



ARAŞTIRMA MAKALESİ
RESEARCH ARTICLE
CBU-SBED, 2022, 9(1): 92-98

U87 Glioblastoma Hücrelerinde Sitokalsin B Uygulamasının Nrf2 Sinyal Yolundaki Anti-Proliferatif Etkisi

Anti-Proliferative Effect of Cytochalasin B Treatment on Nrf2 Signaling Pathway in U87 Glioblastoma Cells

Ceyhan Hacıoğlu^{1*}, Fatih Kar²

¹ Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Düzce, Türkiye.

² Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Merkezi, Kütahya, Türkiye.

e-mail: ceyhanhacioglu@duzce.edu.tr, fatihkarahasanoglu_@hotmail.com,

ORCID: 0000-0002-0993-6118

ORCID: 0000-0001-8356-9806

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ceyhan Hacıoğlu

Gönderim Tarihi / Received:09.09.2021

Kabul Tarihi / Accepted: 24.09.2021

DOI: 10.34087/cbusbed.993773

Öz

Giriş ve Amaç: Glioblastoma kötü prognozlu agresif beyin tümörlerinden biridir ve glioblastoma için mevcut tedavi yöntemleri oldukça sınırlıdır. Sitokalsin B'nin (CB) kanser hücre hatları üzerinde inhibitör etki göstermektedir, ancak antikanser etkileri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışmada, CB'nin U87 insan glioblastoma hücrelerinde nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör (Nrf2) sinyal yolağı üzerinden oksidatif, antioksidan ve DNA hasar mekanizmaları üzerindeki etkisini araştırmayı hedefledik.

Gereç ve Yöntemler: İlk olarak, CB'nin U87 hücrelerindeki sitotoksik konsantrasyonlarını MTT analizi ile belirledik. Ardından, CB'nin Nrf2 seviyeleri üzerindeki etkisini ve bununla bağlantılı olarak total oksidan kapasite (TOS), malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) seviyeleri ölçüldü. Son olarak, CB ile tedavi edilen U87 hücrelerindeki DNA hasarını tespit edebilmek için 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) seviyeleri ölçüldü.

Bulgular: MTT analizine göre, CB'nin U87 hücrelerinde canlılığı konsantrasyona bağımlı bir şekilde azalttığını belirledik ve IC50 konsantrasyonunu 62,8 µM olarak tespit ettik. Ardından, 5,1, 33,6 ve 62,8 µM CB ile tedavi edilen U87 hücrelerinde TOS, MDA ve 8-OHdG seviyeleri konsantrasyon bağımlı bir şekilde artmıştır (p<0,05). Aksine, CB tedavisi U87 hücrelerindeki Nrf2, SOD ve GPx seviyeleri azalmıştır (p<0,05). CB, U87 glioblastoma hücre proliferasyonunu Nrf2 sinyal yolağı üzerinden inhibe etmiştir.

Sonuç: CB tedavisi, U87 hücrelerinde oksidatif stresi ve DNA hasarını indüklemesinin yanı sıra antioksidan enzimlerin seviyelerini azaltmıştır, bu da CB'nin glioblastoma için potansiyel terapötik ajan olabileceğini düşündürdü. Ancak, CB'nin diğer kanser hücre hatlarında ve *in vivo* modellerdeki etkilerini araştıran daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, DNA hasarı, Oksidatif Stres, Sitokalsin B, U87 Glioblastoma Hücreler.

Abstract

Objective: Glioblastoma is one of the aggressive brain tumors with a poor prognosis, and the available treatments for glioblastoma are quite limited. Cytochalasin B (CB) has an inhibitory effect on cancer cell lines, but its anticancer effects are not yet fully understood. In this study, we aimed to investigate the effect of CB on oxidative, antioxidant and DNA damage mechanisms via nuclear factor erythroid 2 associated factor (Nrf2) signaling pathway in U87 human glioblastoma cells.

Materials and Methods: Firstly, we determined the cytotoxic concentrations of CB in U87 cells by MTT analysis. Then, the effect of CB on Nrf2 levels and related total oxidant capacity(TOS), malondialdehyde (MDA), superoxide

dismutase(SOD) and glutathione peroxidase(GPx) levels were measured. Finally, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG) levels were measured to detect DNA damage in U87 cells treated with CB.

Results: According to MTT analysis, we determined that CB decreased viability in U87 cells in a concentration-dependent manner and determined the IC50 concentration to be 62.8µM. Subsequently, TOS, MDA, and 8-OHdG levels increased in a concentration-dependent manner in U87 cells treated with 5.1, 33.6, and 62.8µM CB (p<0.05). In contrast, Nrf2, SOD and GPx levels were decreased in CB-treated U87 cells (p<0.05). CB inhibited U87 glioblastoma cell proliferation via the Nrf2 signaling pathway.

Conclusion: CB induced oxidative stress and DNA damage in U87 cells, as well as reduced antioxidant enzymes levels, suggesting that CB may be a potential therapeutic agent for glioblastoma. However, further studies investigating the effects of CB in other cancer cell lines and *in vivo* models are needed.

Keywords: Antioxidant, Cytochalasin B, Cytochalasin B, DNA damage, Glioblastoma Cells, Oxidative Stress.

