

Hematolojik Malignitelere İlaç Direnç Mekanizmaları

Dr. Ferit AVCU

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Hematoloji Bilim Dalı, Ankara

Hematolojik malignitelere kemoterapi hala en etkili tedavi yöntemidir. Ancak kemoterapötiklerin kullanımı sırasında hastalık tekrarlayabilmekte ve bazen daha önce tedavide hiç uygulanmayan ilaçlara karşı bile bir direnç mekanizması gelişebilmektedir. Hematolojik malignitelere gözlenen bu çoklu ilaç direnci (MDR); hücre içi ilaç birikiminde azalma (ilacın hücre içine girişinde azalma veya hücre dışına atma işlevinde artış), ilaç-hedef ilişkisinde azalma, detoksifikasyon işlevinde artış veya ilaç dağılımında değişiklik şeklinde gözlenebilmektedir.

Hematolojik malignitelere ilaç direncinden sorumlu birçok mekanizma tanımlanmıştır. İlk defa 1976'da 170 kDa'luk hücre membran proteini olarak tanımlanan P-glikoprotein (P-gp) hücre içi ilaç birikimini azalttığı saptanmış ve bu artıştan yedinci kromozom üzerinde bulunan MDR-1 geninin fazla ifadesi (ekspresyonu) sorumlu tutulmuştur. Birçok kanser hücresi bu proteini taşımakla birlikte, daha sonra yapılan çalışmalarda sadece P-gp'nin sorumlu olmadığı, çoklu ilaç direnci sebebi bir protein ailesi olan ve ksenobiyotiklerin taşınmasında görevli ATP bağımlı taşıyıcı proteinlerin (ABC proteinleri) (ATP Binding Cassette Superfamily Transporters) sorumlu olduğu saptanmıştır. Şu ana kadar 30 farklı ATP bağımlı protein tanımlanmış ve dört alt büyük ve dört alt küçük grubu belirlenmiştir. Büyük grupların en önemlileri MRP/CFRT olup, dokuz protein çeşidi içermektedir. Diğer bir büyük grup MDR/TAP'in ise yedi protein çeşidi mevcuttur. ATP bağımlı taşıyıcı proteinler arasında P-gp, çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein ailesi (MRP 1-9) ve meme kanseri direnç proteini (BCRP) çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinlerdir. ATP bağımlı proteinler haricinde;

akciğer direnç proteini (LRP), deoksisitidin kinaz benzeri enzim modifikasyonları, apoptozisi indükleyen kemoterapötik etkinin inhibisyonu, sitostatik ilaçların hedef enzimlerinde mutasyonlar, p53 gen mutasyonu hematolojik malignitelere diğer ilaç direnç mekanizmaları olarak bilinmektedir.

P-glikoprotein (P-gp)

170 kDa'luk hücre membranında taşıyıcı protein olarak tanımlanan P-gp, yedinci kromozomdaki (7q21) MDR-1 geni tarafından kodlanmaktadır. P-gp enerjiye bağımlı olarak çalışır ve hücre içine giren ilacın dışarı pompalanmasını sağlayarak, hücre içi ilaç konsantrasyonunu azaltmaya çalışır. P-gp artışı ile hidrofobik olan doksorubisin, daunorubisin, etoposid, taxol, vinkristin, vinblastin gibi birçok kemoterapötik ilaca karşı direnç gelişebilmektedir. P-gp insanda birçok dokuda bulunmakla birlikte dağılımı nedeni ile normal fonksiyonları arasında bazı ipuçları bulunmaktadır. Taşıyıcı protein olması nedeni ile bazı küçük lipofilik moleküllerin yanında büyük kompleks yapıya sahip lipidleri, steroid hormonları, peptidleri taşıyabilmektedir. P-gp, endojen toksik bileşikler ve ksenobiyotiklere karşı hematopoetik sistemi korumaktadır.

Çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein ailesi (MRP 1-9)

MRP ailesi ilk defa 1992 yılında tanımlanmış olup, şu ana kadar dokuz MRP'i tanımlanmıştır. ATP bağımlı taşıyıcı proteinlerin şimdiye kadar bilinen en büyük protein grubudur. MRP'ler P-gp'den farklı olarak N-terminalinde TMD'ye ve Lo olmak üzere ilave bir yapısal farklılık gösterir.

