



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Oral antidiyabetik metforminin hepatosellüler kanser hücreleri üzerine etkisi

Effects of oral antidiabetic metformin on hepatocellular cancer cells

Ayla Solmaz Avcıkurt¹, Eren Altun²

¹Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Turkey

²Balıkesir Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Turkey

Cukurova Medical Journal 2018;43(3):557-561

Abstract

Purpose: In this study, the effects of the oral antidiabetic metformin on cell proliferation on human hepatocellular carcinoma cell line (Hep3B) at 4 different doses and at 4 different time intervals were determined.

Materials and Methods: Hep3B cell line was used in this study. The cytotoxic effects of metformin on the Hep3B cells at 4 different doses (0.5, 1, 5 10 mM) and at 4 different time intervals (3, 6, 24 and 48 hours) were determined. The results were statistically analyzed. The dose and time specific effects of metformin on cell proliferation was determined.

Results: While metformin did not affect the cell proliferation of Hep3B cells at 3, 6 and 48 h groups according to the control group, the rate of cell proliferation was decreased at 5 mM and 10 mM doses and at 24 h.

Conclusion: Metformin was administered on Hep3B cells at different time intervals and at different doses and its effect on cell viability was determined by MTT assay. The cell proliferation and viability of the Hep3B cells were significantly decreased at 5 mM and 10 mM doses and at 24 h. No effect was observed on cell viability at other time intervals and at other doses.

Key words: Liver cancer, metformin, hep3b, cytotoxicity

Öz

Amaç: Bu çalışmada oral antidiyabetik metforminin 4 farklı dozda ve 4 farklı saat aralığında insan hepatosellüler kanser hücre hattında (Hep3B) hücre canlılığı üzerine etkisi araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada Hep3B hücre hattı kullanılmıştır. Metforminin farklı dozlarda ve farklı zaman aralıklarında oluşturduğu sitotoksik etkinin belirlenmesi için 0.5, 1, 5 ve 10 mM dozunda metformine 3, 6, 24 ve 48 saat süreyle maruz kalan Hep3B hücrelerine MTT testi uygulanmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilerek yorumlanmıştır. Metforminin doza ve zamana spesifik hücre proliferasyonu üzerine etkisi belirlenmiştir.

Bulgular: Metforminin Hep3B hücre hattında hücre proliferasyonu üzerine 3., 6. ve 48. saatlerde kontrol grubuna göre herhangi bir etkisi görülmezken, 24. saatte 5 ve 10mM dozlarında hücre proliferasyonunda azalış gözlenmiştir.

Sonuç: Metformin Hep3B hücre hattına farklı zaman aralıklarında ve farklı dozlarda uygulanmış ve hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. 24 saatte, 5 mM ve 10 mM dozlarında metformin uygulanan Hep3B hücrelerinde proliferasyonun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. Diğer zaman aralıklarında ve dozlarda hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etki gözlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: Karaciğer kanseri, metformin, hep3B, sitotoksikite

GİRİŞ

Hepatosellüler karsinoma (HCC), primer karaciğer kanserlerinin %70-90'ını oluşturur. Batı ülkelerinde kanserden ölümlerin altıncı sırada görülen nedenidir. HCC insidansı kronik hepatit C virüsü (HCV), alkol

tüketimi, obezite ve metabolik sendrom insidansı da dahil olmak üzere birçok faktörler nedeniyle son 40 yılda üç kat artmıştır¹.

Özellikle non alkolik steatohepatit (NASH) karaciğerde inflamasyona ve fibroze yol açar. Karaciğerdeki inflamasyon ve fibrozis, siroz ve

HCC'ye kadar önemli patolojilere neden olabilir². Non alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) ve Metabolik Sendrom arasındaki birliği destekleyen kanıtlardan en önemlisi; insülin direncidir². Dolaşımda yağ asitlerinin artması karaciğer dokusunda yağ birikimini arttırmaktadır. Bu durum özellikle inflamasyonu ve endoplazmik retikulum stresini artırır. Bu da insülin direnci oluşumuna neden olur^{1,2}. Metabolik sendrom; obezite, tip 2 diyabet (DM 2) veya dislipidemi gibi farklı risk faktörlerinden oluşan bir hastalıktır.

