

Apoptosis Üzerine Kanser Tedavisinde Kullanılan Bazı İlaçların Etkisi

Pınar (ASLAN) KOŞAR*, Nurten ÖZÇELİK**

* Biyolog, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
** Doç. Dr. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD, İSPARTA

ÖZET

Apoptosis doku, hücre miktarının normal regülasyonu için esas olan hücre ölümünün aktif bir şeklidir. Apoptosis insan HL-60 hücrelerinde pek çok fiziksel ve kimyasal uyarıcılarla indüklenebilir. Lösemi tedavisinde kullanılan ve alkaloid yapısında olan Harringtonine (HT) ve Homoharringtonine (HHT)'nin HL-60 hücrelerinde apoptosisi teşvik ettiği belirtilmektedir. Ayrıca HL-60 hücrelerinin DNA ekstraktları HT ve HHT ile muamele edildiğinde internükleosomal DNA degradesyonuna neden olmaktadır. HT ve HHT'nin HL-60 hücrelerinde apoptosisi uyarması yönündeki etkisi, belirtilen maddelerin aynı hücrelere sitotoksik etkileri ile paralellik göstermektedir. HT ve HHT'nin antitümör aktivitesi, bu maddelerin apoptosisi teşvik etmesinden kaynaklanmaktadır. Bazı çalışmalarda epipodophyllotoxins etoposid'in (VP-16) HL-60 hücrelerinde düşük dozlarda bile apoptosisi indüklediği bildirilmektedir. İnsanda akut myeloid lösemilerde (AML), HL-60 hücrelerinin süspansiyon kültürlerinde, 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine (ARA-C), mitoxantrone (MTN) ve paclitaksel (TXL) ilaçlarının, internükleozomal DNA fragmentasyonuna ve apoptosise neden oldukları saptanmıştır. Bunlara neden olan en düşük ilaç konsantrasyonunun DNA-reaktif olan MTN ve ARA-C'de düşük, ancak DNA interaktif olmayan TXL'de daha yüksek olduğu bildirilmektedir. İn vivo ve in-vitro yapılan pek çok benzer çalışma özellikle kemoterapotik ilaçların kanser tedavisinde daha rasyonel kullanılması gerektiğini gösterir.

Anahtar Kelimeler: Apoptosis, internükleozomal DNA fragmentasyonu, HL-60 hücreleri, lösemi.

ABSTRACT

EFFECT OF SOME DRUGS USED IN THE TREATMENT OF CANCER ON APOPTOSIS

Apoptosis is an active mode of cell death that is essential for normal regulation of tissue cell number. Apoptosis can be induced by various physical and chemical stimuli in the human HL-60 cell. It was reported that Harringtonine (HT) and Homoharringtonine (HHT) that used in treatment of leukemia and was alkaloid in made induce the apoptosis in HL-60 cells. Moreover, DNA extracted from HL-60 cells treated with HT and HHT showed the internucleosomal DNA degradation. The efficacy of HT and HHT in inducing apoptosis of HL-60 cells was found to parallel with their cytotoxic activity in HL-60 cells. The antitumor activity of HT and HHT is related to their apoptosis inducing activity. It was reported that epipodophyllotoxins etoposid (VP-16), also in low doses induce apoptosis in HL-60 cells in some studies. It was determined that 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine (Ara-c), mitoxantrone (MTN) and paclitaxel (TXL) cause internucleosomal DNA fragmentation and apoptosis in human acute myeloid leukemia HL-60 cells in suspension culture. It was reported that the threshold concentration caused these effects is lower for the DNA-interactive drugs MTN and Ara-C but higher for the non-DNA-interactive drug TXL. A lot of similar studies in-vivo and in-vitro show that chemotherapeutic drugs should use more rational in the treatment of cancer.

Key Words: Apoptosis, internucleosomal DNA fragmentation, HL-60 cells, leukemia.

