

Dose-dependent Apoptosis and Antiproliferative Activity of Lung Cancer Cells (A-549) Treated with Navitoclax (Abt-263)

Esra BİLİCİ^{1*}

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Medical Biology and Genetic, 03200, Erenler, Afyonkarahisar

ABSTRACT

Lung cancer is an aggressive type of tumor with a high mortality rate. The use of agents targeting molecular abnormalities that regulate resistance to apoptosis is seen as a promising approach for the treatment of this disease. BH3 mimetic antagonists such as ABT-737 and its derivative ABT-263 (navitoclax) have been developed to block the function of pro-survival Bcl-2 family members. Navitoclax is a potent small molecule inhibitor of the Bcl-2 family, and numerous studies have reported that Navitoclax has therapeutic effects against many types of cancer, including lung cancer, acute lymphoblastic leukemia, and ovarian cancer. Bcl-2 family proteins are central regulators of mitochondrial apoptosis and validated anti-cancer targets. ABT-263 (Navitoclax), an inhibitor of the Bcl-2 family, is used in clinical trials for cancer treatment. However, the anticancer mechanisms of ABT-263 have not been fully elucidated. Overall, our work highlights the need to target anti-apoptotic Bcl-2 proteins that activate the mitochondrial cell death program to kill cancer cells. In this study, the effects of ABT-263 on human lung cancer cells were investigated in vitro. In our study using the lung cancer cell line as a model, the antiproliferative effect and apoptosis activity of navitoclax concentrations of 0.1, 0.5, 1, 5, 25 μ M after 48 hours was demonstrated. Combined use of chemotherapeutic drugs with Navitoclax suggests that it may bring new approaches to the treatment of lung cancer.

Keywords: ABT-263, A-549 Cell Line, Apoptosis, Lung Cancer, Navitoclax.

Navitoklax (ABT-263) ile Muamele Edilmiş Akciğer Kanseri Hücrelerinin (A-549) Doza Bağlı Apoptoz ve Antiproliferatif Aktivitesi

ÖZ

Akciğer kanseri, ölüm oranı yüksek agresif bir tümör türüdür. Apoptoza direnci düzenleyen moleküler anormallikleri hedefleyen ajanların kullanılması, bu hastalığın tedavisi için ümit verici bir yaklaşım olarak görülmektedir. ABT-737 gibi BH3 mimetik antagonistleri ve bunun türevi ABT-263 (navitoclax), hayatta kalma yanlısı Bcl-2 aile üyelerinin fonksiyonunu bloke etmek için geliştirilmiştir. Navitoclax, Bcl-2 ailesinin güçlü bir küçük molekül inhibitörüdür ve çok sayıda çalışma, navitoclaxın akciğer kanseri, akut lenfoblastik lösemi ve yumurtalık kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türüne karşı terapötik etki gösterdiğini rapor etmiştir. Bcl-2 ailesi proteinleri, mitokondriyal apoptozun merkezi düzenleyicileri ve doğrulanmış anti-kanser hedefleridir. Bcl-2 ailesi inhibitörü olan ABT-263 (Navitoclax), kanser tedavisi için klinik olarak denemelerde kullanılmaktadır. Ancak ABT-263'ün antikanser mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamıştır. Genel olarak çalışmamız, kanser hücrelerini öldürmek için mitokondriyal hücre ölümü programını etkin hale getiren anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin hedeflenmesine olan ihtiyacı vurgulamaktadır. Bu çalışmada ABT-263'ün insan akciğer kanseri hücreleri üzerindeki etkileri in vitro olarak araştırılmıştır. Çalışmamızda bir model olarak akciğer kanser hücre hattını kullanarak, navitoclaxın 0.1, 0.5, 1, 5, 25 μ M konsantrasyonlarının 48 saat sonunda antiproliferatif etkisi ve apoptoz aktivitesi gösterilmiştir. Navitoclax ile birlikte kemoterapik ilaçların kombine edilerek kullanılması, akciğer kanseri tedavisine yeni yaklaşımlar getirebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: ABT-263, A-549 Hücre Çizgisi, Akciğer Kanseri, Apoptoz, Navitoklax.

To cite this article: Biliçi E. Dose-dependent Apoptosis and Antiproliferative Activity of Lung Cancer Cells (A-549) Treated with Navitoclax (Abt-263). Kocatepe Vet J. (2022) 14(4):499-506

