

BALIKESIR MEDICAL JOURNAL

Oral Antidiyabetik Pioglitazonun Karaciğer Kanseri Üzerine Etkisi

Ayla Solmaz Avcıkurt¹

1- Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı e-mail:aylaavcikurt@hotmail.com

ÖZ

Amaç: Yaptığımız çalışmada oral antidiyabetik olarak kullanılan pioglitazonun, 3 farklı dozda ve 5 farklı saat aralığında karaciğer kanseri modeli hücre hattı (Hep3B) üzerinde hücre proliferasyonu üzerine etkisi araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Pioglitazonun çalışmada kullanılan hepatosellüler kanser hücre hattı modeli olan Hep3B hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi 3, 6, 24, 48 ve 72 saatlerde, 1, 2.5 ve 5 mM arasında değişen 3 farklı dozda uygulanarak MTT testi yapıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildi ve yorumlandı. Pioglitazonun doza ve zamana spesifik hücre proliferasyonu üzerine etkisi belirlendi.

Bulgular: Pioglitazon karaciğer kanseri hücre hattı (Hep3B)'nda hücre proliferasyonu üzerine tüm saat ve dozlarda herhangi bir etkisi görülmedi. 3 saat bekleme süresinde 1mM da ve 48 saatte 5 mM dozlarda hücre proliferasyonundaki azalış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Sonuç: Bu çalışmada pioglitazonun Karaciğer kanserinden korunmada ya da var olan kanser hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi araştırıldı. Pioglitazon hepatosellüler karsinoma hücre hattına (Hep3B) hücre canlılığına etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. Farklı zaman aralıklarında ve farklı dozlarda uygulanmış ve hücre canlılığı üzerindeki etkisinin olmadığı belirlendi. Uygulamada bazı doz ve saat aralıklarında gözlenen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı yoktu.

Anahtar Kelimeler: Oral antidiyabetik, Karaciğer Kanseri, Pioglitazon, Hep3B, MTT

ABSTRACT

Objective: In this study, the effects of the oral antidiabetic pioglitazone on the cell proliferation of hepatocarcinoma cell line (Hep3B) at 3 different doses and 5 different time intervals was investigated.

Material and Methods: Pioglitazone was applied to the Hep3B cells, which was the hepatocellular cancer cell line used in the study, at 1, 2.5 and 5 Mm doses and for 3, 6, 24, 48 and 72 hours, and the MTT test was performed. The results were statistically analyzed, interpreted and the dose and time dependent effect of pioglitazone on the cell proliferation was determined.

Results: Pioglitazone showed no effect on the cell proliferation of liver cancer cell line (Hep3B) at all doses and time intervals. Even some decrease in cell proliferation was seen in 1mM dose for 3 hours group and 5Mm dose for 48 hours groups, the differences were not statistically significant.

Conclusion: In this study, we investigated the effect of pioglitazone on cell viability in cancer cells that are present in the liver from cancer prevention. The effect of the pioglitazone on the cell viability in hepatocellular carcinoma cell line (Hep3B) was determined by MTT assay. It was administered at different time intervals and at different doses and was found to have no effect on cell viability. In practice, the decrease observed at some dose and time intervals was not statistically significant.

Keywords: Oral antidiabetic, liver cancer, pioglitazone, Hep3B, MTT.

Geliş Tarihi: 16.10.2017 Kabul Tarihi:05.12.2017

Sorumlu Yazar: Ayla Solmaz Avcıkurt

Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

e-mail:aylaavcikurt@hotmail.com

Giriş

Dünya genelinde 2013 yılında 381.8 milyon kişiye Diabetes Mellitus (DM) tanısı konulmuş 2035 yılında bu sayı % 55 artarak 591.9 milyon kişi ile dünya çapında DM yaygınlığı dramatik bir şekilde artacağı öngörülmektedir (1). Son yıllarda görülme oranı giderek artmakta ve önemli sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Özellikle tip 2 diabetes mellituslu (T2DM), Tip 1 diabetes mellitus (T1DM)'a göre 9-10 kat daha fazla görülmektedir. Diyabete sekonder gelişen böbrek hastalıkları, körlük gibi klinik tablolar diyabetin topluma yükünü arttırmaktadır (2). Tedavi yaklaşımı yaşam tarzı değişikliklerine odaklanır, diyet ve fiziksel aktivite artırılması ile orta derecede kilo verme hastalara tavsiye edilir. Bununla birlikte insülin duyarlılığını arttıran ilaçlar, lipid düşürücü ilaçlar, vitamin E gibi antioksidanlar ve D3 vitamini takviyesi ilaç tedavisi olarak tedaviye dahildir (3). T2DM tedavisinde oral antidiyabetikler önemli bir yer tutar. Thiazolidinedionlar yağ metabolizması ve dağılımı üzerine etkisi olan, yağ dokuda bulunan peroksizomproliferatöraktivatör reseptör gama (PPAR γ) ile etki ederek gösterirler. Bu etki ile TG'lervisseral yağ dokusundan ayrılıp subkütanöz dokuya geçerler. Ayrıca insülin direncine neden olan interlökin (IL)-6 ve tümör nekroz faktörü (TNF)-a sitokinlerinkonsantrasyonlarını azaltıp, adiponektin düzeylerini arttırırlar. Bunun sonucunda insülin duyarlılığı artar (4). Pioglitazon Tip 2 DM tedavisinde kullanılan bir Thiazolidinedion grubu oral antidiyabetiktir (5).

