değildir.

Kanser tedavisindeki gelişmeler ile birlikte, diğer tümörlerde olduğu gibi RMS'da da sağ kalım oranları artmıştır. 1970'de çocukluk çağı RMS'larındaki ortalama sağ kalım yaklaşık %25 iken(18), IRS III sonuçlarına göre günümüzde %65'e ulaşmıştır(17). Ancak, yine de RMS'lu çocukların önemli bir bölümü tedavi edilememektedir. Başarı oranını arttırmak için başarıyı önleyen faktörlerin ortaya konulması ve bunlara yönelik yeni tedavi modellerinin oluşturulması gerekmektedir. Moleküler biyolojideki ilerlemeler, RMS'un kökeni ve biyolojik davranışı ile ilgili daha ayrıntılı bilgiler edinmemizi sağlayacaktır. Radyo-kemoterapi yanıtını etkileyen faktörler bilindiğinde, hangi hastalarda daha az toksik, hangilerinde yoğun tedavi gerektiğini belirlemek kolaylaşacaktır.

RMS'da prognozu değerlendirmek için çeşitli moleküler yaklaşımlar vardır. Miyogenezisin genetik kontrolü, tümör supresör genler, hücre siklsndeki S fazında bulunan hücre oranının etkisi, protoonkogenler ile ürünlerinin rolü araştırılan konuların başlıcalarıdır. Ayrıca, diğer bir çok tümör tipinde olduğu gibi, ilaç direncinde MDR genin nemi RMS'da da sorgulanabilir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, sarkomlarda MDR1 aşırı ekspresyonunun olabileceği, bunun tek başına olmasa da, ilaç direncinden sorumlu tutulabileceği bildirildi. Yumuşak doku sarkomlarındaki en önemli çalışmalardan birinde P-gp pozitifliğinin kötü prognoz kriteri olduğu, diğerinde ise prognostik önemi olmadığı dşnld. Çalışmamızda ocukluk ağı RMS'larında tedavi ncesi P-gp pozitifliği (primer direnç ) %36 bulundu ve pozitiflik tedaviye ara yanıtı olumsuz yönde etkiledi. RMS'da tedaviye yanıtın prognostik önemi bilinmektedir. Primer ilaç direnci gösteren hastalarda tedaviye yanıtızlığın daha yüksek olması tedavide farklı bir yaklaşımı gerektirebilir. Bu hastalarda kemoterapi direnç kırıcı ilaçlarla birlikte kullanılabilir veya MDR grubunda olmayan ilaçlar seçilebilir. İlaç direncinin daha iyi anlaşılması ve gerekli önlemlerin alınması ile RMS'dan kaybedilen çocuklar için yeni bir umut belirecektir.



## ÖZET

Son yıllarda kanser tedavisinde önemli aşamalar elde edilmesine karşın, hala bazı kanser türleri tedaviye yanıt vermemekte, bazısı da başlangıçta yanıtı iken daha sonra direnç kazanmaktadır. Kemoterapinin başarısız olmasında bir çok faktör etkili olabilir. Kemoterapi ilaçlarına karşı oluşan direncin en iyi tanımlanmış mekanizması MDR olup, burada doğal kaynaklı bir sitotoksik ilaç ile karşılaşan memeli hücrelerinin seçilmiş ajanlara direnç geliştirmesi söz konusudur. MDR1 geninin ürünü olan P-gp, dirençli hücrelerin membranlarında enerjiye bağımlı ilaç "efflux" pompası olarak görev yapar ve belirli ilaçların hücre içinde birikimini önleyerek onları etkisiz kılar.

Çocukluk çağı RMS'lerinde multimodal tedaviye rağmen istenilen düzeyde başarı sağlanamamaktadır. Yoğun kemoterapiye her zaman yanıt alınmaması, başlangıçta var olan veya sonradan kazanılan ilaç direncini gündeme getirmiştir. Bu konuda yapılan çalışma sayısı yeterli değildir.

Çalışmamızda, yaşları 2-18 yaş (median 7 yaş) arasında değişen, 11'i erkek, 11'i kız (E/K=1) toplam 22 RMS olgusunda tedavi öncesi P-gp varlığı araştırıldı ve P-gp'in tedavi yanıtı ile sağ kalıma etkisi incelendi. P-gp'in aranmasında immunohistokimyasal yöntem seçildi ve monoklonal antikor olarak JSB1 kullanıldı. Çalışma sonunda:

1) Çalışmaya alınan 22 RMS'lu hastanın 8'inde (%36) P-gp pozitif bulundu. Çalışma grubunun tümünü tedavi görmemiş hastalar oluşturduğu için bu değer grubumuzdaki primer direnç oranını göstermektedir.

