

İLAÇ YENİDEN KONUMLANDIRMA İLE BELİRLENEN ADAY İLAÇLARIN AKUT MYELOİD LÖSEMİ HÜCRELERİNDE PROTEAZOM İNHİBİTÖRÜ İLE KOMBİNASYON TEDAVİSİNİN İNCELENMESİ

Nalan Sümeyra Korkmaz^{1*}, Nurdan Keleşoğlu², Özlem Ateş Duru³, Beste Turanli², Medi Kori², Ayşe Mine Yılmaz Göler¹, Kazım Yalçın Arga², Betül Karademir Yılmaz¹

¹ Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı/Genetik ve Metabolik Hastalıkları Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye

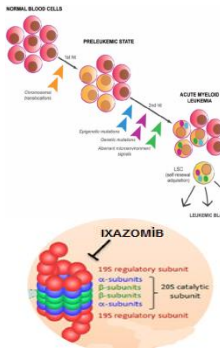
² Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İstanbul, Türkiye

³ Nişantaşı Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Yüksekokulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, İstanbul, Türkiye

GİRİŞ

Akut myeloid lösemi (AML), eş zamanlı farklılaşma durması ve kemik iliğinde ve kanda miyeloid öncüllerinin birikmesine yol açan hücre sinyal düzensizlikleri ile karakterize malign hematopoietik patolojilere sahiptir. AML tedavisinde standart kemoterapilerin lösemik hücreleri etkili ve uzun süreli bir şekilde hedefleyememesi nedeniyle, nükseden hastalar genellikle antilösemik ilaçlara direnç geliştirir. Bu nedenle tedaviye yanıtı iyileştirmek için yeni terapötik ajanlar belirlenmelidir.

Kanser hastalarında terapötik müdahale için umut verici bir moleküler hedef, gereksiz veya hasarlı proteinleri parçalayan multimerik protein kompleksi olan **proteazomdur**. Malign hücreler, artan protein üretimi ve bozulmasına yüksek oranda bağlıdır, bu da onların proteazom inhibisyonuna duyarlı olacaklarını düşündürür.



Carfilzomib gibi proteazom inhibitörleri (PI), artık multiple myeloma çoğu hasta için standart bakım rejimlerine dahil edilmiştir ve geliştirilmiş klinik yanıtlar ve genel hayatta kalım (OS) sağlamıştır. **Ixazomib**, 26S proteazomunun 20S katalitik alt birimini inhibe ederek protein bozulmasını bloke eder. Ixazomibin klinik denemeleri, Bortezomib ile karşılaştırıldığında düşük periferik nöropati insidansı göstermiştir.

ilaç yeniden konumlandırma stratejisi ilaçlar ve protein hedefleri arasındaki etkileşim ağlarını sistematik olarak tanımlamak için veri tabanlarını ve biyoinformatik araçlarını kullanır.



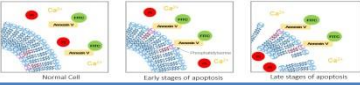
Bu çalışmada ilaç yeniden konumlandırma ile AML için seçilen 7 farklı ilacın öncelikli olarak proteazom aktivitelere bakılması ardından seçilen Desipramine, Risedronate ve Leucovorine ilaçları ile proteazom inhibitörü Ixazomib kombine edilerek AML hücrelerinde ki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sitotoksik deney sonuçlarına göre en etkili görülen Desipramine + Ixazomib kombine ilaç tedavisi seçilerek AML hücrelerinde proteazomal aktivite tayini ve akım sitometrisi yöntemi ile apoptoz tayini yapılmıştır. Trisiklik yapıda bir antidepresan olan **Desipraminin**, glioma, kolon, osteosarkoma gibi başka kanser türlerinde antikanser özellik gösterdiği bilinmektedir.

MATERYAL VE YÖNTEMLER

Hücre Kültürü: HL-60 (ATCC® CCL-240™) hücre hattı bilimsel literatür çalışmalarına uygun olarak %20 fetal siğir serumu, 1% penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 besiyeri içerisinde %5 CO₂ ve %95 nemli hava koşullarında 37°C inkübatörde kültür edilmiştir.

