

# Vinkristinin Uyardığı Apoptozis Üzerine $\beta$ -Karoten ve Folik Asitin Etkileri

Erkan Yurtcu\*, Özge Özalp Yüreğir\*\*, Feride İffet Şahin\*\*

\*Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Ankara

\*\*Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD, Ankara

**Amaç:** Bir kemoterapötik ajan olan vinkristin, iğ iplikçiklerinin oluşumunu hem neoplastik hem normal hücrelerde engellemektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda farklı kemoterapötik ajanlarla uyarılan apoptozisin, ortama folik asit ve  $\beta$ -karoten eklenmesi ile *in vitro* olarak geri dönüşümü gösterilmiştir. Bu çalışmada insan multiple myeloma (MM) hücre dizisi ARH77 ve insan kronik myeloid lösemi (KML) hücre dizisi K562 kültürlerinde vinkristinin uyardığı apoptozise folik asit ve  $\beta$ -karotenin tek tek ve birlikte etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** İnsan MM hücre dizisi ARH77 ve insan KML hücre dizisi K562 standart hücre kültürü koşullarında üretilerek 24, 48 ve 72 saat süre ve  $10^{-5}$ M konsantrasyonda vinkristin ile muamele ederek apoptozis uyarılmıştır. Folik asit ve  $\beta$ -karoten tek tek veya birlikte sırasıyla  $10^{-5}$  ve  $10^{-7}$  M konsantrasyonlarda eklenerek etkileri izlenmiştir. Her kültürden canlı hücre oranı belirlendikten sonra, en az 500 hücre apoptotik bulgular açısından analiz edilmiştir. İstatistiksel analizler iki oran z testi ile yapılmıştır.

**Bulgular:** ARH77 hücrelerinde vinkristinin indüklediği apoptotik hücre oranlarında folik asit ve  $\beta$ -karotenin tek tek veya birlikte eklenmesiyle anlamlı azalma belirlenmemiştir ( $p > 0.05$ ). K562 hücrelerinde ise 24 saat süreyle uygulanan vinkristinin indüklediği apoptozis hem folik asit hem de  $\beta$ -karotenin tek tek veya birlikte eklenmesiyle istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır ( $p < 0.05$ ).

**Anahtar Kelimeler:** Vinkristin, apoptozis, folik asit, beta-karoten, ARH77, K562

## The Effects of Beta-Carotene and Folic Acid on Vincristine-Induced Apoptosis

**Background:** A chemotherapeutic agent, vincristine, inhibits spindle fiber formation in both the neoplastic and normal cells. Reversal of apoptotic effects may be exerted by folic acid and beta-carotene addition *in vitro*. In this study, we aimed to investigate the effects of folic acid and beta-carotene added alone or together on vincristine induced apoptosis in human multiple myeloma cell line ARH77 and human chronic myeloid leukemia cell line K562 cultures.

**Materials and Methods:** Apoptosis was induced by  $10^{-5}$ M vincristine added to the cultures for 24, 48 and 72 hours. Folic acid and beta-carotene were added alone or together in  $10^{-3}$  M and  $10^{-7}$ M respectively. Cell viability of every culture was determined after which at least 500 cells were analyzed for apoptotic features. Statistical comparisons of ratios were made with two proportion z test.

**Results:** In ARH77 cells, no significant decrease in apoptotic cell ratios were determined after folic acid and beta-carotene addition alone or together ( $p > 0.05$ ). Whereas, in K562 cells, after incubation with vincristine for 24 hours, apoptotic cell ratios were significantly reduced by folic acid and beta-carotene treatment one at a time or together ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Reversal of apoptotic effects is dependent on type and metabolic activity of the target cells as well as the induction mechanism of the agent used.

**Key Words:** Vincristine, apoptosis, folic acid, beta-carotene, ARH77, K562

Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptozis hücresel homeostazisin sürdürülmesinde önemli role sahiptir. Apoptozis kemoterapötik ajanlar, büyüme faktörü eksikliği ve irradasyon gibi çok sayıda faktör tarafından uyarılabilir.<sup>1</sup> Çoğu kemoterapötik ajan neoplastik hücrelerde olduğu gibi normal (transforme olmamış) hücrelerde de apoptozisi uyarır. Çeşitli kemoterapi protokollerinde yer alan vinkristin mitozda mikrotübül oluşumunu engelleyerek hücre döngüsünü  $G_2$ -M geçişinde durdurur ve apoptozisi uyarır.<sup>2,3</sup>

