



DERLEME

BAŞ-BOYUN KANSERLERİNDE GEN TEDAVİSİ UYGULAMALARI

Dr. Lokman UZUN¹, Dr. Levent Bekir BEDER²

¹Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, KBB AD, Zonguldak, Türkiye

²Okayama Univ. School of Medicine and Dentistry, Otolaryngology and Head & Neck Surgery Depart., Okayama, Japonya

ÖZET

Gen tedavisi, geleneksel tedavilerle kıyaslandığında kanser tedavisinde yeni fırsatlar sunmaktadır. İnsanda ilk olarak kullanıma girdiği zamandan bu yana in vitro çalışmaların yanında 400'den fazla klinik uygulama gerçekleştirilmiştir. Gen tedavisi başlığı altında çeşitli protokoller ve farklı stratejiler kullanılmaktadır. Bu yazıda hem gen tedavisine ilişkin kavramlar, tedavide kullanılan stratejiler ana başlıklar halinde açıklanmaya çalışılacak hem de baş-boyun kanserlerindeki uygulamalar konusunda bilgiler sunulacaktır.

Anahtar Sözcükler: Gen Tedavi; Baş boyun; Kanser

GENE THERAPY IN HEAD AND NECK CANCERS

SUMMARY

Gene therapy offers new opportunities in cancer therapy other than traditional treatment options. In addition to in vitro studies, more than 400 clinical trials have been carried out in human subjects since its first application. Various protocols and different strategies do exist under the gene therapy heading. In these article concepts of gene therapy, treatment strategies will be explained under main headings as well as applications in head and neck cancers.

Keywords: Gene therapy; Head Neck; Cancer

GİRİŞ

Günümüzde genel olarak çeşitli kanser tipleri ile benzer şekilde baş-boyun bölgesi kanserlerinde de gen tedavisi ile ilgili klinik protokoller artış eğiliminde bulunmaktadır. Şüphesiz bu durumun en önemli nedenlerinden biri özellikle baş-boyun bölgesi kanserlerinde radyoterapi (RT), kemoterapi (KT), cerrahi veya bunların çeşitli kombinasyonlarından oluşan geleneksel tedavi protokollerinin sınırlarının az çok belirlenmiş olmasıdır. Tanıda giderek artan özgüllük ve duyarlılık ölçütlerine rağmen geleneksel tedavi protokolleri ile ulaşılan sınırlar beklenin çok altındadır. Genel olarak baş-boyun kanserlerinde kür ancak hastaların yarısında sağlanabilmektedir¹.

KT ve RT, hızla bölünen hücreleri hedef almaktadır. Tümör hücrelerinde ise her iki yönteme karşı da belirgin direnç gelişimi söz konusudur. Doz artırımına gidilmesi durumunda ise hem tümör hücrelerine yönelik duyarlılık azalmakta hem de sistemik toksisiteye bağlı ciddi sorunlar ortaya çıkmaktadır. Diğer taraftan baş-boyun bölgesinde tümör kitlesinin radikal rezeksiyonlarla tamamen çıkarılması bile operasyon sonrası dönemde lokal rekürrens, bölgesel rekürrens ve ikincil primer gelişme riskini tamamen ortadan kaldıramamaktadır.

İletişim kurulacak yazar: Dr. Lokman Uzun, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, KBB Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye, Tel: 0 372 261 01 69 Faks: 0 372 261 01 55 E-mail: luzun@lycos.com

Gönderilme tarihi: 15 Mayıs 2004, revizyon isteme tarihi : 03 Temmuz 2004, yayın için kabul edilme tarihi: 06 Temmuz 2004

Özellikle baş-boyun bölgesindeki kanserler için ortaya konulan “alan kanserleşmesi” kavramı cerrahi tedavi sonrası sık olarak ortaya çıkan rekürrens ve ikincil primerlerin açıklanmasında önem taşımaktadır. Bu konu üzerinde ilerideki bölümlerde daha ayrıntılı olarak durulacaktır.

Geleneksel yöntemlerdeki engellere karşılık moleküler biyoloji, genetik ve immünoloji alanında son yıllarda başdöndürücü hızdaki keşifler ve yenilikler, tümör gelişiminde moleküler düzeydeki yolların (pathway) belirlenmesi ile bir yandan kanser gelişimini gitgide aydınlatırken diğer yandan da bu yüksek birikimin klinik uygulamalara da aktarılması eğilimini doğurmuştur. Normalde erişkin vücut hücrelerinde çoğalma sıklığı bir kontrol altındadır: hücreler, G0 veya G1 olarak adlandırılan hücre siklusu fazlarında bölünmeden bulunmaktadır. Hücrenin bu fazlarda kalması, bölünme fazına geçmesi veya apoptoza uğraması p53 ve retinoblastoma geni (Rb) proteinleri ile adlandırılan iki ana yoldan gelen sinyaller ile yakından ilişkilidir. Bu yollarda bulunan proto-onkojen ve tümör baskılayıcı genlere ait protein ürünleri önemli rollere sahiptir. Bu genlerdeki mutasyon ve delesyonlar ile genin fonksiyon kaybına uğraması sonucu hücre çoğalması üzerindeki kontrolün kaybına yol açabilir. Gerçi normal hücreden tümör hücresine geçiş için bir çok gende mutasyonlar ve fonksiyon kayıpları gerekli olmakla birlikte defektli genlerden sadece bir tanesinin düzeltilmesi bile,



tümör ilerlemesinin durdurulmasında yeterli olabilmektedir.