Submission: 24.05.2021 Accepted: 04.10.2021 Published Online: 07.12.2021

ORCID ID; HLA: 0001-0001-6636-5975

*Corresponding author e-mail: vet.hekimesrabilici@gmail.com

GİRİŞ

ABT-263'ün antikanser mekanizmaları tam olarak aydınlatılmadığından, çalışmamızda ABT-263'ün insan akciğer kanseri hücrelerinin antiproliferasyonu üzerindeki etkisi, apoptoz temelinde değerlendirilmiştir. Bu çalışmamızın, BH3 taklidinin anti-kanser mekanizmasına ve akciğer kanseri olan hastaların tedavisinde potansiyel uygulamalarına yeni bir bakış açısı sağlaması beklenmektedir. Hayatta kalmayı sürdüren Bcl-2 ailesi üyelerinin (Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1) aşırı ekspresyonu, yaygın olarak tümör bakımı, ilerlemesi ve kemorezistans ile ilişkilidir. İnsan tümör hücrelerinde ABT-263, Bax translokasyonunu, sitokrom c salınımını ve ardından apoptozu indükler. ABT-263'ün tek başına oral uygulaması, küçük hücreli akciğer kanseri ve akut lenfoblastik lösemisinin ksenograft modellerinde tam tümör gerilemelerini indükler (Tse ve ark. 2008). B hücreli lenfoma 2 (BCL-2) familyası proteinleri öncelikle programlanmış bir hücre ölümü düzenleyicisi olarak çalışır, bu sayede aralarındaki çoklu etkileşimler hücrenin hayatta kalmasını belirler. Bu, anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler olan iki ana BCL-2 protein sınıfını açıklar (Hwang ve ark. 2021). Anti-apoptotik proteinler, intrinsik apoptotik yolun artmasıyla sonuçlanan BCL-2 ailesi inhibitörleri için çekici hedeflerdir. BCL-2 ailesi inhibitörleri, çeşitli kanser türlerinde, fibrotik hastalıklarda, yaşlanmayla ilgili ve ayrıca otoimmün hastalıklarda yeni hedefli tedaviler için kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Navitoclax bunlardan biridir ve BCL-2, BCL-W ve B-hücreli lenfoma-ekstra-büyük dahil olmak üzere BCL-2 anti-apoptotik proteinlere karşı yüksek bir afiniteye sahip olduğu keşfedilmiştir (Hamdy ve ark. 2020). Navitoclax'ın tek bir ajan olarak veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde tümör progresyonunu ve fibrozis gelişimini başarılı bir şekilde iyileştirdiği gösterilmiştir. Navitoclax bugüne kadar faz I ve faz II klinik çalışmalarına girmiştir. Navitoclax tek başına küçük hücreli akciğer kanserini ve akut lenfositik lösemiye güçlü bir şekilde tedavi ederken, katı tümörler için kombinasyon tedavisinde diğer kemoterapötik ajanların terapötik etkisini arttırmaktadır (Anuar ve ark. 2020). Akciğer kanseri, vakaların % 15'ini temsil eden ve ABD'de her yıl 30.000 yeni vakayı oluşturan kansere bağlı ölümlerin en yaygın nedenidir (Jackman ve Johnson 2005). Akciğer kanseri için son 40 yılda tedavilerde önemli gelişmeler görülmemiştir ve hedefe yönelik tedavi onaylanmamıştır (Sato ve ark. 2007). Terapötik direncin üstesinden gelmek için ümit verici bir yaklaşım olarak, apoptozu direnci düzenleyen moleküler anormallikleri hedefleyen ajanların kullanılması düşünülmektedir (William ve Glisson 2011).

Anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1) ve pro-apoptotik (Bax, Bak, Bim, Bid, Puma, Bad, Noxa, Bik, Bmf ve Hrk) proteinleri, bir hücrenin çeşitli sitotoksik saldırılardan sonra yaşayıp yaşamayacağını belirler

(Hanahan ve Weinberg 2000). Kanserde hayatta kalma yanlısı proteinlerin aşırı ifadesi genellikle kötü prognoz ve kemoterapiye direnç ile ilişkilidir.

Apoptotik kontrol noktalarından kaçınmak için, kanser hücreleri genellikle anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerini aşırı ifade eder (Korsmeyer, 1992). Bcl-2 kontrollü apoptotik yolun aktivasyonunun çoğu, kemoterapötik maddelerin etkinliği için kilit nokta olması nedeniyle, Bcl-2 aile üyeleri terapötik gelişim için çekici hedefler olarak ortaya çıkmıştır.

Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyelerinin antikanser ilaçların neden olduğu hücre ölümünü baskıladığı bulunmuştur. Bu nedenle, Bcl-2 aile üyelerini inhibe eden tedaviler, kanser ile savaşmak için potansiyel bir strateji olabilir (Adams ve Cory 2007; Yip ve Reed 2008). Ayrıca yapısal ve fonksiyonel çalışmalar, hem anti- hem de pro-apoptotik üyelerin, korunmuş bir Bcl-2 homoloji (BH3) alanı tarafından düzenlendiğini ve böylece kanser tedavisi için çeşitli BH3 mimetiklerinin geliştirilmesiyle sonuçlandığını göstermiştir (Llambi ve Green 2011; Weyhenmeyer ve ark. 2012). Çalışmamız, anti-kanser terapötikleri olarak geliştirilen küçük molekülü BH3 mimetik bileşiklerinin etkilerine dayanmaktadır. BH3 mimetikleri, hayatta kalma yanlısı Bcl-2 proteini için yüksek bağlanma özgüllükleri gösterir. Bu durum olası yan etkileri sınırlandırdığından, bu ilaçların diğer hastalık alanlarında da faydalı olabileceği tahmin edilebilir. Burada Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3' ün fonksiyonel önemi araştırıldı. Navitoclax'ın konsantrasyonlarının akciğer kanser hücrelerinin sağkalımında hayatta kalma yanlısı etkilerinin üstesinden nasıl gelebileceği araştırıldı.

MATERYAL ve METOT

Hücre Kültürü

Sunulan çalışmada kullanılan A-549 insan akciğer kanser hücreleri (CRL-1571TM, ATCC®) Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Hücreler, içinde % 10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco Qualified, 10500-064, USA), % 1 L-glutamin (Gibco 25030-024) ve % 1 penisilin-streptomisin (Gibco 15140-122, USA) karışımı içeren RPMI 1640 (Capricorn Scientific, cp19-2782, Germany) içinde % 5 CO₂ içeren ve 37 °C'ye ayarlı inkubatörde (Thermo Heracell, 51026282, USA) kültüre edildi.