Diyette alınan mikrogıdaların eksikliğinde, DNA bütünlüğünün sürdürülmesinde gerekli enzimlerin yokluğuna benzer veya DNA'nın karsinojenik etkilere maruz kalmasıyla ortaya çıkan sonuçlara benzer tablolar gözlenmektedir.<sup>4</sup> Laboratuvar deneyleri ve klinik çalışmalardan elde edilen veriler ışığında bu mikrogıdaların aynı zamanda kanser hastalarında kemoterapinin başarısını da artırdığı bilinmektedir.<sup>5</sup> Vitamin A'nın (retinoik asit) suda eriyebilen öncülü olan  $\beta$ -karoten bir antioksidan olup dokularda peroksit radikallerinin yakalanmasından sorumludur.  $\beta$ -karotenin özellikle kimyasal karsinogenezde koruyucu rolü olduğu bilinmektedir.<sup>6,7</sup> DNA replikasyonunda çok önemli rol oynayan folik asit ise adenin ve timin sentezinde esansiyeldir. Folik asit, hücreyi DNA kırıklarına ve DNA hipometilasyonuna karşı korur.<sup>8</sup> Özellikle, DNA üzerindeki p53'ün kodlandığı bölgeyi hipometilasyondan koruduğu için DNA tamirinde çok önemli rol oynar.<sup>9,10</sup> İn vitro çalışmalarda kültür ortamına folik asit ve  $\beta$ -karoten eklendiğinde genomik instabilitenin azaltıldığı gösterilmiştir.<sup>4,7</sup>

Normal diyet ve kemoterapinin yan etkilerini azaltmak amacıyla kullanılan bu iki maddenin neoplastik hücrelerde, kemoterapötik ajanlarla uyarılan apoptozisin geri dönüşümü üzerine olan etkisinin araştırılması bu çalışmanın temel hedefini oluşturmaktadır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**1- Hücre kültürü ve kimyasalların uygulanması:** İnsan MM hücre dizisi ARH77 ve KML hücre dizisi K562 hücreleri %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve 2 mM L-Glutamin içeren RPMI besi yeri içinde 24'lü kültür kaplarında üretildi. Hücreler %5 CO<sub>2</sub>, %95 nem içeren ortamda 37°C de inkübe edildi.

Çalışma öncesinde hücre canlılıkları tripan mavisi boya atma testi, hücre sayıları ise Thoma lamı ile sayılarak belirlendi. 24'lü kültür kabının her bir kuyucuğunda %98'i canlı en az 10<sup>5</sup> hücre olacak

şekilde deneylere başlandı. Kontrol kuyucuğu hariç her bir kuyucuğa son konsantrasyonu 10<sup>-5</sup> M olacak şekilde vinkristin uygulandı. Buna ek olarak inkübasyon süreleri 24, 48 ve 72 saat olmak üzere tüplere sırasıyla; 10<sup>-6</sup>M  $\beta$ -karoten tek başına, 10<sup>-7</sup> M folik asit tek başına ve 10<sup>-6</sup> M  $\beta$ -karoten ve 10<sup>-7</sup> M folik asit birlikte eklendi. Kontrol kuyucuğuna çözücü olarak kullanılan %96'lık 5  $\mu$ l etanol eklendi.<sup>7</sup>

**2- Apoptozisin belirlenmesi:** Apoptotik hücrelerin etidyum bromür ve akrinin turuncusu ile boyanma kalıpları incelenerek floresan mikroskop (Nicon Eclips E600) ile değerlendirildi. Her kültürden en az 500 hücre morfolojik olarak değerlendirildi (Resim1).

**3-İstatistik analiz:** İstatistiksel değerlendirmede iki yüzde arasındaki farkın önemlilik testi kullanıldı. Sonuçlar yüzde (%) olarak ifade edildi. p<0.05 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Gerek ARH77 gerekse K562 hücre dizisinde 10<sup>-5</sup> M vinkristin ile 24-72 saat inkübasyon sonrasında apoptotik hücre oranlarında artış gözlemlendi. Yükselen oranlar ile indüklenmemiş kontrol hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi (p<0.05). ARH77 hücre dizisi kültürlerinde vinkristinin ile artan apoptotik hücre oranlarında kültürlerle  $\beta$ -karoten veya folik asitin tek tek veya birlikte eklenmesiyle istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlemlendi (p>0.05), (Tablo 1). K562 hücre dizisi kültürlerinde ise  $\beta$ -karoten ile 24 ve 48 saat inkübe edildiğinde, folik asit ile 24 saat inkübe edildiğinde veya her iki maddenin birlikte eklenerek 24 saat inkübasyona tabi tutulduğunda apoptotik hücre oranlarının, vinkristinin tek başına eklendiği kültürler ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düşüş saptandı (p<0.05), (Tablo 2). Çözücü kontrolü olarak kullanılan %96'lık etanolün eklendiği kültürlerde madde eklenmemiş kültürlerle kıyasla apoptotik hücre oranlarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış saptanmadı (p>0.05).