1. Giriş

Gliomalar, tüm beyin tümörlerinin yaklaşık %80'ini oluşturan, glial hücrelerden kaynaklanan hızla ilerleyen malign beyin tümörleridir [1]. Gliomalar, etkilenen beyin bölgesine bağlı olarak çeşitli nörolojik semptomlara neden olabilen agresif tümörlerdir [2]. Genetik heterojenlik gliomaların karakteristiğidir ve bu yüzden, hastalardaki prognoz değişkenlik içerir ve hastaların hayatta kalma süreleri birkaç aydan birkaç yıla kadar farklılık gösterir [3]. Glioblastoma (GB), en agresif form olan IV derece bir gliomadır [4]. GB hastaları için kötü prognoz, GB'nin kemoterapiye ve radyo terapiye direncinden kaynaklanmaktadır [5]. Glioma tümörleri için mevcut tedavi stratejilerindeki sınırlılık, moleküler tekniklerin gelişmesiyle birlikte yenilikçi tedavi yaklaşımlarına olan ihtiyacı daha net bir şekilde ortaya koymaktadır.

Sitokalsinler, mantarlarda yaygın olarak bulunan alkaloid mikotoksinlerdir [6]. Sitokalsinler, tipik olarak bir makrosiklik halkaya bağlanan bir perhidro izoindolon yapısı ile karakterize edilir [7]. Sitokalsinler A, B, C, D, H ve O dahil olmak üzere birçok sitokalsin filamentli (F)-aktin'i bağlayan ve böylece sitoskelet elemanlarının polimerizasyonu bloke eden mikojenik toksinlerdir [8]. Sitokalsinler mikrofilamentlerin alt birimlerine bağlanarak hücre iskeleti yapısında bazı değişikliklere yol açarlar [9]. Sonuç olarak, mikrofilament oluşumu önemli ölçüde engellenir. Bu da hücre morfolojiyi etkileyerek hücre bölünmesi gibi hücre morfolojiyi engeller ve hatta apoptozu indükler [10]. Bu nedenle, hücre morfoloji ve hareketlilikten sorumlu hücre iskeleti elemanlarında neden oldukları değişikliklerle sitokalsinler, malign hücrelerde potansiyel terapötik ajanlar olarak kullanılması yeni bir olasılıktır.

Oksidatif stresin zararlı etkileri genellikle reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin üretim kapasitesi ile yakından ilişkilidir. Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör (Nrf2)/antioksidan yanıt elemanı (ARE) sinyal yolu, oksidatif strese karşı koruma sağlayan antioksidan proteinlerin ekspresyonunu düzenleyebilen en önemli savunma sistemlerinden biridir [11]. Fizyolojik koşullarda, Nrf2 sitoplazmik inhibitör proteini Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1'e (Keap1) bağlanır ve sitoplazmada bulunur. Keap1, hücre homeostazı sağlamak için Nrf2'yi uygun bir seviyede tutan adaptör protein olarak işlev görür. ROS üretimi Keap1'i inaktive eder; daha sonra Nrf2, Keap1'den

ayırır ve çekirdeğe taşınır. Çekirdekteki Nrf2 birikimi, küçük muskuloaponevrotik fibrosarkom (MAF) proteini ile bağlanarak heterodimer oluşturur, daha sonra ARE dizisine bağlanarak glutatyon-S-transferazlar (GST), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidazlar (GPx) gibi antioksidanların transkripsiyonunu aktive eder [12]. Bu nedenle, Nrf2 sinyal yolunun regülasyonu için yeni potansiyel terapötiklerin tanımlanması GB tedavisinde değerli olacaktır.

Bu çalışmada, sitokalsin B ile Nrf2 sinyal yolunun regülasyonu U87 glioblastoma hücrelerinin proliferasyonunda etkili bir rol oynayabileceği hipotezi öne sürüldü. Bu yüzden, sitokalsin B tedavisinin insan U87 glioblastoma hücrelerinde SOD, GPx, total oksidan kapasite (TOS) ve malondialdehit (MDA) seviyelerini üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık. Ayrıca, sitokalsin B'nin DNA hasarı üzerindeki etkisini belirlemek için de 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) seviyelerini ölçtük.

2. Materyal ve Metot

2.1. Hücre kültürü ve sitokalsin B tedavisi

İnsan U87 glioblastoma hücreleri, American Type Culture Collection'dan (HTB14, ATCC, Virginia, United States) satın alındı. U87 hücreleri 37°C'de %95 hava ve %5 CO2 içeren nemlendirilmiş bir ortamda %1'lik 100 µg/ml penisilin-100 µg/ml streptomisin ve %10 fetal sıvı serumu (FBS) ile takviye edilmiş yüksek glikozlu Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle ortamı (DMEM) ile kültüre edildi.