Reaktif

Navitoclax (ABT-263; Selleckchem) deneylerden önce DMSO içinde seyreltilmiştir (Lee ve ark. 2018). 1 mg ABT-263, 1.0261 ml DMSO içinde seyreltilerek stok elde edilmiştir. Stoktan dilüsyon yapılarak diğer dozlar hazırlanmıştır.

MTT

Akciğer kanser hücrelerine uygulanan Navitoclax'ın (Selleck chemicals, S100126) çeşitli konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri

MTT testi ile çalışılmıştır. Büyüyen hücreler, 96 oyuklu plakalara ekilmiştir ve yaklaşık % 70-80 konflue olana kadar kültürlenmiştir. Hücreler, belirtilen konsantrasyonlarda test bileşikleri ile işleme tabi tutulmuştur. Daha sonra oyuklara 5 mg/mL MTT içeren solüsyon ilave edilmiştir ve 3 saat 37 °C de inkübe edilmiştir. Formazanı çözüldürmek için 200 µL DMSO ilave edilmiştir ve karanlıkta 10 dakika çalkalanmıştır. 570 nm'deki absorpsiyon, bir mikropilaka okuyucusu (Bio Tek Epoch, USA) ile kaydedilmiştir.

Toplam RNA Ekstraksiyonu ve cDNA Sentezi

Üreticinin talimatlarına göre RNA sentez kiti (ABT 102-01-10, Türkiye) kullanılarak hücreler lize edildi ardından etanol ile çöktüldü. RNAase free bir ortam oluşturabilmek adına RNA izolasyonu esnasında kullanılacak bütün malzemeler uygun çözümlerle (RNA away) önceden temizlenerek hazır edildi. Nanodrop ile ölçüm, izole edilen RNA'ların saflığını ve miktarını belirledi. OD260/280 oranı 1.7-2.1 aralığında olan RNA'lar cDNA sentezinde kullanıldı (White ve Kaestner 2009). RNA izolasyonu işlemi baştan sona buz üzerinde gerçekleştirildi. cDNA kiti

(Thermo Fisher 4368814, USA) ve 4 µL 5 × RT primer kullanılarak 10 ng toplam RNA cDNA'ya dönüştürüldü. 20 µL reaksiyonları bir termocycler içinde 15 dakika 55 °C de, 5 dakika 85 °C de inkübe edildi ve 4 °C de tutuldu.

Kantitatif Real-Time PCR analizi

qPCR, Brightgreen Universal 2x qPCR (Abt, 204454, Türkiye) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. 10 µL PCR reaksiyonu 0,6 µL Forward, 0,6 µL Reverse, nükleaz içermeyen su ve kitteki diğer ürünler kullanılarak reaksiyon 96 oyuklu plakada 95 °C de 10 dakika süreyle inkübe edildi, ardından 40 döngü 95 °C de 15 saniye ve 60 °C de 60 saniye süreyle inkübe edildi. Tüm reaksiyonlar, üç kez gerçekleştirildi. Her bir transkripsiyon analizi için primerler spesifik dizayn edildi ve literatürdeki çalışmalar referans alındı (Çizelge 1). Kantitatif döngü (Ct), numunenin floresansının tanımlanan eşikten geçtiği kesirli bir döngü olarak tanımlandı. RT-qPCR verilerinin analizi 2^{-ΔΔCt} yöntemi ile hesaplandı.

Tablo 1. Real-time PCR reaksiyonlarında kullanılan primer sekansları (Sentebiolab, Türkiye)

Table 1. Primers sequens used for real-time PCR reactions

Primers	Forward	Reverse
B-actin	CACCCAGCCATGTACGTTTC	ACCATCGCTATCTGAGCAGC
Bax	CGCCTCACTCACCATCTGGAA	CCTCAAGACCACTCTTCCCCA
Bcl-2	GAGGGGCTACGAGTGGGATGC	GGAGGAGAAGATGCCCGGTGC
Casp-3	GGAAGCGAATCAATGGACTCTGGA	CCTGAGGTTTGCATCGAC

İstatistik Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi amacıyla SPSS 22.00 paket programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak sunuldu. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi kullanılarak yapıldı. MTT sitotoksitesite analizlerinde, normal dağılım göstermeyen gruplar arası farklılık Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Farkın hangi grup veya gruplardan kaynaklandığını belirlemek için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi uygulandı. Normal dağılım gösteren gruplar arası farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile, farkların önem kontrolü ise post hoc Duncan testi ile yapıldı. Gen ekspresyon analizlerinde, normal dağılım göstermeyen gruplar arası farklılık Mann-Whitney U testi ile normal dağılım gösteren gruplar arası farklılık student's t-testi ile gerçekleştirildi. Yapılan istatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlardan p<0.05, p<0.01 ve p<0.001 olan değerler önemli kabul edildi.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Navitoclax'ın A-549 Hücreleri Üzerine Antiproliferatif Etkisi

