ARAŞTIRMA MAKALESİ

Merve Alpay[1,2]

[1]Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilimdalı, Düzce, Türkiye
[2]MD Anderson Cancer Center, Department of Cancer Systems Imaging, Texas

Yazışma Adresi:
Merve Alpay
Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilimdalı, Düzce, Türkiye
Email: mervealpay86@yahoo.com

Geliş Tarihi: 26.10.2018
Kabul Tarihi: 03.02.2019
DOI: 10.18521/ktd.475324

Konuralp Tıp Dergisi
e-ISSN1309–3878
konuralptipdergi@duzce.edu.tr
konuralptipdergisi@gmail.com
www.konuralptipdergi.duzce.edu.tr

Kansere Yeni Yaklasim: Akciger Kanserinde in Vitro Antianjiyogenik Tedavi

ÖZET

Amaç: Anjiyogenez, endotelyal hücreler, malign durumlardaki tümör hücrelerinin yanı sıra kemik iliği kaynaklı hücreler ve stromal hücreleri içeren tümör mikroçevresindeki hücreleri kapsayan çok faktörlü ve çok hücreli bir kompleks (pato-)fizyolojik olaydır. Bu olayın ana faktörü, vasküler endotelyal büyüme faktörüdür (VEGFA). Son yillarda tümör hücrelerinde potansiyel damarlanma sinyalini bloke etmek için VEGFA reseptörüne karşı Bevacizumab (anti-VEGF) ajani kullanılmaktadır ve akciğer kanseri (NSCLC), kolorektal kanser, meme kanseri ve renal hücreli karsinomada in vitro deneylerle farklı etkinlikleri belirlenmiştir. Bu çalışmadaki temel hedef, Bevacizumab uygulanmış akciğer kanser hücrelerinde damarlanma etkinliği ve mekanizmasının normal hücrelerle karşılaştırılarak belirlenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Ana uyarıcı VEGF ve anjiyogenez blokajını sağlayan Bevacizumab uygulamaları ile hücre fonksiyonları incelendi. Normal epithelial HUVEC hattı ile akciğer kanser A549 hücre hattı kullanıldı ve ATCC protokolune göre kültüre edildi. Farklı dozlarda ajanlar uygulandıktan sonra, hücre canlılığı, Sytox çoğalma indeksi ve anjiyogenezden sorumlu basamak Notch etkinliği araştırıldı.

Bulgular: VEGF ile muamele edilen hücrelerde 24 saat inkubasyon ile hücre canlılığında belirgin artış saptandı. Iki hücre hattında canlılık düzeyleri karşılaştırıldığında VEGF etkisinin anlamlı derecede farklı olduğu görüldü. Bevacizumab uygulamasında ise, A549 hücrelerinin çoğalma indeksi anlamlı derece azaldı ve Notch mekanizması ile ilişkili ADAM10 protein düzeyinin, HUVEC hücresine göre anlamlı artış gösterdiği tespit edildi.

Sonuç: Elde edilen bulgulara göre anjiyogenez moleküler mekanizmasının açıklanması adına daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir. Geleneksel kanser tedavi yöntemleri yanı sıra etkisi bilinen antianjiyogenik ajanlarla kombine tedavilerin arttırılması başarı şansını arttıracaktır.

Anahtar Kelimeler: Anti-Anjiyogenez, Akciger Kanseri, A549, Anti-VEGF

New Approach to Cancer: Anti-Angiogenic Treatment in Vitro Lung Cancer

ABSTRACT

Objective: Angiogenesis is physiological event which involve endothelial cells and in malignant conditions involve bone-marrow derived cells, stromal cells related to tumor microenvironment is a multifactorial event. The main factor in this action is vascular endothelial growth factor (VEGFA). In recent years, bevacizumab (anti-VEGF) agent has been used against VEGFA receptor to block potential vascular signal in tumor cells and different activities were determined by in vitro experiments in lung cancer (NSCLC), colorectal cancer, breast cancer and renal cell carcinoma. The main objective of this study was to determine the vascularity and mechanism of vascular cancer in Bevacizumab-treated lung cancer cells compared to normal cells.

Methods: Study of cell functions with main stimulant VEGF and Bevacizumab applications which provide angiogenesis blockade. Normal epithelial HUVEC line and lung cancer A549 cell line were used and cultured according to ATCC protocol. After application of different doses of agents, cell viability, Sytox proliferation index and Notch pathway activity responsible for angiogenesis were investigated.