Hücreler, 5×10³ başlangıç yoğunluğunda 96 oyuklu plakalara ekildi ve 24 saat boyunca 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 ve 640 µM sitokalsin B konsantrasyonları ile inkübe edildi. Sitokalsin B inkübasyonunu takiben IC50'yi (hücre canlılığının %50'sini inhibe eden madde konsantrasyonu) hesaplamak için, hücreler 37°C'de 3 saat süreyle 100 µL 0,5 mg/ml 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) solüsyonu ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra süpernatant atıldı ve oluşan formazan kristalleri 100 µL %100 dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü. Ardından, her kuyucuğun absorbans değerleri, bir mikropilaka okuyucusu kullanılarak 570 nm'de ölçüldü. Canlı hücrelerin yüzdesi şu şekilde hesaplandı:

Hücre canlılığı (%) = [A570 (sitokalsin B ile tedavi edilen) - A570 (boş)] / [A570 (kontrol) - A570 (boş)] x %100.

MTT analizine göre sitokalsin B konsantrasyonları 25,1 (IC25), 33,6 ve 62,8 μM (IC50) olarak belirlendi. Bu sitokalsin B konsantrasyonları sonraki biyokimyasal analiz için kullanıldı.

2.2. Hücre lizatları hazırlaması ve biyokimyasal analizler

Nrf2, TOS, MDA, SOD, GPx ve 8-OHdG seviyelerinin analizi için sitokalsin B uygulanmış U87 hücre lizatları sadece önceki çalışmamıza göre hazırlanmıştır [13]. Kısaca, 24 saat süreyle 25,1, 33,6 ve 62,8 μM konsantrasyonlardaki sitokalsin B uygulanmış hücreler tripsin eklenerek kültür ortamından ayrılmaları sağlandı ve 4°C'de 1000 xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminde sonra hücreler soğuk fosfat tamponu ile 3 kez yıkandı ve yeniden süspansiyon edilmiş hücreler 4°C'de 30 dakika boyunca lizis tamponunda (RIPA) ile inkübe edildi. Daha sonra hücre kalıntıları 4°C'de 10000 xg'de 20 dakika süreyle santrifüjlenerek uzaklaştırıldı. Protein seviyeleri Lowry yöntemiyle ölçüldü [14].

Sitokalsin B 25,1, 33,6 ve 62,8 μM konsantrasyonları uygulanmış hücre lizatlarındaki Nrf2 (NWK-NRF2H1, ABD), TOS (Rel Assay Diagnostic, Türkiye), MDA (MAK085-1KT, Sigma-Aldrich, Almanya) SOD (574601, Sigma-Aldrich, Almanya), GPx (MBS167041, MyBioSource, ABD) ve 8-OHdG (MBS160699, MyBioSource, ABD) seviyeleri ticari olarak mevcut kitler kullanılarak üretici firma talimatları doğrultusunda mikropilaya okuyucu yardımıyla ölçülmüştür.

2.3. İstatistiksel Analizler

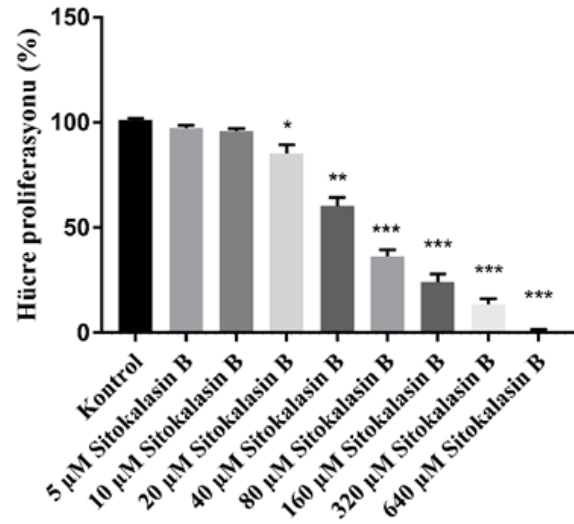
İstatistiksel analizler GraphPad Prism 7 programı ile yapıldı. Sonuçlar, üç tekrar halinde ortalama \pm standart sapma olarak sunuldu. Sonuçların normallik analizi Shapiro-Wilk normallik testi yardımıyla yapılmıştır. Normal olarak dağılan veriler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirildi ve çoklu karşılaştırmalarda Tukey post-hoc testi ile analiz edildi. Normal dağılım veya varyans homojenliği göstermeyen veriler için parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi kullanıldı. $P < 0,05$, istatistiksel anlamlı kabul edildi.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Sitokalsin B'nin hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri

Sitokalsin B'nin U87 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi, Şekil 1'de gösterildiği gibi MTT testi ile tespit edildi. U87 hücrelerine 24 saat süreyle 10, 20, 40, 80, 160, 320 ve 640 μM sitokalsin B konsantrasyonları uygulanmıştır. 10 μM ve altındaki sitokalsin B konsantrasyonlarının 24 saatlik tedavisi MTT analizine göre hücre canlılığında önemli bir düşüş neden olmamıştır ($p > 0,05$). Öte yandan, 20, 40, 80, 160, 320 ve 640 μM sitokalsin B konsantrasyonları, U87 hücrelerinin proliferatif aktivitesi üzerinde önemli inhibitör etkiler göstermiştir. 24 saat süreyle 20, 40 ve 80 μM sitokalsin B uygulanması U87 hücrelerin canlılığını kontrole kıyasla sırasıyla %16,2, %41,7 ve %63,5 oranında baskılamıştır ($p < 0,01$). Dahası, 160, 320 ve 640 μM sitokalsin B konsantrasyonları U87 hücrelerindeki canlılık kontrol grubuna göre sırasıyla %76,2, %88,2 ve %95,3 oranında düşüş göstermiştir ($p < 0,0001$). Ek

olarak, 640 μM sitokalsin B konsantrasyonunda U87 hücrelerinde canlılık neredeyse yok denecek kadar azdı (kontrole göre %98,4; $p < 0,0001$). MTT analizine göre sonraki biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere üç sitokalsin B konsantrasyonu belirledik: 1) Hücre canlılığında önemli bir düşüşün tespit edildiği ilk konsantrasyon olan 25,1 μM (IC25), 2) 62,8 μM , sitokalsin B'nin IC50'si ve 3) bir ara konsantrasyon olarak da 33,6 μM .