DM ve kanser arasındaki ilişki çoklu epidemiyolojik çalışmalar ile, T2DM hastalarda

çeşitli malignitelerin artan riskini (hem insidansı hem de mortaliteyi) vurgulamıştır. Diyabet ve kanserler arasında gastrointestinal sistemi (GI) etkileyen bağlantı özellikle kolon, pankreas ve hepatoselüler kanserlerdir. Önemlisi, DM ile ilişkili artmış kanser riskinin vücut kitle indeksinden (BKİ) bağımsız olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, DM bağımsız bir risk faktörüdür. Karaciğer kanserleri kanserlerden ölümlerin altıncı sebebidir. Karaciğer kanseri etyolojisinde metabolik sendrom, obezite, kronik hepatit B ve C enfeksiyonu, siroz, non-alkolik steatohepatit (NASH), aflatoksin B1 veya diğer mikotoksinler ve alkol tüketimi yer almaktadır (6, 7). Metabolik sendrom; obezite, tip 2 diyabet veya dislipidemi gibi farklı risk faktörlerinden oluşan bir hastalıktır. Obezite ve metabolik sendromda en önemli sorun insülin direncidir (8).

Bu çalışmada karaciğer kanseri etyolojisinde yer alan Tip 2 DM tedavisinde sıkça kullanılan pioglitazonun, karaciğer kanseri hücre hattı üzerinde hücre proliferasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır.

Gereç Ve Yöntem

Materyal

İnsan karaciğer kanser hattı modeli olarak Hep3B kullanıldı. Hücre kültürü materyalleri Gibco'dan alınarak temin edildi. Bu çalışmada kullanılan pioglitazon eczaneden temin edildi. Pioglitazon steril distile su içinde 5 mM konsantrasyonda hazırlanıp -20°C saklandı.

Hücre Kültürü

İnsan karaciğer kanser hattı Hep3B %5 CO₂ atmosfer koşullarında etüvde, 37°C’de büyütüldü. Hücreler 75cm² flasklarda DMEM medyumunda içinde büyütüldü. 15 ml DMEM içerisine 0,2 mM L-Glutamin ve % 10 ısı ile inaktive edilmiş FCS (FetalCalf Serum) eklendi.

Sitotoksisite Deneylerinin Kurulması

Sitotoksisite deneyleri kurulmadan önce, hücre sayısının belirlenmesi gerekmektedir. Bu işlem için, hemositometre lamı kullanıldı. Bu lam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısı hesaplamada kullanılan bir lamdır. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 µl hücre süspansiyonu eşit hacimde trypanblue (1:1dilüsyon oranında) ile 3–5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra mikroskop altında canlı hücreler sayıldı, hücre süspansiyonundan 5000 hücreyi içeren miktarda çözelti alınıp, 96 kuyulu kültür plakalarına konuldu. Hücreler buldukları yüzeye tutunmaları için 1 gün bekletildi.