Results: Cells treated with VEGF showed a significant increase in cell viability with incubation for 24 hours. VEGF effect was significantly different in two cell lines compared to viability. In the application of Bevacizumab, the proliferation index of A549 cells decreased significantly and the ADAM10 protein level associated with the Notch mechanism was found to increase significantly compared to HUVEC cell.

Conclusion: According to the findings, it is seen that it needs more detailed studies to explain the molecular mechanism of angiogenesis. In addition to conventional cancer treatment methods, enhancing combined therapies with known antiangiogenic agents will increase the chances of success.

Keywords: Anti-Angiogenesis, Lung Cancer, A549, Anti-VEGF

GİRİŞ

Anjiyogenez, önceden var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşumu, çeşitli tümör tiplerinde randomize çalışmalarla, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) inhibitörlerini uyararak yeni damarlanma mekanizmasının şekillenmesidir (1). Yeni kan damarlarının gelişimi sadece tümör dokusunu besinlerle beslemek için değil, aynı zamanda kanser hücrelerinin metastaz yapması için bir araçtır. Bununla birlikte, tümör ve vaskülarizasyon arasındaki etkileşimin karmaşıklığı tam olarak çözülememiştir. Normal fizyolojik koşullar altında, pro- ve anti-anjiyogenik mediatörler arasında denge vardır ve bu denge, fizyolojik veya patolojik süreçlerin ilerlemesinde önemli rol oynar (2,3). Angiogenez, kanser hücrelerinin belirli uyaranlara maruz kalmasıyla aktive edilir, en başlıca etken tümörün kalınlığı 2 mm'den fazla büyüdüğü ve çekirdek hücrelerin kan kaynağından uzaklaştığı hipoksi ortamıdır (4).

Anjiyogenez hedeflenmesi, yeni kan damarlarının gelişmesini önlemek için etkili bir yaklaşım olabilir ve tümörle ilişkili damar sisteminin normalleştirilmesi için gerekli bir yöntemdir. Böylece, tümörlerin progresyonu ve metastazı önlenebilir ve kanser tedavisi için tamamlayıcı bir terapötik paradigma olarak hizmet edebilir (5,6).

1971 yılında Judah Folkman'ın ilk olarak antianjiyojenik ilaçlar olarak bahsettiği konsept, 30 yıl boyunca, anjiyogenez hakkında yaklaşık 10.000 araştırma makalesi yayınlanarak devam etti ve bir antianjiyojenik ilaç (Bevacizumab) ile kemoterapinin kombinasyonu şimdi Amerika Birleşik Devletleri'nde birçok kanser türünde birinci basamak tedavi olarak onaylandı (7).

Anjiyojenik tedavi kavramı, tümör biyolojisindeki çeşitli öngörülere dayanmaktadır. İlk olarak, tümör büyümesi için anjiyogenez kesinlikle gereklidir. Bu nedenle, anjiyogenezin (antianjiyogenik tedavi) inhibisyonu, tümör büyümesini önleyebilir. İkincisi, yüksek proliferatif aktiviteye bağlı olarak, tümör kaynaklı endotelyal hücreler seçici olarak hedeflenebilir. Üçüncü olarak, düşük mutasyon oranına bağlı olarak, endotelyal hücrelerin adaptif mutasyon yoluyla ilaç direncini kazanması mümkün değildir. Diğer bir deyişle, endotel hücreleri dirençlidir (8,9).

Akciğer kanseri, malignite tanısı konan hastalar arasında dünya çapında önde gelen ölüm nedenidir. Son yıllarda çok sayıda klinik çalışmada araştırılan yeni kemoterapi rejimlerine ve yeni sitotoksik kombinasyonlara rağmen, akciğer kanseri olan hastaların prognozunda belirgin bir iyileşme sağlanamamıştır (10). Amerikan Kanser Derneği'nden alınan istatistikler, 2018'de ABD'de yaklaşık 244.000 yeni akciğer kanseri vakasının yaşanacağını ve 154.000'den fazla ölümün hastalığa bağlı olduğunu tahmin etmiştir.