Şekil 1. Sitokalsin B'nin 24 süreyle uygulamasından sonra U87 glioblastoma hücrelerindeki canlılık yüzdeleri. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

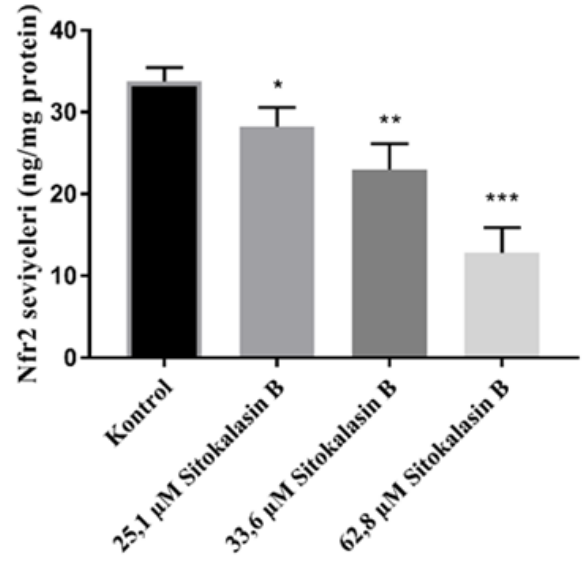
Çalışmamızla aynı paralellikte Tong ve ark., sitokalsin B ile tedavi edilen U251 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla hücre proliferasyonunu zaman ve konsantrasyon bağımlı bir şekilde inhibe ettiğini rapor etmişlerdir [15]. Bir başka çalışmada, Heidarzadeh ve ark., 10-5 M konsantrasyonunda sitokalsin H'nin 48 saat boyunca U87 kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir [16]. Yine aynı çalışmada, ilginç bir şekilde, U87 kanser hücrelerine kıyasla normal (HEK) hücre hattı üzerinde sitokalsin H toksisite etkilerinin olmadığını göstermişlerdir. Benzer şekilde, 48, 72 veya 96 saat boyunca sırasıyla 10-11, 10-10, 10-9, 10-8, 10-7 veya 10-6 M sitokalsin E uygulanan U87 hücrelerinde 10-8 ila 10-6 M konsantrasyonlarının hücre canlılığını inhibe etti bulunurken; 10-9 M'dan düşük konsantrasyonlarda proliferasyon üzerinde inhibitör etkiler tespit edilmemiştir [17]. Bir başka çalışmada, HeLa insan servikal karsinom hücrelerinin büyümesi üzerinde 5, 10, 20 ve 40 μM sitokalsin B konsantrasyonlarının 48 saatlik tedavisinin sitotoksik etkilerini araştırmışlar ve yaklaşık 8 μM 'lik bir IC50 ile hücre canlılığını inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir [18]. Bahsi geçen çalışmalar ve verilerimiz doğrultusunda, sitokalsin B'nin kanser hücresi proliferasyonunu baskılayabildiğini ve bu da kanser hücrelerinin büyümesinin inhibisyonuna yol açabileceğini göstermektedir.

3.2. Sitokalsin B'nin antioksidan ve oksidan mekanizmalar üzerindeki etkisi

Nrf2, Cap'N'Collar (CNC) ailesine ait temel bir lösin fermuar (bZIP) transkripsiyon faktörüdür [19]. Nrf2 genellikle bir sitoprotektif transkripsiyon faktörü ve bir tümör baskılayıcı olarak kabul edilir [20]. Fizyolojik koşul altında, Nrf2 hücrel redoks homeostazını koruması, anti-inflamatuar fonksiyonları ve antikanser etkileri sayesinde hücrel proliferasyonun sürdürülmesinde rol alır [21]. Nrf2'nin aktivasyonu, çeşitli kanserlerin gelişimini desteklediğine ve özellikle kanser direncini arttırdığına dair klinik araştırmalarda da, Nrf2'nin aşırı ekspresyonunun kötü prognozla yakından ilişkili olduğu görülmüştür [22]. Kanser hücreleri çoğunlukla, ROS aracı hücre ölümünün önlenmesinde etkili olan antioksidan enzimleri yüksek seviyelerde eksprese ederler [23]. Kanser hücrelerindeki Nrf2'nin aktivasyonu, GSH sentezi için gerekli antioksidan enzimlerin ekspresyonunu artırarak ROS üretimini dengeler ve diğer sinyal yolları ile de etkileşime girerek kanser hücrelerindeki apoptozun baskılanmasına katkıda bulunur [24]. Akciğer, pankreas ve endometrium dahil olmak üzere çeşitli kanser dokularında sağlıklı hücre hatlarına göre Nrf2 seviyelerinde artış olduğu tespit edilmiştir [25]. Nrf2 sinyalinin bozulması, hücre döngüsü ilerlemesini ve kanser hücre hatlarının in vitro çoğalmasını etkilemektedir [26]. Yapılan önceki çalışmada, kanser hücrelerinde Nrf2'in susturulmasının, hücre göçünde ve tümör metastazında zayıflamaya neden olduğu bildirilmiştir [27]. Öte yandan, DeNicola ve ark., çeşitli onkogenlerin fare fibroblastlarında Nrf2 transkripsiyonunu ve aktivasyonunu uyararak ROS'un hücrel yükünde genel bir azalmaya yol açabileceğini ve tümörögeneze neden olabileceğini göstermiştir [28]. Çalışmamızda ilk kez, U87 hücrelerinde sitokalsin B'nin Nrf2 ile olan ilişkisini ortaya koyduk. ELISA ile yapılan Nrf2 analiz bulgularına göre (Şekil 2), U87 hücrelerindeki Nrf2 seviyeleri uygulanan sitokalsin B'nin konsantrasyonuna bağımlı şekilde düşüş göstermiştir.