GİRİŞ

Apoptosis hücre ölümünün fizyolojik bir şekli olarak tanımlanabilir. Farklı biyokimyasal ve moleküler aşamaları içeren apoptosis, aktif ve enerji bağımlı bir işlemdir (1). Programlı hücre ölümü genomik DNA'nın irreversible fragmentasyonuna neden olan bir dizi biyokimyasal ve morfolojik olaylara neden olur ve sonuçta hücre yok olur (1,2). Programlı hücre ölümünde, nükleozomal oligomerlerdeki DNA'nın fragmentasyonu, irreversible olarak hücrenin ölümünü başlatan, plasma ve internal membran permeabilitesinde değişiklik oluşmadan önce gerçekleşen erken bir olaydır. DNA fragmentasyonunun hücre nükleusu içinde var olan Ca^{2+} / Mg^{2+} bağımlı endonükleazın aktivasyonu ile meydana geldiği gösterilmiştir. Bu enzim nükleozomal unitler arasında lokalize olan yerlerde DNA'yı selektif olarak hidrolize eder. Böylece DNA fragmentasyonu gelişir (1,2). Bu nükleaz aktivasyonunun apoptotik prosede, intrasellüler serbest Ca^{2+} konsantrasyonunda erken başlayan, devamlı bir artış ile aktive olduğu düşünülür (3). Aktif olarak başlayan bu prosesi, plazma, mitokondri ve lizozomal membrandaki değişikliklerin, hücre nükleusunun disintegrasyonundan önce oluştuğu nekrotik hücre ölümünden ayırmak için, apoptosis ismi verilmiştir.

Apoptosisin morfolojik özellikleri hücrede hacim kaybı, komşu hücrelerden ayrılma, sitoplazmik yoğunlaşma ve nükleusun küçük fragmanlara ayrılması ile takip eden nükleer yoğunlaşmadır (4). Agaroz jel elektroforezi apoptotik hücrelerdeki internükleozomal DNA fragmentasyonunu tipik merdiven tarzında gösterir (5).

Bu selektif sellüler silinme işlemi pek çok fizyolojik ve patolojik olayda yaygın olarak gözlenir. Embriyolojik gelişme, adult dönemde organ homeostazisinin regülasyonu, morfogenezis, hücrel immünite, hormon bağımlı dokuların hormon yokluğunda involüsyonu gibi fizyolojik pek çok olayda rol oynar (6). Apoptosis son yıllarda kanser tedavisi için daha efektif terapotik modelleri üretmeye yönelik araştırmalarda sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Pek çok kemoterapotik ilacın insan myeloid lösemi hücrelerinde apoptozisi indüklediği görülmüştür. Bu nedenle kanser kemoterapisinde yeni odak, kemoterapotik ilaçların kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklediği ve enternükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olduğu optimal dozları ve tedavi sürelerini araştırmak-

tır (6). Bu derlemede özellikle lösemi tedavisinde kullanılan ilaçların apoptosis üzerine etkilerini değerlendirmeye çalıştık.

MATERYAL VE METOD

Apoptosisi araştırmada kullanılan HL-60 hücrelerinin hazırlanması.

HL-60 Hücrelerinin Morfolojisi

İnvitro çalışmalarda tedaviden sonra 50×10^3 hücre phosphate buffered saline (PBS) (pH=7.3) ile yıkanır ve aynı tamponla resüspanse edilir. Hücre süspansiyonlarının preperasyonları fikse edilir ve Wright boyası ile boyanır. Hücre morfolojisi ışık mikroskopu ile saptanır. Tüm preparatlarda 5 farklı alan en az 500 hücre saymak için rastgele seçilir. Apoptotik hücrelerin yüzdesi her deney için hesap edilir. Apoptotik hücreler morfolojik olarak küçülmüş, kromatin kondansasyonu ve membrana bağlı apoptotik cisimleri gösteren hücrelerdir.

Hücre Kültürünün Hazırlanması

HL-60 hücreleri, %5 CO_2 içeren nemli atmosferde $37^\circ C$ 'de, %10 fetal sıgır serumu ve antibiyotikler eklene RPMI 1640 besiyerinde süspansiyon kültürü olarak geliştirilir. Hücrelerin canlılığı onların %0.5 tripan mavisi boyasını dışlayabilme yeteneğiyle değerlendirilir. Kültürdeki hücre yoğunluğu bir otomatik sayım aracı ile saptanır. Yalnız düzgün büyüyen canlı hücreler çalışma için kullanılır. Hücreler 0.5×10^6 hücre/ml olacak şekilde besiyerine ekilir ve ayarlanan doz ve sürelerde ilaçlarla inkübe edilir.