Akciğer kanser hücreleri genellikle geleneksel kemoterapi ve radyoterapiye dirençlidir. Bu tedaviden sonra nüksetmeye yol açabilir. Hedgehog, Wnt ve Notch gibi sinyal yolları genellikle hücrelerin kendini yenilemesinde rol oynamaktadır. Böylece, bu yolları hedefleyen tedaviler nüksü önlemeye yardımcı olabilir (11). Akciğer kanserleri akciğerlerin herhangi bir yerinde ortaya çıkabilir, ancak akciğer kanserlerinin %90-95'inin epitel hücrelerinden, daha büyük ve daha küçük hava yollarını (bronşlar ve bronşiyoller) kaplayan hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir; Bu nedenle akciğer kanserleri bazen bronkojenik kanserler olarak adlandırılır. Kanserler ayrıca pleuradan veya nadiren akciğerler içindeki destekleyici dokulardan, örneğin kan damarlarından kaynaklanabilir (12).

Onaylanan ve günümüzde kullanılan tüm antianjiyogenik ilaçlar, VEGF ligand bağlanmasını, hücre içi VEGFR2 aktivasyonunun bağlanması üzerine etkindir. VEGF, kemik iliğinden endotelyal hücre prekürsörlerinin bölünmesini, migrasyonunu, sağkalımını, vasküler geçirgenliğini ve kemotaksisini destekleyen birkaç endotelyal hücre sinyal yolunu uyarır (13). VEGF'ye ek olarak, tümör anjiyogenezine katkıda bulunan diğer önemli yollar da, anjiyopoietin (ANGPT) familyasının endotelyal hücre membranı reseptör tirozin kinaza bağlanmasıdır. ANGPT1, ANGPT2 veya her ikisini birden hedefleyen birkaç ilaç geç evre klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. VEGF ve anjiyopoietin yollarının eş zamanlı olarak hedeflenmesi ilgi çekicidir çünkü bu strateji toksisiteyi artırmadan etkinliği artırabilir. Tümör anjiyogenezine aracılık eden üçüncü bir yol veya sistem Notch-Notch-ligand sistemidir. Notch yolak inhibitörleri erken faz klinik çalışmalarda kullanılır (14,15).

Çalışmamızın temel amacı, akciğer kanserinde rutin uygulanan tedavi (cerrahi-kemoterapi- radyoterapi) yöntemleri dışında etkinliği daha arttırmak için tümör damarlanmasını yok etmek ve anti-anjiyogenik tedavinin hücre metastazında hangi yolağı inhibe ettiğini göstermektir

MATERYAL VE METOD

Anti-anjiyogenik ajanın etkinliğini hücreler üzerinde test etmek için, normal endotel hücre hattı ve akciğer karsinoma hattı kullanıldı. HUVEC (endotel) hücreleri % 10 FBS, % 1 NEAA (Sigma-Aldrich) ile MEM besiyerinde (Sigma-Aldrich, Almanya); A549 akciğer hücreleri %10 FBS, %1 Pen/Strep ile DMEMF12 ortamında kültürlendi. Tüm hücreler 37 °C sıcaklık, 5% CO2 ile inkube edildi. T75 flaskta yaklaşık % 70-80 oranında bulunan A549 hücrelerinin sayısı 1.77x106 / ml olarak hesaplandı (16).

VEGF and anti-VEGF uygulamalarında hücresel aktiviteyi değerlendirmek için her kuyucuğa eşit hacimde 5x104 hücre /100 ml'lik 96'lık plakalara ekildi. VEGF konsantrasyonu 1; 5; 10; 20 μg/ml; anti-VEGF konsantrasyonu 5; 10; 20;

40 µg/ml ayrıca kombine terapi Tablo 1 'de gösterildiği gibi uygulandı.