MRP'ler organik anyonik taşıyıcılardır. Örneğin metotreksat gibi anyonik ilaçları ve asidik ligandlar ile konjuge olmuş glukronat, glutatyon, sulfat gibi ilaçları taşırlar. MRP-1, MRP-2 ve MRP-3 doğal organik ilaçlara karşı direnç geliştirir iken, MRP-4 nükleozid analoglarına karşı direnç oluşmasında rolü vardır.

MRP-1: 1992 yılında keşfedilen MRP-1, 16. (16p13.1) kromozom tarafından kodlanmaktadır ve 190 kDa büyüklüğündedir. MRP-1'in aşırı ekspresyonu sonucu vinka alkaloidleri, epipodofilotoksinler, doksorubisin, mitoksantrona karşı belirgin direnç oluşturmakta, daunorubisin ve epirubisine karşı da oldukça yüksek oranda direnç oluşturabilmektedir. İki ayrı mekanizma ile Glutatyonun MRP-1'e bağlı direnç oluşmasında rol oynamakta olup, ya MRP-1'in bir substratı gibi ilacı bağlayabilmekte veya ilaçlar MRP-1 tarafından glutatyon aracılıklı olarak taşınabilmektedir. MRP-1 ayrıca modifiye olmamış ksenobiyotiklerin taşınmasında da görev almakta ve sıklıkla bu işlem için glutatyona ihtiyaç göstermektedir.

MRP-2: 10. (10q23) kromozom tarafından kodlanmaktadır. Kanaliküler multispesifik organik anyon taşıyıcısı olarak da bilinen MRP-2, karaciğerden organik anyonların sekresyonunu sağlar. Eksikliğinde bilirubin glukronid salınımı gerçekleşemez (Dubin-Johnson sendromu). En çok fonksiyon gördüğü yerler karaciğer, böbrekler ve GİS'dir. Genellikle direnç mekanizmasında MRP-1 gibi rol oynarken, MRP-2 aşırı ekspresyonunda gözlenen direnç MRP-1 aşırı ekspresyonunda asla gözlenmez.

MRP-3: 1997 yılında keşfedilen MRP-3, 17. (17q21) kromozom tarafından kodlanmaktadır. MRP-1'in en fazla homologue (%58) olan proteindir. Organik anyonların taşınmasını sağlar. MRP-1 ve MRP-2'ye yapı olarak çok benzemesine rağmen, direnç mekanizmasında glutatyon aracılık etmez. En çok bulunduğu yerler karaciğer, pankreas, böbrek üstü bezleri, böbrekler ve GİS'dir. Karaciğerde organik anyonlarınkana salınımında ve safra tuzlarının uptake'inde rol oynar. Böbrek üstü bezlerindeki rolleri bilinmemektedir.

MRP-4: 13. (13q31) kromozom tarafından kodlanmaktadır. Nükleozid analoglarına karşı direnç oluşmasında rolü vardır. Ayrıca HIV ilaçlarına karşı da [azidotimidin monofosfat

ve 9-(2-fosfonilmetoksietil)adenin] direnç oluşmasında rol oynamaktadır.

MRP-5: 3. (3q27) kromozom tarafından kodlanmaktadır. MRP-4 gibi nükleozid analoglarına karşı direnç oluşmasında rolü vardır.

MRP-6: 16. (16p13.1) kromozom tarafından kodlanmaktadır. En çok karaciğer ve böbreklerden eksprese edilmektedir. Dirençli tümör hücrelerinde MRP-1 ile birlikte MRP-6'nın da aşırı ekspresyonu izlenmektedir.

MRP-7: 6. (6p21) kromozom tarafından kodlanmaktadır. Molekül yapısı MRP-1,MRP-2, MRP-3 ve MRP-6'ya çok benzemektedir. 6. kromozomun kısa kolunda kodlanan MRP-6, bu kromozomu glutatyon metabolizmasındaki genler ile paylaşmaktadır. Glutatyon S-konjugatları ile ilgili ilaçlara karşı birlikte direnç oluşturmaktadır.