**Tablo 1:** ARH77 hücre dizisinde gözlenen apoptotik hücre oranları

	Apoptotik hücre oranları (%)					Kimyasal uygulanmamış hücreler
	Vinkristin (10 <sup>-5</sup> M)	Vinkristin (10 <sup>-5</sup> M) + $\beta$ -Karoten (10 <sup>-6</sup> M)	Vinkristin (10 <sup>-5</sup> M) + Folik asit (10 <sup>-7</sup> M)	Vinkristin (10 <sup>-5</sup> M) + $\beta$ -Karoten (10 <sup>-6</sup> M) + Folik asit (10 <sup>-7</sup> M)	Etanol (%96) (çözücü kontrol) 5 $\mu$ l	
24 saat	11,6 *†	5,8 *†	6,2 *†	5,8 *†	0,8	0,2
48 saat	13,2 *†	10,6 *†	9 *†	11,6 *†	0,7	0,2
72 saat	19,2 *†	8,8 *†	16 *†	5,8 *†	2,7	0,2

\* hiçbir kimyasal uygulanmamış hücrelerde görülen apoptotik hücre oranları ile arasındaki fark (p<0.05)

† çözücü kontrolü olarak kullanılan etanole bağlı apoptotik hücre oranları ile arasındaki fark (p<0.05)

## Vinkristinin Uyardığı Apoptozis Üzerine $\beta$ -Karoten ve Folik Asitin Etkileri

**Tablo 2:** K562 hücre dizisinde gözlenen apoptotik hücre oranları

	Apoptotik hücre oranları (%)					Etanol (%96) 5 $\mu$ l	Kimyasal uygulanmamış hücreler
	Vinkristin (10 <sup>-5</sup> M)	Vinkristin (10 <sup>-5</sup> M)+ $\beta$ -Karoten (10 <sup>-6</sup> M)	Vinkristin (10 <sup>-5</sup> M) + Folik asit (10 <sup>-7</sup> M)	Vinkristin (10 <sup>-5</sup> M) + $\beta$ -Karoten (10 <sup>-6</sup> M) + Folik asit (10 <sup>-7</sup> M)			
24 saat	18 *†	8,4 *†*	4,8 *†*	4,8 *†*	0,4	0,2	
48 saat	17,6 *†	5,2 *†*	10 *†	7,8 *†	0,6	0,2	
72 saat	13,6 *†	9,8 *†	9,2 *†	9,8 *†	0,9	0,2	

♦ hiçbir kimyasal uygulanmamış hücrelerde görülen apoptotik hücre oranları ile arasındaki fark (p<0.05)

† çözücü kontrolü olarak kullanılan etanole bağlı apoptotik hücre oranları ile arasındaki fark (p<0.05)

\* vinkristin ile uygulama sonrası elde edilen apoptotik hücre oranları ile arasındaki fark (p<0.05)

### TARTIŞMA

Apoptozis hücre bölünmesi ve ölümü arasındaki dengeyi sağlayarak hücre homeostazine katkı sağlar. Temel olarak kanser kemoterapilerinin amacı hücre ölümünü apoptozis yolu ile uyarmaktır.<sup>2</sup> Vinkristin KML ve MM'u da kapsayan farklı malignitelerin kemoterapi protokollerinde diğer ajanlarla birlikte kullanılmaktadır.<sup>11,12</sup> Bizim deneyimizde vinkristin ARH77 ve K562 hücre dizilerinde vinkristin uygulanmamış hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde apoptotik hücre oranlarında artış sağlamıştır (p<0.05), (Tablo 1-2).