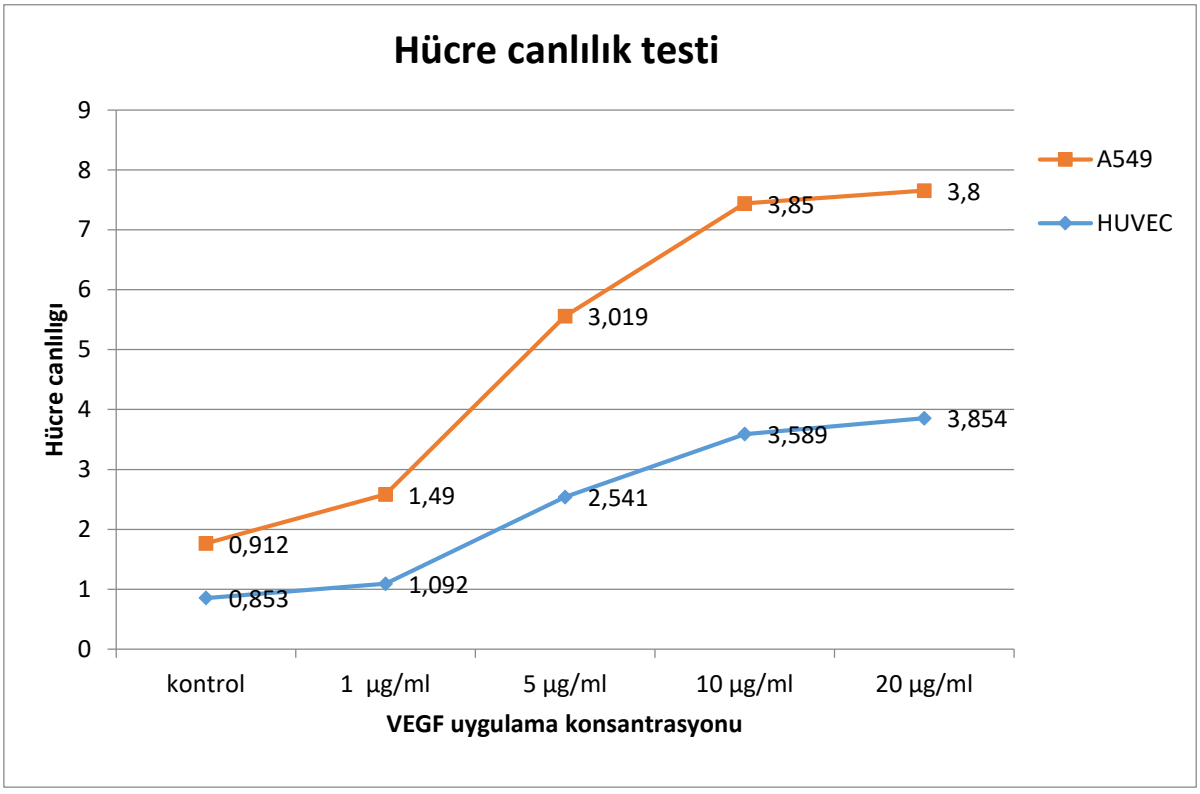
Anjiyogenik proliferasyon yeteneğine dayalı sytox aktivitesi flow sitometri kullanılarak belirlendi. Yapılan kantitatif analizle korele olarak anti-VEGF ve VEGF uygulanmış hücre gruplarında çoğalma indexleri morfolojik olarak görüntülendi. Belirlenen optimal dozlarla uygulama yapılan VEGF ve anti-VEGF ajanlarının bilinen etkisi akciğer karsinoma hücrelerinde mekanizma yönüyle araştırıldı. Antianjiyogenik tedavi etkinliğini akciğer kanserinde arttırmak için anti-VEGF uygulanmış hücre gruplarında Notch sinyal yolak belirteci immunokimyasal yöntemle değerlendirildi.

BULGULAR

Tüm deneylerde pozitif kontrol olarak kullanılan 0, 1, 5, 10, 20 µg/ml VEGF ile 24 saat inkübe edilen 2 hücre hattının canlılık değişimi belirlendi. Tüm zaman periyotları için kontrol (0) %100 olarak alındı ve diğer örneklerin canlılık değerleri ortalama absorbans değerlerinden hesaplandı. Hücre lizatlarındaki canlılık oranları artan VEGF konsantrasyonları ile orantılı belirgin bir şekilde arttı. Normal ve kanser hücre hatları karsılaştırmasında ise, log dozlarda uygulanan VEGF etkisinin anlamlı derecede farklı olduğu belirlendi. (Tablo 1) (Şekil 1).