Hep3B hücreleri büyütüldükleri flask yüzeyini %75-80 oranında kaplayacak kadar büyüdüklerinde, flask içerisindeki medyum uzaklaştırıldı ve hücreler steril PBS ile 3 kez yıkandı. 75 cm² flasklara 2 ml Tripsin-EDTA eklendi ve 5 dakika CO₂ ‘li inkübatörde inkübe edildi. Mikroskop altında hücrelerin yüzeyden ayrıldığı görüldüğünde 5 ml medyum eklenerek Tripsin-EDTA inaktive edildi. 5 dakika 1000 rpm’de santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Üstte kalan supernatant atıldı, pellet 10ml kadar medyum ile çözüldü. Tripin mavi boyaması ile

süspansiyondaki canlı hücre sayısı belirlendi. 96 kuyucuklu plakada her bir kuyucukta hücre sayısı 5000 olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Her bir kuyucuğa son hacim 200 µl olacak şekilde %10 FCS içeren DMEM medyum eklendi. Ekim işleminden sonra, hücreler CO₂ ‘li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. 24 saatin sonunda %0,1 BSA içeren medyum eklendi. 1 saat sonra farklı dozlarda pioglitazon uygulandı. 3, 6, 24, 48 ve 72 saatlerde MTT testi yapıldı. 550 nm de absorbanları alındı.

MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) Testi

MTT testi hücrelerin canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksisite ölçümü için kullanılan ve kantitatif kolorometrik bir yöntemdir. MTT testinde temel prensip canlı hücrelerin MTT (tetrazolium tuzu) 'yi formazan kristallerine dönüştürmesi esasına dayanır. Bu metod ile istenilen inkübasyon periyodundan sonra (3, 6, 24, 48 ve 72 saat) hücrelerin bulunduğu ortama, son konsantrasyonu 0,5 mg/ml olacak şekilde stok MTT solüsyonu eklenir ve %5 CO₂ içeren ortamda, 4 saat, 37 oC'de inkübe edilir. İnkübasyon sonunda medyum uzaklaştırılıp; 0.004 M HCl içeren isopropanol ile kristaller çözülür ve UV spektro okuyucu ile 550 nm dalga boyunda absorban alınır.

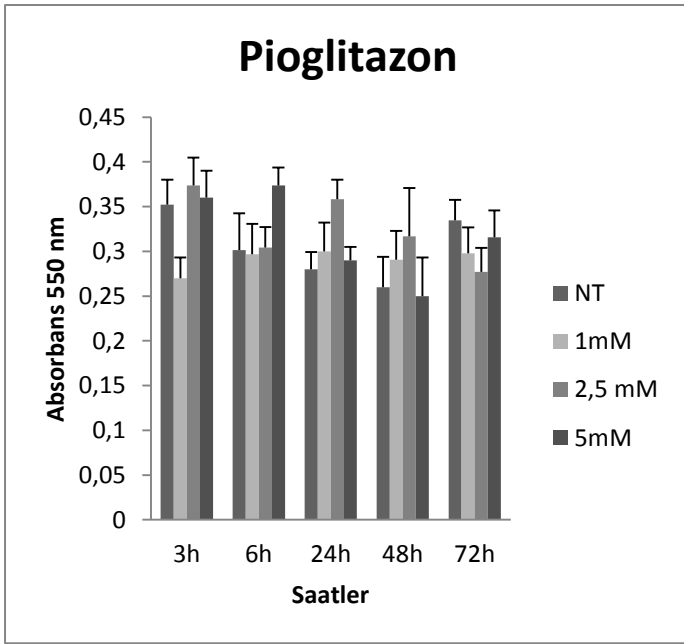
İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme Minitab 15 programı ile yapılmıştır. UV spektroda 550nm de alınan absorban değerlerinin ortalamaları, standart sapmaları alınıp ve Mini Tab, OneWay analizi kullanılarak sayısal değerler kontrol hücreleri ile

karşılaştırılarak yapılmıştır. $p \leq 0,05$ altındaki değerler anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

Bu çalışmada oral antidiyabetik pioglitazon, farklı zaman aralıklarında ve farklı dozlarda karaciğer kanseri hücrelerine uygulandı. İstatistiksel olarak pioglitazonun 1, 2.5 ve 5 mM dozlarda karaciğer kanseri üzerine etkisinin olmadığı gözlemlendi. (Şekil 1)



Şekil 1. 3, 6, 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında ve 1, 2.5 ve 5 mM konsantrasyonda pioglitazon uygulanmış insan karaciğer kanser modeli Hep3B hücrelerinin sitotoksik değerleri. NT, belirtilen zaman aralıklarında hücrelere herhangi bir madde uygulanmamış kontrol hücrelerini işaret etmektedir. * İstatistiksel analizler sonucu anlamlı görülen yani $p \leq 0,05$ 'in altında olan değerleri temsil etmektedir.