2) P-gp pozitifliği ile hastaların yaşı, cinsiyeti, klinik grup, tümörün yerleşim bölgesi ve histolojik tipi gibi özellikler arasında istatistiksel bir ilişki saptanmadı.

3) Kemoterapi yanıtı için yapılan ara değerlendirmede elde edilen yanıt ile P-gp pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki bulundu. P-gp pozitif grupta objektif yanıt (CR+PR) oranı (%25), P-gp negatif olanlara göre (%80) daha azdı ( $p=.03$ ).

4) Ara değerlendirmedeki yanıtın ve P-gp değerinin hastaların son durumlarını (yaşıyor/öldü) etkilediği saptandı. Ara değerlendirmede objektif yanıt elde edilen 10 hastanın sekizi (%80) yaşarken, yanıtızsız sekiz hastadan yalnız biri (%13) yaşamaktadır ( $p=.007$ ). P-gp pozitif olan sekiz hastanın ikisi (%25), P-gp negatif olan 14 hastanın ise on tanesi (%71) hayattadır ( $p=.04$ ).

5) Hastaların sağ kalımları incelendiğinde, sağ kalımı etkileyen tek klinik özelliğin ara değerlendirmedeki tedavi yanıtı olduğu saptandı. Yanıtlı grupta bir yıllık sağ kalım %90, yanıtızsızlarda ise %14 bulundu ( $p=.003$ ).

6) Hastaların P-gp sonuçları ile sağ kalımları arasındaki ilişki incelendiğinde, P-gp pozitif hastalarda iki yıllık sağ kalım %29, P-gp negatif grupta ise %83 olarak hesaplandı. Aradaki sayısal fark yüksek olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p=.1$ ). Ancak, P-gp değerinin sağ kalıma etkisini sağlıklı olarak yorumlayabilmek için hasta sayısı ve izlem sresinin artması gerekmektedir.

Bu alışma sonucunda, çocukluk ağı RMS'larında primer MDR'ın olabileceği, primer dirençli olgularda tedaviye ara yanıtın kötü olduğu saptandı. RMS'larda tedavi yanıtının prognozu etkileyen bir faktör olduğu bilindiğinden, primer ilaç direnci saptanan grupta prognozu iyileştirmek için daha değişik tedavi yöntemlerinin gündeme gelebileceği, ancak bu konuda daha çok sayıda çalışma yapılması gerektiği dşnld.

## KAYNAKLAR

- 1) Baldini N, Scotlandi K, B-Baradono G, Manara MC: Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. *N Engl J Med* 333:1380-5 (1995).
- 2) Balis FM, Holcenberg JS, Poplack DG: General principles of chemotherapy. In *Principles and practice of pediatric oncology*. Pizzo AP, Poplac DG (eds), Lippincot Co, Philadelphia pp202-203 (1993).
- 3) Bates SE, Shien CY, Tsokos M: Expression of a mdr1/P glycoprotein in human neuroblastoma. *Am J Pathol* 139:305 (1991).
- 4) Bell Dr, Gerlah JH, Kartner N: P-glycoprotein expression in ovarian cancer: Evidence for multidrug-resistance. *J Clin-Oncol* 3:311-5 (1985).
- 5) Biedler JL: Genetic aspects of multidrug resistance. *Cancer supp* 70:1799-1809 (1992).
- 6) Campos L, Guyotat D, Archimbaud E: Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood* 79:473 (1992).
- 7) Carulli G, Petrini M, Marini A: P-glycoprotein in acute non lymphoblastic leukemia and in the blastic crisis of myeloid leukemia. *N Engl J Med* 319:797 (1988).
- 8) Chan HSL, Haddad G, Thorner PS, DeBoer G, Lin YP, Ondrusek N, Yeger H, Ling V: P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N Engl J Med* 325:1608-14 (1991).
- 9) Chan HSL, Thorner PS, Haddad G: Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: Prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol* 8: 689 (1990).
- 10) Chan HSL, Thorner PS, Haddad G: Multidrug resistant phenotype in retinoblastoma correlates with P-glycoprotein expression. *Ophthalmology* 98:1425 (1991).
- 11) Chan HSL, DeBoer G, Thorner PS, Haddad G, Gallie BI, Ling VL: Multidrug resistance. In : *Hematology/oncology Clinics of North America*. Muggia FM, Speyer JL(eds), WB Saunders Co, Philadelphia pp383-410 (1994)
- 12) Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB: Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 80:2729-34 (1992).
- 13) Cordon-Cardo C, O'Brien JP: The multidrug resistance phenotype in human cancer. in: *Important advances in oncology*, DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). JB Lipincott Co, Philadelphia, 19-38 (1991).