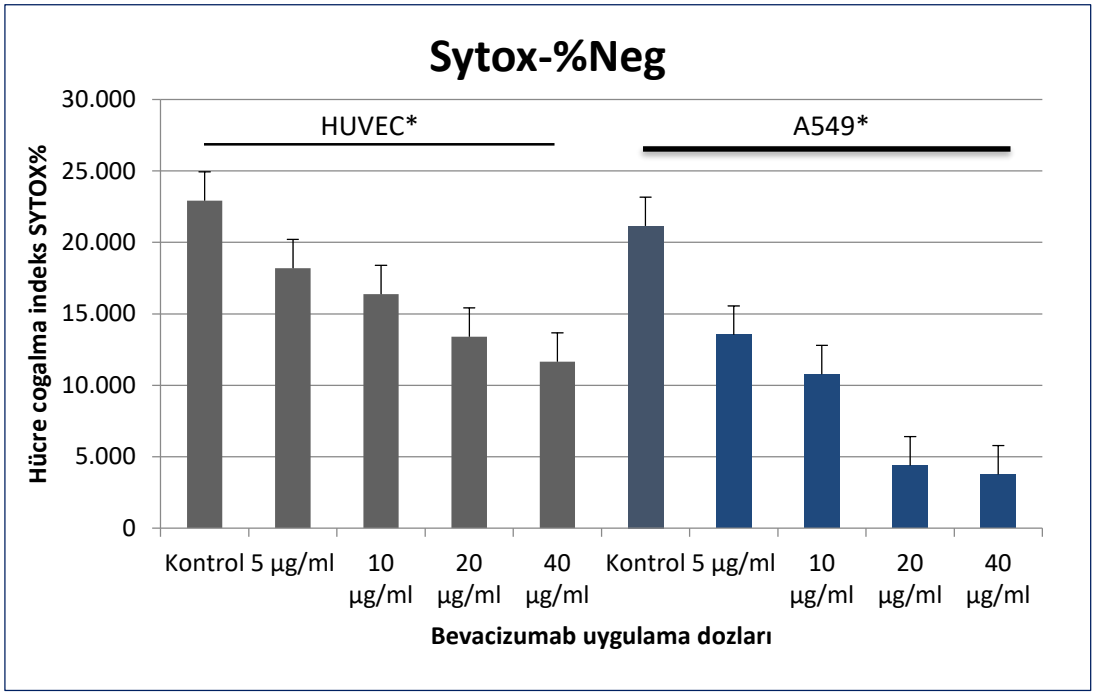
Tablo 1. Etken madde uygulama dozları ve grupları

HUVEC hücre / A549 hücre (24h)					
VEGF µg/ml	Kontrol (0)	1	5	10	20
Anti-VEGF (Beva) µg/ml	Kontrol (0)	5	10	20	40

