

Bortezomib ve C vitamini Kombinasyonunun HL-60 Akut Promyelositik Lösemi Hücrelerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

Evaluation of the Effect of Bortezomib and Vitamin C Combination in HL-60 Acute Promyelocytic Leukemia Cells

Abdullah TAŞKIN ¹ ¹Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Şanlıurfa, TÜRKİYE

Öz

Amaç: C vitamini, tedaviye bağlı yan etkileri azaltma ve kanser hücrelerinin kemoterapötik ajanlara duyarlılığını arttırmak için farklı kanser tedavilerinde kullanılmaktadır. Bunun yanında C vitamininin serbest radikal süpürücü özelliği, inhibitör etkisi ve oksidatif stresi indüklemeye rolü tedavilerin etkinliğini değiştirebilmektedir. Bu çalışmada lösemi tedavisinde kemoterapötik-sitotoksik ajan olarak kullanılan Bortezomib ve C vitamininin ve bunların kombinasyonlarının HL-60 akut promyelositik lösemi hücrelerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Materyal ve metod: HL-60 hücreleri, Bortezomib (1-100 nM), C vitamini (1-100 µM) konsantrasyonları ve bunların kombinasyonları ile 24 saat inkübe edildi. Bortezomib ve C vitamininin tekli konsantrasyonları ve bunların kombinasyonunun sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle, genotoksik etkiler Comet assay yöntemiyle ve intraselüler reaktif oksijen türleri (ROS) düzeyi DCFH-DA floresan prob yöntemiyle analiz edildi.

Bulgular: HL-60 hücrelerinde Bortezomib konsantrasyonla ilişkili olarak sitotoksik ve genotoksik etkiler oluşturduğu (p<0.001), C vitamininin ise (100 µM hariç) sitotoksik ve genotoksik etki oluşturmadığı bulundu (p>0.05). Bortezomib+C vitamini kombinasyonlarında, yüksek C vitamini konsantrasyonları içeren kombinasyonların daha yüksek sitotoksik, genotoksik etkiler oluşturduğu ve hücre içi ROS seviyelerini artırdığı bulundu (p<0.001). Ancak bu etkiler bortezomib tekli konsantrasyonlarda uygulandığında elde edilen sitotoksik ve genotoksik etkiler kadar güçlü değildi.

Sonuç: HL-60 akut promyelositik lösemi hücrelerinde Bortezomib tekli uygulanan konsantrasyonlarına karşılık Bortezomib+C vitamini kombinasyonu daha az sitotoksikite, genotoksikite ve hücre içi ROS oluşumuna sebep olmuştur. C vitamininin bu potansiyel etkileri kanser tedavisinde göz önünde bulundurulmalıdır. Bu sonuçların farklı lösemi hücre hatları, *in vivo* ve prelinik çalışmalarla desteklenmesi lösemi tedavisinde onkolojik etkinliği artırmaya yardımcı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Bortezomib, C vitamini, Sitotoksikite, Genotoksikite, Hücre içi ROS

Abstract

Background: Vitamin C is used in different cancer treatments to reduce treatment-related side effects and increase the sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents. In addition, the free radical scavenging property of vitamin C, its inhibitory effect and its role in inducing oxidative stress may change the effectiveness of treatments. In this study, it was aimed to investigate the effects of Bortezomib, vitamin C, and their combinations which are used as chemotherapeutic-cytotoxic agents in the treatment of leukemia, on HL-60 acute promyelocytic leukemia cells.

Materials and Methods: HL-60 cells were incubated with Bortezomib (1-100 nM), vitamin C (1-100 µM) concentrations and their combinations for 24 hours. Single concentrations of bortezomib and vitamin C and the cytotoxic effects of their combination were analyzed by the MTT method, the genotoxic effects were analyzed by the Comet assay method, and the intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were analyzed by the DCFH-DA fluorescent probe method.

Results: Bortezomib was found to have cytotoxic and genotoxic effects in relation to concentration in HL-60 cells (p<0.001), while vitamin C (except 100 µM) did not produce cytotoxic and genotoxic effects (p>0.05). In bortezomib+vitamin C combinations, higher vitamin C concentrations were found to produce higher cytotoxic, genotoxic effects and increase intracellular ROS levels (p<0.001). However, these effects were not as strong as the cytotoxic and genotoxic effects obtained when bortezomib was administered at single concentrations.

Conclusions: Compared to the single-administered concentrations effects of Bortezomib in HL-60 acute promyelocytic leukemia cells, the combination of Bortezomib+vitamin C resulted in less cytotoxicity, genotoxicity and intracellular ROS generation. These potential effects of vitamin C should be considered in cancer treatment. Supporting these results with different leukemia cell lines, *in vivo* and preclinical studies may help to increase the oncological efficacy in leukemia treatment.

Key Words: Bortezomib, Vitamin C, Cytotoxicity, Genotoxicity, Intracellular ROS

Sorumlu Yazar/Corresponding Author

Dr. Abdullah TAŞKIN

Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Haliliye, 63300, Şanlıurfa, TÜRKİYE

E-mail: abdullahtaskin52@harran.edu.tr

Geliş tarihi / Received: 13.08.2023

Kabul tarihi / Accepted: 28.08.2023

DOI: 10.35440/hutfd.1342256

Giriş

Antioksidan diyet takviyeleri, fenolik bileşikler, meyve ve sebzelerde bulunan doğal polifenoller, N-asetilsistein, E vitamini ve C vitamini gibi antioksidan ilaç formlarının konvansiyonel kemoterapi ve radyasyon tedavisi sırasında artan kullanımı, bunların tümör hücreleri ve tedaviler üzerindeki potansiyel etkilerine ilişkin endişeleri de beraberinde getirmiştir (1,2). Antioksidanlar, tedaviye bağlı yan etkileri azaltma ve kanser hücrelerinin kemoterapötik ajanlara duyarlılığını arttırmalarına karşılık serbest radikal süpürücü özellikleri, inhibitör etkileri ve oksidatif stres indüklenmesini bozarak tedavilerin etkinliğini azaltabilirler (3,4).