Metformin, 30 yılı aşkın süredir kullanılan biguanid antidiyabetik ilaçtır. Metforminin; *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda hem diyabetik kişilerde hem de hayvan modellerinde iskelet kasi ve adipositlere glukoz alımının insülinle indüklenen bileşenini uyardığı gösterilmiştir¹. Metforminin bu kadar yaygın kullanılmasının bir diğer nedeni de, insülin direnci, hipertrigliseridemi, hipertansiyon ve azalmış fibrinolitik aktivite ile seyreden Metabolik Sendrom'da tedavide iyi yanıt sağlamasıdır. Metformin, periferik insülin duyarlılaştırma mekanizması yoluyla, insülin direncinin başlıca semptomlarını çoğunu düzeltmek için kullanılmaktadır⁵.

Bu çalışmada; dünya üzerinde insidansı giderek artan hastalıklar olan diabet ve Metabolik Sendromun tedavisinde kullanılan metforminin insan hepatosellüler kanser modeli olan Hep3B hücrelerinde, hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Materyal

İnsan hepatosellüler kanser hattı Hep3B, ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures)'den temin edildi. Metformin yerel eczaneden temin edildi. Metformin steril distile su içinde 10mM konsantrasyonda hazırlanıp -20°C saklandı. Hücre kültürü için gerekli olan materyaller Greiner ya da Gibco firmalarından satın alındı.

Hücre kültürü

İnsan hepatosellüler kanser hattı Hep3B 75cm² flaklarda DMEM besiyerinde büyütüldü. 15ml DMEM içerisine 0.2 mM L-Glutamin ve ısı ile inaktive edilmiş %10 FCS (Fertal Calf Serum) eklendi. Hücreler 37°C'de %5CO₂ atmosfer koşullarında etüvde büyütüldü.

Canlı hücrelerin belirlenmesi (trypan blue exclusion) ve hücre sayımı

Toplam hücre sayısının belirlenebilmesi için, 1mm² alana sahip, 0.1mm derinliği olan üzeri 25 küçük kareye ayrılmış, toplam hacmin hesaplanmasına uygun olan Thoma lamı (hemositometre lamı) kullanıldı. Bu lam ile hücre süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı hesaplandı. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 µl hücre süspansiyonu eşit hacimde trypan blue (1:1 dilusyon oranında) ile 3-5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra mikroskop altında canlı hücreler sayıldı, hücre süspansiyonundan 5000 hücreye denk gelecek miktarda çözelti alınıp, 96 kuyulu kültür kaplarına konuldu ve hücrelerin buldukları yüzeye tutunmaları için 24 saat beklendi.

Sitotoksite deneylerinin kurulması

75cm²'lik flakta büyütülen Hep3B hücreleri flask yüzeyini %75-80 oranında kapladıkların da flask içerisindeki medyum uzaklaştırıldı ve hücreler steril PBS ile 2 kez yıkandı. Flaklar için 2ml Tripsin-EDTA eklenip, 5 dakika CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklenip Tripsin-EDTA inaktive edildi. Flak içerisinden bir pipet ile toplanan hücre süspansiyonu 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Supernatant atıldı, hücre pelleti 10ml kadar medyum ile çözüldü. Tripan 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 hücrelere farklı dozlarda metformin uygulandı. Metformin uygulanmasından 3, 6, 24 ve 48 saat sonra MTT testi yapıldı. 550nm'de absorbansları alındı. Kontrol grubu olarak her bir saat ve her bir doz için ayrılan kuyucuklara metformin eklenmedi. Deneyler kendi içinde 3 tekrarlı olarak düzenlendi.