MRP-8 ve MRP-9: 16. (16q12) kromozom tarafından kodlanmaktadır. 2001 yılında MRP ailesinin iki üyesi daha keşfedildi ve literatüre ABCC11 (MRP-8) ve ABCC12 (MRP-9) isimleri ile katıldı. Her ikisi de 16. (16q12) kromozom tarafından kodlanmaktadır. MRP-8'in %40'ı, MRP-9'un %42'si MRP-5 ile identiktir ve diğer MRP'lerden yapısal olarak daha küçüktür. Fonksiyonel olarak ta nükleozid analoglarına karşı direnç oluşmasında rol oynar ve bu özellikleri MRP-4 ve MRP-5'e benzer.

Meme kanseri direnç proteini (BCRP)

BCRP'de P-gp ve MRP'ler gibi ATP bağımlı taşıyıcı protein ailesinden olup, bu proteinin aşırı ekspresyonu hücre içi ilaç konsantrasyonunu azaltır ve dolaylı olarak ilaç direncine sebep olur. 4. (4q22) kromozom tarafından kodlanmaktadır. ABC protein ailesinden olduğu için ABCG2 olarak ta isimlendirilmiştir. Oral kullanılan ilaçların barsaklardan uptake'ini de azaltır. BCRP ekspresyonunda artış sonucu hematolojik malinite tedavisinde kullanılan metotreksat, mitoksantron, topoizomeraaz I inhibitörlerine karşı direnç oluşturmaktadır.

Akciğer direnç proteini (LRP)

İlk defa Scheper ve arkadaşları tarafından 1993 yılında çoklu ilaç direnci saptanan akciğer kanseri hücre dizisinde varlığı ispatlanan LRP, taşıyıcı proteinlerin bir üyesidir. Fakat ATP bağımlı taşıyıcı protein ailesinden değildir. 110 kDa ağırlığındadır ve 16. (16p11.2) kromozom tarafından kodlanmaktadır.

Diğer ilaç direnç mekanizmaları

Deoksisitidin kinaz benzeri enzim modifikasyonları: Sitozin arabinozid (Ara-C) hematolojik malinitelerde sıklıkla kullanılan, ancak hücre içine taşınmasında azalma ve hücre içinde eliminasyonunda artma nedeni ile sıklıkla direnç gelişen bir ilaçtır. Hücre içinde direnç Ara-C'nin eliminasyonunu sağlayan deoksisitidin kinaz ve sitidin deaminaz enzimlerinin aşırı artması nedeni ile gelişmektedir. Genellikle tedavide kullanım sonrası hematolojik malinite oluşturan hücrelerde bu enzimlerin aşırı artması sonucu veya bazen birincil tedavide bile direnç gözlenebilmektedir. Bu direnci kırabilmek için Ara-C'nin tedavi dozlarını çok yükseltmek gerekebilmektedir. Fludarabin, cladribin gibi nükleozid analoglarına karşı da benzer mekanizmalar ile direnç gelişebilmektedir. Fludarabin ve cladribin hücre içinde trifosfat hali ile sitotoksik etki göstermektedir. Deoksisitidin kinaz ve 5' nükleotidaz enzimleri fludarabin ve cladribini mono fosfat haline çevirerek inaktive etmektedir. Bu enzimlerin aşırı artışı, ilaçları hızla inaktive etmekte ve hücreleri dirençli hale getirmektedir.

Apoptozisi indükleyen kemoterapötik etkinin inhibisyonu: Programlanmış hücre ölümü olarak ta bilinen apoptozisi indükleyen bazı ilaçlar (arsenik trioksit, imexon gibi) mitokondrial membran potansiyel kaybı oluşturarak, glutasyon peroksidaz oluşumunu baskılayarak, serbest oksijen radikallerinin hücre içinde oluşumunu artırarak, sitozolde sitokrom-C'nin serbestleşmesine neden olarak apoptozisi indükleyemekte ve bu amaçla tedavide kullanılmaktadır. Bcl-2 ailesinde özellikle Bcl-2, Bcl-X_L olmak üzere anti-apoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu sonucunda bu ilaçlara karşı direnç gelişmektedir. 18. (18q21) tarafından kodlanan Bcl-2 lösemi/lenfomada (ALL, B-lenfoblastik lösemi/lenfoma ve diffüz büyük B hücreli lenfoma) ekspresyonu artarken, 20. (20q11) kromozom tarafından kodlanan Bcl-X_L'nin ise bazı solid tümörlerde ekspresyonu artmaktadır.