C vitamini, naturapatik tıp uygulayıcıları ve bütünleştirici onkoloji sağlık hizmeti profesyonelleri tarafından kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (5). L-askorbik asit olarak da bilinen C vitamini, birçok meyve ve sebzede doğal olarak bulunan ve güçlü antioksidan aktivitesi ile yaygın olarak bilinen temel mikro besindir (6). Kanser tedavisinde C vitamininin monoterapi, adjuvan veya kemoterapötik ajanlarla birlikte kombinasyon tedavisi olarak kullanımı tartışmalı bir geçmişe sahiptir (6,7). Öncelikle C vitamininin kanser hücre hatlarında sitotoksik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (8,9). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda, yüksek doz C vitamininin geleneksel anti-kanser ilaçlar ile birleştirilmesinin, çeşitli kanser hücre dizileri modellerinde daha yüksek sitotoksitasyonu teşvik ettiği gösterilmiştir (10,11). C vitamininin anti-kanserojenik etkisi; seçici pro-oksidan potansiyeli, epigenetik faktörleri hedeflemesi, proapoptotik özelliği, immün sistemdeki farklı sitokinlerin ekspresyonunu düzenlemesi ve anti-tümör bağışıklık tepkisinin düzenlenmesindeki potansiyel rolü ile ilişkilendirilmiştir (6,11,12). İn vitro kanıtlar, C vitamininin düşük konsantrasyonlarda antioksidan olarak işlev gördüğünü, yüksek konsantrasyonlarda ise pro-oksidan-antikanser etkilerinin olduğunu göstermektedir (9). Antikanser ve antioksidan aktiviteleri nedeniyle bugüne kadar çeşitli C vitamini analogları üretilmiştir (12). Son yirmi yıldır anti-kanser ajanı olarak, olağanüstü bir yükseliş, düşüş ve yeniden ortaya çıkışa sahip olmuştur. Özellikle yüksek doz intravas-küler C vitamini uygulamasının sonuçları umut verici olmuştur (8). Bunlara karşılık, C vitamininin bazı kanser türlerindeki farmakokinetiği, kemoterapötik ajanların etkilerini bloke eden ilaç etkileşimleri, antioksidan özelliğinden dolayı serbest radikal süpürücü özelliği, antiapoptotik etkileri ve proteozom inhibitörlerini bloke etmesi terapötik spektrumunu daraltmakta, anti-kanserojenik belirsizliğini sürdürmektedir (13,14).

Ubikitin-proteozom sistemi, protein yıkımını kontrol eden başlıca proteolitik sistemdir ve ökaryotik hücrelerde DNA onarımı, stres tepkileri ve hücre proliferasyonu gibi birçok hücrel süreçleri düzenler. Bu özelliklerinden dolayı proteozomlar kanser başta olmak üzere birçok hastalıkta temel hedef haline gelmiştir (15). Bortezomib, multipl miyelom ve manto hücreli lenfoma ve hematolojik malignitelerin tedavisinde proteozom inhibitörü olarak kullanılan ilk ilaçtır (16). Kanserde bortezomib aracılı hücre ölümünün, intrinsik apoptotik mitokondriyal yol, ekstrinsik ölüm reseptör yolu

ve endoplazmik retikulum stres yanıt yolu dahil olmak üzere birçok metabolik yol aracılığıyla yüksek apoptozdan kaynaklandığı gösterilmiştir (17). Bazı prelinik çalışmalar, kemoterapötik duyarlılık ve kemoterapi direncinin üstesinden gelme potansiyelinden dolayı bortezomibi güvenilir terapötik ajan olarak tanımlamışlardır (15,18). Bununla birlikte yüksek yan etki insidansı, sınırlı doz, düşük suda çözünürlük, hızlı klirens ve ilaç direnci bortezomibin önemli kısıtlılıklarından (19). Ek olarak, bortezomibin farklı kanser ajanları ile sinerjistik etkilerine (20), karşılık özellikle C vitamini ile kombinasyonunda antikanser etkilerini inhibe ettiğini gösteren çalışmalar (7,21) bortezomib tedavisinde C vitamininin klinik önemini tartışmalı hale getirmiştir.

Akut ve kronik lösemilerde bortezomibin sitotoksik etkileri rapor edilmiştir (22). Bortezomib gibi C vitamininin de akut lösemilerde farklı ajanlarla kombinasyon halinde kullanımın sinerjistik ve aditif etkileri (23) ve ayrıca kemoterapötik etkileri ortadan kaldıran inhibitör etkileri de tanımlanmıştır (13). Bortezomib+C vitamini kombinasyonunun skuamöz hücreli karsinomda (21) ve *in vitro/in vivo* multipl myeloma (13) kanserindeki antagonistik etkileri gösterilmiş, daha başarılı kemoterapötik tedaviler için öneriler sunulmuştur. Akut myeloid lösemilerde proteozom inhibitörü bortezomib ve C vitamininin monoterapötik etkileri gösterilmiş, kombinasyon halindeki terapötik etkileri açık değildir. Bu çalışmada HL-60 akut promyelositik lösemi hücre hattında bortezomib+C vitamini kombinasyonunun etkileri araştırılmıştır.