Yapılan Analizler/Deney Akışı:

- WST-1 canlılık testi ile ilaçların IC50 değerlerinin belirlenmesi
- Aday ilaçların proteazom aktivite tayini
- WST-1 testi ile kombine ilaç gruplarının canlılık testi
- Seçilen kombine ilaç grubunun proteazom aktivite tayini
- Akım sitometrisi ile apoptoz tayini



TARTIŞMA

	DSP	IXA	DSP+IXA	RSD	RSD+IXA	LV	LV+RSD
AML (HL-60)							
Sitotoksikite	+++	++	++++	++	++	NS	NS
Proteazom Aktivitesi	+	++	+++				
Apoptoz Tayini	+++	++	++++				

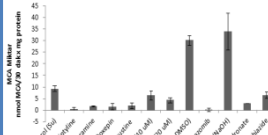
ilaç yeniden konumlandırma ile belirlenen tüm aday ilaçların öncelikli olarak proteazom aktivitelere bakılarak aday ilaçlardan hiçbirinin proteazomu aktive etmediği önveri olarak gösterilmiştir. Proteazomu inhibe eden ilaçlardan 3 farklı ilaç grubuna ait 3 ilaç (DSP, LV, RSD) seçilerek PI olan Ixazomib ile kombine edilerek WST-1 canlılık testi yapılmıştır. Hücre canlılığı, DSP+IXA kombine ilaç tedavisinde diğer kombine gruplarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. AML hücrelerinin 20S + 26S proteazom aktiviteyi DSP ve IXA uygulamalarından sonra azalırken, DSP+IXA kombine uygulamasında ki proteazom inhibisyonunun diğer gruplara göre daha fazla olduğu gösterilmiştir. Kanser hücrelerinin sahip olduğu yüksek proteazom aktivitesinin inhibisyonunun AML tedavisinde ki direnç ve nüksün önlenmesinde etkili olabileceği önveriler doğrultusunda desteklenmektedir. AML hücrelerinin apoptoz tayini sonucunda kontrol grubuna kıyasla DSP, IXA ve DSP+IXA gruplarında bir artış görülmüştür.

KAYNAKLAR

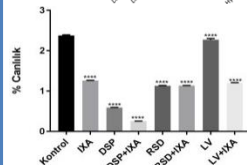
- Cizmzar, C. M., Kim, D. H., & Sachs, Z. (2016). The role of the proteasome in AML. *Blood cancer journal*, 6(12), e503-e503.
- Oka, S., & Ono, K. (2021). Successful ixazomib treatment for relapsed and refractory acute myeloid leukemia transformed from myelodysplastic syndrome. *Clinical Case Reports*, 9(6), e04287.
- Muz, B., Ghazarian, R. N., Ou, M., Luderer, M. J., Kusdono, H. D., & Azab, A. K. (2016). Spotlight on ixazomib: potential in the treatment of multiple myeloma. *Drug design, development and therapy*, 10, 217.
- Masuda, T., Tsuruda, Y., Matsumoto, Y., Uchida, H., Nakayama, K. I., & Mimori, K. (2020). Drug repositioning in cancer: The current situation in Japan. *Cancer science*, 111(4), 1039-1046.

BULGULAR

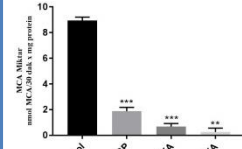
Öncelikli olarak, HL-60 hücrelerinde tüm aday ilaçlar (Nortriptyline, Desipramine, Doxepin, Estramustine, Leucovorin, Risedronate ve Hydrochlorothiazide) ve Ixazomib için etkin dozlar bulunmuştur.



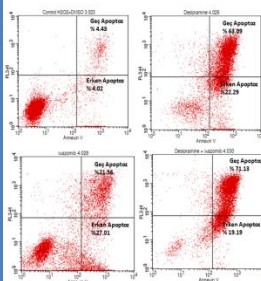
Şekil 1: HL-60 hücrelerine aday ilaçların hepsi 24 saatlik uygulandıktan sonra **proteazomal aktivite sonuçları**.



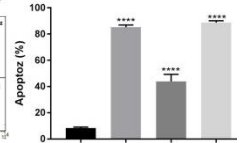
Şekil 2: Aday ilaçlardan Desipramine (DSP), Risedronate (RSD) ve Leucovorin (LV) ilaçları Ixazomib (IXA) ile kombine edilerek 24 saatlik maruziyet ardından HL-60 hücrelerinde **WST-1 canlılık testi** yapılmıştır. DSP+IXA kombinasyonu ilaç tedavisinden diğer kombine ilaç gruplarına kıyasla daha etkili bir sonuç elde edilmiştir.



Şekil 3: DSP ve IXA ile 24 saatlik ilaç maruziyeti ardından **proteazom aktivite sonuçları**. DSP+IXA grubuna bakıldığında diğer gruplara kıyasla anlamlı bir şekilde proteazom inhibisyonu görüldü.



Şekil 4: DSP ve IXA ile 24 saatlik ilaç maruziyeti ardından **akım sitometrisi ile apoptoz tayini** sonuçları. DSP+IXA grubuna bakıldığında diğer gruplara kıyasla apoptozu gidişin arttığı gözlemlendi.



İstatistiksel karşılaştırmalar, ANOVA testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Arduyen Tüky çoklu karşılaştırma analizi yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık p < 0.05 olarak belirlenmiştir.