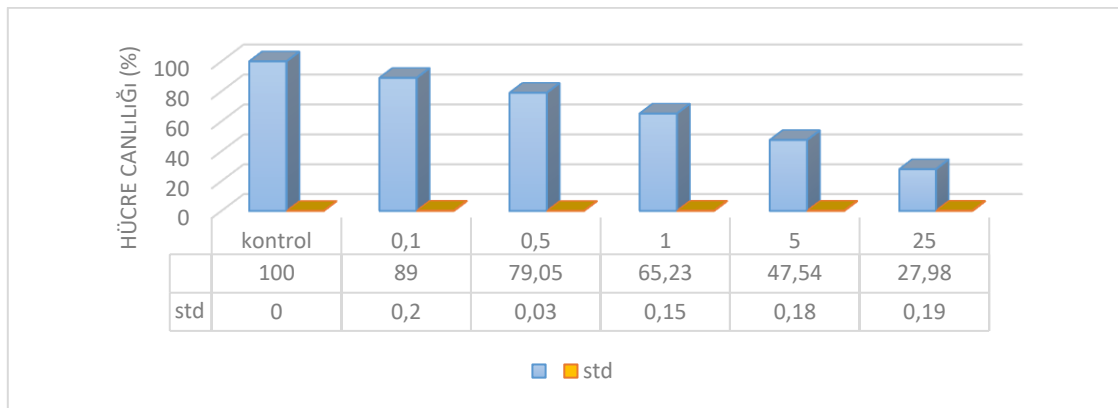
Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda Abt-263 uygulanan gruplarda A-549 hücrelerindeki hücre canlılığı (%) grafik 1 de gösterilmiştir. Kontrol grubu olarak çalışılan hücreye 0 µM ilaç uygulaması yapılmıştır. Letal doz uygulaması yapılmamıştır, kontrol grubuna ilaç uygulaması yapılmadığı için canlılık % 100 kabul edilir. 0.1, 0.5, 1, 5 ve 25 µM Navitoclax uygulanan gruplarda (Lock ve ark. 2008) hücre canlılığı (%) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Şekil 1) Navitoclax uygulanan gruplarda istatistiksel olarak bir azalma tespit edildi (p<0.001). 25 µM Navitoclax uygulanan gruptaki hücre canlılığının (%) kontrol ve 1 µM Navitoclax uygulanan gruba göre daha düşük olduğu (p<0.001), 5µM Navitoclax uygulanan grup ile benzer olduğu (p>0.05) belirlendi. 5 µM Navitoclax uygulanan gruptaki hücre canlılığının (%) ise kontrol, 0.1, 0.5 ve 1 µM Navitoclax uygulanan gruba göre anlamlı düzeyde azaldığı (p<0.001), 25 µM Navitoclax uygulanan grup ile istatistiksel bir fark olmadığı (p>0.05) görüldü (Çizelge 2).

Tablo 2. A549 hücre hattında MTT testi ile Navitoclax'ın sitotoksik aktivitesinin değerlendirilmesi
Table 2. The cytotoxic activity of Navitoclax by MTT test in A549 cell line

Abt-263 konsantrasyonu (μM)	Hücre Canlılığı (%) ($\bar{x} \pm \text{Sx}$)
Kontrol (0 μM)	100 \pm 0.00 ^a
0.1	89 \pm 0.2 ^b
0.5	79.05 \pm 0.03 ^{bc}
1	65.23 \pm 0.15 ^c
5	47.54 \pm 0.18 ^{de}
25	27.98 \pm 0.19 ^e
p	***

a,b,c,d,e Aynı sütunda farklı harf taşıyan veriler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir.

***: $p < 0.001$, \bar{x} : Ortalama, Sx : Standart Hata



Şekil 1. Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1, 5, 25 μM) Navitoclax uygulanan gruplarda hücre canlılık yüzdeleri

Figure 1. Cell viability percentages in control and Navitoclax applied groups at different concentrations (0.1, 0.5, 1, 5, 25 μM)

Apoptoz İlişkili Proteinlerin Ekspresyonları

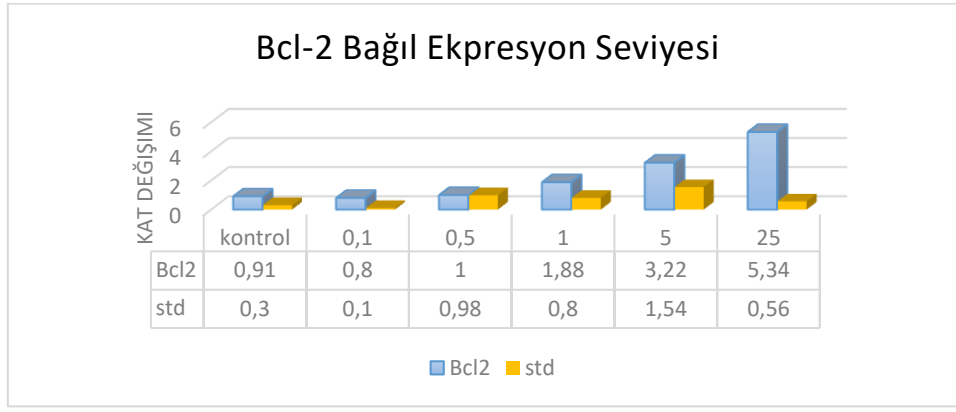
Apoptoz ile ilişkili Bcl-2 ve Bax proteinlerinin ekspresyonu açısından kontrol grubu istatistiksel

olarak karşılaştırıldığında (Şekil 2, Şekil 3) 25 μM Navitoclax uygulanan grupta görülen artışların önemli olduğu belirlendi ($p < 0.001$) (çizelge 3, çizelge 4).