Genomik DNA Ekstraksiyonu

Her ilaçla inkübasyon süresi sonunda 1×10^6 hücre, 5 dakika 1000 devirde santrifüj edilir. Sonra PBS ile (pH = 7.3) iki kez yıkanır ve pelet 1.5 ml'lik Eppendorf tüpünde toplanır. Hücreler dikkatli bir şekilde lizis tamponunda ($50 \mu l$) tekrar süspanse edilir ve 1 saat, $37^\circ C$ 'de inkübe edilir. Bunun üzerine $200 \mu l$ sindirim tamponu ilave edilerek içerik karıştırılır ve 3 saat $50^\circ C$ 'de tekrar inkübe edilir. Fenol (pH = 8) ve kloroform (1 = 1 v/v) karışımı eşit miktarda ilave edilerek 10 dakika karıştırılır ve 2 saat oda ısısında bekletilir. On dakika 3000 devirde santrifüjle yapışkan akvaz kısım ayrılır. Bu geniş çaplı pipet ucu ile başka bir tüpe aktarılır. Fenol/Kloroform ekstraksiyonu tekrar edilir. Akvaz kısım kloroform ile ekstrakte edilir. Fragmente olan DNA'nın çökeltisini arttırmak için 1 M $MgCl_2$ ilave edilir. DNA 15 dakika 3000 de-

virde santrifügasyonla pelet haline getirilir. Etanolle 2 kez yıkanır ve açık havada kurutulur. Pelet 10 mM TRIS-HCl'nin 25 ml'si içinde çözülür.

Agaroz Jel Elektroforezi

TAE (40 mM TRIS, 40 mM sodium acetate, 1.0 mM EDTA; pH 8.3) içinde molten agarozu 1.5 mm kalınlıkta bir jel yapmak için tablaya dökülür. Agaroz jel katılaştırılır ve oda ısısında 1 saat kurutulur. Sonra jel 1 x TAE içeren bir tüpe transfer edilir. Elektroferezis 1 saat 2 v/cm'de yapılır. Örnekler 3 dakika 60°C'de ısıtılır, buzlu suda hızla soğutulur ve jelin üzerine yüklenir. Örnek boya karışımının 0.2 volümü de DNA (< 1 µg)'nin karışımından hazırlanır. Örnekler buzlu ortamda 5.5 saat, 2v/cm'de elektroforezise verilir. Jel, arkada floresan görülünceye kadar yavaş sallamalarla 15 dakika süre ile ethidium bromid ile boyanır ve floresan bir UV (302 nm.) transilluminatör üzerinde gözlenir.

İLAÇLAR VE APOPTOSİS'E ETKİLERİ

Harringtonine (HT) ve Homoharringtonine (HHT): 1970'li yıllarda Cephalotaxus hainanensis ağacının kabuğundan izole edilen iki alkaloiddir. Bu ilaçların sıçan lösemi, lewis akciğer karsinomu ve B16 melanamuna karşı aktiviteye sahip olduğu bulundu. İlaçlar klinikte antilösemik ilaçlar olarak kullanılmaktadır. HT ve HHT'nin HL-60 hücrelerinde invitro koşullarda apoptosisi indüklediği gösterilmiştir (8). Aynı çalışmada HT'nin 2×10^{-7} mol. L-1 ve HHT'nin 10^{-7} mol.L-1 miktarlarının 4 saatte HL-60 hücrelerinde apoptosise sebep olabildikleri saptanmıştır. Çalışmada, agaroz jel elektroforezle bu ilaçlara maruz kalan HL-60 hücrelerinde internükleozomal DNA fragmentasyonunun tipik bulgusu olan DNA'da merdivenleşme yaygın olarak gösterilmiştir. Ayrıca yine apoptosisin diğer morfolojik bulguları da bu bulgu ile beraber izlenmiştir. HT ve HHT'nin apoptosisi indükleyici etkilerinin doz ve zamana, antitümör aktivitelerinin ise apoptosisi indükleyici etkilerine bağlı olduğu belirlenmiştir.

1-β D Arabino furanosylyctosine (Ara-C): Akut myeloid lösemisinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan etkili bir kemoterapotik ajandır. Ara-C hücre içinde DNA sentezinin bir potent inhibitörü olan sitozin arabinozid trifosfata fosforile olarak etkili olur (9,10). Ara-C'nin yüksek dozlarının AML hücrelerinde internükleozomal DNA fragmentasyonu ve apoptosisi indüklediği bildirilmektedir (9,10). Yapılan bir çalışmada belirtilen mad-

denin HL-60 hücrelerinde apoptosis oluşturuvcu etkisi araştırılmıştır (11). Bu çalışmada 1 µM Ara-C'nin 4 saatte apoptosisi indüklediği, ayrıca Ara-C'nin apoptosisi indükleyici etkisinin doz ve zaman bağımlı olduğu da gösterilmiştir.