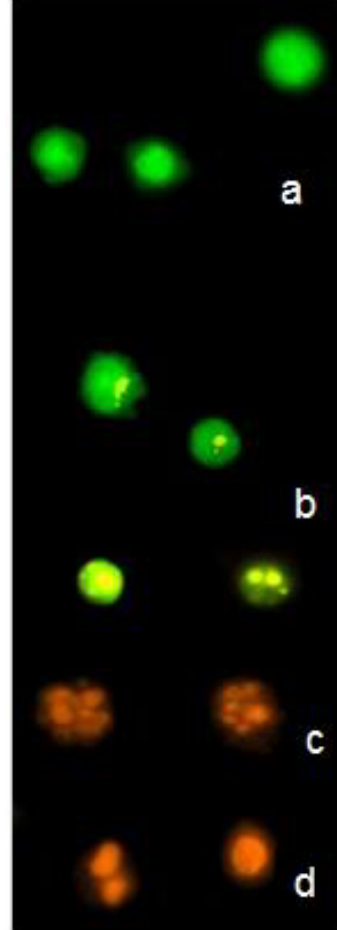
$\beta$ -karoten, tek değerlikli oksijen radikallerini bağlayan serbest radikal tutucu olarak ekili bir antioksidan olmasının yanı sıra, kimyasal karsinogenezi de önler ve bu etkisini, diğer antioksidanlardan farklı olarak karsinogen ajanlarla çapraz bağlar kurarak gerçekleştirir.<sup>13</sup> Folik asit ise DNA onarımında ve DNA ipliği kırıklarında, urasilin DNA'ya yanlış katılımının onarımında rol oynar. Eksikliğinde DNA instabilitesi gerçekleşir. DNA onarımının bozulması, kırık oluşumu ve metilasyon değişimlerine bağlı bu mekanizmalar folik asit ile ilişkili karsinogenezin oluşumunda aday mekanizmalardır. Folik asit alımının artması ile kolorektal kanser riskinin azaldığı ve gebelikte kullanılması ile bebekte lösemi gelişme riskinin yarıya indiği bildirilmiştir.<sup>14</sup>

Daha önceki in vitro çalışmalarda  $\beta$ -karoten ve folik asitin değişik hücre tiplerinde proapoptotik ajanların uyardığı apoptozisin geri dönüşümünde ve kardeş kromatid değişiminin azaltılmasında rol aldığı gösterilmiştir.<sup>7,15</sup> Bu çalışmada,  $\beta$ -karoten ve folik asitin lösemi hücre dizilerinde benzer etkileri araştırılmıştır.

Vinkristin MM olgularında standart tedavi protokollerinde kullanılan bir kemoterapötik ajan olarak bizim çalışmamızda da beklendiği şekilde myeloma hücre dizisi hücrelerinde apoptozis oranını

### Resim 1

- Canlı hücreler bozulmamış yapıda parlak yeşil çekirdeğe sahiptir.
- Hala bozulmamış membrana sahip fakat DNA parçalanması başlamış erken apoptotik hücreler yeşil çekirdeğe sahiptir fakat çekirdek etrafındaki kromatin kondensasyonu parlak yeşil bölgeler halinde görülebilmektedir.
- Geç apoptotik hücrelerin kromatinini kondanse olmuş, turuncudan kırmızıya değişen çekirdek görünümü vardır.
- Nekrotik hücrelerse bozulmamış çekirdek görünümüne sahiptir ve turuncudan kırmızıya değişen floresans yayma özelliğine sahiptirler.



madde eklenmemiş kontrol kültürlerine oranla artırmıştır ( $p < 0.05$  Tablo 1). Çalışmamızda kullandığımız  $\beta$ -karoten ve folik asitin vinkristinin ARH77 hücrelerinde indüklediği apoptozisi azaltmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüş sağlamadığını gözledik ( $p > 0.05$ ). Benzer koşullarda çalışmamız kapsamında yer alan K562 hücre dizisinde ise benzer doz ve sürelerle uygulanan  $\beta$ -karoten ve folik asit ile apoptotik hücre oranlarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüş sağlandı ( $p < 0.05$ , Tablo 2)

İnsan lenfoblastik lösemi hücre dizisi Jurkat'da vinkristinin mitokondriyal yolla apoptozisi uyardığı ve uygulama sonucunda reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücre içi miktarının arttığı bildirilmiştir. ROS üretiminin antioksidanlarla engellenmesinin kaspaz-9 ve -3'ün üretimini ve apoptozisi engellediği gösterilmiştir.<sup>16</sup>

Sonuçlarımıza göre gerek  $\beta$ -karoten ve gerekse folik asit K562 hücre dizisinde zamana bağlı olarak etkilerini göstermektedir. Uygulama süresinin uzaması ile her iki kimyasalın etkileri azalmakta ve sonuçta kaybolmaktadır. Bu durum kimyasalların metabolize edilmesiyle açıklanabilir. MM hücre dizisinden farklı olarak bu hücre dizisinde apoptotik etkilerde geri dönüşün gözlenmesi her iki hücre tipinde farklı hücre içi yolların aktive olduğunu ve hücrelerin farklı biyolojik özelliklerinin olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda kullandığımız benzer kemoterapötik ajan ve kimyasal maddelerin iki farklı özellikteki hücre dizisinde farklı etkide bulunduğunu gözledik. Bizim bulgularımız in vitro deneyler sonucunda elde edilmiş olmakla birlikte in vivo sistemde metabolizmanın da katkısı ile bulguların etkilenebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Kanser hastalarının büyük bir kısmının, standart kemoterapi protokollerinde yer almamasına rağmen, vitaminleri ve antioksidanları normal diyetle veya normal diyete ek olarak aldığı bilinmektedir. Normal hücreler gibi kanser hücreleri de antioksidanları ve vitaminleri de içeren mikrogıdılara ihtiyaç duymaktadır ve düşük doz antioksidanların diyetle