Gen tedavisi nedir? Nasıl doğmuştur?

Gen tedavisi henüz deneysel aşamada olup, tedavide yaygın şekilde uygulamaya girmiş değildir. Tedavi yaklaşımında genel hedef, hastalığın genetik temeline kaynağında müdahale edilmesidir; doğal "wild" tip "allel"den elde edilen "transgenik DNA"nın hastalığın sebebi olan mutant "allel"i taşıyan hücrelere aktararak anormal durumun düzeltilmesi ya da daha basit olarak normal genin bozuk olan fonksiyonu düzeltme amacıyla hücreye aktarımıdır. Bu şekilde gen aktarımı yoluyla fenotipik düzelmenin sağlandığı uygulamalar hayvan deneylerinde başarı ile gerçekleştirilmektedir. İnsanda gen tedavisi uygulaması ilk defa 1990 yılında gerçekleştirilmiş ve günümüze kadar 5000'in üzerinde hastada 400'den fazla klinik tedavi protokolü uygulanmıştır.

İnsanda uygulanabilen gen tedavisinde olası 2 ana tip hücre bulunmaktadır, germ hücrelerine ve somatik hücrelere yönelik tedavi. Somatik gen tedavisi vücut (soma) hücrelerine odaklanır. Buradaki yaklaşımda somatik hücrelerin bir kısmına yönelik müdahale ile hastalıkta düzelmeye hedeflenir. Metot olarak önce defektif genotip taşıyan hastadan bazı hücreler alınır, klonlanarak çoğaltılmış olan "wild" tipdeki normal gen kopyaları bu hücrelere aktarılır. Son aşamada oluşan bu "transgenic" hücreler tekrar hasta vücuduna geri verilir. Buna karşılık germ hücreli gen tedavisinde ise sperm veya ovuma müdahale söz konusudur. Bu hücreler üzerinde yapılacak işlemlerle kalıtsal hastalıkların önüne geçilmesi gibi parlak bir sonuç beklentisi olsa da teknik zorlukların yanında ciddi etik problemleri de bünyesinde taşımaktadır. Bu nedenlerle germ hücrelerine yönelik yöntemin günümüzde pratikte kullanımı olmadığından, bu yazıda somatik hücrelere yönelik gen tedavisi üzerinde odaklanılacaktır.

Gen transferinde kullanılan metotlar:

Gen tedavisinde verimliliği belirleyen temel iki faktör bulunmaktadır; tedavi edici genin potansiyeli ve hedef hücreye genin ulaşma etkinliği. Bu nedenle gen potansiyeli ile ulaştırma etkinliğinin toplamı en üst düzeye çıkarıldığında klinik etkinlik te o denli yüksek olacaktır. Vektörün kan dolaşımına enjeksiyonundan sonra etkili olabilmesi için hem hedef tümör hücrelere ulaşabilmesi hem de uzun bir süre çeşitli dış etkilerden (immün saldırı, sekestrasyon, degradasyon) korunması gerekmektedir. Hedef tümöre ulaşmada "yüzey hedefleme" (surface targetting) özellikle adenovirusların taşıyıcı olarak kullanıldığı

durumlarda etkinliği büyük oranda artırmaktadır. İnsan epitelyal hücre adezyon molekülünün (EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule) mide ve özofagus kanser hücrelerinde normal hücrelere göre daha yüksek ekspresyon gösterdiği saptanmıştır. Sonuçta EpCAM molekülüne spesifik antikorları bulunduran virusların, mide ve özofagus hücrelerini daha spesifik olarak enfekte ettiği gösterilmiştir².

Günümüzde gen transferi amacıyla kullanılan yöntemler viral ve non-viral olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Klinik uygulamalarda kullanılan en önemli vektör (taşıyıcı) viruslar retrovirus, adenovirus, adeno-associated virus ve herpes viruslarıdır. Bununla birlikte sayılan virusların hiçbiri ideal gen tedavi sistemi için gerekli kriterlerin tümünü sağlayamamaktadır. Bu nedenle son yıllarda yarı-sentetik veya sentetik viral vektörler önem kazanmıştır. Viral olmayan tipteki transfer metotları arasında ise lipozom, protein-DNA kompleksi, kalsiyum-fosfat presipitasyonu, elektroporasyon, hücre içine enjeksiyon veya vektörsüz olarak DNA'nın enjeksiyonu bulunmaktadır³.