Tablo 3. Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1, 5, 25 μM) Navitoclax uygulanan gruplarda Bcl-2 ekspresyon değişimlerinin değerlendirilmesi

Table 3. Evaluation of bcl-2 expression changes in control and Navitoclax at different concentrations (0.1, 0.5, 1, 5, 25 μM)

Abt-263 konsantrasyonu (μM)	Bcl-2 Ekspresyon Seviyesi ($\bar{x} \pm \text{Sx}$)
Kontrol (0 μM)	0.91 \pm 0.3 ^a
0.1	0.8 \pm 0.1 ^{ba}
0.5	1.0 \pm 0.98 ^{bc}
1	1.88 \pm 0.8 ^{ed}
5	3.22 \pm 1.54 ^{de}
25	5.34 \pm 0.56 ^e
p	***



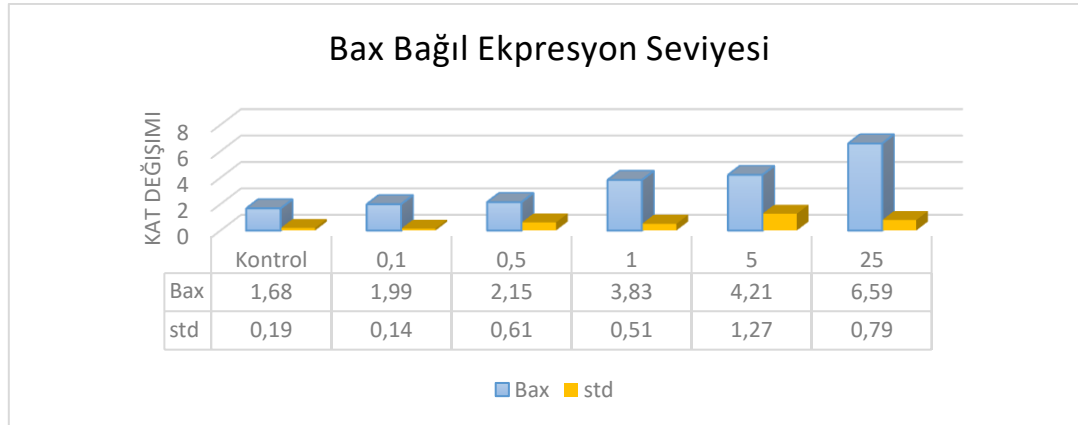
Şekil 2. Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1, 5, 25 µM) Navitoclax uygulanan gruplarda Bcl-2 ekspresyon değişimleri

Figure 2. Bcl-2 expression changes in control and Navitoclax applied groups at different concentrations (0.1, 0.5, 1, 5, 25 µM)

Tablo 4. Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1, 5, 25 µM) Navitoclax uygulanan gruplarda Bax ekspresyon değişimlerinin değerlendirilmesi

Table 4. Evaluation of Bax expression changes in control and Navitoclax applied groups at different concentrations (0.1, 0.5, 1, 5, 25 µM)

Abt-263 konsantrasyonu (µM)	Bax Ekspresyon Seviyesi ($\bar{x} \pm Sx$)
Kontrol (0 µM)	1.68 ± 0.19 ^a
0.1	1.99 ± 0.14 ^{ba}
0.5	2.15 ± 0.61 ^{bc}
1	3.83 ± 0.51 ^c
5	4.21 ± 1.27 ^{de}
25	6.59 ± 0.79 ^e
<i>p</i>	***



Şekil 3. Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1, 5, 25 µM) Navitoclax uygulanan gruplarda Bax ekspresyon değişimleri

Figure 3. Bax expression changes in control and Navitoclax applied groups at different concentrations (0.1, 0.5, 1, 5, 25 µM)

Kaspaz-3 Aktivitesi

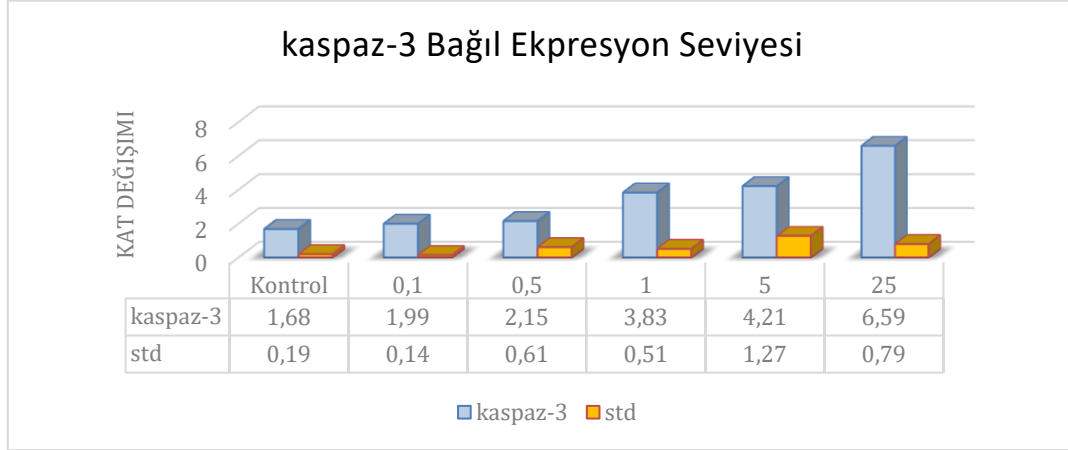
Kontrol grubu ile farklı konsantrasyonlarda Navitoclax uygulanan gruplarda kaspaz aktivasyonları yönünden istatistiksel olarak karşılaştırıldığında (çizelge 5), 25 µM Navitoclax uygulanan grupta

kontrol grubuna göre Kaspaz-3 aktivasyonunun arttığı tespit edildi ($p < 0.001$). 0.1 ve 0.5 µM Navitoclax uygulanan gruplar (şekil 4) istatistiksel olarak benzerlik göstermişlerdir ($p > 0.05$).