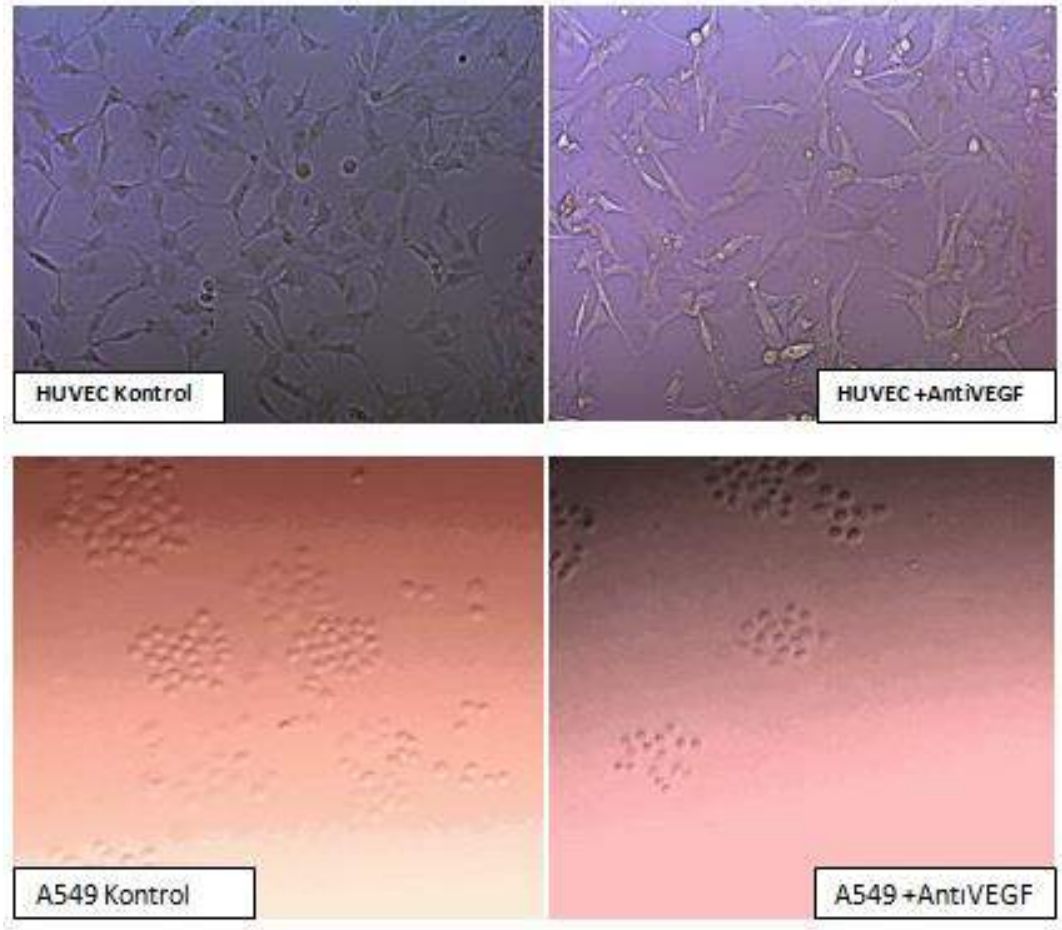


Şekil 1. VEGF ile inkube edilen hücrelerde canlılık oranları (24 saat)

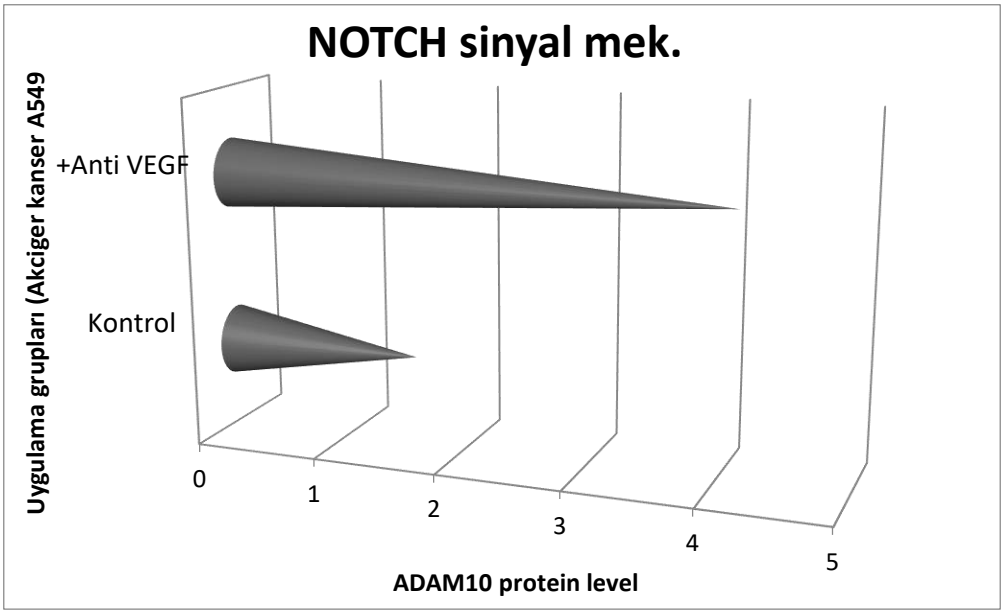
Bununla birlikte, anti-VEGF etkisi, Şekil 2'de gösterildiği gibi 24 saatlik inkübasyon ile artan doza bağlı (0; 5; 10; 20; 40 µg/ml) kullanılarak kontrol ile karşılaştırıldığında hücre canlılığını önemli ölçüde azalttı. Çoğalma indeksleri değerlendirilen hücrelerde, hücre ölümünün akciğer kanser hattında belirgin düzeyde normal epitel hücrelere kıyasla daha fazla olduğu görüldü.



Şekil 2. Anti-VEGF uygulamasında hücre çoğalma indeksi (24 saat)



Şekil 3. Anti-VEGF uygulamasında hucre morfolojik ve proliferatif değişim (24 saat)



Şekil 4. Anti-VEGF uygulanan hücre gruplarında anjiyogenik aktivitenin moleküler düzeyi

Bevacizumab (antiVEGF) ile uyarılan akciğer kanser hücrelerinde antianjiyogenez mekanizmasının belirlenmesi amacıyla ADAM10 protein düzeyleri değerlendirildi. Uygulama yapılmamış kontrol grubuna göre anti-VEGF grubunda 3 kat artan ADAM10 proteini, Notch sinyal mekanizmasının belirleyicisidir. Buna göre, antianjiyogenik ajanla muamele edilen akciğer kanser hücrelerinde Notch yolağının aktivasyonu ile damarlanmanın azaldığı anlaşılmaktadır.