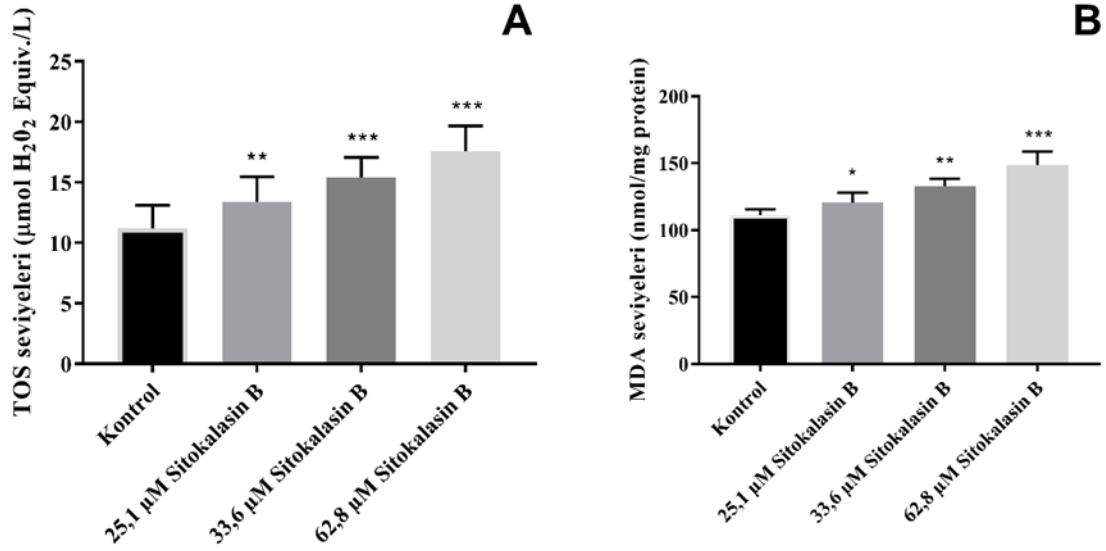
Dahası, 24 saat süreyle 25,1, 33,6 ve 62,8 µM konsantrasyonlardaki sitokalsin B uygulanan U87 hücrelerinden kontrol grubuna kıyasla Nrf2 seviyelerinde sırasıyla %13,7, %24,2 ve %56,3'lük bir olduğunu tespit ettik ($p<0,01$).

Aslında, ROS'un aşırı üretimi, hücre kaderini belirlemede tartışmalı bir role sahiptir. Biriken kanıtlar, apoptozun da dahil olduğu bir takım sinyal mekanizmalarının aktivasyonu veya inhibisyonu ile ROS'un aşırı üretimi hücre ölümüne yol açtığını gösterilmiştir [23]. Öte yandan, kanser hücreleri, sağlıklı hücrelere kıyasla aktif metabolizma ve yüksek çoğalma ve göç hızı ile karakterize edilir [29]. Bu nedenle kanser hücreleri, anormal çoğalma ve büyüme oranlarını sürdürmek için daha yüksek enerji seviyelerine ihtiyaç duyar, bu da mitokondri ve nikotinamid adenin nükleotid fosfat (NADPH) oksidaz tarafından artan ROS üretimine yol açan sonuçlanan aşırı metabolizmaya yol açar [30].