"bystander" etkisi:

Transfekte gen taşıyan vektör virus ile enfekte olan tümör hücrelerinin, çevrelerinde temasta oldukları 'virus ile transfekte olmamış tümör hücrelerinde' hücre ölümünü uyardıkları gösterilmiştir. Bu etkiye "bystander" etki adı verilmektedir ve bu etkiyi artırmak için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Vektörün tümör hücresine transferindeki düşük etkinlik sorunu "bystander" etki belli bir düzeye çıkarılabildiğinde aşılabilir. Bu yolla oluşan hücre ölümünde hücreler arasında toksik metabolitlerin alışverişi, anjiogenezin baskılanması ve ölen hücreden komşu hücrelere gönderilen sinyaller başlıca mekanizmalardır. Hücreler arası iletişimi artıran genetik materyaller yardımı ile bu etki daha da artırılabilir. Ayrıca hücre ölümü ile oluşan immün uyarı tümör hücrelerinin lokal ölümünün artmasına yardımcı olur.

Kanserde gen tedavisi stratejileri:

Kanser tedavisinde gen tedavisinin potansiyeli ve ideal sınırları, kanser oluşumu ve gelişimine ilişkin moleküler düzeydeki bilgilerle doğrudan orantılıdır. Önümüzdeki yıllarda, insan genomunda bulunan kanserle ilişkili genler mutasyon analizleri ve "knockout" analizleri ile belirlenecektir. İn-vivo ve in-vitro deneylerle elde edilen deneyimlerden gen tedavisinde en üst düzeyde etkinlik sağlayacak stratejiler geliştirilmiştir. Bu stratejiler dört ana başlık altında, özellikle baş-boyun bölgesi göz önüne alınarak incelenecektir (Tablo 1). Bu başlıklar hakkında daha ayrıntılı bilgi vermeye



geçmeden önce baş-boyun bölgesi kanserlerinin moleküler genetiği ve biyolojisi hakkında özet bir bilgi verilmesini faydalı buluyoruz.

1. Replasman gen tedavisi
 - Onkojen aktivasyonun inhibe edilmesi
 - Tümör baskılayıcı gen aktivasyonu
2. İmmünoterapi
3. İntihar gen tedavisi (genetik ön-ilaç aktivasyon tedavisi)
4. Tümörde anjiogenezin inhibe edilmesi

Tablo 1. Baş-Boyun Kanserlerinde Gen Tedavisi Stratejileri

Baş-Boyun Kanserlerinin Moleküler Biyolojisi ve Alan Kanserleşmesi Kavramı:

Baş-boyun kanserlerinin anlaşılmasında ve tanı-tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde “bölge kanserleşmesi” (field cancerization) önemli bir kavramdır. Bu kavram ilk olarak 1953’de Slaughter tarafından oral kanserlerle ilgili olarak ortaya atılmıştır. Geniş mukozal yüzeylerin sigara gibi kanserojenlere uzun süreli maruziyeti sonrasında çok sayıda ve birbirinden bağımsız prekanseröz ve kanseröz odakların gelişmesi olarak açıklanabilir⁴. Baş-boyun bölgesinde ağız boşluğu, orofarenks, larenks ve özofagus kanserlerinde bu kavram tanımlanmıştır. Normal hücreden kanser hücresine geçiş çeşitli genetik değişikliklerin biriktiği “çok basamaklı karsinogenezis (multistep carcinogenesis)” sürecidir.

Bu kompleks süreç çeşitli onkojenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunu içermektedir. Bu genlerdeki değişiklikler hücre siklusu ve apoptozis’i (programlı hücre ölümü) çeşitli düzeylerde etkileyerek normal hücreden kanser hücresine geçişe yol açmaktadırlar. Önce kök hücrelerden biri, bir veya bir kaç genetik değişiklik sonucu normal büyüme kontrolünü kaybeder ve komşu hücrelere göre daha fazla büyüme avantajı elde eder. Bu sayede bir tek kök hücre giderek çoğalıp bir klon haline dönüşür. Bu klon genişleyerek çevresindeki normal mukoza hücrelerinin yerini alır ve bir “bölge” haline gelir. Bu klonu oluşturan hücrelerin komşu normal hücrelere göre daha yüksek büyüme-gelişme kapasitesine sahip oluşu, bu sürecin esas itici gücünü oluşturmaktadır. Uzun süreli kanserojen maruziyetleri üst solunum ve sindirim sisteminin mukozal yüzeyinde bu şekilde çok sayıda birbirinden bağımsız bölgelerin oluşmasına zemin hazırlayabilir. Bu şekilde oluşan çeşitli klonlar yeni genetik değişikliklerin (genetic hit) eklenmesi ile farklı alt-klonlara dönüşebilirler. Her eklenen yeni genetik değişim hücreye kontrolsüz olarak büyümesi için daha büyük avantaj kazandırabilir. Böylece saatli bombayı andıran bir süreç içinde alt-klonlardan biri invaziv bir kanser

haline dönüşebilir. Hastada son dönüşümün gerçekleşebilmesi, etkilenen kök hücrelerin miktarı ve genetik değişikliklerin sayısı ile orantılıdır. Bu modelde iki kritik basamak söz konusudur: 1) Bir kök hücresinden bir bölgeyi kaplayan ve büyüme kontrolü olmayan bir grup hücrenin oluşması, 2) Bir bölgede kontrolsüz büyüyen klonla, invaziv gelişme ve metastaz gibi kanser özelliklerinden oluşan son transformasyonun ortaya çıkması.