- 14) Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Grauer LR, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR: Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:695-98 (1989).
- 15) Constine LS, Marcus RB, Halperin EC: The future of therapy for childhood rhabdomyosarcoma: Clues from molecular biology. *Int J Radiation Oncol Biol Phys* 32: 1245-9 (1995).
- 16) Cornelissen JJ, Sonneveld P, Schoester M, Raaijmakers HGP: MDR1 expression and response to vincristine, doxorubicine, and dexamethasone chemotherapy in multiple myeloma refractory to alkylating agents. *J Clin Oncol* 12:115-9 (1994).
- 17) Crist W, Gehan E, Ragab A, Dickman P, Donaldson S, Fryer C, Hammond D: The third intergroup rhabdomyosarcoma study. *J Clin Oncol* 13:610-30 (1995).
- 18) Crist WM, Kun LE: Common solid tumors of childhood. *N Eng J Med* 324:461-71 (1991).
- 19) Dalton WS: Overcoming the multidrug-resistant phenotype. In *Cancer Principles and Practice of Oncology*. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds), J.B. Lippincott Co, Philadelphia 2655-64 (1993).
- 20) Dalton WS, Grogan TM, Rybski JA: Immunohistochemical detection and quantitation of P-glycoprotein in multiple drug resistant human myeloma cells: Association with level of drug resistance and drug accumulation. *Blood* 73:747 (1989).
- 21) Deuchars KL, Ling V: P-glycoprotein and multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Semin Oncol* 16:156 (1989).
- 22) Mechanisms of drug resistance in human lung cancer cells. *Semin Oncol* 20:326-37 (1993).
- 23) Ebstein J, Xiao HQ, Oba BK: P-glycoprotein expression in plasma-cell myeloma is associated with resistance to VAD. *Blood* 74:913-17 (1989).
- 24) Favrot M, Combaret V, Goillet E: Expression of P-glycoprotein restricted to normal cells in neuroblastoma biopsies. *Br J Cancer* 64:233 (1991).
- 25) Fitzgerald D, Willingham MC, Cardarelli CO, Hamada H: A monoclonal antibody *Pseudomonas* toxin conjugate that specifically kills multidrug resistant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4288-92 (1987).
- 26) Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I: Expression of a multidrug resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:265-9 (1987).
- 27) Gaveriaux C, Boersch D, Boelsterli JJ, Bollinger P: Overcoming multidrug resistance in Chinese hamster ovary cells in vitro by cyclosporin A (Sandimmune) and non immunosuppressive derivatives. *Br J Cancer* 60:867-71 (1989).