MTT testi

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) testi hücrelerin canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksite ölçümü için kullanılan ve kantitatif kolorometrik bir yöntemdir. MTT yöntemi canlı hücrelerin tetrazolium tuzu olan

MTT'yi formazan kristallerine dönüştürmesi esasına dayanmaktadır. Bu metot ile istenilen inkübasyon periyodundan sonra (3, 6, 24 ve 48 saat) hücrelerin bulunduğu ortama, optimizasyon çalışmaları sonucu belirlenen son konsantrasyonu 0,5 mg/ml olacak şekilde stok MTT solüsyonu eklendi ve 4 saat 37 °C, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda medyum uzaklaştırılıp 0.004 M HCl içeren isopropanol ile kristaller çözüldü ve UV spektroskopu ile 550 nm dalga boyunda absorpsiyon alındı.

İstatistiksel analiz

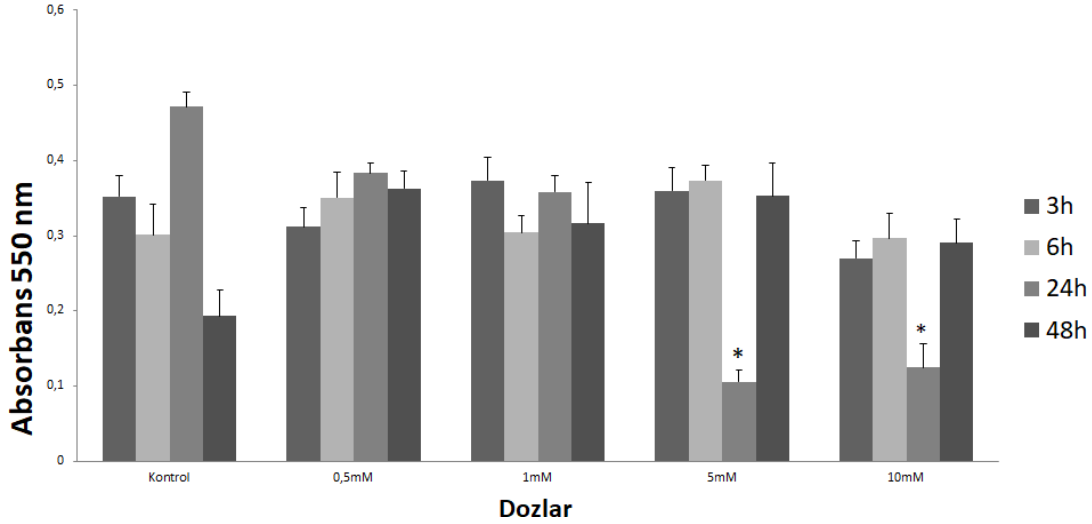
İstatistiksel değerlendirme Minitab 15 programı ile yapıldı. UV spektroskopu ile alınan sayısal değerlerin ortalamaları, standart sapmaları hesaplandı ve ANOVA kullanılarak kontrol hücreleri ile karşılaştırıldı. $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Oral antidiyabetik metforminin Hep3B hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla MTT testi kullanıldı. Hep3B hücre hattı hepatosellüler kanser modeli olarak kullanıldı. Hep3B hücrelerine metformin uygulaması 0.5, 1, 5 ve 10 mM olacak biçimde 4 farklı konsantrasyonda ve 3, 6, 24 ve 48 saat aralıklarında uygulandı. MTT uygulamasından sonra spektrofotometrik olarak alınan absorpsiyon sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildi.

Metformin, Şekil 1'de de gösterildiği gibi 5 ve 10 mM dozlarında 24 saat inkübasyonda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden oldu. 3, 6 ve 48 saat uygulamalarında ise 4 farklı dozda da herhangi bir etki görülmedi.