Baş-boyun bölgesi, meme, deri ve akciğer kanserlerinin gelişiminde normal hücreden kök hücreye geçişte en önemli genetik değişiklik 17. kromozomun kısa kolunda bulunan p53 tümör baskılayıcı genindeki inaktivasyondur. Baş-boyun kanserlerinde mutasyona bağlı p53 inaktivasyonuna %40-70 oranında rastlanmaktadır⁵. Bu gendeki mutasyonlar karsinoma insitu, orta-ağır displazi gibi premalign bölgelerde ise %20 gibi yüksek oranlarda rastlanmaktadır⁶. p53 genindeki değişikliği takiben, 3p, 9p, 8p ve 18q kromozom bölgelerinde oluşan delesyon ve mutasyonlar, bu bölgelerde yerleşimli olası tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu sonucunu doğurmakta ve neticede daha hızla büyüyen alt-klonlar meydana gelmektedir. Bu bölgelerden 9. kromozomun kısa kolunda yerleşimli p16 (INK4) geninin baş-boyun kanserlerinde inaktivasyonu %50 düzeyinde bulunmaktadır⁷.

Diğer taraftan onkojenlerdeki aktivasyon daha az belirgindir. Baş-boyun kanserlerinde myc, ras, neu, bcl ve int onkojenlerinde anormal ekspresyon saptanmıştır⁸. Larenks kanserlerinde %25-35 düzeylerinde “Cyclin D1” ve epidermal büyüme faktör reseptöründe - epidermal growth factor receptor (EGFR) %25-35 düzeylerinde amplifikasyon rapor edilmiştir⁹. Özellikle 11. kromozomun uzun kolunda 11q13 bandında yerleşimli “Cyclin D1” proto-onkojeni hücre siklusunun önemli düzenleyicilerindedir. Tümör çevresindeki normal veya premalign özellikteki mukozada, bu genin amplifikasyonuna %70 oranında rastlanması nedeniyle premalign-malign geçişte önemli bir basamak olduğu iddia edilmektedir¹⁰.

Baş-boyun kanserlerinin genetik yapısı hakkında verilen bu özet bilgiden sonra şimdi gen tedavisinde kullanılan stratejiler baş-boyun kanserleri de göz önüne alınarak incelenecektir:

1. Replasman Gen Tedavisi - Hücre siklusu defektlerinin onarımı: onkojen inaktivasyonu, tümör baskılayıcı gen aktivasyonu.

i-) Onkojenlerin aktivasyonunun inhibe edilmesi

Onkojenlerin aktivasyonu çeşitli şekillerde bloke edilebilir. Hedef onkojene ait nükleotit dizisini



tamamlayıcı (complementary) DNA parçaları içeren bir vektör verilebilir. Örneğin onkojenin nükleotid dizisi ..GAATGGGCC.. şeklindeyseCTTACCCGG..... şeklinde DNA parçasını içeren bir vektör verilebilir. Bu DNA parçaları transkripsiyon olduğunda, ortaya çıkan “antisense” RNA, onkojene ait mRNA ile bağlanır ve bu şekilde oluşan RNA çift sarmalı ile translasyon-protein sentezi bloke edilmiş olur. Gen ekspresyonunun spesifik olarak inhibisyonu için onkojen mRNA’ sı ile tamamlayıcı özellikteki kısa oligodeoksiribonükleotid (ODN)’ ler de kullanılabilir. Bunlar da benzer şekilde RNA-protein sentezi aşamasında gen ekspresyonunu bloke ederler. ODN’ler onkojenin bulunduğu DNA çift sarmalındaki büyük oluklara bağlanarak üçlü bir sarmal yapısı oluşturur ve DNA’dan RNA’ nın sentez edildiği transkripsiyon safhasını bloke eder¹¹. Onkojen inaktivasyonunun en önemli dezavantajı bu yolla tümör hücrelerinin her zaman ortadan kaldırılamamasıdır. Bu nedenle tümörün baskılanması sağlamak için onkojene ait “antisense” moleküllerin devamlı olarak verilmesi gerekmektedir. Buna rağmen hücre kültürleri ve “xenograft”lerde yapılan çalışmalar erken safhada olmakla birlikte ümit verici gözükmektedir. Epidermal büyüme faktörü reseptör genine ait “antisense” gen tedavisi baş-boyun kanserlerine ait “xenotransplant”ları taşıyan farelerde uygulanmış ve tümöral yapıda büyümenin inhibe olduğu gösterilmiştir. Ayrıca EGFR genindeki inhibisyonun endotelial hücre gelişimi de baskıladığı gösterilmiştir¹². Aynı strateji “Cyclin D1” proto-onkojeni için baş-boyun kanserlerine ait hücre kültürlerinde uygulanmış ve in vitro ve in vivo olarak tümör gelişiminin azaldığı gösterilmiştir¹³.

ii-)Tümör baskılayıcı gen aktivasyonu:

Fonksiyonel p53 proteini eksik tümör hücrelerinde normal p53 ekspresyonunu yeniden inşa etmenin etkisi üzerine çeşitli dokulara ait hücre kültürlerinde geniş şekilde çalışılmıştır¹⁴.