Materyal ve Metod

Kimyasallar, Reaktifler ve Analiz Kitleri

Bortezomib Cayman kimyasaldan (Ann Arbor, MI, USA), vitamin C, dimetil sülfoksit, etidium bromit, low-melting agaroz, normal melting agaroz, trypan blue, MTT reaktifi ve tampon çözeltilerde kullanılan tüm kimyasallar Sigma kimyasaldan (St. Louis, MO, USA) temin edildi. Deneylerde kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktaydı. RPMI-1640 hücre kültür medyumunu ve fetal bovin serum (FBS) HyClone Laboratories Inc. (Logan, UT, USA), antibiyotikler (100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin) Gibco Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA) firmasından temin edildi. DCFDA / H₂ DCFDA intraselüler ROS ölçüm kiti Abcam (Cambridge, MA, USA)'dan temin edildi.

Hücre Kültürü ve Test Solüsyonları

HL-60 insan akut promyelositik lösemi kanser hücreleri daha önceki çalışmalarımızda kullandığımız pasaj sayısı bilinen stoklarımızdan elde edildi. Hücreler, %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ile desteklenmiş RPMI 1640 büyüme medyumunda, %95 nem, 37 °C ve %5 CO₂'de karbondioksit inkübatöründe kültüre edildi. Hücreler 25-75 cm² kültür flasklarına ekilerek canlılıklarının devamı sağlandı. Deneylerden önce hücre canlılığı tripan mavisi ile kontrol edildi. Hücre canlılığı %95 ve üzerindeki kültürler çalışmalara dahil edildi. Sitotoksitite analizleri için bortezomib (22) ve C vitamini (2) konsantrasyonları hazırlandı. DMSO içinde çözödüren 10

μM bortezomib stok çözeltisinden bortezomib konsantrasyonları (1, 5, 10, 25, 50, 100 nM) hazırlandı. PBS içerisinde çözdürülen C vitamini çözeltisinden ise 1, 5, 10, 25, 50, 100 μM konsantrasyonlar hazırlandı. Hücre kültürü ortamındaki nihai DMSO konsantrasyonu % 0.1'di. % 0.1 DMSO içeren hücreler negatif kontrol olarak kullanıldı.

Sitotoksikite Analizi

Bortezomib, C vitamini konsantrasyonları ve Bortezomib+C vitamini kombinasyonlarının HL-60 hücresindeki sitotoksik etkisi MTT testi ile analiz edildi. Farklı konsantrasyonlardaki bortezomib (1-100 nM) ve C vitamini (1-100 μM) konsantrasyonları, 96 kuyucuklu mikropalakada, her kuyucukta $\sim 1.5 \times 10^4 / 100 \mu\text{L}$ HL-60 hücreleri üzerine eklendi, 24 saat, 37 °C'de, %5 CO₂ içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon periyodunun tamamlanmasından sonra her kuyucuğa 10 μL MTT reaktifi (5 mg/mL) eklendi ve 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücre süspansiyonu kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Kuyucuklardaki formazan kristallerini çözmek için her kuyucuğa 100 μL DMSO eklendi ve mikropalaka okuyucuda (Varioskan™ LUX; ThermoFisher Scientific) 570 nm'de optik dansiteler ölçüldü. Test solüsyonlarının sitotoksikite sonuçları kontrol kuyucuklarına göre % nispi canlılık olarak hesaplandı. Bortezomibin IC₅₀ değeri Graphpad Prism 8 programı (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) ile hesaplandı. Bortezomib ve C vitamini konsantrasyonlarının sitotoksik etkisi 3 farklı zamanda yapılan deneylerle belirlendi.

Genotoksikite Analizi (Comet Assay Testi)

HL-60 hücrelerinde Bortezomib ve C vitamini kombinasyonunun genotoksikitesi (DNA hasarı) alkali tek hücreli jel elektroforezi (comet assay) yöntemi ile analiz edildi. 24 kuyucuklu mikropalakada, her kuyucukta $\sim 1.5 \times 10^5 / \text{mL}$ HL-60 hücreleri üzerine bortezomib (1-100 nM), C vitamini (1-100 μM) konsantrasyonları ve Bortezomib+C vitamini kombinasyonları eklendi. Mikropalaka, 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. %0,1 DMSO içeren hücreler negatif kontrol olarak, 100 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ içeren hücreler pozitif kontrol olarak kabul edildi. İnkübasyon periyodunun sonunda hücreler RPMI-1640 ile süspansiyon edildi ve 2000 rpm'de, 4°C'de, 10 dakika santrifüj edildi. Pellet, PBS ile süspansiyon edildi. 10 μL hücre süspansiyonu analiz için kullanıldı. DNA hasarı, Singh ve arkadaşları (24) tarafından geliştirilen ve modifiye edilen yöntemle analiz edildi (25). Her bir örnekten rastgele seçilen 100 çekirdeğin görüntüleri floresan mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan) ile vizüel olarak analiz edildi. Her görüntü comet yoğunluğuna göre 0, 1., 2., 3. ve 4. derece hasar olarak derecelendirildi. Sonuçlar % DNA hasarı (comet yoğunluğu) olarak ifade edildi.

Hücre içi ROS Analizi

Hücre içi ROS düzeyi oksidasyona duyarlı DCFDA / H₂ DCFDA floresans ölçüm kiti ile analiz edildi. Bortezomib, C vitamini

konsantrasyonları ve Bortezomib+C vitamini kombinasyonlarının HL-60 hücreleri ile 24 saat inkübasyonundan sonra hücreler soğuk PBS ile süspansiyon edildi. Daha sonra her kuyucuğa 20 μM DCFDA reaktifi eklendi ve 30 dakika, 37°C'de karanlık ortamda inkübe edildi. Floresans yoğunluk (Ex./Em.=485/535 nm) mikropalaka okuyucuda (Varioskan™ LUX; ThermoFisher Scientific) ölçüldü. Sonuçlar, kontrol hücrelerine göre nispi floresans yüzdesi olarak rapor edildi.