Tartışma

Günümüz toplumlarında Tip2 DM son derece önemli bir sağlık sorunudur. Bununla ilgili olarak oral antidiyabetikler çok sık

kullanılmaktadır. Karaciğer kanserinin etyolojisinde metabolik sendrom yer almaktadır. Metabolik sendromun en önemli klinik bulgularından biride Tip 2 DM 'tir. Diyabet ile kanser riski arasındaki ilişki insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) -1 ile ilişkilidir; IGF-1 reseptörünün aşırı ekspresyonu çeşitli kanserlerde saptanmıştır (9). Bu amaçla bu çalışmada oral antidiyabetik olarak kullanılan pioglitazonun karaciğer kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonu üzerine etkilerini incelendi.

Tubaki ve ark. 1 yapmış oldukları çalışmada, Pioglitazonun neden olduğu apoptozun altında yatan mekanizmayı araştırmışlardır. Bu çalışmada benzer konsantrasyonlarda pioglitazonun, yüksek veya düşük PPAR γ seviyeleri ifade eden kanser hücrelerinde ölümcül olduğu gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada pioglitazonun, sinyal aktivasyonu ve transkripsiyon 3 (STAT3) ve Survivin ekspresyonunun aktivatörünü bastırdığı ve bunun hücrelerdeki apoptozu indükleyici faktör (AIF) seviyelerini arttırdığı bulunmuştur. Sonuç olarak pioglitazonun bir PPAR γ 'den bağımsız bir yol ile apoptozu indüklediğini, dolayısıyla pioglitazonun farklı kanserlerin ilerlemesini kontrol etmek için potansiyel bir terapötik madde olarak tanımlanabileceği söylenmiştir (10). Bizim çalışmamızda kullandığımız pioglitazon dozları ile karaciğer kanserinde hücre ölümü üzerinde herhangi bir etki gözlenmedi.

Xiong ve ark. nın yapmış oldukları çalışmada; pioglitazonun akciğer kanserinin önlenmesinde rolünün altında yatan mekanizmaları incelemek için transkriptom

dizilemesi (RNA-Seq) yapmışlar ve akciğer adenokarsinomalı farelerin solunum yolu epitel hücrelerinde K-ras sinyalizasyonunun pioglitazon tedavisi ile inhibe olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışma pioglitazonun hava yolu epitelinde Kras sinyal yolağını ve glikoz metabolizmasını inhibe etmesine bağlı olarak akciğer adenokarsinomunu önleyebiliyor olabileceğini düşündürmektedir (11).

Thiazolidinedionların mesane kanseri ile ilişkisi olup olmadığına dair birçok çalışma yapılmıştır. Özellikle pioglitazonun mesane kanseri üzerine etkisi çalışmalarında veriler birbirinin tam aksini ifade etmektedir. Piccini ve ark.nın yapmış olduğu çalışmada antidiyabetik olarak pioglitazon kullanan çocuklarda mesane kanseri görülme sıklığının arttığı, gliklazid ve akarboz kullanan çocuklarda yine riskin arttığı ama bu riskin pioglitazon kullananlardan daha düşük olduğu gösterilmiştir. (12). Rosiglitazon ile yapılan klinik araştırmalarda, mesane kanseri ile rosiglitazon kullanımı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı bildirilmiştir (13). Filipova ve ark. ı yapmış oldukları çalışmada pioglitazon kullanımı ile mesane kanseri riski arasında herhangi bir bağlantı bulunmadığını göstermişlerdir (14).

Pankreas kanseri fare modelinde, Pioglitazone, Rosiglitazone, Gemcitabin tek başına ve bu ilaçların kombinasyonlarının uygulanmasının tümör ilerlemesi, farede sağkalım ve metastazlar üzerine etkisinin değerlendirildiği Bunt ve ark.nın yaptığı çalışmada, Rosiglitazone ve Gemcitabin kombinasyonu, tek başına Gemcitabine ile karşılaştırıldığında, tümör ilerlemesini ve metastazlarını önemli ölçüde

azalttığı, bu etkiyi artmış apoptoz ile gerçekleştirdiği ve genel sağkalımı önemli derecede uzattığını göstermişlerdir. Yüksek doz Rosiglitazone ve Gemcitabin tedavisinin, özellikle T regülatör hücreleri de dahil olmak üzere bağışıklık baskılayıcı mediyatörler üzerindeki etkisini gösterdiğini belirlemişlerdir (15).