p53 geni hücre siklusunda G1 kontrol noktasının regülasyonunda önemli bir rol oynar. Hücre DNA’sında hasar oluştuğunda p53 geni aktive olarak hücre çoğalma sistemini durdurur, böylece hem DNA’ da oluşan hasarın tamiri için zaman kazanılır hem de DNA’ daki hasarın çoğalma ile başka hücrelere geçmesi önlenmiş olur. Tamirin mümkün olmadığı durumlarda apoptozis tetiklenerek hücrenin ortadan kaldırılması sağlanır. Buna karşılık malign transformasyon gösteren hücrelerde sıklıkla rastlanan mutant tip p53 ise hücre siklusunu kontrol yeteneğini kaybettiğinden kontrolsüz şekilde ilerleyen hücre büyüme ve gelişimi ortaya çıkar.

Öncelikle baş-boyun kanserine ait hücre kültürlerinde adenovirus vektörü ile enfeksiyon sonrasında, p53 ekspresyonunda 10 kata yakın artış saptanmış ve buna paralel olarak da kanser hücrelerinde büyümenin durduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde in vivo olarak baş-boyun kanser kitlesini taşıyan farelerde, p53 genini taşıyan adenoviruslerin, peritümöral infiltrasyonunu takiben tümöral kitlede belirgin küçülme saptanmıştır. Daha sonra yapılan başka bir çalışmada da, kanser hücrelerinde p53 geni transferi ile gerçekleşen büyümenin durdurulmasında etkili mekanizmanın apoptozis olduğu da ortaya konulmuştur¹⁵. Apoptozisin uyarılması ve tümör hücrelerinin ayıklanması sayesinde sağlanan tümöral gelişim baskılanması, onkojenlerin inaktivasyonu ve hücre siklusunun durdurulmasına göre çok daha cazip bir yöntem olarak görünmektedir.

Fonksiyonel p53 geni ile enfekte hücreler ve enfekte olmayan hücreler birbirleri ile temas halinde yetiştirildiğinde, p53 negatif kanser hücrelerinde de %29 oranında büyümede inhibisyon saptanmıştır. Buna karşılık hücreler birlikte ancak birbirleri ile temasta olmadan kültür yapıldığında bu tür etkiye rastlanmamıştır. Bu çalışma da “bystander etki” nin p53’ ile ilişkisini ortaya koymaktadır¹⁶.

Baş-boyun kanserlerinde p53 dışında başka tümör baskılayıcı genlerin de gen tedavisindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmalardan birinde p21 (WAF1/CIP1) ile p53’ ün etkileri karşılaştırılmıştır: p21 geni taşıyan adenoviruslarla enfekte kanser hücrelerinde p53’ ün tersine büyümede duraklama gözlenmemiştir¹⁷. Buna karşılık başka bir çalışma da p16 ve p21 genlerinin kanser hücre kültürleri üzerindeki etkileri birlikte ve ayrı ayrı araştırılmıştır: her iki gen de ayrı ayrı büyümeyi inhibe ederken, birlikte enfekte edildiklerindeki etki aynı düzeyde kalmış sinerjistik veya aditif etkiye rastlanmamıştır⁹.

Baş-boyun bölgesine ait kanserlerde en sık rastlanan genetik değişikliklerden birisi de p16 (INK4) tümör baskılayıcı geninin inaktivasyonudur. Bu sebeple p16 geni, gen replasmanında ideal bir hedef olmuştur. p16 genini yüksek düzeyde üretebilecek şekilde dizayn edilen adenovirus (Ad5-p16) invitro olarak baş-boyun kanseri hücre kültürüne uygulandığında hücre büyümesinin %96’ya varan etkinlikte inhibe edilebildiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada “flow-cytometric” analizlerle de hücre siklusunun G1-S aralığında %90’ a varan düzeylerde duraklama olduğu tesbit edilmiştir¹⁸.

Son yıllarda fonksiyonel olarak birbirini tamamlayan tümör baskılayıcı genlerin birlikte verilmesi durumunda, apoptozisin uyarılmasında koopere şekilde çalışabildiği gösterilmiştir. Karaciğer



ve kolon kanserlerinde (p53 mutant veya düşük düzeyde), p53 ve p16'nin birlikte verilmesi durumunda sinerjistik etki elde edilmiştir. p16, bir diğer tümör baskılayıcı olan Rb üzerinden etkili olmaktadır, bu nedenle de Rb geninin sağlam olması gerekmektedir. Ancak bu çalışmada p16 ile p53'ün birlikte hangi mekanizma ile sinerjistik etki gösterebildiği tam anlaşılamamıştır¹⁹.

Tümör baskılayıcı gen aktivasyonunun kullanıldığı çeşitli klinik uygulamalar da bulunmaktadır. Rekürrent lokal-bölgesel metastazı bulunan ileri evre baş-boyun bölgesi kanserli 33 hastada intratümöral enjeksiyon şeklinde p53 geni taşıyan adenovirus uygulanmıştır. Klinik olarak değerlendirmesi yapılabilen 18 hastanın 9'unda belirgin klinik cevap alınmıştır. Hastalarda ciddi bir yan etki veya doz kısıtlayıcı toksisiteye rastlanmamıştır. Geleneksel tedavilere cevapsız 200 baş-boyun kanserli hastaya benzer yöntemle yapılan faz II bir çalışmada ise %10 tam veya kısmi cevap gözlenmiştir²⁰.