Çizelge 5. Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda (0,1, 0,5, 1, 5, 25 µM) Navitoclax uygulanan gruplarda Kaspaz-3 ekspresyon değişimlerinin değerlendirilmesi

Table 5. Evaluation of Caspase-3 expression changes in control and Navitoclax at different concentrations (0,1, 0,5, 1, 5, 25 µM)

Abt-263 konsantrasyonu (µM)	Kaspaz-3 Ekspresyon Seviyesi ($\bar{x} \pm Sx$)
Kontrol (0 µM)	1.28 ± 0.12 ^a
0.1	1.09 ± 0.32 ^b
0.5	1.15 ± 0.43 ^{bc}
1	2.00 ± 0.16 ^{cd}
5	3.21 ± 1.19 ^{de}
25	5.03 ± 1.23 ^e
p	***



Şekil 4. Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda (0,1, 0,5, 1, 5, 25 µM) Navitoclax uygulanan gruplarda Kaspaz-3 ekspresyon değişimleri

Figure 4. Caspase-3 expression changes in control and Navitoclax applied groups at different concentrations (0,1, 0,5, 1, 5, 25 µM)

Apoptoz, hücre ölümüne yanıt olarak sergilenen ana mekanizmalardan biridir ve tümör hücrelerinde apoptozun indüklenmesi, kanser tedavisi için potansiyel bir hedef anlamına gelir. Bcl-2 ailesi proteinleri, apoptotik yolun düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Bcl-2 aşırı ekspresyonu genellikle meme kanseri, prostat kanseri, B hücreli lenfomalar ve kolorektal adenokarsinomlar dahil olmak üzere çeşitli kanserlerle ilişkilidir (Gonsalves ve ark. 2018). Bu nedenle, Bcl-2 dünya çapında tıbbi kimyagerleri çeken yeni bir anti-kanser hedefidir. Bcl-2 hedefinin altında yatan araştırmalar, 'BH3-mimetikleri' olarak adlandırılan küçük molekül inhibitörlerinin üretilmesiyle sonuçlanmıştır (Wang ve ark. 2018). Bu ilaçlar, kanser hücrelerinin apoptozunun aktivasyonu ile sonuçlanan hayatta kalma yanlısı Bcl-2 proteinlerine bağlanma gösterir. Yapı bazlı ilaç tasarımı ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) bazlı taramanın bir sonucu olarak keşfedilen ilk BH3 mimetikleri, bir N-asilsülfonamid analogu olan ABT-263 dir. Küçük moleküller olarak birkaç Bcl-2 inhibitörü klinik geliştirme aşamasındadır ve sonuçlar, bu moleküllerin tek başına veya kombinasyon halinde kanser tedavisinde potansiyel uygulama olabileceğini göstermiştir (Suvarna ve ark. 2019).

Hücre ölümünden kaçınmak, kanser için ayırt edici özelliklerden biridir (Hanahan ve Weinberg 2011).

KontROLSÜZ hücre döngüsü ilerlemesini yönlendiren onkojenik dönüşüm, genellikle apoptozu tetikleyen doğuştan gelen tümör baskılayıcı kontrol noktalarını etkinleştirir (Lowe ve ark. 2004). Apoptotik kontrol noktalarını ortadan kaldırmak için, kanser hücreleri sıklıkla, yukarı regüle edilmiş BIM ve PUMA'yı ayıran anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerini aşırı ifade eder. Bu nedenle, birçok kanser hücrelerinde Bcl-2/Bcl-x yer değiştirir (Anderson ve ark. 2014). Kanser tedavisi geliştirme stratejilerinden biri, içsel programlanmış hücre ölümünü teşvik etmektir. Anti-apoptotik proteinlerin mitokondriyal zarlar üzerindeki yürütücü proteinlerle etkileşimini bloke etmek, bu yaklaşımın temeli olmuştur. Bu nedenle, Bcl-2 ailelerinin hayatta kalma yanlısı proteinleri, bu terapötik müdahale için potansiyel hedeflerdir. Birkaç Bcl-2 ailesi inhibitörü, anti-kanser ilaçları olarak araştırılmıştır ve bunlardan biri Navitoclax'tır. Bir çalışma, anti-apoptotik proteinlerin BH3 alan bağlama proteinleri ile etkileşimini bozarak kanser hücresi apoptozunu indüklemek için navitoclaxın mekanizmasını bildirmiştir.

Antikanser ilaçlara karşı direncin altında yatan ana mekanizmalardan biri, B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) familyası proteinlerinin değişmiş ifadesidir (Martinou ve Youle, 2011). Böylece, Bcl-2 ailesi proteinleri, tümör başlangıcını, büyümesini ve radyoterapinin yanı

sıra kemoterapiye direnci kolaylaştıran apoptozun merkezi kontrolörleri olarak gelişmiştir (Oltersdorf ve ark. 2005). Mevcut kanıtların ortaya koyduğu gibi, Bcl-2, Bax gibi pro-apoptotik moleküllerin aracılık ettiği apoptozu inhibe eder. Bu nedenle, Bcl-x1/Bcl-2'nin veya herhangi birinin bağlanma kabiliyetini bozan moleküller diğer anti-apoptotik ila pro-apoptotik moleküller, kanser yönetiminde terapötik öneme sahip olacaktır (Shangary ve Johnson 2002).