TARTIŞMA

Çalışmaların sonuçları, oksijen ve besinlerin sağlanmasına ek olarak, yeni damar sisteminin, komşu tümör hücrelerinin büyümesini doğrudan uyarabilen ve potansiyel olarak yeni tedavi hedeflerini belirleyen büyüme faktörlerini salgılayabildiğini göstermiştir (17).

Antianjiyogenik terapinin sınırları nedir? Ya tedavinin düşük etkinliği ya da tedaviye bağlı tümör progresyonu kazanmasıdır. Antianjiyogenik tedavinin metastaz ve progresyonu artırdığına dair bir belirti yoktur. Bunun yanında, antianjiyojenik tedavi ‘‘tümör damarlanmasını baskılayarak tümör hücresini apoptoza yönlendirme’’ kuramları ile sınırlıdır. Tedavinin etkinliğini arttırmak için çeşitli stratejiler vardır. Güçlü VEGF blokajı, yerleşik tümörler ve metastazların gerilemesine neden olabilir.

Ancak bu paradoksaldır. Damarlanmanın yok edilmesinin, katı tümöre oksijen ve terapötiklerin verilmesini ciddi biçimde tehlikeye sokacağı ve birçok kemoterapötik yanı sıra radyasyonun daha az etkili olmasını sağlayacak olan hipoksiyi doğuracağı beklenebilir (18).

Kanser tedavisinin başarısının önündeki engellerden biri, ilaçların kanser hücrelerine verimsiz taşınması ile ilgilidir. Endotelyal hücreler (EC) arasındaki uygun ara bağların olmaması nedeniyle, tümör kan damarları fenestre edilir ve bu, kemoterapinin tümör dokusuna taşınması ve hatta dağıtılması için büyük bir engel teşkil eder. Tümör damarlarının bir başka özelliği de, damar duvarının ince olmasını sağlayan, aynı tümör içindeki ve farklı tümörler arasındaki geçirgenliği değiştiren perisitlerin olmamasıdır. Kemoterapötik ilaçların uygulanmasına dayanan birçok kanser türüne karşı tedavi, tümör büyümesini inhibe etmek için tümör kan damarı artışını azaltmayı amaçlayan anti anjiyojenik aktiviteye sahip moleküllerin kullanımıyla desteklenir (19,20).

Antianjiyojenik ilaçların başarısına rağmen, bazı sorular antikanser tedavisini iyileştirmek için daha fazla araştırmayı gerektirmektedir. İlk olarak, bazı kanser türleri dirençlidir; duyarlı hastalarda bile, antianjiyojenik ilaçlar sadece aylar boyunca yaşam süresini uzatırlar. Genel olarak klinik etkinlik, klinik öncesi yapılan araştırmalarda elde edilen kanser modellerinden daha düşüktür. Tümörün antianjiyogenik tedaviye karşı direnci, tümörlerin çoklu proanjiyojenik üretmelerinden kaynaklanir. Vaskularizasyona devam edebilmek için PlGF, FGF'ler, interlökin-8 ve diğerleri dahil olmak üzere VEGF'ye ek olarak moleküller üretirler. Tümör endotel hücreleri, VEGF blokajına karşı dirençli büyümüş olgun damarlar geliştirirken; diğer damarlanma yolu olan Notch sinyal mekanizmasının inhibisyonu ile deney modelinde antianjiyojenik ilaçlara karşı duyarlılığı geri yüklediği görülmüştür. Antianjiyogenik tedavide tümör direncinin kırılması kombine tedavi ile farklı sinyal yolaklarını aynı anda bloke etme yöntemiyle aşılabilir (21,22).

Çalışmada elde ettiğimiz bulgulara göre, akciğer kanserinde antianjiyogenik tedavinin tümör proliferasyonunu azalttığı ve anjiyogenezde önemli bir yolak olan Notch mekanizmasını aktive ettiği

görülmektedir. Daha önceki araştırmalarda açıklanan antianjiyogenik terapiler, çalışmamızdaki sonuçlarla korelasyon göstermektedir. Geleneksel tedavilerle birlikte kullanıldığında etkinliğin daha yüksek ve hızlı olduğu belirtilmelidir.