alındığı zaman bazı kanser hücrelerinin bölünmesini uyardığı bilinmektedir.<sup>5</sup> Çalışmamızın sonuçları bu kapsamda değerlendirildiğinde kemoterapi alan hastalarda destek olarak verilen benzer kimyasalların kanser hücreleriyle olan etkileşiminin verilen tedavinin ve hedef hücre tipinde işleyen moleküler mekanizmaların temel alınarak uygulanması gerekliliği açıktır. Her hücre ve molekülün hücre içindeki etki yolu kendine özgü olduğundan mekanizmaya yönelik çalışmaların aydınlatıcı olacağı görüşündeyiz.

## KAYNAKLAR

- 1- Ryungsa K.,Recent Advances in Understanding the Cell Death Pathways Activated by Anticancer Therapy Cancer (2005) 103 (8): 1551-60
- 2- Ricci M.S, Zong WX., Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways Oncologist 2006;11:342-57
- 3- Kuo C., Hsieh H.,Pan W.,Chen C. et al. BPR01075, a Novel Synthetic Indole Compound with Antimitotic Activity in Human Cancer Cells, Exerts Effective Antitumoral Activity in Vivo Can res. 64,(2004) 4621-4628,
- 4- Fenech M., Recommended dietary allowances (RDAs) for genomic stability Mutation Research 480-481 (2001) 51-4
- 5- Prasad K.N. Multiple Dietary antioxidants enhance the efficacy of standart and experimental cancer therapies and decrease their toxicity Integr Cancer Ther. 2004 3(4):310-22
- 6- Prakash P., Russell R.M., Krinsky N.I. In Vitro Inhibition of Proliferation of Estrogen-Dependent and Estrogen- Independent Human Breast Cancer Cells Treated with Carotenoids or Retinoids J Nutr. 2001 131(5):1574-80.
- 7- Yilmaz Z., Karabay G., Oktem M., et al. The apoptotic effects of mitomycin C on human endometrial cell cultures and reversal of its effects by  $\beta$ -carotene and folic acid. Acta Physiol Hung. 2006 93(1):41-51
- 8- Wang X., Fenech M.: A comparison of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate for prevention of DNA damage and cell death in human lymphocytes in vitro, Mutagenesis 2003, 18: 81-6
- 9- Fenech M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells Mutation Research 475 (2001) 57-67
- 10- Zijno A., Andreoli C., Leopardi P., et al. Folate status, metabolic genotype, and biomarkers of genotoxicity in healthy subjects, Carcinogenesis, 2003, 24: 1097-103
- 11- Giles F.J., Kantarjian H., O'Brien S., et al. Results of therapy with interferon alpha and cyclic combination chemotherapy in patients with philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia in early chronic phase Leuk. Lymphoma 2001 41 (3-4): 309-19
- 12- Jimenez-Zepeda VH, Dominguez-Martinez VJ. Vincristine, doxorubicin, and dexamethasone or thalidomide plus dexamethasone for newly diagnosed patients with multiple myeloma? Eur J Haematol. 2006 77(3):239-44.
- 13- Hanukoglu I: Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells, Drug Metab Rev. 2006;38:171-96
- 14- Park In-C, Park MJ, Hwang CS, et al. MMC induced apoptosis in a caspase-dependent and Fas/CD95-independent manner in human gastric adenocarcinoma cells. Cancer Letters. 2000;158:125-32
- 15- Bal F., Sahin F.I., Yirmibes M., et al. The in vitro effect of  $\beta$ -carotene and mitomycin C on SCE frequency in Down's syndrome lymphocyte Cultures Tohoku J. Exp. Med. 1998, 184, 295-300
- 16- Groninger E., Meeuwssen-de Boer G.J., De Graaf S.S.N., et al. Vincristine induced apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells: A mitochondrial controlled pathway regulated by reactive oxygen species? International Journal Of Oncology 2002 21: 1339-45,

## Yazışma Adresi:

Dr.Erkan YURTCU  
Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,  
ANKARA