Apoptozdan kaçınma, kanserin bir özelliğidir ve kemorezistans ile ilişkilidir (Pommier ve ark. 2004). Bcl-2 ailesi, intrinsik yoldan apoptoza katılır (Brunelle ve Letai 2009). Bcl-2, ER pozitif tümörlerin yaklaşık %85'inde, HER2 pozitif tümörlerin %50'sinde, üçlü negatif meme kanserlerinin % 41'inde ve bazal benzeri tümörlerin % 19'unda aşırı eksprese edilir (Dawson ve ark. 2010; Oakes ve ark. 2012b; Vaillant ve ark. 2013). Hayatta kalma yanlısı Bcl-2 ailesi ekspresyonu, kemoterapötik ajanlara dirençle ilişkilidir (Fiebig ve ark. 2006).

Apoptoz yolunun aktivasyonu, ya kanser hücresi ölümünü ya da yerleşik sitotoksik maddelere duyarlılığı ya da intrinsik hücre ölüm yolunun aktivasyonu yoluyla işlev gören radyasyon terapisini indükleyen hedeflenen kemoterapiler için en yaygın mekanizmadır (Zhu ve ark. 2016). Anti-apoptotik alt ailesini (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 ve A1), pro-apoptotik alt ailesini (Bax, Bak ve Bok) ve yalnızca BH3'ü içeren Bcl-2 ailesi proteinler (Bik, Bad, Bid, Bim, Bmf, Hrk, Noxa ve Puma), kemoterapi sırasında hücre ölümünün düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar (Adams ve Cory 2007; Youle ve Strasser 2008). Anti-apoptotik proteinler, hücreleri çeşitli sitotoksik koşullardan korurken, pro-apoptotik proteinler hücre apoptozunu destekler. Özet olarak, verilerimiz, ABT-263 tedavisinin in vitro kanser hücresi apoptozunu indüklemeye tümör büyümesini ve ilerlemesini inhibe etmede güvenli ve oldukça etkili olduğunu göstermektedir.

Navitoclax ile etkili tedavi için bir ön koşul, anti-apoptotik Bcl-2 proteininin tümör hücrelerinde ekspresyonudur. Bu amaçla, A-549 hücre hattında bu proteinlerin ekspresyonu araştırıldı. Bu çalışmanın amacı, Bcl-2 inhibitörü Navitoclax'ın akciğer kanseri hücrelerinde, hücre büyümesi inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonu üzerindeki tedavisinin etkinliğini araştırmaktır. Sonuçlarımız, tüm konsantrasyonların anti-apoptotik Bcl-2 proteinini ifade ettiğini ve A-549 hücre hatlarının Navitoclax'a duyarlı olduğunu göstermektedir. Navitoclax apoptoz indüksiyonu yoluyla hücre çizgisi canlılığını daha da azaltmıştır.

SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızda insan akciğer kanser hücrelerinde in vitro Navitoclax uygulamasının apoptozu indüklediği ve hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Navitoclax'ın hücre canlılığını azaltıcı etkisinin hücrelerde apoptozu indükleyici

etkisinden kaynaklanabileceğini göstermektedir. Yeni yapılacak çalışmalarda in vivo denemelerle Navitoclax'ın etkisine yönelik mekanizmaların daha iyi anlaşılacağı düşünülmektedir. Ayrıca ileride yapılacak olan çalışmalarda Navitoclax ile birlikte kemoterapik ilaçların kombine edilerek kullanılması, akciğer kanseri tedavisine yeni yaklaşımlar getirebileceğini düşündürmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Etik izin

Bu çalışma "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" Madde 8 (k) gereği HADYEK iznine tabi değildir. Ayrıca yazarlar Araştırma ve Yayın Etiğine uyulduğunu beyan etmişlerdir.

Finansal destek

Bu çalışma, finansal olarak herhangi bir kurumdan destek almamıştır.

KAYNAKLAR

- Adams JM, Cory S.** The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 2007, 1324–37.
- Anderson MA, Huang D, Roberts A.** Targeting Bcl-2 for the treatment of lymphoid malignancies, *Semin Hematol.* 2014 Jul; 51(3):219-27.
- Anuar NN, Hisam NS, Liev SL, Ugusman A,** Clinical Review: Navitoclax as a Pro-Apoptotic and Anti-Fibrotic Agent, *Front Pharmacol.* 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.564108
- Brunelle JK, Letai A.** Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *Journal of Cell Science*, 2009, 122, 437-441.
- Dawson SJ, Makretsov N, Blows FM, Driver KE, Provenzano E, Le Quesne J, Baglietto L, Severi G, Giles GG, McLean CA, Callagy G, Green AR, Ellis I, Gelmon K, Turashvili G, Le ung S, Aparicio S, Huntsman D, Caldas C, Pharoah P.** BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *British Journal of Cancer*, 2010, 103, 668-675.
- Fiebig AA, Zhu W, Hollerbach C, Leber B, Andrews DW.** Bcl-XL is qualitatively different from and ten times more effective than Bcl-2 when expressed in a breast cancer cell line. *BMC Cancer*, 2006, 6, 213.
- Gonsalves WI, Buadi FK, Kumar SK.** Combination therapy incorporating Bcl-2 inhibition with Venetoclax for the treatment of refractory primary plasma cell leukemia with t (11;14). 2018. *Eur. J. Haematol.* 100, 215–217. <https://doi.org/10.1111/ejh.12986>.
- Hamdy R, Elseginy SA, Ziedan NI, Sadek M, Lashin M, Jones AT, Westwell AD.** Design, Synthesis and

Evaluation of New Bioactive Oxadiazole Derivatives as Anticancer Agents Targeting Bcl-2, *Int J Mol Sci.* 2020, doi: 10.3390/ijms21238980.

