

Araştırma Makalesi

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg 2022;15(1):56-65

doi: 10.26559/mersinsbd.1001821

Sertralin ve sorafenibin karaciğer kanseri hücrelerinde P-glikoprotein gen ekspresyonuna ve rodamin 123 birikimine etkileri

 Yaprak Dönmez Çakıl^{1,2},  İlayda Altun³,  Elif Tekin İşlerel⁴,
 Zeynep Güneş Özunal^{2,5}

¹Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, İstanbul, Türkiye

²Maltepe Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye

³Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye

⁴Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, İstanbul, Türkiye

⁵Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD, İstanbul, Türkiye

Öz

Amaç: Hepatoselüler karsinom (HCC), tüm dünyada görülme sıklığı giderek artan, en yaygın ölümcül kanser türleri arasında yer almaktadır. Vakaların büyük çoğunluğunda ileri evrede tanı ve ilaç direnci hayatta kalma oranını sınırlayan temel sorunlardır. ATP bağımlı bir efluks (dışa atım) pompası olan P-glikoprotein (P-gp), kanserde çok sayıda ilaç direnci modeli ile ilişkilidir. Rodamin 123 (rh123) floresan bir boyadır ve bir referans P-gp substratı olarak birçok araştırmada P-gp aktivitesini incelemek amacıyla kullanılmaktadır. Sorafenib, HCC tedavisi için onaylanmış ilk sistemik tedavidir. Etkinliğini artırmak ve ilaç direncini azaltmak için farklı ilaçlarla beraber kullanımları araştırılmaktadır. Bu kapsamda, daha önce sorafenib ve antidepresan sertralinin HepG2 hücre proliferasyonu ve ölümü üzerinde sinerjistik etkileri gösterilmiştir. **Yöntem:** Bu çalışmada, HepG2 hücrelerinde, sorafenib ve sertralinin tek başına veya birlikte uygulanması sonrası, qPCR ve akış sitometrisi ile P-gp gen ekspresyonu ve rh123 birikimi/efluks araştırılmıştır. **Bulgular:** Sorafenib uygulaması hem P-gp gen ekspresyonu hem de hücrelerde rh123 birikimini anlamlı olarak azaltırken, sertralin tek başına kullanıldığında P-gp mRNA seviyelerini arttırmış, rh123 birikiminde ise anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır. İki ilacın birlikte uygulanması ise, kontrol grubuna kıyasla P-gp gen ekspresyonunda ve rh123 birikiminde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. **Sonuç:** Sonuçlar, sorafenib ve sertralinin antiproliferatif sinerjistik etkilerinde P-gp ile ilişkili etkenlerden ziyade farklı mekanizmaların rol alabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Sertralin, sorafenib, sinerjistik etki, P-glikoprotein, HepG2, rodamin 123

Yazının geliş tarihi: 29.09.2021

Yazının Kabul tarihi: 21.10.2021

Sorumlu yazar: Yaprak Dönmez Çakıl, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Marmara Eğitim Köyü 34857 Maltepe, İstanbul, Türkiye Tel: 0216 6261050, E-posta: yaprak.cakil@maltepe.edu.tr

The effects of sertraline and sorafenib on P-glycoprotein expression and rhodamine 123 accumulation in liver cancer cells

Abstract

Aim: Hepatocellular carcinoma (HCC) is among the most common lethal cancer type with an increasing incidence all over the world. In the majority of cases, advanced stage diagnosis and drug resistance are the main issues that limit the survival rate. P-glycoprotein (P-gp), an ATP-dependent efflux pump, is associated with numerous drug resistance patterns in cancer. Rhodamine 123 (rh123) is a fluorescent dye used as a reference substrate for measurement of P-gp activity in various studies. Sorafenib is the first approved systemic therapy for HCC treatment. Novel combined approaches of sorafenib with cytotoxic drugs are extensively studied to increase its effectiveness and overcome drug resistance. Recently, the synergistic effects of sorafenib and antidepressant sertraline on HepG2 cell proliferation and death were shown. **Method:** In the present study, we investigated the possible effects of sorafenib and sertraline as single agents or in combination on P-gp expression and rh123 accumulation/efflux by qPCR and flow cytometry, respectively. **Results:** Sorafenib administration significantly decreased both P-gp gene expression and rh123 accumulation in cells, while sertraline increased P-gp mRNA levels, it did not cause a significant change in rh123 accumulation. Co-administration of the two drugs did not cause any alterations in P-gp gene expression and rh123 accumulation compared to the control group. **Conclusion:** The results suggested that the presence of other mechanisms rather than P-gp associated effects are responsible for the synergistic activity of sorafenib and sertraline.