İstatistiksel Analizler

Bu araştırmadan elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizi Statistical Package for the Social Sciences version 20.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) programı ile gerçekleştirildi. Tüm sonuçlar üç bağımsız tekrarlar ile elde edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-wilk testi ile değerlendirildi. Bortezomib ve C vitamini tekli ve kombine etkilerinin karşılaştırıldığı çoklu karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi kullanıldı, post hoc analizi Tukey testi ile yapıldı. Grafikler, Graphpad Prism 8 programı (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) ile oluşturuldu. Sonuçlar ortalama±standart sapma (SS) olarak ifade edildi. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Sitotoksikite Bulguları

Bortezomib, C vitamini, Bortezomib+C vitamini kombinasyonlarının HL-60 hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki inhibitör etkisi MTT testi ile değerlendirildi. Bortezomibin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda konsantrasyonla ilişkili olarak HL-60 hücrelerinde hücre canlılığını azaltarak sitotoksik etki oluşturduğu bulundu ($p < 0.001$) (Şekil 1a.). Bortezomibin HL-60 hücrelerindeki IC₅₀ değeri 38.41 nM olarak hesaplandı. C vitamini 100 μM konsantrasyonu dışındaki tüm konsantrasyonların 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etki oluşturmadığı bulundu ($p > 0.05$) (Şekil 1b).

Bortezomib+C vitamini kombinasyonu, bortezomibin HL-60 hücrelerindeki IC₅₀ değerinin 1 ve 0.50 katına karşılık gelen konsantrasyonları ve C vitamini 100, 50 ve 10 μM konsantrasyonları ile oluşturuldu. Bortezomib (nM)+C vitamini (μM) kombinasyonlarını oluşturan konsantrasyonlar; sırasıyla 40:100, 40:50, 40:10, 20:100, 20:50, 20:10 olarak belirlendi. Kombinasyonların sitotoksik etkileri Şekil 2'de gösterilmektedir (Şekil 2). 40 nM bortezomib içeren kombinasyonlarda, C vitamini konsantrasyonu arttıkça sitotoksik etkinin arttığı bulundu ($p < 0.001$). 20 nM bortezomib içeren kombinasyonlarda ise yalnızca 100 μM C vitamini konsantrasyonunun sitotoksik etki oluşturduğu bulundu ($p < 0.001$).

Bortezomib+C Vitamini Kombinasyonunun Genotoksik Etkileri

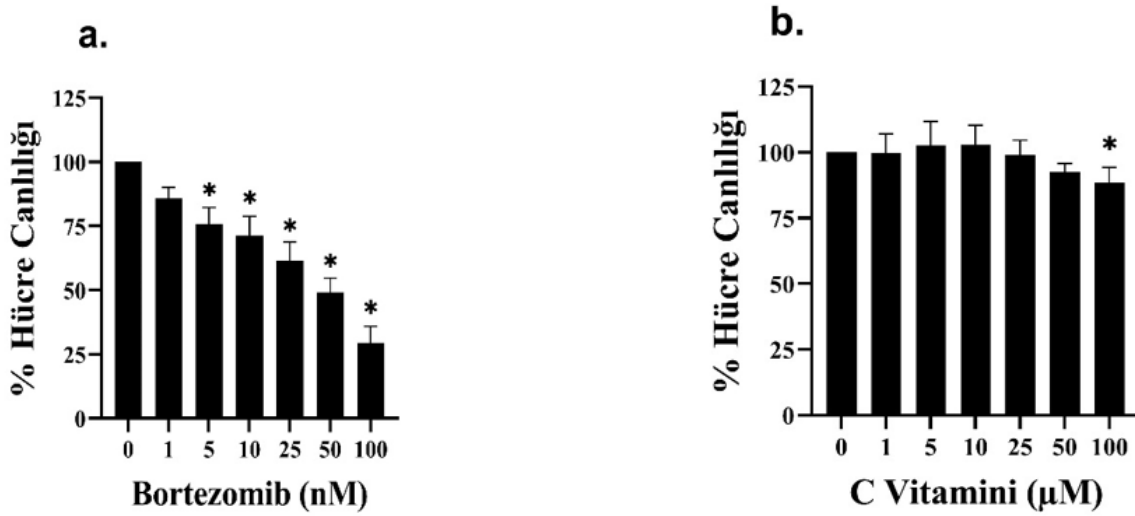
Bortezomib, C vitamini ve bortezomib+C vitamini kombinasyonlarının DNA hasar düzeyleri Şekil 3'te gösterilmiştir. Bortezomib konsantrasyonlarının doza bağlı olarak DNA hasarı oluşturduğu bulundu. Kontrol hücreleri ile 10, 25, 50 ve 100 nM bortezomib konsantrasyonları arasındaki fark istatistik-

sel olarak anlamlıydı ($p<0.05$) (Şekil 3a). Sitotoksikite sonuçlarında olduğu gibi C vitamininin 100 μM konsantrasyonu dışındaki tüm konsantrasyonların DNA hasarı oluşturmadığı bulundu ($p>0.05$) (Şekil 3b). Kombinasyonu oluşturan C vitamini konsantrasyonu ile ilişkili olarak bortezomib+C vitamini kombinasyonlarının DNA hasarı oluşturduğu bulundu (Şekil 3c). Kontrol hücreleri ile bortezomib+C vitamini kombinasyonları arasında istatistiksel farklılık bulundu ($p<0.001$).