Mitoxantrone (MTN) : Bir antrasenedion türevi olan MTN, umut verici bir antilösemik aktiviteye sahiptir. DNA interaktif bir ilaçtır. DNA helixinin baz çiftleri üzerine etkilidir. MTN topoisomeraz II enzimini inhibe eder (12). Son zamanlarda yüksek doz MTN'nin insan myeloid lösemi hücrelerinde apoptosisi indüklediği saptanmıştır (13). Yapılan başka bir çalışmada MTN'nin HL-60 hücrelerinde apoptosis yapıcı etkisi doz ve zamana bağımlı olarak araştırılmış ve 0.25 µM MTN'nin apoptosisi başlattığı gösterilmiştir (11). Doz 1 ve 50 µM'ye çıkarılınca apoptosis dozla paralel artış göstermiş, fakat dozu daha fazla arttırmak apoptosisi artırmamıştır. Süre çalışmasında apoptosisin 3 saatte oluştuğu ve süre artışına paralel olarak apoptosisin artış gösterdiği bulunmuştur.

Paktitaxel (TXL) : Antilösemik aktiviteye sahip olduğu gösterilen bir diterpenoid bitki ürünüdür. Nukleusta tubuller üzerine etkilidir. Hücrede sabit nonfonksiyonel mikrotübül bantlarına ve G2/M fazında hücre siklus büyüme arrestine neden olmaktadır (14). TXL DNA interaktif bir ajan olmasına rağmen insan lösemi hücrelerinde apoptosisi indüklediği gösterilmiştir (15). Yapılan bir çalışmada HL-60 hücrelerinde apoptosise etkisi zaman ve doza bağımlı araştırılmıştır (11). Belirtilen çalışmada 0.01 mM kadar küçük dozun 24 saatte apoptosisi artırdığı fakat bu artışın 0.5 ve 1 mM dozlarda istatistiki olarak anlamlı bulunmadığı bildirilmektedir. Aynı çalışmada apoptosisin 16 saatte başladığı ve zamanla arttığı fakat 48. saatten sonraki sürelerde artışın anlamlı olmadığı bulunmuştur.

Etoposide : Bu ilaç da etkisini DNA'da topoisomeraz II enzimini inhibe ederek gösterir. Bazı kanser türlerinin tedavisinde kullanılır. Küçük hücreli akciğer kanseri, germ hücreli tümörler ve akut myeloid lösemide (AML) özellikle etkilidir. Etoposidin de HL-60 hücrelerinde apoptosisi doza ve zamana bağımlı olarak indüklediği bildirilmektedir (16). Doz ve zaman artışı ile apoptosis oranının da arttığı gösterilmiştir.

Ayrıca adriamycin, daunorobucin, nitrojen mustart, cisplatin, camptothecin'in apoptosisi indüklediği saptanmıştır (16). Bu ilaçların da etkisi-

nin doz ve zamana bağımlı olduğu ve 4 saat içerisinde apoptosisi başlattıkları belirtilmektedir.

Günümüzde kanser kemoterapisinde sıklıkla pek çok kemoterapötik ilacın bir arada bulunduğu kemoterapi şemaları kullanılmakta böylece ilaçların etkinliği artırılmakta ve rezistans önlenmektedir. Bu tedavi protokollerinde sinerjik etki tek amaç olmasına rağmen farklı ilaçların birbirini antagonize ettiği de gösterilmiştir. Son zamanlarda bu amaçla ilaç kombinasyonlarının apoptosise üzerine etkinliği değerlendirilerek daha uygun kombinasyon arayışları yapılmaktadır. Holm B. ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, etoposidin apoptosise yapıcı etkisini (17) aclarubicinin belirgin olarak azalttığını göstermiştir. Bu bulgular, sıkça kullanılan etoposid-aclarubicin kombinasyonunun uygun bir kombinasyon olmadığını, hatta tek başına etoposidin daha etkili olduğunu göstermiştir.