Bcl-2 ailesi anti-apoptotik veya pro-apoptotik rolleri olan bir protein ailesi olup, insanlarda 20 homologu tanımlanmış ve üç gruba ayrılmıştır.

1. grup: bu gruba Bcl-2 benzeri yaşam faktörleri de denir ve membran bağımlı pro-apoptotik proteinlerin yakalayıcılarıdır. Bu grupta Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, A1/Bfl-1, Boo/Diva/Bcl-B and Mcl-1 bulunmaktadır.

2. grup: Bax benzeri proteinleri içerir. Pro-apoptotik rolleri vardır. Bu gruptaki Bax ve Bak proteinleri Bcl-2 ve Bcl-x_L proteinlerinin anti-apoptotik etkilerini inhibe ederler.

3. grup: Bcl-2 ailesinin sadece BH3 bölgesini içeren pro-apoptotik proteinlerdir. Bu gruptaki Bid ve Bim proteinleri de Bcl-2 ve Bcl-x_L proteinlerinin antiapoptotik etkilerini inhibe ederler.

Sitostatik ilaçların hedef enzimlerinde

mutasyonlar: Tablo I'deki sitostatik ilaçların etki göstermesi için hedef enzimleri inhibe etmeleri gerekmektedir. Özellikle sitostatik ilaçların inhibisyon sağladığı enzimlerin yapısal bölgelerindeki mutasyonlar nedeni ile dirençli hale gelmeleri söz konusudur. Genellikle bu durumda daha yüksek doz ilaç uygulayarak bu direnç kırılmaya çalışılmaktadır.

Tablo I. Bazı sitostatik ilaçların hedef enzimleri

Hedef enzimler	Sitostatik ilaçlar
Dihidrofolat redüktaz	Metotreksat
Timidilat sentaz	5-FU
Ribonükleotid redüktaz	Hidroksiüre
Topoizomeraz I	Kamptotekin
Topoizomeraz II	Doksorubisin, Etoposid
Tubulin	Vinka alkaloidleri, Taksol

Hematolojik malinitelerde çoklu ilaç direncinin inhibisyonu

Çoklu ilaç direnç mekanizmalarının tanımlanması ile birlikte, oluşan direncin azaltılmasına yönelik çalışmalar da yoğunluk kazandı. Bu konuda özellikle anti MDR-1 oligonükleotidleri ile P-gp ekspresyonu ve fonksiyonunun azaltılması veya staurosporin gibi protein kinaz C inhibitörleri ile MDR-1'in ekspresyonunun azaltılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca P-gp'i bağlayan [³H]azidopin veya [³H]sitostatik ilaçlar ile oluşan çoklu ilaç direnci geri döndürülebilmektedir. Kalsiyum kanal blokerleri, kalmodulin inhibitörleri, immunosupressif ajanlar, kinolonlar, indol alkaloidleri, deterjanlar, steroidler, ve antiöstrojenler gibi birçok toksik olmayan ilaçlar ile P-gp'nin pompalama görevi inhibe edilerek sitostatik ilaçların hücre içinde birikme fonksiyonlarının geri döndürülebildiği gösterilmiş, bazıları tedavide kullanılmaya başlanmıştır. BCRP'i inhibe eden GF120918 and fumitremorgin-C molekülleri saptanmıştır.