Hücre içi ROS Düzeyleri

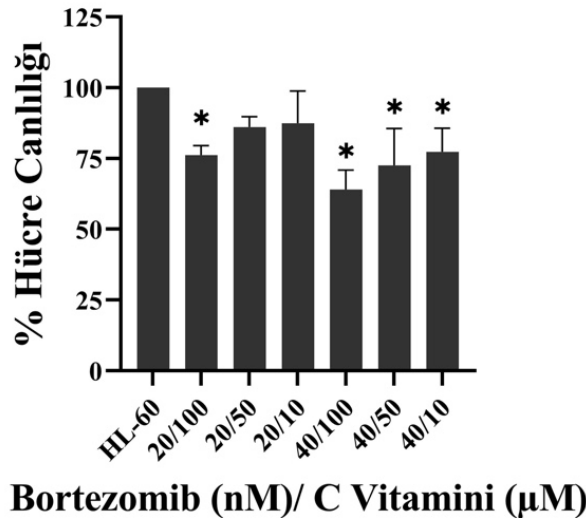
Bortezomib ve C vitamininin HL-60 hücrelerinde konsantrasyonla ilişkili olarak hücre içi ROS seviyelerinin arttığı bulundu

(Şekil 4a-b). Bortezomib konsantrasyonları (50, 100 nM) ile kontrol hücreleri arasında ve C vitamini konsantrasyonları (25, 50, 100 μM) ile kontrol hücreleri arasındaki fark istatistiksel anlamlıydı ($p<0.05$). 25, 50, 100 μM C vitamininin konsantrasyonlarının pro-oksidan etkiler oluşturduğu bulundu. C vitamini konsantrasyonlarının pro-oksidan etkileri 40 nM Bortezomib konsantrasyonu kadar dramatik değildi. Bortezomib+C vitamini kombinasyonlarının HL-60 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonrasında intraselüler ROS artışına sebep olduğu bulundu (Şekil 4c). Kontrol hücrelerine göre en yüksek pro-oksidan etki 20:100 ve 40:100 kombinasyonlarında bulundu ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.001$).

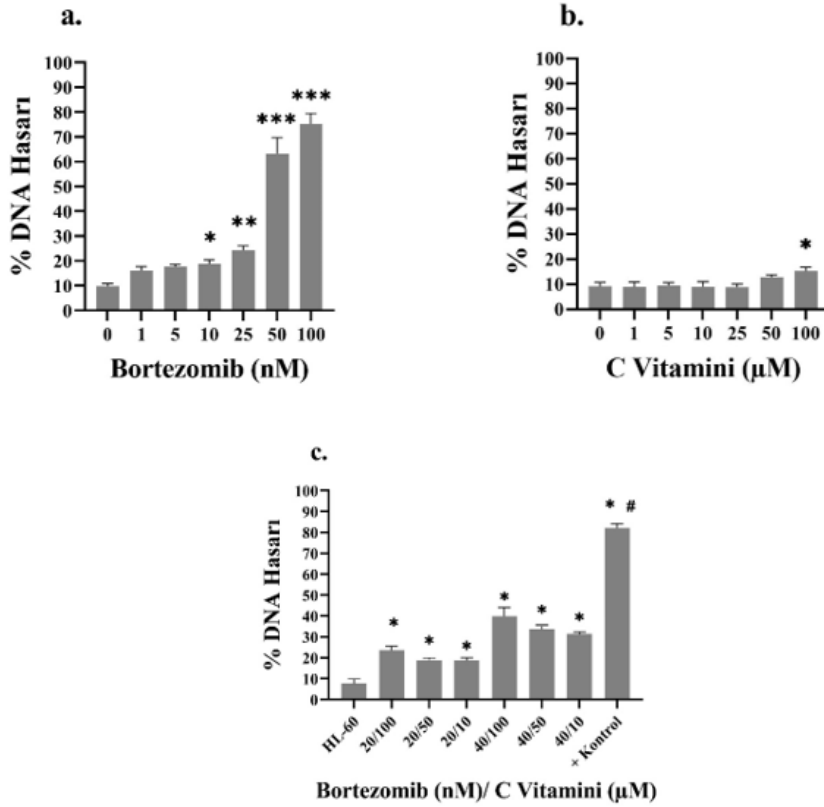


Şekil 1. HL-60 hücreleri ile 24 saat inkübe edilen (a.) Bortezomib (1-100 nM) ve (b.) C vitamini (1-100 μM) konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi. Bar grafiğini oluşturan sonuçlar ortalama \pm SS olarak ifade edildi.

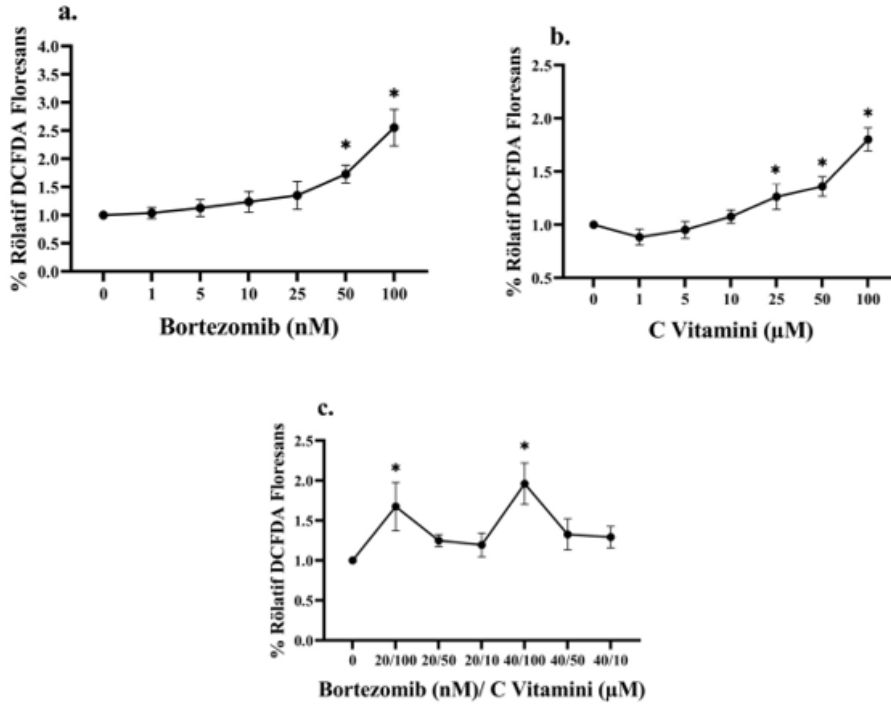
* Kontrol hücreleri ile Bortezomib ($p<0.001$) ve C Vitamini ($p=0.028$) konsantrasyonları arasında istatistiksel farklılık vardır.