- 28) Gerlach JH, Bell DR, Karakosis C: P-glycoprotein in human sarcoma: evidence for multidrug resistance. *J Clin Oncol* 5:1452-60 (1987).
- 29) Goasguen JE, Dossot J-M, Fardel O, Lee Mee F: Expression of the multidrug resistance-associated P-glycoprotein in 59 cases of de novo acute lymphoblastic leukemia: prognostic implications. *Blood* 81:2394-98 (1993).
- 30) Goldstein MN, Hamm K, Amrod E: Incorporation of tritiated actinomycin D into drug sensitive and drug resistance HeLa cells. *Science* 151: 1555-56 (1966).
- 31) Goldstein LJ, Fojo AT, Ueda K: Expression of the multidrug resistance, MDR1, gene in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 8:128 (1990).
- 32) Goldstein LJ, Ozols RF: Drug resistance: mechanism and clinical application. In: *Handbook of Chemotherapy in Clinical Oncology*. Cvitkovic E, Droz JP, Armand JP, Khoury S (eds), Sci Comm Int Ltd, 94-8 (1993).
- 33) Grogan TM, Spier CM, Salmon SE, Matzner M, Rybski J: P-glycoprotein expression in human plasma cell myeloma: correlation with prior chemotherapy. *Blood* 81:490-95 (1993).
- 34) Gruber A, Vitols S, Norgren S, Arenstrom I: Quantitative determination of *mdr1* gene expression in leukaemic cells from patients with acute leukaemia. *Br J Cancer* 66:266-72 (1992).
- 35) Hays DM, Lawrence W, Wharam M: Primary reexcision for patients with microscopic residual tumor following initial excision of sarcomas of trunk and extremity sites. *J Ped Surg* 24: 5-10 (1989).
- 36) Hijazi YM, Axiotis CA, Navarro S : Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors before and after chemotherapy. *Am J Clin Pathol* 102:61-67 (1994).
- 37) Horio M, Gottesman MM, Pastan I: ATP dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3580-3584 (1988).
- 38) Jones BL, Dalton W, Fisher GA, Sikic BI: Reversal of multidrug resistance to cancer chemotherapy. *Cancer* 72:3484-8 (1993).
- 39) Kartner Y, Evernden-Porelle D, Bradley G, Ling V: Detection of P-glycoprotein in multidrug resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature* 316:820-23 (1985).
- 40) Kutluk MT: Multidrug resistance in cancer chemotherapy. *European School of Oncology Tumor Biology Course Book* pp 3-25 (1995).
- 41) Kuttesch JF, Parham DM, Luo X, Meyer W H: P-Glycoprotein expression at diagnosis may not be a primary mechanism of therapeutic failure in childhood rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 14:886-900 (1996).

- 42) Kuwazuru Y, Yoshimura A, Hanada S, Ichikawa M, Saito T: Expression of multidrug transporters, P-glycoprotein, in chronic myelogenous leukemia cells in blast crisis. *Br J Haematol* 74:24-9 (1990).
- 43) Kuwazuru Y, Yoshimura A, Hanada S, Utsunomiya A, Makino TT: Expression of multidrug transporter, P-glycoprotein, in acute leukemia cells and correlation to clinical drug resistance. *Cancer* 66:868-73 (1990).
- 44) Licht T, Pastan I, Gottesman M, Herrmann F: P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in normal and neoplastic hematopoietic cells. *Ann Hematol* 69:159-171 (1994).
- 45) Ling V: P-glycoprotein and resistance to anticancer drugs. *Cancer* 69: 2603-9 (1992).
- 46) List AF, Spier CM, Greer J, Wolff S: Phase I/II trial of cyclosporine as a chemotherapy-resistance modifier in acute leukemia. *J Clin Oncol* 11:1652-60 (1993).
- 47) Lum BL, Fisher GA, Brophy NA, Yahanda AM: Clinical trials of modulation of multidrug resistance. *Cancer (Suppl)* 72:3502-14 (1993).
- 48) Ma DDF, Scurr RD, Davey RA: Detection of a multidrug resistant phenotype in acute non-lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1:135 (1987).
- 49) Marie JP, Zittoun R, Sikic BI: Multidrug resistance (mdr1) expression in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood* 78:586-92 (1991).
- 50) Marie JP, Brophy NA, Ehsan MN, Aihara Y, Mohamed NA: Expression of multidrug resistance gen mdr1 mRNA in a subset of normal bone marrow cells. *Br J Haematol* 81:141-52 (1992).
- 51) Maurer HM, Beltangady M, Gehan EA: The intergroup rhabdomyosarcoma study-I: A final report. *Cancer* 61:209-2 (1988).
- 52) Mechetner EB, Roninson LB: Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci-USA* 89:5824-28 (1992).
- 53) O'Meara A, Imamura A, Johnson P: Reactivity of P-glycoprotein monoclonal antibodies in childhood cancers. *Oncology* 49:203 (1992).
- 54) Pastan I, Gottesman M: Multipledrug resistance in human cancer. *N Engl J Med* 316:1388-93 (1987).
- 55) Pieters R, Hongo T, Loonen AH, Huismans DR, Broxterman HJ: Different types of non-P-glycoprotein mediated multidrug resistance in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Br J Cancer* 65:691-7 (1992).
- 56) Raney RB, Melvin T, Triche T: Rhabdomyosarcoma and the undifferentiated sarcomas. In *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. sPizzo AP, Poplack DG(eds), J.B. Lippincott Co, Philadelphia 769-94 (1993).