Keywords: Sertraline, sorafenib, synergy, p-glycoprotein, HepG2, rhodamine123

Giriş

Hepatoselüler karsinom (HCC), karaciğer kanseri vakalarının yaklaşık %90'ını oluşturur ve 2025 yılına kadar bir milyondan fazla vaka insidansı bildirileceği tahmin edilmektedir.¹ Ne yazık ki, HCC hastalarının %50'sinden fazlasında hastalığın ileri evresinde tanı konulur. Bunun yanı sıra, tedaviyi takiben ilk beş yılda hastaların %70'inde hastalık nükseder. Erken evre HCC için tam cerrahi rezeksiyon bir tedavi seçeneği olsa da, ilerlemiş HCC'li hastalarda ablasyon, transarteriyel kemoembolizasyon veya harici ışınlama ile lokal tedaviye ek olarak sıklıkla sorafenib ile sistemik tedaviler kullanılır.² Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), HCC tedavisi için 2017 ve 2020 yılları arasında regorafenib, lenvatinib, cabozantinib ve ramucirumab dahil olmak üzere çeşitli multikinaz inhibitörlerini ve nivolumab ve pembrolizumab dahil olmak üzere immün kontrol noktası (checkpoint) inhibitörlerini, bevacizumab ile birlikte atezolizumab'ı onaylamıştır.³ 2007'de sorafenib'in HCC'li hastalarda kullanım için onaylanması tedavide önemli bir adım

olmuştur.⁴ Sorafenib, vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörleri (VEGFR1, 2, 3), trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü- β (PDGFR β) ve Raf ailesi kinazları (ağırlıklı olarak C-Raf) hedef alan bir oral multikinaz inhibitörüdür.⁵ İleri evre HCC için etkisi kanıta dayalı olarak gösterilmiş, klinik deneyimle desteklenmiş, dünya çapında kabul gören sistemik birinci basamak tedavi olmaya devam etmektedir.² Bununla birlikte, birçok hastada ilaç direnci sorafenib etkinliğini engellemektedir. Hastaların yaklaşık %30'unda ilaç direncine bağlı olarak farklı tedavi yanıtları gözlenmiştir.⁵ Epigenetik düzenlemeler, ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarını içeren taşıma süreçleri, düzenlenmiş hücre ölümü ve tümör mikro-ortamı, muhtemelen toplu olarak HCC'de hem birincil hem de edinilmiş sorafenib direncini kolaylaştıran olası mekanizmalar arasında sayılmaktadır. HCC'de sorafenib direncini yönetmek için sitotoksik ilaçlarla yeni kombine yaklaşımlar çalışılmıştır.^{2,6-8}

ABC ailesinin bir üyesi olan P-glikoprotein (P-gp/MDR1/ABCB1), çok sayıda substratın bağlandığı ve insan MDR1 geni tarafından kodlanan bir ilaç efluks (dışa atım) pompasıdır. Antikanser ilaçlara direnç olarak tanımlanan çoklu ilaç direnci modeli ile ilişkili olan P-gp'nin aşırı ekspresyonu, birçok tümör tipinde gösterilmiştir.⁹ İlaçlar bu taşıyıcı ile etkileşime girdiğinde protein aktivitesi inhibe olur veya düzenlenir. Bu nedenle P-gp ligandlarının birlikte uygulanması, ilaçların farmakokinetiğini ve farmakodinamiğini etkileyen ilaç-ilaç etkileşimlerine yol açabilir.¹⁰

Rodamin 123 (rh123), lipofilik katyonik bir floresan boyadır. Başlarda rh123 canlı hücrelerde mitokondrinin boyanması ve membran potansiyelinin ölçülmesinde kullanılırken daha sonra plazma membranından P-gp tarafından taşındığı gösterilmiştir. P-gp aracılı rh123 efluks, normal veya tümör hücrelerinde P-gp aktivitesini analiz etmek için akış sitometrik veya florimetrik deneylerde yaygın olarak kullanılmaktadır.^{11,12}