Hsiao ve ark.nın pioglitazonun hepato-koruyucu etkisinin, antioksidan savunma mekanizmasının düzelmesi ile ilişkili olup olmadığını araştırmak için yaptıkları çalışmada, C57BL / 6 farelerine sırasıyla % 30 yağlı diyet, 100 mg / kg / gün pioglitazon 8 hafta boyunca verilmiştir. Bunun sonucunda dokularda oksidatif stres sonucunda oluşan oksidatif DNA hasarının, enzimatik antioksidan savunma moleküllerinin artması ile DNA onarımının gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada yüksek yağlı bir diyetle, pioglitazonun hepatik oksidatif DNA hasarının zayıflatılmasında, antioksidan savunma mekanizması ve oksidatif DNA tamir aktivitesinin artmasında rolü olduğu gösterilmiştir. Bu durum, karaciğer kanseri etyolojisinde bulunan, alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı olan hastalarda pioglitazon tedavisinin klinik yararı olabileceğini açıklayabilir (16).

Sonuç olarak bu çalışmada karaciğer kanseri hücre hattında Pioglitazonun hücre canlılığı üzerine etkisi gösterilmeye çalışılmıştır. İleriki çalışmalarda pioglitazonun farklı konsantrasyonları eklenerek ve apoptotik yolak çalışmaları ile pioglitazonun karaciğer kanser hücreleri üzerine etkileri daha ayrıntılı araştırılarak çalışma genişletilebilir.

Kaynaklar

- 1 Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035 for the IDF Diabetes Atlas. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;103(2):137–149.
2. Satman İ. (2007). Diabetes Mellitus Tanı ve İzleminde Yeni Kriterler ve Belirlenme Gerekçeleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*, 3(3), 1-15.
- 3 Del Ben M, Polimeni L, Baratta F, Pastori D, Loffredo L, Angelico F. Modern approach to the clinical management of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014 Jul 14;20(26):8341-50.
4. Eray E, and Balcı M. K. (2005). Tip 2 diyabet tedavisi. *Dahili Tıp Bilimleri Dergisi*, 12(2), 66-71.
- 5 Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitazone Clinical Trial In macro Vascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2005;366:1279–89.
- 6 Erstad Derek J, and Kenneth K. Tanabe. "Hepatocellular carcinoma: early-stage management challenges." *Journal of Hepatocellular Carcinoma* 4 (2017): 81.
- 7 Herrigel DJ, Moss RA. Diabetes mellitus as a novel risk factor for gastrointestinal malignancies. *Postgrad Med.* 2014 Oct;126(6):106-18.
- 8 Tanaka K, Tsuji I, Tamakoshi A, Matsuo K, Ito H, Wakai, K, Tsugane S. (2012). Obesity and liver cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. *Japanese journal of clinical oncology*, 42(3), 212-221.
- 9 Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, et al. Diabetes and cancer: A consensus report. *Diabetes Care.* 2010;33:1674–1685.
- 10 Tsubaki M, Tekade T, Tomonari Y, Kawashima K, Pioglitazone inhibits cancer cell growth through STAT3 inhibition and enhanced AIF expression via a PPAR γ -independent pathway. *J Cell Physiol.* 2017 Oct 14.
- 11 Xiong D, Pan J, Zhang Q, Szabo E, Miller MS, Lubet RA, Wang Y, You M. Pioglitazone-mediated reversal of elevated glucose metabolism in the airway epithelium of mouse lung adenocarcinomas. *JCI Insight.* 2017 Jul 6;2(13): pii: 94220.
12. Piccinni C, Motola D, Marchesini G, et al. Assessing the association of pioglitazone use and bladder cancer through drug adverse event reporting. *Diabetes Care.* 2011;34:1369–1371.
- 13 Bosetti C, Rosato V, Buniato D, Zambon A, La Vecchia C, Corrao G. Cancer Risk for Patients Using Thiazolidinediones for Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis. *Oncologist.* 2013;18(2):148-56. doi: 10.1634/theoncologist.2012-0302. Epub 2013 Jan 23.
- 14 Filipova E, Uzunova K, Kalinov K, Vekov T., Pioglitazone and the Risk of Bladder Cancer: A Meta-Analysis. *Diabetes Ther.* 2017 Aug;8(4):705-726.
- 15 Bunt SK, Mohr AM, Bailey JM, Grandgenett PM, Hollingsworth MA. (2013). Rosiglitazone and Gemcitabine in combination reduces immune suppression and modulates T cell populations in pancreatic cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62(2), 225-236.
- 16 Hsiao P J, Hsieh T J, Kuo K K, Hung W W, Tsai K B, Yang C H, Shin S J. (2008). Pioglitazone retrieves hepatic antioxidant DNA repair in a mice model of high fat diet. *BMC molecular biology*, 9(1), 82.