Şekil 2. Sitokalsin B uygulanan U87 glioblastoma hücrelerindeki Nrf2 seviyeleri. * $p<0,01$; ** $p<0,001$; *** $p<0,0001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

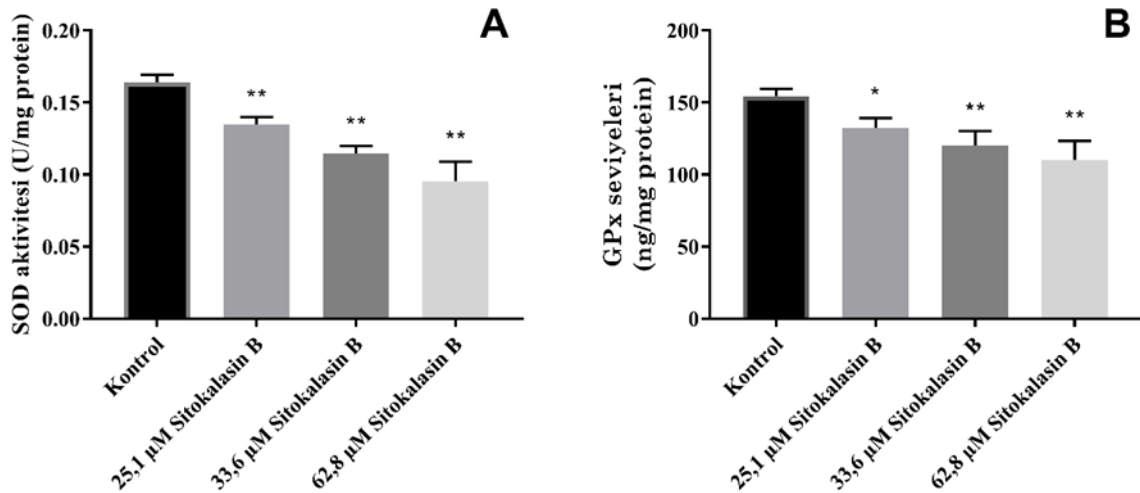
Oksidatif stresle başa çıkmak için birçok kanser hücresi, hücrel antioksidan sistemlerin aktivitesini artırarak yüksek ROS seviyelerini kontrol eder, böylece hücre ölümünü önler ve tümör gelişimini desteklerken kemoterapi ve radyoterapi gibi ekzojen uyarılara karşı daha dirençli hale gelirler [31]. Paradoksal olarak, artan oksidatif stres, kanser hücrelerinin ölümünü seçici bir şekilde indüklemeye çok etkilidir [32]. Son yıllarda kanser hücrelerinde redoks durumunun değiştirilmesi ve ROS seviyesinin artırılması, kansere karşı savaşmanın yeni bir yolu haline geldi. Normal hücrelerden farklı olarak, kanser hücrelerinin aşırı metabolizması, daha önce de belirtildiği gibi daha yüksek ROS seviyelerine neden olur. Ancak kanser hücreleri, ROS seviyelerini toksisite eşliğinin altında tutan etkili antioksidan sistemler geliştirmiştir [33]. Sağlıklı hücrelerde Nrf2, hücrelerdeki ROS ve DNA hasarı miktarını azaltarak tümör oluşumuna karşı koruyucu olmasına rağmen, tümör hücrelerinde ise proliferasyonu sürdürebilmek için Nrf2'nin koruyucu işlevinden yararlanılabildiği bulunmuştur [34]. Şöyle ki, Nrf2 kanser hücrelerindeki aktivasyonu ve yüksek nükleer lokalizasyonu, bu hücre hatlarında ROS üreten terapötik ajanlara duyarlılığı da düzenleyebileceğini gösterilmiştir [35]. Çalışmamızda Nrf2 sonuçlarıyla tutarlı bir şekilde, sitokalsin B uygulanan U87 hücrelerinde oksidatif stresin indüklendiği ve antioksidan savunma mekanizmalarının düştüğünü bulduk. Şekil 3'te görüldüğü gibi sitokalsin B (25,1, 33,6 ve 62,8 µM) ile tedavi edilen U87 hücrelerindeki TOS seviyeleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sırasıyla %34,4, %45,8 ve %67,2 artış göstermiştir (Şekil 3A; $p<0,001$).



Şekil 3. Sitocalasin B ile tedavi edilen U87 glioblastoma hücrelerindeki oksidatif stres seviyeleri. (A) TOS seviyeleri (B) MDA seviyeleri. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

Benzer şekilde, 25,1, 33,6 ve 62,8 µM sitocalasin B tedavisi U87 hücrelerinde kontrole kıyasla MDA seviyelerinde sırasıyla %11,7, %24,6 ve %38,3 oranında konsantrasyon bağımlı bir artış olduğunu bulduk (Şekil 3B; $p < 0,01$). Öte yandan, sitocalasin B U87 hücrelerinde oksidatif hasarı artırırken beraberinde antioksidan savunma sistemini de sekteye uğratmıştır. TOS ve MDA sonuçlarının aksine, 25,1, 33,6 ve 62,8 µM sitocalasin B tedavisi U87 hücrelerinde kontrole kıyasla SOD aktivitelerinde sırasıyla %23,5, %30,8 ve %35,2 düşüş olurken (Şekil 4A; $p < 0,0001$), GPx seviyelerinde de

%15,3, %20,6 ve %32,7 oranın düşüş olmuştur (Şekil 4B; $p < 0,001$). Sonuçlarımızın aksine, Takaishi ve meslektaşları, insan arteriyel düz kasındaki yüksek glikozun neden olduğu oksidatif hasarına karşı sitocalasin B, NADPH oksidaz aktivitesini azaltarak süperoksit seviyelerinde bir azalmaya yol açtığını bildirmişlerdir [36]. Öte yandan, bir başka çalışmada, 10-5 M konsantrasyonda sitocalasin H ile tedavi edilen U87 hücrelerinin sitoplazmasında, konsantre ve parçalanmış halde DNA yapılarının olduğu bulunmuştur.¹⁶