Antianjiyogenik ajanların aslında kanserle mücadele konusunda nasıl çalıştığını açıklayan tek bir mekanizma yoktur. VEGF-hedefli terapiye karşı dirençle ilgili olarak, bu dayanıklılığın vurgulandığı iki mekanizma tanımlanabilir: (i) tümörler tedavi başlangıcından (iç direnç) tamamen cevap vermezler veya (ii) başlangıçta yanıt verirler ve hala tedaviyi alıyorken büyümeye devam ederler (23, 24).

SONUÇ

Birçok klinik çalışmanın bulguları ve vaka çalışmaları, Bevacizumab (anti-VEGF) kullanımıyla ve/veya hastalık ilerleyişine kadar uzun bir süre ile yanıt oranlarında bir artış olduğunu saptamaktadır. Bununla birlikte, genel sağkalım üzerindeki etkinin daha net tanımlanması gerekmektedir. Rutinde kullanılan tek yolakla anjiyogenezi engelleyen preparatlar yerine, damarlanma mekanizmasının keşfedilmesiyle birkaç yolak inhibisyonu ile kombine antianjiyogenik ajanlar dizayn edilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. The New England journal of medicine. 2008; 358:2039-49.
2. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. Nature. 2005; 438:967-74.
3. Lingbao Ai et al. TRIM29 Suppresses TWIST1 and Invasive Breast Cancer Behavior Cancer Res, 2014; 74(17):1
4. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix- PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92:5510-4.
5. Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. Nat Rev Drug Discov. 2011; 10:417-27.
6. Paksoy S, Sağol Ö. Pankreas Adenokarsinomunda Anjiogenetik Aktivite ve Cox-2 Ekspresyonunun Prognostik Önemi. Konuralp Tıp Dergisi 2013; 5(3):18-23
7. H. Hurwitz et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. N. Engl. J. Med. 2004; 350: 2335.
8. Kerbel, R., Folkman, J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. Nat. Rev. Cancer 2002; 2: 727-739.
9. Büküm E ve ark. Mide Kanserli Hastalarda Siklin D1 (G870A) Gen Polimorfizminin Araştırılması. Konuralp Tıp Dergisi 2013; 5(1):18-22.
10. Spira A, Ettinger DS. Multidisciplinary management of lung cancer. N Engl J Med. 2004; 350:379-92.
11. Prabavathy D, Swarnalatha Y, Ramadoss N. "Lung cancer stem cells-origin, characteristics and therapy". Stem Cell Investigation. 2018; 5(6):6. doi:10.21037/sci.2018.02.01.
12. 12.https://www.lung.org/lung-health-and-diseases/lung-disease-lookup/lung-cancer/resource-library/lung-cancer-factsheet.html
13. Bridges EM, Harris L. The angiogenic process as a therapeutic target in cancer. Biochem Pharmacol 2011; 81: 1183-91.
14. Ridgway J, Zhang G, Wu Y, et al. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. Nature 2006; 444: 1083-87.
15. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature 2011; 47: 298-307.
16. https://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf
17. Butler JM, Kobayashi H, Rafi IS. Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. Nat Rev Cancer 2010; 10: 138-46.
18. H. Hurwitz et al., The Clinical Benefit of Bevacizumab in Metastatic Colorectal Cancer Is Independent of K-ras Mutation Status. The Oncologist 2009; 14:22–28.
19. Maes et al. Angiogenic–osteogenic coupling: the endothelial perspective. Bonekey Rep. 2014; 3: 578.
20. Jain RK. Antiangiogenesis Strategies Revisited: From Starving Tumors to Alleviating Hypoxia, Perspective 2014; 26(5):605-622.
21. Li JL, et al. DLL4-Notch signaling mediates tumor resistance to anti-VEGF therapy in vivo. Cancer Res. 2011; 71(18):6073-6083.
22. 22.Yildirim V et al. Sodium Nitrite Provides Angiogenic and Proliferative Effects In vivo and In vitro. Med Sci Monit Basic Res. 2015; 21: 41-46.
23. Bergers G.,Hanahan D. Modesofresistancetoanti-angiogenic therapy. Nat.Rev.Cancer 2008; 8:592-603. doi: 10.1038/nrc2442
24. Hein M, Graver S. Tumor cell response to bevacizumab single agent therapy in vitro. Cancer Cell International 2013; 13:94.