Sertralin, seçici bir serotonin geri alım inhibitörü olup depresyon dahil olmak üzere birçok psikiyatrik hastalık tedavisinde kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra kanser üzerindeki etkileri de araştırılmıştır ve son zamanlarda bu konu özel ilgi görmektedir.^{13,14} Daha önce, araştırma grubumuz sorafenibin sertralin ile birlikte uygulanmasının HepG2 hepatoselüler kanser hücresi proliferasyonu ve ölümü üzerinde sinerjistik etkileri olduğunu göstermişti. Bu sinerjistik etki XTT hücre proliferasyonu testi, akış sitometrisi ve morfolojik analiz yöntemleriyle çalışılmış ve sertralin+ sorafenib grubunda bu ilaçların tek uygulandığı diğer gruplara göre önemli ölçüde daha fazla antiproliferatif etki ve apoptotik hücre yüzdesi belirlenmişti.¹⁵ Bu çalışmada ise HepG2 hücrelerinde sertralin ve sorafenib birlikte uygulandığında gözlenen bu sinerjistik etkide efluks pompası P-gp'nin olası bir rolünün, P-gp gen ekspresyonu ve rh123 birikimi/eflüks değişimi incelenerek değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hücre Kültürü ve İlaçlar

İnsan HCC hücre hattı HepG2 (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu, ABD), %10 (v/v) ısıyla inaktive edilmiş fetal sıgır serumu ve %1 antibiyotik (10mg/ml streptomycin and 10.000 U/ml penicillin, PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) ile takviye edilen Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Biosera LM-T1720/100, Nuaille, Fransa) içerisinde 37°C de ve % 5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Sorafenib (LC Laboratories, Woburn, MA, ABD) ve sertralin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) sırasıyla DMSO ve distile su içinde 10 mmol/L olacak şekilde çözüldü. Deney gününde ilaçlar gerekli konsantrasyonlarda hazırlandı. İlaç uygulanan gruplar sırasıyla (i) sertralin (ii) sorafenib veya (iii) sertralin+ sorafenib olarak belirlendi. İlaç dozları ise daha önceki çalışmamızda iki ilacın en yüksek antiproliferatif sinerjistik etkinin gösterildiği dozlar olarak (sertralin için 5.6 µM ve sorafenib için 11.9 µM) seçildi.¹⁵ Kontrol grubuna herhangi bir ilaç uygulanmadı.

P-gp gen ekspresyonu analizi

İlaçların tekil veya kombinasyon halinde uygulanmasının ardından, HepG2 hücrelerinden total RNA izolasyonu Quick-RNA MiniPrep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, ABD) ile önerilen talimatlara göre yapıldı. Elde edilen total RNA örneklerinin kalite ve miktar tayinleri Synergy Microplate Reader ile yapıldı. cDNA sentezi 500ng total RNA kullanılarak gene özgü ters primer ve RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) ile gerçekleştirildi. QPCR analizleri RealQ Plus 2X Master Mix Green (Amplicon, Denmark) ve Roche LightCycler® 96 cihazı (Basel, İsviçre) kullanılarak yapıldı. Arka plan sinyali ve primer dimer oluşumunu saptamak için negatif kontrolde cDNA yerine dH₂O kullanıldı. Delta delta Ct (2^{-ΔΔCT}) rölatif kantitasyon metodu ile P-gp gen ekspresyonundaki değişim oranı β-aktin (endojen kontrol) ile kıyaslanarak belirlendi.

Hücrelerde rh123 birikimi

Rh123 birikimi için Dönmez Çakıl ve ark.'larında¹⁶ verilen metot küçük değişiklikler yapılarak kullanıldı. HepG2 hücreleri rh123 birikiminin belirlenmesi amacıyla 24 saat (i) sertralin, (ii) sorafenib veya (iii) sertralin+ sorafenibe maruz bırakıldı. İnkübasyon sonrasında hücreler tripsinlenerek 500g'de 6 dakika santrifüj edildi ve iki kez fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Ardından hücreler DMEM, pH 7.8 içerisinde 37°C'de 30 dakika hafif çalkalanarak rh123 (Sigma-Aldrich) ile yüklendi. Rh123'ün son konsantrasyonu 0.2 ug/ml (0.53 uM) olacak şekilde hazırlandı. 30 dakika tamamlandığında hücrelerin bulunduğu tüpler buz üzerinde soğutuldu ve sonrasında buz soğukluğunda DMEM, pH 7.4 ile iki kez yıkandı. Herhangi bir rh123 efluksunu önlemek için hücreler buz soğukluğunda DMEM'de tutulurken BD Accuri C6+ akış sitometresi ile ölçüm yapıldı ve floresan veriler FL-1'den toplandı. Rh123 birikimindeki değişim oranının hesaplanmasında medyan floresans değerleri kullanılarak kontrol ile kıyaslandı.