Şekil 4. Sitocalasin B'nin U87 glioblastoma hücrelerindeki antioksidan enzimler üzerindeki etkisi. (A) SOD aktivitesi (B) GPx seviyeleri. * $p < 0,001$; ** $p < 0,0001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

Çalışmamızda, sitokalsin B uygulanan U87 hücrelerinde konsantrasyon bağımlı artan oksidatif stresle birlikte DNA hasarının da arttığını belirledik. Şekil 5'te görüldüğü gibi, 25,1, 33,6 ve 62,8 µM sitokalsin B uygulamasının U87 hücrelerinde kontrole yasla 8-OHdG seviyelerinde sırasıyla %28,3, %34,5 ve %39,7 oranında bir artış olduğunu bulduk (p<0,0001).

4. Sonuç

Sonuç olarak bu çalışmamızda, sitokalsin B'nin U87 hücrelerinde Nrf2 sinyal yolağı üzerindeki etkilerini değerlendirdik. Dikkat çekici bir şekilde, sitokalsin B'nin insan glioma U87 hücrelerini Nrf2 seviyelerini konsantrasyona bağlı bir şekilde inhibe ettiği bulduk. Böylece, sitokalsin B U87 hücrelerinde antioksidan seviyelerini düşürerek oksidatif yükün artışına neden olmuştur. Ayrıca sitokalsin B uygulanması ile DNA hasarındaki artışı, U87 hücrelerinin canlılığını inhibe ettiğini belirledik. Genel olarak sonuçlarımız, sitokalsin B'nin malign glioblastomaların tedavisi için önemli bir potansiyel terapötik olacağını düşündürmektedir. Ancak, sitokalsin B'nin diğer glioblastoma hücre hatlarının yanı sıra farklı kanser hücre hatlarında ve *in vivo* modeller üzerindeki etkilerinin araştırıldığı daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır. Öte yandan, sitokalsin B'nin yalnızca *in vitro* olarak U87 insan glioblastoma hücreleri üzerindeki araştırılmış olması çalışmamızın en önemli kısıtlamalarından biridir. Ek olarak, sitokalsin B'nin Nrf2 sinyal yolağındaki genlerin ekspresyon seviyelerinin üzerindeki etkilerinin analiz edilememiş olması diğer önemli bir kısıtlamadır.