2. Tümöre karşı immün cevabın güçlendirilmesi (immünoterapi):

Kanser gen tedavisinde ilk kullanılan protokollerde hastadan taze olarak izole edilen tümör hücrelerinin sitokinlerle modifiye edilmesi söz konusudur. Baş-boyun kanserlerinde de bu amaçla IL-2 (sitokin; interlokin 2) kullanılmıştır: Aktive olmuş T lenfositleri tarafından üretilen IL-2 doğal öldürücü hücreleri ("natural killer": NK) ve T lenfositleri uyarmaktadır. Bu yöntem, fare modelinde tümörde gerilemeyi sağlamıştır. İnsanda yapılan uygulamalarda T lenfositleri ve NK hücrelerinde artış sağlanmıştır. Ancak sistemik uygulamanın multipl organ sistemlerinde ciddi toksisiteye yol açması nedeniyle son uygulamalarda intratümöral yol tercih edilmektedir. Ayrıca tümörde oluşan gerileme sınırlı ve kısa süreli olması nedeniyle sonuçlar beklenen düzeyde değildir. Buna ilaveten hastadan tümör hücrelerinin alınması ve sitokin genlerinin modifikasyonu için yeterli süre hücre kültüründe beslenmesi zaman gerektiren, zor ve pahalı bir işlemdir.

Günümüzde immünoterapinin önemli ilerleme yapması beklenen iki alan bulunmaktadır; tümörle ilişkili antijenlerin belirlenmesi ve antijen sunucu hücrelerin ("antigen presenting cell": APC) antitümör immün cevap oluşturmadaki merkezi özelliklerinin kullanılması. Kansere karşı gen tedavisi geliştirilmesinde en önemli basamaklardan birisi insan tümör hücrelerinden (genellikle melanoma) tümörle ilişkili antijenlerin klonlanmasıdır. Bu şekilde tümör hücreleri CD8+ veya CD4+ T

lenfositleri tarafından tanınabilmektedir²¹. Bu gelişme tümör hücrelerinde bulunan antijenlere karşı gelişecek T lenfosit cevabının artırılabilceği inancını moleküler açıdan da desteklemektedir. Bununla birlikte tümörlerin heterojen bir yapı göstermesi ve tümör hücrelerinin tümünde sadece bir antijenin dominant olarak bulunma şansının düşük olması nedeniyle birden fazla antijeni içeren "kokteyl" aşılama protokolleri kullanılmaktadır. Burada karşılaşılan bir diğer sorun da vücudun immün sisteminde antijenlere karşı gelişecek toleransın ortadan kaldırılmasıdır. Çünkü immün sistemde kendi antijenlerine karşı tolerans sık karşılaşılan bir durumdur. Çeşitli araştırmalar, immün toleransın yenilmesinde anahtar noktanın tümör antijeninin aktive APC hücrelerine aktarılması olduğunu göstermiştir. Sonuçta oluşan antitümör cevabın büyüklüğünü 3 ana kriter belirlemektedir: 1.migratuar APC hücrelerinin hedef tümör bölgesi ile karşılaşma, sonra da bölgesel lenf noduna dönmesi, 2.APC hücrelerinin tümör antijenlerini hücre içine alma ve işleme kapasitesi, 3. APC 'lerin hedefe spesifik T lenfositleri uyarma potansiyeli. Düşük düzeyde apoptozise giden tümör hücreleri APC'lerin bu üç fonksiyonunu aktive etmede yetersiz kalmaktadır. Buna karşılık APC fonksiyonunu uyaran başka tipde hücre ölüm şekilleri bulunmaktadır: hücre içeriğinin stromaya saçılması, hücredeki yabancı bir antijene bağlı ölüm ya da geniş çaplı apoptozis gelişimi.

Otoimmün hastalık gelişimi, immünojen tedavinin potansiyel bir riskini teşkil etmektedir. Tümöre karşı otoimmünojenin uyarılmasında kullanılan tümörle ilişkili antijenler (ekspresyon düzeyleri farklı olmakla birlikte) vücuttaki diğer doku ve hücrelerde de bulunabilir. Bu durumda, bu tür dokular da hedef olarak algılanarak yıkıma uğrayabilir.

3. "intihar" gen tedavisi (genetik "prodrug" aktivasyon tedavisi):

Bu tür tedavide, önce tümör hücresine gen yerleştirilir, daha sonra bu gene ait protein ürünü hastaya verilen bir ön ilacı (nontoxic "prodrug") toksik ürünlere çevirerek hücre ölümüne yol açar. Herpes simpleks virusu timidin kinaz (HSV-tk) gen tedavisi bu grupta ilk yapılan ve en çok araştırılan tipidir. Buradaki yaklaşımda tümör hücreleri HSV-tk geni ile modifiye edildikten sonra ön ilaç olarak gansiklovir verilir. HSV-tk enzimi gansikloviri fosforile ederek gansiklovirmonofosfata çevirir, bu ürün de normal hücrelerel enzimlerle gansiklovirtrifosfata çevrilir. Oluşan son ürün DNA polimerazı inhibe eder, DNA'ya bağlanarak zincirin sonlanmasına ve hücre ölümüne yol açar.