Rh123 efluksu değişimi

HepG2 hücreleri öncesinde sorafenib veya sertralin maruz bırakılmadan yukarıda belirtildiği gibi rh123 ile yüklendi. Hücreler buz soğukluğunda DMEM, pH 7.4 ile yıkandıktan sonra yine buz soğukluğunda DMEM, pH 7.4 içinde rh123 birikimi ölçüldü. Devamında aynı hücreler ilaçlar ile (sertalin / sorafenib ile tek başına veya sertalin+sorafenib) 5 dakika boyunca hafif çalkalama ile 37°C'de DMEM, pH 7.4'te inkübe edildi. Hücreler buza alındı ve 5 dakikalık efluks sonrası rh123 birikimindeki farkın belirlenmesi ve dolayısıyla ilaçların olası inhibitör aktivitesinin belirlenmesi amacıyla tekrar akış sitometrisinde ölçüm yapıldı. Medyan floresan değerlerinin öncesi ve sonrası arasındaki farklar hesaplanarak rh123 akışının değişim oranı olarak ifade edildi.

İstatistiksel Analiz

Tüm veriler ortalama±standart sapma (SD) olarak gösterildi. Rh123 birikimi ve dışa atımının engellenmesi verileri, tek yönlü Anova kullanılarak karşılaştırıldı ve

gruplar arasındaki belirgin farklılıklar, post hoc Tukey analizi ile belirlendi (GraphPad Prism V.8.2.0, GraphPad Software, La Jolla, CA, ABD). QPCR verileri için, Levene's varyansların homojenite testi yapıldığında anlamlı sonuç (p=0.043) elde edildi ve varyanslar homojen dağılmadığı için Welch's testi ile post hoc Games-Howell analizleri yapıldı (Statistical Package for the Social Sciences v.24). Anlamlılık düzeyleri *(p<0.05), ***(p<0.001) ve ****(p<0.0001) olarak gösterildi.