- 57) Ro J, Sahin A, Ro JY: Immunohistochemical analysis of P-glycoprotein expression correlated with chemotherapy resistance in locally advanced breast cancer. *Hum Pathol* 21:737 (1990).
- 58) Safa AH, Stern RK, Choi K, Agresti M: Molecular basis of preferential resistance to colchicine in multidrug-resistant human cells conferred by Gly-185--Val-185 substitution in P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7225-9 (1990).
- 59) Salmon SE, Soehnlen B, Dalton WS, Meltzer P: Effects of tumor necrosis factor on sensitive and multidrug-resistant human leukemia and myeloma cell lines. *Blood* 74:1723-27 (1989).
- 60) Salmon SE, Dalton WS, Grogan TM, Plezia P: Multidrug resistant myeloma: laboratory and clinical effects of verapamil as a chemosensitizer. *Blood* 78:44-50 (1991).
- 61) Sato H, Preisler H, Day R: MDR1 transcript levels as an indicator in resistant disease in acute myelogenous leukemia. *Br J Haematol* 75:340 (1990).
- 62) Schlaifer D, Laurent DG, Chittal S: Immunohistochemical detection of multidrug resistance associated P-glycoprotein in tumor and stromal cells of human cancers. *Br J Cancer* 62:177-82 (1990).
- 63) Scotto KW, Biedler JL, Melera PW: Amplification and expression of genes associated with multidrug resistance in mammalian cells. *Science* 232:751-5 (1986).
- 64) Shalinsky DR, Jekunen AP, Alcaraz JE, Christen RD, Kim S, Khatibi S, Howell SB: Regulation of initial vinblastine influx by P-glycoprotein. *Br J Cancer* 67:30-36 (1993).
- 65) Serra M, Scotlandi K, Manara MC, Maurici D, Benini S, Sarti M, Campanacci M, Baldini N: Analysis of P-glycoprotein expression in osteosarcoma. *Eur J Cancer* 31A,12:1988-2002 (1995).
- 66) Sikic BL: Modulation of multidrug resistance: at threshold (Editorial). *J Clin Oncol* 11:1629-35 (1993).
- 67) Sonneveld P, Durie BDM, Lokhorst HM, Marie JP: Modulation of multidrug resistant multipl myeloma by cyclosporine. *Lancet* 340:255-9 (1992).
- 68) Sonneveld P, Nooter K, Burghouts JT, Herweijer H: High expression of mdr3 multidrug resistance gene in advanced-stage chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 79:1496-1500 (1992).
- 69) Stein U, Wunderlich V, Haensch W, Schmidt-Peter P: Expression of mdr1 gene in bone and soft tissue sarcomas of adult patients. *Eur J Cancer* 29A:1979-81 (1993).
- 70) Tawa A, Inoune M, Ishiura S: Increased expression of the multidrug resistance gene in undifferentiated sarcoma. *Cancer* 66:1980-3 (1990).
- 71) Tishler DM, Weinberg KI, Sender LS, Nolte JA, Raffel C: Multidrug resistance gene expression in pediatric primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *J Neurosurg* 76:507-512 (1992).

72) Triche TJ: (Edit) Multiple-drug resistance in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors. *Am J Clin Pathol* 102:1-2 (1994).

73) Van der Valk P, Van Kalken CK, Ketelaars H: Distribution of multidrug resistance-associated P-gp in normal and neoplastic human tissues. *Ann Oncol* 1:56-64 (1990).

74) Vergier B, Cany L, Bonnet F, Robert J, Mascarel A, Coindre JM: Expression of MDR/1 glycoprotein in human sarcomas. *Br J Cancer* 68:1221-26 (1993).

75) Wignaendts LCD, van der Linden JC, van Diest PA: Prognostic importance of DNA flow cytometric variables in rhabdomyosarcoma. *J Clin Pathol* 46:948-52 (1993).

76) Weinstein RS, Kuszak JR, Kluskens LF: P-glycoproteins in pathology: The multidrug resistant gene family in humans. *Hum Pathol* 21:34 (1990).

77) Yahanda AM, Alder KM, Fisher GA, Brophy NA: Phase I trial of etoposide with cyclosporine as modulator of multidrug resistance. *J Clin Oncol* 10:1624-34 (1992).