Gansiklovirifosfat, ön ilaç olan gansiklovirin tersine hücre zarını geçemediğinden hücre içinde hapis kalır. Baş-boyun kanserlerinde hayvan modeli üzerinde bu yöntem denenmiştir: tedavinin etkinliği ve tümörde gerilemeyi sağladığı gösterilmekle birlikte viral doz yüksek olduğunda HSV-tk geni uzak organlarda da saptanmıştır.

Bu grupta diğer bir yol da sitozin deaminaz geninin kullanımınıdır. Bu sistemde ön ilaç toksisitesi minimal olan 5-florositozin kullanılır. Bu ilaç daha sonra sitozin deaminaz enzimi ile toksisite düzeyi çok yüksek olan 5-Florourasil'e çevrilir. Bu yöntemin baş-boyun kanserlerinde de, hayvan çalışmaları ile tümörde gerileme ve tam kür sağladığı gösterilmiştir²².

İntihar gen tedavisinin solid tümörlerde kullanımı ile ilgili olarak başlangıçta şüpheler bulunmaktaydı. Çünkü vektörlerin hedef geni tümör hücrelerinin tümüne ulaştırması mümkün görünmüyordu. Bununla birlikte "hayvan modellerinde tümör hücrelerinin sadece %10'unun hedef geni taşımasına rağmen tümör regresyonunun gerçekleşmesi "bystander" etkinin de önemli bir rol oynadığını gösterdi. Başka bir hayvan çalışmasında iki ayrı bölgede gelişen baş-boyun kanserinden sadece birine HSV-tk geni transfer edilmesine rağmen her iki kanserin de regresyona uğradığı gösterildi. Bu çalışma da, lokal şekilde oluşan "bystander etki" dışında sistemik yolla da immün cevaba bağlı olarak "bystander etki" gelişebileceğini göstermektedir.

İntihar gen tedavisi ile ilgili olarak yukarıda belirtilen gelişmelere rağmen baş-boyun kanserleri için henüz insanda uygulama gerçekleştirilmemiştir, bu nedenle şimdilik diğer kanserlere ilişkin sonuçlar takip edilmektedir.

4. Antianjiyogenik gen tedavisi:

Sistemik olarak kullanılabilir hedefe spesifik vektörlerin yapımında çeşitli zorluklar bulunmaktadır. Buna alternatif bir yol; tümörün normal dokulardan farklı yapıdaki biyolojik yapılarının hedeflenmesi olabilir. Tümör dokusundaki büyümenin en önemli ayırt edici özelliklerinden biri anjiyogenezis yoluyla sağlanan yüksek düzeydeki kan akımıdır. Tümör hücreleri tarafında üretilen anjiyogenetik faktörler arasında vasküler endotelial büyüme faktörü – vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast büyüme faktörü, anjioproteinler bulunmaktadır. Diğer taraftan tümör hücrelerinin anjiyogenezisi inhibe eden faktörler de ürettiği gösterilmiştir. Bu inhibitörler arasında endostatin, anjiostatin, antitrombin bulunmaktadır. Bu iki grup arasındaki denge, tümörün anjiyogenezis özelliğini

belirlemektedir. Tümör kaynaklı anjiyogenezis inhibitörlerinin belirlenmesi tümöre spesifik antianjiyogenik tedavinin temelini oluşturmuştur. Bununla birlikte şu anki anti-anjiyogenik faktörler ile etkin şekilde antitümöral ve anjiostatik etki elde etmek zor görünmektedir. İleri evre kanser hastalarındaki endostatin ve anjiostatin uygulamalarında bir dereceye kadar klinik fayda sağlanmışsa da belirgin bir antitümöral etkinlik gözlenmemiştir. Anjiostatik bir ilacın antitümöral etki oluşturması birçok faktörle yakından ilişkili içindedir. Bunlar arasında tümörün anjiyogenez durumu, endotelin heterojenitesi, kullanılan ilacın potansiyeli ve biyokimyasal aktivitesi sayılabilir. Bu faktörler gözönüne alınarak antianjiyogenezis tedavisi tekli olarak değil ancak diğer gen tedavi stratejileri ile kombine olarak kullanımı daha etkili gözükmektedir. Bu amaçla baş-boyun kanserlerinde endostatin ile EGFR "antisense" gen tedavisi kombine edilerek yapılan bir çalışmada tümör gelişiminin tam olarak inhibe edildiği gösterilmiştir¹¹.

Gen tedavisinin geleceği:

Gen tedavisi uygulamalarında çeşitli sınırlamalar bulunmakla birlikte pratikte klinik kullanımının bulunduğu kanıtlanmıştır. p53 gen replasmanı ile ilgili klinik denemelerde elde edilen bilgiler ilerde daha etkili stratejiler oluşturma açısından ümit vericidir. Genetik materyalin direkt olarak tümör içine enjeksiyonunda hem toksisite azalmakta hem de mevcut tedavi yöntemleri ile birlikte kullanılabilir. Özellikle baş-boyun kanserlerinde intratümöral enjeksiyon kolay kullanılabilir bir yoldur.