Şekil 2. HL-60 hücreleri ile 24 saat inkübe edilen Bortezomib+C vitamini kombinasyonlarının sitotoksik etkisi. Sonuçlar ortalama \pm SS olarak ifade edildi. *Kontrol hücreleri ile kombinasyonlar arasında istatistiksel farklılık vardır ($p<0.001$).



Şekil 3. HL-60 hücreleri ile 24 saat inkübe edilen (a.) Bortezomib (1-100 nM) ve (b.) C vitamini (1-100 µM) ve (c.) Bortezomib+C vitamini kombinasyonlarının DNA hasarı düzeyleri. Bar grafiğini oluşturan sonuçlar ortalama±SS olarak ifade edildi. *Kontrol hücreleri ile Bortezomib (*; $p<0.05$, **; $p<0.01$, ***; $p<0.001$), C vitamini (*; $p<0.05$) ve Bortezomib+C vitamini kombinasyonları (*; $p<0.001$) arasında istatistiksel farklılık vardır. # Pozitif kontrol ile diğer gruplar arasında fark vardır ($p<0.001$).



Şekil 4. (a.) Bortezomib (1-100 nM), (b.) C vitamini (1-100 µM) ve (c.) Bortezomib+C vitamini kombinasyonlarının HL-60 hücrelerinde 24 saat inkübasyonu sonrası kontrol hücrelerine % DCFDA floresans değişimlerini gösteren hücre içi ROS düzeyleri. Sonuçlar ortalama±SS olarak ifade edildi. *Kontrol hücreleri ile Bortezomib, C vitamini ve Bortezomib+C vitamini kombinasyonları arasında istatistiksel farklılık vardır ($p<0.05$).

Tartışma

Konvansiyonel kemoterapi ve radyasyon tedavisi sırasında antioksidan desteğinin kullanımı yaklaşık otuz yıldır araştırılmasına rağmen bu tamamlayıcı tedavinin etkinliği ve güvenliği konusunda tartışmalar devam etmektedir (1). Sitotoksik kanser ajanlarıyla eş zamanlı diyet veya farmasötik antioksidan uygulamalarının tedaviyle ilişkili yan etkilerde orta düzeyde azalmalar olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, tamamlayıcı antioksidanların etkisinin, radyasyon tedavisi ve bazı kemoterapötik ajanlar tarafından normal dokularda üretilen oksidatif hasarı azaltmakla sınırlı kalamayacağı da rapor edilmiştir (26). Antioksidanlar koruyucu etkilerini bir dereceye kadar tüm dokularda gösterebilirler, böylece sağlıklı hücreler kadar tümör hücrelerini de korurlar (1). Bazı çalışmalarda, klinik radyasyon veya kemoterapi sırasında antioksidan takviyeleri kullanan kanser hastalarının, kullanmayanlara göre daha kötü hayatta kalma oranlarına sahip olduğunu öne sürerek bu hipotezi desteklemektedir (27,28).

Bazı *in vitro* çalışmalarda, C vitamininin düşük konsantrasyonlarda antioksidan olarak işlev gördüğü, yüksek konsantrasyonlarda ise pro-oksidan etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (9). Bu, C vitamininin her iki karakterinin de klinik faydalara dönüştürülebileceğini göstermektedir. Bu çalışmada HL-60 lösemi hücre hattında C vitamininin düşük ve yüksek konsantrasyonlardaki pro-oksidan profili doğrulandıktan sonra sitotoksik ajan bortezomib ile kombine etkileri araştırıldı. Yüksek doz C vitamini içeren bortezomib+C vitamini kombinasyonlarının düşük doz C vitamini içeren bortezomib+C vitamini kombinasyonlarına göre daha sitotoksik, genotoksik ve pro-oksidan etkiler oluşturduğu bulundu. Ancak bu etkilerin bortezomibin tekli uygulanan konsantrasyonları kadar güçlü olmadığı bulundu.

Yüksek antioksidan aktivitesi nedeniyle bugüne kadar farklı formlarda ve uygulanma şekilleriyle, monoterapötik ve kombine olarak kullanılan C vitamini kanser tedavileri için umut ışığı olmuştur. Yapılan bir çalışmada radyoterapi uygulamasıyla eş zamanlı uygulanan C vitamini takviyesinin HL-60 hücrelerinde apoptozisi artırdığı ve C vitamini konsantrasyonunun tedaviye bağlı herhangi bir ciddi yan etki oluşturmadığı rapor edilmiştir (29). Ayrıca C vitamininin oral ve intravenöz şeklinde uygulanmasının farmakolojik etkinliği etkilediği ve özellikle yüksek dozlarda uygulandığında potansiyel olarak güçlü anti-tümör etkiler gösterdiği ifade edilmiştir (30). C vitamininin, lösemi ve diğer birçok kanserin tedavisinde kullanılan arsenik trioksidin apoptotik etkinliğini artırarak sitotoksik etkinliğini güçlendirdiği, sinerjistik etkiler oluşturduğu gösterilmiştir (31). Buna karşın bu bilgiyle çelişkili sonuçlarda mevcuttur (50). Bizim çalışmamızda en yüksek konsantrasyon olan 100 µM C vitamini dışındaki diğer konsantrasyonların sitotoksik ve genotoksik etki oluşturmadığı bulundu. Diğer taraftan C vitamininin konsantrasyonla ilişkili olarak hücre içi ROS düzeylerini arttırdığı bulundu. Özellikle yüksek konsantrasyonlardaki bu artışın, H₂O₂ ve diğer reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol

açan kültür ortamındaki serbest geçiş metal iyonları ile etkileşimden kaynaklandığı düşünülmektedir (32).