Referanslar

- Ohgaki, H, Kleihues, P, Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas, *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 2005, 64(6), 479–489.
- Goodenberger, M.L, Jenkins, R.B, Genetics of adult glioma, *Cancer genetics*, 2012, 205(12), 613–621.
- Molinaro, A.M, Taylor, J.W, Wiencke, J.K, Wrensch, M.R, Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma, *Nature reviews, Neurology*, 2019, 15(7), 405–417.
- Jovcevska, I, Kočevan, N, Komel, R, Glioma and glioblastoma- how much do we (not) know? *Molecular and clinical oncology*, 2013, 1(6), 935–941.
- Bahadur, S, Sahu, A.K, Baghel, P, Saha, S, Current promising treatment strategy for glioblastoma multiform: A review, *Oncology reviews*, 2019, 13(2), 417.
- Haidle, A.M, Myers, A.G, An enantioselective, modular, and general route to the cytochalasins: synthesis of L-696,474 and cytochalasin B, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(33), 12048–12053.
- Scherlach, K, Boettger, D, Remme, N, Hertweck, C, The chemistry and biology of cytochalasins, *Natural product reports*, 2010, 27(6), 869–886.
- Hayot, C, Debeir, O, Van Ham, P, Van Damme, M, Kiss, R, Decaestecker, C, Characterization of the activities of actin-affecting drugs on tumor cell migration, *Toxicology and applied pharmacology*, 2006, 211(1), 30–40.
- Van Goietsenoven, G, Mathieu, V, Andolfi, A, Cimmino, A, Lefranc, F, Kiss, R, Evidente, A, In vitro growth inhibitory effects of cytochalasins and derivatives in cancer cells, *Planta medica*, 2011, 77(7), 711–717.
- Hwang, J, Yi, M, Zhang, X, Xu, Y, Jung, J.H, Kim, D.K, Cytochalasin B induces apoptosis through the mitochondrial apoptotic pathway in HeLa human cervical carcinoma cells, *Oncology reports*, 2013, 30(4), 1929–1935.
- Ma, Q, Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity, *Annual review of pharmacology and toxicology*, 2013, 53, 401–426.
- Bellezza, I, Giambanco, I, Minelli, A, Donato, R, Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress, *Biochimica et biophysica acta Molecular cell research*, 2018, 1865(5), 721–733.
- Hacıoğlu, C, Kar, F, Kacar, S, Sahintürk, V, Kanbak, G, Bexarotene inhibits cell proliferation by inducing oxidative stress, DNA damage and apoptosis via PPAR γ /NF- κ B signaling pathway in C6 glioma cells, *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 2021, 38(3), 31.
- Lowry, O.H, Rosebrough, N.J, Farr, A.L, Randall, R.J, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *The Journal of biological chemistry*, 1951, 193(1), 265–275.
- Tong, Z.G, Liu, N, Song, H.S, Li, J.Q, Jiang, J, Zhu, J.Y, Qi, J.P, Cytochalasin B inhibits the proliferation of human glioma U251 cells through cell cycle arrest and apoptosis, *Genetics and molecular research: GMR*, 2014, 13(4), 10811–10822.
- Heidarzadeh, S, Motalleb, G.H, Zorriehzaha, M.J, Evaluation of Tumor Regulatory Genes and Apoptotic Pathways in The Cytotoxic Effect of Cytochalasin H on Malignant Human Glioma Cell Line (U87MG), *Cell journal*, 2019, 21(1), 62–69.
- Li, J, Gu, B, Chen, G, Ma, B, Xu, J, Zhang, G, et al., Cytochalasin E, a potential agent for anti-glioma therapy, efficiently induces U87 human glioblastoma cell death, *Latin American Journal of Pharmacy*, 2012, 31(1), 147–151.
- Hwang, J, Yi, M, Zhang, X, Xu, Y, Jung, J.H, Kim, D.K, Cytochalasin B induces apoptosis through the mitochondrial apoptotic pathway in HeLa human cervical carcinoma cells, *Oncology reports*, 2013, 30(4), 1929–1935.
- Rojo de la Vega, M, Chapman, E, Zhang, D.D, NRF2 and the Hallmarks of Cancer, *Cancer cell*, 2018, 34(1), 21–43.
- Murakami, S, Motohashi, H, Roles of Nrf2 in cell proliferation and differentiation, *Free radical biology & medicine*, 2015, 88(Pt B), 168–178.
- Wu, S, Lu, H, Bai, Y, Nrf2 in cancers: A double-edged sword, *Cancer medicine*, 2019, 8(5), 2252–2267.
- Solis, L.M, Behrens, C, Dong, W, Suraokar, M, Ozburn, N.C, Moran, C.A, et al., II, Nrf2 and Keap1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features, *Clinical cancer research: An official journal of the American Association for Cancer Research*, 2010, 16(14), 3743–3753.
- Sajadimajid, S, Khazaei, M, Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2, *Current cancer drug targets*, 2018, 18(6), 538–557.
- Zimta, A.A, Cenariu, D, Irimie, A, Magdo, L, Nabavi, S.M, Atanasov, A.G, Berindan-Neagoe, I, The Role of Nrf2 Activity in Cancer Development and Progression, *Cancers*, 2019, 11(11), 1755.
- Basak, P, Sadhukhan, P, Sarkar, P, Sil, P.C, Perspectives of the Nrf-2 signaling pathway in cancer progression and therapy, *Toxicology reports*, 2017, 4, 306–318.
- Ma, X, Zhang, J, Liu, S, Huang, Y, Chen, B, Wang, D, Nrf2 knockdown by shRNA inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy in cervical cancer, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2012, 69(2), 485–494.
- Lister, A, Nedjadi, T, Kitteringham, N.R, Campbell, F, Costello, E, Lloyd, B, et al., Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer: implications for cell proliferation and therapy, *Molecular cancer*, 2011, 10, 37.
- DeNicola, G.M, Karreth, F.A, Humpton, T.J, Gopinathan, A, Wei, C, Frese, K, et al., Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis, *Nature*, 2011, 475(7354), 106–109.
- Galadari, S, Rahman, A, Pallichankandy, S, Thayyullathil, F, Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free radical biology & medicine*, 2017, 104, 144–164.
- Kim, J, Kim, J, Bae, J.S, ROS homeostasis and metabolism: a critical liaison for cancer therapy, *Experimental & molecular medicine*, 2016, 48(11), e269.
- Kalyanaraman, B, Cheng, G, Hardy, M, Ouari, O, Bennett, B, Zielonka, J, Teaching the basics of reactive oxygen species and their relevance to cancer biology: Mitochondrial reactive oxygen species detection, redox signaling, and targeted therapies, *Redox biology*, 2018, 15, 347–362.
- Nguyen, C, Pandey, S, Exploiting mitochondrial vulnerabilities to trigger apoptosis selectively in cancer cells, *Cancers*, 2019, 11(7), 916.

33. Castaldo, S.A, Freitas, J.R, Conchinha, N.V, Madureira, P.A, The tumorigenic roles of the cellular REDOX regulatory systems, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 8413032.
34. Hayes, J.D, McMahon, M, NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer, *Trends in biochemical sciences*, 2009, 34(4), 176–188.
35. Rushworth, S.A, Bowles, K.M, MacEwan, D.J, High basal nuclear levels of Nrf2 in acute myeloid leukemia reduces sensitivity to proteasome inhibitors, *Cancer research*, 2011, 71(5), 1999–2009.
36. Takaiishi, K, Kinoshita, H, Feng, G.G, Azma, T, Kawahito, S, Kitahata, H, Cytoskeleton-disrupting agent cytochalasin B reduces oxidative stress caused by high glucose in the human arterial smooth muscle, *Journal of pharmacological sciences*, 2020, 144(4), 197–203.

<http://edergi.cbu.edu.tr/ojs/index.php/cbusbed> isimli yazarın CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Alıntı-Gayriticari4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