Hep 3B Hücre Hattı



Şekil 1. 3, 6, 24 ve 48 saat zaman aralıklarında ve 0.5, 1, 5 ve 10 mM konsantrasyonda metformin uygulanmış insan hepatosellüler kanser modeli Hep3B hücrelerinin sitotoksik değerleri. Kontrol grubu, belirtilen ilgili zaman aralıklarında hücrelere herhangi bir madde uygulanmamış kontrol hücrelerini temsil etmektedir. * $p < 0.05$ 'in altında olan değerler.

TARTIŞMA

HCC dünyadaki altıncı en sık rastlanan kanser türüdür ve kanser nedenli ölümlerde ikinci sırada yer alır. Tip 2 diyabet (DM2), sağlık harcamaları ve yaşam kalitesi üzerinde önemli etkileri bulunan küresel bir sorundur. Diabetes mellitus'un HCC oluşumu ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür ve son

veriler, DM2'nin HCC için bir risk faktörü olduğunu açıkça göstermektedir^{1,2}. Oral antidiyabetikler Diabetes mellitus tedavisinde oldukça sık tercih edilirler. Antiproliferatif bir ajan olarak da belirtilen metformin DM2 tedavisi için ilk seçenekte kullanılan oral antidiyabetik bir ilaçtır ve Dünya genelinde 120 milyondan fazla reçete edilmiştir¹.

Literatürde metformin kullanımının in vitro akciğer, pankreas, kolon, over, meme, prostat, böbrek kanseri hücreleri, melanoma ve hatta akut lenfoblastik lösemi hücrelerinde çoğalmayı inhibe ettiği ve in vivo kanser riskini azalttığını belirten çalışmalar bulunmaktadır^{1,2,3}.

Epidemiyolojik çalışmalar DM2'nin benign prostat hiperplazisi gelişimi riskini arttırdığını göstermektedir¹. Wang ve ark. çalışmalarında, metformin ile tedavi edilen benign prostat hiperplazisi hastalarının, stromal hücrelerdeki IGF-1R ve IGF-1 sekresyonunu baskılayarak benign prostatik epitel hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiğini göstermişlerdir¹³. Metforminin, G2/M hücre popülasyonunu düşürdüğü ve aynı anda G0/G1 popülasyonunu arttırdığı belirtilmiştir².

Yapılan bir çalışmada DM2'nin HCC için bağımsız bir risk faktörü olduğu ve HCC hastalarının çoğunun, karaciğer tümörünün başlamasından önce, DM2'ye sahip oldukları gösterilmiştir. Aynı çalışmada, metformin tedavisinin HCC riski ile ters bir ilişkisi olduğu halde, insülin veya sülfanilüre tedavilerinin HCC için belirgin olarak artmış bir risk ile ilişkili olduğu gösterilmiştir². Araştırmalar, DM2 tedavisinde yaygın olarak kullanılan metforminin doğal antineoplastik özelliklere sahip olduğunu ileri sürmektedir. HCC'ye sahip olan metabolik sendromlu hastalar için, metforminin antitümöral etkiler sağlayabileceği düşünülmektedir².