Kemoterapötik ajan, proteazom inhibitörü bortezomibin sitotoksik etkinliğinin apoptozis, endoplazmik retikulum stresi ve diğer birçok metabolik yol aracılığıyla gerçekleştiği kanıtlanmıştır (17). Bu çalışmada da bortezomibin konsantrasyonla ilişkili olarak HL-60 hücrelerinde sitotoksik etkiler oluşturduğu bulundu. Aynı şekilde bortezomib konsantrasyonlarıyla ilişkili olarak DNA hasarının ve hücre içi ROS seviyelerinin arttığı gösterildi. Bu sonuçlar bortezomibin sitotoksik etkisine yüksek DNA hasarı ve hücre içi ROS düzeylerinin de katkısının olduğunu göstermektedir. Yüksek yan etki insidansı, ilaç direnci ve hızlı klirens bortezomibin önemli sınırlılıkları olarak tanımlanmıştır (19). Kemoterapötik etkinliği güçlendirme çabası, yan etkileri azaltma, hormesis mekanizmasının aktivasyonu ve çok hedefli metabolik yolların inhibisyonu, kombinasyon tedavilerini potansiyel bir seçenek haline getirmiştir. Bu amaçlarla, HL-60 hücrelerinde bortezomib ve histon deasetilaz inhibitörü olan valproik asit kombinasyonunun hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozu indüklediği bulunmuştur (20). Bununla birlikte bortezomib+C vitamini kombinasyonunun SqCC/Yq1-skuamöz hücreli karsinomda (21) ve *in vitro/in vivo* multipl myeloma (13) kanserindeki inhibitör etkileri de rapor edilmiştir. Bu çalışmada bortezomib+C vitamini kombinasyonunun bortezomibin tekli etkilerine göre sitotoksik ve genotoksik etkinliği azalttığı ve hücre ROS seviyelerini düşürdüğü bulunmuştur. Kombinasyonu oluşturan yüksek C vitamini konsantrasyonlarının düşük C vitamini konsantrasyonlarına göre daha etkili olduğu, ancak bu etkilerin bortezomibin tekli uygulanan etkileri kadar güçlü olmadığı gösterilmiştir. C vitamininin bu inhibitör etkisinin yapısındaki hidroksil grubu ile bortezomibin yapısındaki boronik asit arasındaki kimyasal etkileşimden kaynaklandığı düşünülmektedir (13,21). Bu çalışmada bortezomib+C vitamini kombinasyonunun HL-60 akut promiyelositik lösemi hücrelerinde bortezomibin sitotoksik profilini azalttığı ve bunun C vitamini konsantrasyonu ile ilişkili olduğu bulundu.

Sonuç

Bu çalışma C vitamininin bortezomib ile biyolojik olarak aktif olmayan bir kompleks oluşturarak bortezomibin sitotoksik ve genotoksik etkilerini azalttığı, hücre içi ROS oluşumunu düşürdüğü ve terapötik yanıtı zayıflattığı gösterilmiştir. Bu nedenle bortezomib temelli lösemi tedavilerinde C vitamininin bortezomibin antikanser aktivitesi üzerine olumsuz etkisinin göz önünde bulundurulması gerektiği önerilmektedir.

Etik onam: Bu çalışmada insan HL-60 akut promiyelositik lösemi hücre hattı kullanılmıştır. Bu yüzden etik kurul belgesine ihtiyaç duyulmamıştır.

Yazar Katkıları:

Konsept: A.T.

Literatür Tarama: A.T.

Tasarım: A.T.

Veri toplama: A.T.

Analiz ve yorum: A.T.

Makale yazımı: A.T.

Eleştirel incelenmesi: A.T.

Çıkar Çatışması: Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek: Bu çalışma için herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