Hematolojik malinitelerde çapraz direnç

Hematolojik malinitelerde uygulanan ilaçlara karşı özellikle ATP bağımlı taşıyıcı proteinler ile (sıklıkla P-gp ve MRP ailesi) olmak üzere birçok mekanizma sonucu ilaçlara karşı direnç gelişebilmektedir. Bu direnç, özellikle sitostatik ilacın uygulanması sonrası çoklu ilaç direncinden sorumlu proteinlerin aşırı ekspresyonu sonucu gelişmektedir. Son zamanlarda tedavide kullanılan bir sitostatik ilaca karşı gelişen direncin tedavide kullanılmayan başka bir sitostatik ajana karşıda geliştiği gösterilmiş, bu durum çapraz direnç olarak tanımlanmıştır. Türkiye’de Ural AU ve arkadaşlarının yaptığı *in vitro* çalışmada HL-60 hücre dizilerinde doksorubisine karşı geliştirilen akkiz ilaç direncinin MDR ve MRP-1 ekspresyonuna bağlı olduğu, bu hücre dizisinin aynı zamanda Ara-C’e karşı da çapraz direnç gösterdiği saptanmıştır. Bu direncin siklosporinle geriye döndürülebildiği de gösterilmiştir.

Çoklu ilaç direncinde gen tedavisinin yeri

Yüksek dozlarda sitostatik ilçlardan hematopoetik kök hücrelerin etkilenmesi, bu hücrelerin sitostatik ilaçlara karşı nasıl daha dirençli hale getirebiliriz sorusunu gündeme getirmiştir. Bu düşünce ile yapılan çalışmalarda çoklu ilaç direncinden sorumlu genlerin hematopoetik kök hücrelere aktarılması sağlanarak daha dirençli hücre özelliği kazandırılmıştır. Gen tedavisinde özellikle mutant dihidrofolat redüktaz geni ve MDR-1 geni aktarılarak hematopoetik kök hücrelerin yüksek doz sitostatik ilaçlara karşı dirençli hale gelmesi sağlanmıştır.

Kaynaklar

1. Jean-Pierre M. **Drug resistance in hematologic malignancies.** Curr Opin Oncol 2001; 13(6):463-469.
2. Hirose M, Hosoi E, Hamano S, Jalili A. Multidrug resistance in hematological malignancy. J Med Invest 2003; 50(3-4):126-135.
3. Covelli A. Modulation of multidrug resistance (MDR) in hematological malignancies. Ann Oncol 1999; 10 Suppl 6:53-59.
4. Sonneveld P. Multidrug resistance in haematological malignancies. J Intern Med 2000; 247:521-534.
5. Ross DD. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. Leukemia 2000; 14(3):467-473.
6. Leith C. Multidrug resistance in leukemia. Curr Opin Hematol 1998; 5(4):287-291.
7. Hipfner DR, Deeley RG, Cole SP. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. Biochim Biophys Acta 1999; 1461(2):359-376.
8. Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. Pharmacol Ther 2000; 85(3):217-229.
9. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. The multidrug resistance protein family. Biochim Biophys Acta. 1999;1461(2):347-357.
10. Breedveld P, Zelcer N, Pluim D, Sonmezer O, Tibben MM, Beijnen JH, Schinkel AH, van Tellingen O, Borst P, Schellens JH. Mechanism of the pharmacokinetic interaction between methotrexate and benzimidazoles: potential role for breast cancer resistance protein in clinical drug-drug interactions. Cancer Res. 2004; 64(16):5804-5811.
11. Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, Kaaijk P, Dalton WS, van Heijningen TH, van Kalken CK, Slovak ML, de Vries EG, van der Valk P. Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. Cancer Res. 1993; 53(7):1475-1479.
12. Kirkin V, Joos S, Zornig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis Biochimica et Biophysica Acta 2004; 1644:229-249.
13. Lotfi K, Juliusson G, Albertioni F. Pharmacological basis for cladribine resistance. Leuk Lymphoma. 2003; 44(10):1705-1712.
14. Rivoltini L, Colombo MP, Supino R, Ballinari D, Tsuruo T, Parmiani G. Modulation of multidrug resistance by verapamil or mdr1 anti-sense oligodeoxynucleotide does not change the high susceptibility to lymphokine-activated killers in mdr-resistant human carcinoma (LoVo) line. Int J Cancer. 1990; 46(4):727-732.
15. Banerjee D, Zhao SC, Li MX, Schweitzer BI, Mineishi S, Bertino JR. Gene therapy utilizing drug resistance genes: a review. Stem Cells. 1994; 12(4):378-385.