Yapılan randomize kontrollü çalışmalar HCC tedavisinde kullanılan multikinaz inhibitörü sorafenibin ileri evre HCC'de hasta sağ kalımında iyileşme sağlayan tek ilaç olduğunu ortaya koymuştur². HCC tedavisinde metformin ve sorafenib kombinasyonunun hücre proliferasyonunu bastırdığı ve mTOR yolunu indükleyerek HCC hücrelerinde apoptozu ve otofajiyi arttırdığı gösterilmiştir^{2,3}. Kanser tedavisinde metformin, potansiyel rolü olan ve yaygın olarak kullanılan bir antidiyabetik ilaçtır. Epidemiyolojik, klinik öncesi ve hücresele araştırmalar metforminin antitümöral özellikler sergilediğini göstermiştir. Son yıllardaki araştırmalar, metforminin ayrıca iltihaplanmayı düzenleyebildiğini ve bu nedenle tümör mikro ortamında rol oynayabileceğini göstermektedir². Çeşitli in-vitro ve in-vivo çalışmalar, metforminin kanser tedavisinde kullanılabileceğini gösterse de, gerçek etkinliğini belirlemek için klinik araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada oral antidiyabetik metforminin 4 farklı dozda ve 4 farklı saat aralığında insan hepatosellüler kanser hücre hattı olan Hep3B hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi araştırılmıştır. 24 saat boyunca metformin uygulanan Hep3B hücrelerinde hücre proliferasyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. Bu da literatürle uyumlu olarak metforminin doğal antineoplastik olduğu görüşünü desteklemektedir. Bununla birlikte 48. saatte hücre canlılığının tekrar eski haline gelmesi metforminin doz, kullanım sıklığı ve süresi konusunda yeni araştırmalara ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Erstad DJ, Tanabe KK. Hepatocellular carcinoma: early-stage management challenges." J Hepatocell Carcinoma. 2017;4:81-92
2. Guzman G, Brunt EM, Petrovic LM, Chejfec G, Layden TJ, Cotler SJ. Does nonalcoholic fatty liver disease predispose patients to hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis? Arch Pathol Lab Med. 2008;132:1761-1766.
3. Tanaka K, Tsuji I, Takakoshi A, Matsuo K, Ito H, Wakai K et al. Obesity and liver cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. Jpn J Clin Oncol. 2012;42:212-21.
4. Sirtori C R., Pasik C. Re-evaluation of a biguanide, metformin: mechanism of action and tolerability. Pharmacol Res. 1994;30:187-228.
5. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case-control study. Gut. 2005;54:533-9.
6. El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 2004;126:460-8.
7. Wang Z, Olumi AF. Diabetes, growth hormone-insulin-like growth factor pathways and association to benign prostatic hyperplasia. Differentiation. 2011;82:261-71.
8. Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. Cancer Res. 2006;66:10269-73.
9. Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ, DeBerardinis RJ, Zhao F et al. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. Cancer Res. 2007;67:6745-52.

10. Vallianou NG, Evangelopoulos A, Kazazis C. Metformin and cancer. *Rev Diabet Stud.* 2013;10:228-35.
11. Chen Z, Miao L, Gao X, Wang G, Xu Y. Effect of obesity and hyperglycemia on benign prostatic hyperplasia in elderly patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8:11289-94.
12. Wang Z, Xiao X, Ge R, Li J, Johnson CW, Rassoulia C et al. Metformin inhibits the proliferation of benign prostatic epithelial cells. *PLoS One.* 2017;12:e0173335.
13. Donadon V, Balbi M, Mas MD, Casarin P, Zanette G. Metformin and reduced risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients with chronic liver disease. *Liver Int.* 2010;30:750-8.
14. Cauchy F, Mebarki M, Leporq B, Laouirem S, Albuquerque M, Lambert S et al. Strong antineoplastic effects of metformin in preclinical models of liver carcinogenesis. *Clin Sci.* 2017;131:27-36.
15. Guo Z, Cao M, You A, Gao J, Zhou H. Metformin inhibits the prometastatic effect of sorafenib in hepatocellular carcinoma by upregulating the expression of TIP30. *Cancer Sci.* 2016;107:507-13.
16. Ling S, Song L, Fan N, Feng T, Liu L, Yang X et al. Combination of metformin and sorafenib suppresses proliferation and induces autophagy of hepatocellular carcinoma via targeting the mTOR pathway. *Int J Oncol.* 2017;50:297-309.
17. Xin HW, Ambe CM, Miller TC, Chen JQ, Wiegand GW, Anderson AJ et al. Liver label retaining cancer cells are relatively resistant to the reported anti-cancer stem cell drug metformin. *J Cancer.* 2016;7:1142-51.
18. Bost F1, Sahra IB, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Metformin and cancer therapy. *Curr Opin Oncol.* 2012;24:103-8.