Kaynaklar

- Lawenda BD, Kelly KM, Ladas EJ, Sagar SM, Vickers A, Blumberg JB. Should Supplemental Antioxidant Administration Be Avoided During Chemotherapy and Radiation Therapy? *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2008; 100(11): 773–83.
- Huang R-FS, Huang S-M, Lin B-S, Hung C-Y, Lu H-T. N-Acetylcysteine, Vitamin C and Vitamin E Diminish Homocysteine Thiolactone-Induced Apoptosis in Human Promyeloid HL-60 Cells. *J Nutr.* 2002; 132(8): 2151–6.
- Taşkın A, Tarakçıoğlu M, Ulusal H, Örkmez M, Taysı S. Idarubicin-bromelain combination sensitizes cancer cells to conventional chemotherapy. *Iran J Basic Med Sci.* 2019; 22(10): 1172–8.
- Harvie M. Nutritional Supplements and Cancer: Potential Benefits and Proven Harms. *Am Soc Clin Oncol Educ B.* 2014; (34): e478–86.
- Padayatty SJ, Sun AY, Chen Q, Espey MG, Drisko J, Levine M. Vitamin C: Intravenous Use by Complementary and Alternative Medicine Practitioners and Adverse Effects. *PLoS One.* 2010; 5(7): e11414.
- Bedhiafi T, Inchakalody VP, Fernandes Q, Mestiri S, Billa N, Uddin S, et al. The potential role of vitamin C in empowering cancer immunotherapy. *Biomed Pharmacother.* 2022; 146: 112553.
- Catley L, Anderson KC. Velcade and Vitamin C: Too Much of a Good Thing? *Clin Cancer Res.* 2006; 12(1): 3–4.
- Lee SJ, Jeong J, Lee I, Lee J, Jung JH, Park HY, et al. Effect of High-dose Vitamin C Combined With Anti-cancer Treatment on Breast Cancer Cells. *Anticancer Res.* 2019; 39(2): 751–758.
- Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, Buettner GR, et al. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102(38): 13604–9.
- Pires AS, Marques CR, Encarnação JC, Abrantes AM, Marques IA, Laranjo M, et al. Ascorbic Acid Chemosensitizes Colorectal Cancer Cells and Synergistically Inhibits Tumor Growth. *Frontiers in Physiology.* 2018; 9: 911.
- Ngo B, Van Riper JM, Cantley LC, Yun J. Targeting cancer vulnerabilities with high-dose vitamin C. *Nat Rev Cancer.* 2019; 19(5): 271–82.
- Reang J, Sharma PC, Thakur VK, Majeed J. Understanding the therapeutic potential of ascorbic acid in the battle to overcome cancer. *Biomolecules.* 2021; 11(8): 1130.
- Perrone G, Hideshima T, Ikeda H, Okawa Y, Calabrese E, Gorgun G, et al. Ascorbic acid inhibits antitumor activity of bortezomib in vivo. *Leukemia.* 2009; 23(9): 1679–86.
- Llobet D, Eritja N, Encinas M, Sorolla A, Yeramian A, Schoenenberger JA, et al. Antioxidants block proteasome inhibitor function in endometrial carcinoma cells. *Anticancer Drugs.* 2008; 19(2): 115–24.
- Park J, Cho J, Song EJ. Ubiquitin–proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment. *Arch Pharm Res.* 2020; 43(11): 1144–61.
- Fricker LD. Proteasome Inhibitor Drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2020; 60(1): 457–76.
- Lioni M, Noma K, Snyder A, Klein-Szanto A, Diehl JA, Rustgi AK, et al. Bortezomib induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells through activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7(9): 2866–75.
- Voorhees PM, Dees EC, O’Neil B, Orlowski RZ. The Proteasome as a Target for Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(17): 6316–25.
- Korani M, Korani S, Zendedel E, Jaafari M, Sathyapalan T, Sahebkar A. Utilization of Lipid-Based Nanoparticles to Improve the Therapeutic Benefits of Bortezomib. *Anticancer Agents Med Chem.* 2020; 20: 643–650.
- Nie D, Huang K, Yin S, Li Y, Xie S, Ma L, et al. Synergistic/additive interaction of valproic acid with bortezomib on proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* 2012; 53(12): 2487–95.
- Zou W, Yue P, Lin N, He M, Zhou Z, Lonial S, et al. Vitamin C Inactivates the Proteasome Inhibitor PS-341 in Human Cancer Cells. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(1): 273–80.
- Klíková K, Štefaníková A, Pilchová I, Hatok J, Chudý P, Chudej J, et al. Differential impact of bortezomib on HL-60 and K562 cells. *Gen Physiol Biophys.* 2015; 34: 33–42.
- Kramarenko GG, Wilke WW, Dayal D, Buettner GR, Schafer FQ. Ascorbate enhances the toxicity of the photodynamic action of Verteporfin in HL-60 cells. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40(9): 1615–27.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175(1): 184–91.
- Duran E, Taşkın S, Pehlivan B, Çelik H. DNA damage and changes in oxidized biomolecules in COVID-19 patients treated in intensive care units: a single center experience. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2023; 27(13): 6414–21.
- D’Andrea GM. Use of Antioxidants During Chemotherapy and Radiotherapy Should Be Avoided. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55(5): 319–21.
- Bairati I, Meyer F, Jobin E, Gélinas M, Fortin A, Nabid A, et al. Antioxidant vitamins supplementation and mortality: A randomized trial in head and neck cancer patients. *Int J Cancer.* 2006; 119(9): 2221–4.
- Salganik RI. The Benefits and Hazards of Antioxidants: Controlling Apoptosis and Other Protective Mechanisms in Cancer Patients and the Human Population. *J Am Coll Nutr.* 2001; 20: 464S–472S. Available at: <https://doi.org/10.1080/07315724.2001.10719185>
- Shinozaki K, Hosokawa Y, Hazawa M, Kashiwakura I, Okumura K, Kaku T, et al. Ascorbic Acid Enhances Radiation-induced Apoptosis in an HL60 Human Leukemia Cell Line. *J Radiat Res.* 2011; 52(2): 229–37.
- González-Montero J, Chichiarelli S, Eufemi M, Altieri F, Saso L, Rodrigo R. Ascorbate as a Bioactive Compound in Cancer Therapy: The Old Classic Strikes Back. *Molecules.* 2022; 17: 12.
- Yedjou CG, Thuisseu L, Tchounwou C, Gomes M, Howard C, Tchounwou P. Ascorbic acid potentiation of arsenic trioxide anticancer activity against acute promyelocytic leukemia. *Arch Drug Inf.* 2009; 2(4): 59–65.
- Karasavvas N, Cárcamo JM, Stratis G, Golde DW. Vitamin C protects HL60 and U266 cells from arsenic toxicity. *Blood.* 2005; 105(10): 4004–12.