- Hanahan D, Weinberg RA.** The hallmarks of cancer, *Cell*, 2000, 100(1):57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144, 646–674.
- Hwang KT, Kim YA, Kim J, Oh HJ, Park JH, Choi IS, Park JH, Oh S, Chu A, Lee JY, Hwang KR.** Prognostic influences of BCL1 and BCL2 expression on disease-free survival in breast cancer, *Sci. Rep.*, 2021 Jun 7. doi: 10.1038/s41598-021-90506-x.
- Jackman DM, Johnson BE.** Small-cell lung cancer, *Lancet*, 2005, 366(9494):1385-96.
- Korsmeyer SJ.** Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death, *Blood*, 1992, 80(4): 879-86.
- Lee EY, Gong EY, Shin JS, Moon JH, Shim HJ, Kim SM, Lee S, Jeong J, Gong JH, Kim MJ, Lee DH, Park YS, Shin J, Hong SW, Kim YS, Jin DH.** Human breast cancer cells display different sensitivities to ABT-263 based on the level of survivin, *Toxicol In Vitro*, 2018 Feb;46:229-236. doi: 10.1016/j.tiv.2017.09.023. Epub 2017 Sep 23.
- Llambi F, Green DR.** Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Curr Opin Genet Dev*, 2011, 12–20.
- Lock R, Carol H, Houghton PJ, Morton CL, Kolb EA, Gorlick R, Reynolds CP, Maris JM, Keir ST, Wu J, Smith MA,** Initial Testing (Stage 1) of the BH3 Mimetic ABT-263 by the Pediatric Preclinical Testing Program, *Pediatr Blood Cancer* 2008. 50:1181–1189.
- Lowe SW, Cepero E, Evan G.** Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 2004, 432: 307–315.
- Martinou JC, Youle RJ.** Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. 2011. *Dev. Cell* 21, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.017>.
- Oakes SR, Vaillant F, Lim E, Lee L, Breslin K, Feleppa F, Deb S, Ritchie ME, Takano E, Ward T, Fox SB, Generali D, Smyth GK, Strasser A, Huang DC, Visvader JE, Lindeman GJ.** Sensitization of BCL-2-expressing breast tumors to chemotherapy by the BH3 mimetic ABT737. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2012b. 2766-2771.
- Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ, Joseph MK, Kitada S, Korsmeyer SJ, Kunzer AR, Letai A, Li C, Mitten MJ, Nettesheim DG, Ng S, Nimmer PM, O'Connor JM, Oleksijew A, Petros AM, Reed JC, Shen W, Tahir SK, Thompson CB, Tomaselli KJ, Wang B, Wendt MD, Zhang H, Fesik SW, Rosenberg SH.** An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, 2005. 435, 677–681. <https://doi.org/10.1038/nature03579>.
- Pommier Y, Sordet O, Antony S, Hayward RL, Kohn KW.** Apoptosis defects and chemotherapeutic resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene*, 2004, 23, 2934-2949.
- Sato M, Shames DS, Gazdar AF, Minna JD.** A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2007, 2:327-43; PMID:17409807; <http://dx.doi.org/10.1097/01.JTO.0000263718.69320.4c>.
- Shangary S, Johnson DE.** Peptides derived from BH3 domains of Bcl-2 family members: a comparative analysis of inhibition of Bcl-2, Bcl-x L and Bax oligomerization, induction of cytochrome c release, and activation of cell death. *Biochemistry*, 2002. 41, 9485–9495. <https://doi.org/10.1021/bi025605h>
- Suvarna V, Singh V, Murahani M.** Current overview on the clinical update of Bcl-2 anti-apoptotic inhibitors for cancer therapy. *European Journal Of Pharmacology*, 2019, 5, 172655.
- Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, Johnson EF, Marsh KC, Mitten MJ, Nimmer P, Roberts L, Tahir SK, Xiao YU, Yang X, Zhang H, Fesik S, Rosenberg SH, Elmore SW,** ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor, *Cancer Res.* 2008 May 1;68(9):3421-8 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5836.
- Vaillant F, Merino D, Lee L, Breslin K, Pal B, Ritchie ME, Smyth GK, Christie M, Phillips LJ, Burns CJ, Mann GB, Visvader JE, Lindeman GJ.** Targeting BCL-2 with the BH3 mimetic ABT-199 in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Cell*, 2013. 24, 120-129.
- Wang J, Yang D, Luo Q, Qiu M, Zhang L, Li B, Chen H, Yi H, Yan X, Li S, Sun J.** APG-1252-12A induces mitochondria-dependent apoptosis through inhibiting the antiapoptotic proteins Bcl-2/Bcl-xl in HL-60 cells. 2017. *Int. J. Oncol.* 51, 563–572. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4028>.
- Weyhenmeyer B, Murphy AC, Prehn JH, Murphy BM.** Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family members for the treatment of cancer. *Exp Oncol*, 2012, 192–9.
- White P, Kaestner PW.** Gene Expression Analysis in Diabetes Research, *Methods Mol Biol.* 2009;560, 239-61.
- William WN Jr, Glisson BS.** Novel strategies for the treatment of small-cell lung carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8:611-9; PMID:21691321; <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.90>.
- Yip KW, Reed JC.** Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, 2008, 6398–406.
- Youle RJ, Strasser A.** BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 47–59.
- Zhu Y, Tchkonina T, Stroissnigg HF, Dai HM, Ling YY, Stout MB, Pirtskhalava T, Giorgadze N, Johnson KO, Giles CB, Wren JD, Niedernhofer LJ, Robbins PD, Kirkland KL.** Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors, *Aging cell*, 2016, 428–435.