Günümüzde gen tedavisi geleneksel tedavilerin yerini alacak düzeye henüz gelememiştir ancak KT ve RT ile kombine edildiğinde, mevcut tedavilerin etkinliğini artırmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. CA Cancer J Clin. 1999; 49(1):8-31, 1. (PMID: 10200775)
2. Heideman DA, Snijders PJ, Craanen ME, Bloemena E, Meijer CJ, Meuwissen SG, van Beusechem VW, Pinedo HM, Curiel DT, Haisma HJ, Gerritsen WR. Selective gene delivery toward gastric and esophageal adenocarcinoma cells via EpCAM-targeted adenoviral vectors. Cancer Gene Ther. 2001;8(5): 342-51. (PMID: 11477454)
3. Rochlitz CF. Gene therapy of cancer. Drugs Today (Barc). 2000 36(9): 619-29. (PMID: 12847567)
4. Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. Cancer Res. 2003 63(8):1727-30. (PMID: 12702551)



5. Nadal A, Cardesa A. Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2003; 442(1):1-7. (PMID: 12536308)
6. Sozzi G, Miozzo M, Donghi R, Pilotti S, Cariani CT, Pastorino U, Della Porta G, Pierotti MA. Deletions of 17p and p53 mutations in preneoplastic lesions of the lung. *Cancer Res.* 1992;52(21):6079-82. (PMID: 1394234)
7. Gleich LL, Salamone FN. Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control.* 2002 ;9(5):369-78. (PMID: 12410176)
8. Field JK, Spandidos DA, Stell PM, Vaughan ED, Evan GI, Moore JP. Elevated expression of the c-myc oncoprotein correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 1989 4(12):1463-8. (PMID: 2687767)
9. Mobley SR, Liu TJ, Hudson JM, Clayman GL. In vitro growth suppression by adenoviral transduction of p21 and p16 in squamous cell carcinoma of the head and neck: a research model for combination gene therapy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;124(1):88-92. (PMID: 9440786)
10. Izzo JG, Papadimitrakopoulou VA, Li XQ, Ibarguen H, Lee JS, Ro JY, El-Naggar A, Hong WK, Hittelman WN. Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene.* 1998;17(18):2313-22. (PMID: 9811462)
11. Helene C. Rational design of sequence-specific oncogene inhibitors based on antisense and antigene oligonucleotides. *Eur J Cancer.* 1991; 27(11):1466-71. (PMID: 1835863)
12. Li M, Ye C, Feng C, Riedel F, Liu X, Zeng Q, Grandis JR. Enhanced antiangiogenic therapy of squamous cell carcinoma by combined endostatin and epidermal growth factor receptor-antisense therapy. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(11):3570-8. (PMID: 12429648)
13. Nakashima T, Clayman GL. Antisense inhibition of cyclin D1 in human head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;126(8):957-61. (PMID: 10922227)
14. Nielsen LL, Maneval DC. P53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Cancer Gene Ther.* 1998;5(1):52-63. (PMID: 9476967)
15. Liu TJ, el-Naggar AK, McDonnell TJ, Steck KD, Wang M, Taylor DL, Clayman GL. Apoptosis induction mediated by wild-type p53 adenoviral gene transfer in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 1995;55(14):3117-22. (PMID: 7606733)
16. Frank DK, Frederick MJ, Liu TJ, Clayman GL. Bystander effect in the adenovirus-mediated wild-type p53 gene therapy model of human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 1998; 4(10):2521-8. (PMID: 9796986)
17. Clayman GL, Liu TJ, Overholt SM, Mobley SR, Wang M, Janot F, Goepfert H. Gene therapy for head and neck cancer. Comparing the tumor suppressor gene p53 and a cell cycle regulator WAF1/CIP1 (p21). *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996 122(5):489-93. (PMID: 8615965)
18. Rocco JW, Li D, Liggett WH Jr, Duan L, Saunders JK Jr, Sidransky D, O'Malley BW Jr. p16INK4A adenovirus-mediated gene therapy for human head and neck squamous cell cancer. *Clin Cancer Res.* 1998; 4(7):1697-704. (PMID: 9676844)
19. Lukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, Peters G, Bartek J. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature.* 1995 8;375(6531):503-6. (PMID: 7777060)
20. Goodwin WJ, Esser D, Clayman G, Nemunaitis J, Yver A, Dreiling L., et al Randomized Phase II study of intratumoral injection of two dosing schedules using a replication-deficient adenovirus carrying the P53 gene (AD5CMV-P53) in patient with recurrent/refractory head and neck cancer. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.,* 18: 445a 1999.
21. Boon T, van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med.* 1996;183(3):725-9. (PMID: 8642276)
22. Hamstra DA, Rice DJ, Fahmy S, Ross BD, Rehemtulla A. Enzyme/"prodrug" therapy for head and neck cancer using a catalytically superior cytosine deaminase. *Hum Gene Ther.* 1999;10(12):1993-2003. (PMID: 10466633)