SONUÇ

Yukarıda belirtildiği gibi antikanser ilaçların pek çoğu kanser hücrelerinde aktif ve gen bağımlı hücre ölümü olan apoptosise indüklediği için, kanser kemoterapisinde yeni hedef ilaçların apoptotik hücre ölümünü oluşturacak optimal dozunu ve süresini incelemek olmuştur. Bu çalışmalarda internükleozomal DNA fragmentasyonu agaroz jel elektroforezi ile doğru olarak saptanmıştır. Bulgular bu hücrelerin morfolojik incelenmesi ile doğrulanmıştır. Yukarıdaki sonuçlar kemoterapötik ilaçların apoptosise indüklemek için herbirinin bir eşik dozu ve süresinin olduğunu göstermektedir. Bu eşik değerler test edilen ilaca göre değişiklik göstermektedir. Yine herbir ilaç dozu ve süre artışı ile paralel olarak apoptosise miktarı artmaktadır. Son yıllarda yapılan bu çalışmalar yeni kemoterapi kombinasyonlarının uygun seçimine de yardımcı olacak bulgular ortaya koymuştur.

Bu sonuçların kanserlerin optimal tedavisi için ilaç rejimlerinin daha rasyonel düzenlenmesi gerekliliğini ve belirtilen ilaçların antikanser sitotoksik etkilerinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Wyllie Alt, Kerr JFR, Currie AR. *Cell death : The significance of apoptosis. Int Rev Cytol.* 1980; 68 : 251-306.
2. Cohen JJ, Duce RC. *Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. J Immunol.* 1994; 132: 38-42.
3. Mc Conkey DJ, Nikotera P, Hartzell P, Belloma G, Wyllie AH, Orrenius S. *Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration. Arch Biochem Biophys* 1989; 269: 365-70.
4. Wyllie Alt. *Apoptosis: Cell death in tissue regulation, J Pathol* 1987; 153: 313-8.
5. Compton MM. *A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. Cancer Metastasis Rev* 1992; 11: 105-10.
6. Ellis PA, Smith IE, Mc Carthy, Detre S, Salter J, Dowsett M. *Preoperative chemotherapy induces apoptosis in early breast cancer. Lancet* 1997; 349 (9055): 849.
7. Raff MC. *Social controls on cell survival and cell death. Nature* 1992; 356: 397-400.
8. Li L, Xia LJ, Jiang C, Han R. *Induction of apoptosis by harringtonine and homoharringtonine in HL-60 cells. Yao Hsueh Hsueh Pao.* 1994; 29: 667-72.
9. Kufe DW, Major PP, Egan AM, Beardsley GP. *Correlation of cytotoxicity with incorporation of ara-C into DNA, J. Biol Chem.* 1980; 255: 8997-9 .
10. Gunji H, Kharbanda S, Kufe D. *Induction of internucleosomal DNA fragmentation in human myeloid leukemia cells by 1-b-D-arabinofuranosylcytosine. Cancer Res.* 1991; 51: 741-6.
11. Ray S, Ponnathpur V, Huang Y, Tang C, Mahoney MF, Ibrado AM et al. *1-beta-D arabinofuranosylcytosine, mitoxantrone, and paclitaxel-induced apoptosis in HL-60 cells: Improved method for detection of internucleosomal DNA fragmentation. Cancer Chemother Pharmacol.* 1994; 34: 365-71.
12. Crespi MO, Ivanier SE, Genovese J, Baldi A, Mitoxantrone affects topoisomerase activities in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 136: 521-6.
13. Bhalla K, Ibrado AM, Tourkina A, Tang C, Grant S, Bullock G et al. *High dose mitoxantrone induces programmed cell death in human myeloid leukemia cells. Blood* 1993; 82: 3133-8.
14. Manfredi JJ, Horwitz SB. *Taxol an antimetabolic agent with a new mechanism of action. Pharmacol Ther.* 1984; 25: 83-7.
15. Bhalla K, Ibrado AM, Tourkina E, Tang C, Mahoney ME, Huang Y. *Taxol induces internucleosomal DNA fragmentation associated with programmed cell death in human myeloid leukemia cells. Leukemia* 1993; 7: 563-8.
16. Solany E, Bertranel K, Kohn KW, Pommier Y. *Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cell by DNA topoisomerase I and II inhibitors. Blood* 1993; 81: 1359-64.
17. Holm B, Jensen PB, Sehested M, Hansen HH. *In vivo inhibition of etoposide-mediated apoptosis, toxicity, and antitumor effect by the topoisomerase II-uncoupling anthracycline aclarubicin. Cancer Chemother Pharmacol* 1994; 34: 503-8.