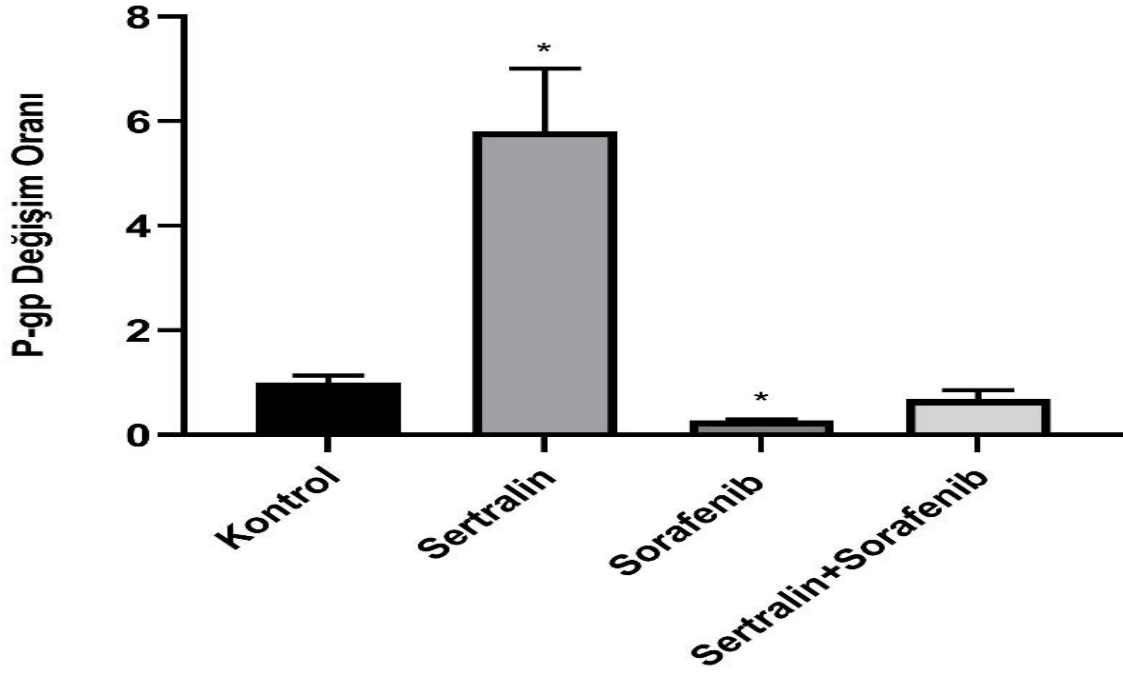
Bulgular

Sertralin ve sorafenib uygulamalarının P-gp gen ekspresyonuna etkileri

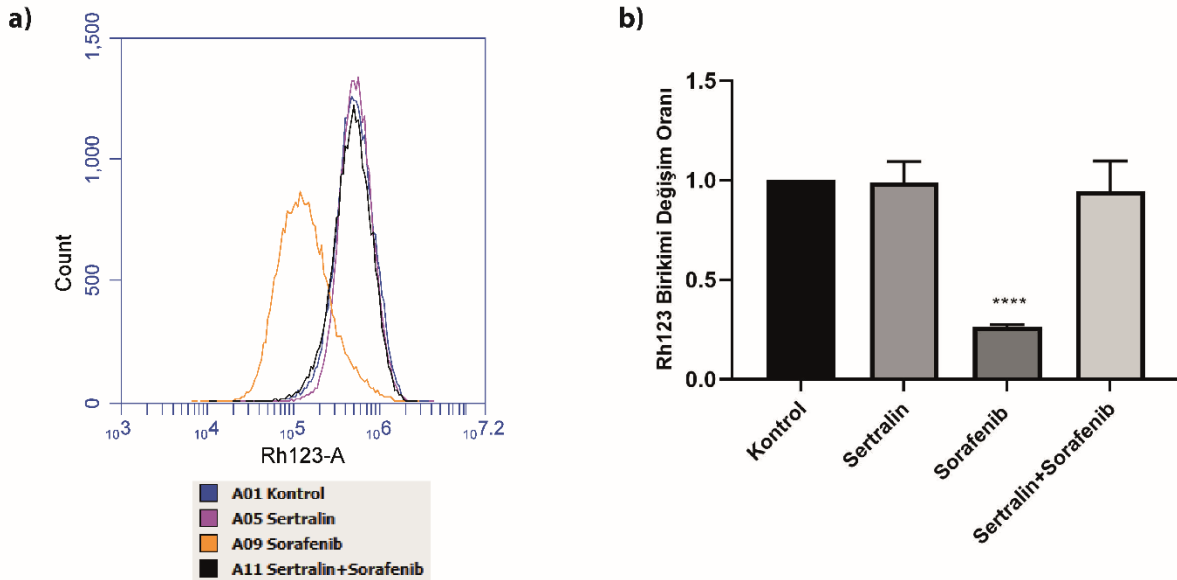
P-gp gen ekspresyonu, HepG2 hücrelerinde 24 saat süre ile (i) sertralin, (ii) sorafenib veya (iii) sertralin+sorafenib uygulamaları sonrası qPCR analizi ile belirlenmiştir. Şekil 1'de gösterildiği gibi, P-gp ekspresyonu, kontrol grubuna kıyasla sertralin uygulaması sonrası önemli ölçüde artış göstermiştir (5.81±1.20 kat, p=0.048). Aksine, hücreler sadece sorafenibe maruz bırakıldığında P-gp mRNA seviyeleri önemli ölçüde azalmıştır (0.28±0.03 kat, p=0.023). Sertralin ve sorafenib'in birlikte uygulanması, P-gp ekspresyonunda kontrol grubuna göre anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır (0.69 ± 0.17, p=0.189).

Sertralin ve sorafenib uygulamalarının rh123 hücre içi birikimine etkileri

HepG2 hücrelerinde 24 saat süre ile (i) sertralin, (ii) sorafenib veya (iii) sertralin+ sorafenib uygulamaları sonrası rh123 birikimi, rh123'ün floresan yapısından yararlanılarak akış sitometrisi ile ölçülmüştür. Şekil 2a, kontrol grubu ve ilaç grupları için histogramları göstermektedir. FL-1 kanalındaki medyan floresan değerleri, kontrol grubuna göre değişim oranlarını hesaplamak için kullanılmıştır (Şekil 2b). Buna göre sertralin ve sertralin+ sorafenib gruplarında hücre içi rh123 birikiminde anlamlı bir fark elde edilmezken (sırasıyla p=0.999 ve p=0.883), sorafenib uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha az rh123 birikimi bulunmuştur (0.26 ± 0.01 kat, p<0.0001).



Şekil 1: İlaç uygulanmamış (kontrol) veya sertralin, sorafenib veya sertralin+sorafenib uygulamasına 24 saat boyunca maruz bırakılmış HepG2 hücrelerinde P-gp gen ekspresyonu değerleri ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmektedir. Gruplar arasındaki farklar Welch testi ve post-hoc Games-Howell testi kullanılarak analiz edilmiştir. * $p < 0.05$ (kontrol grubuna göre)

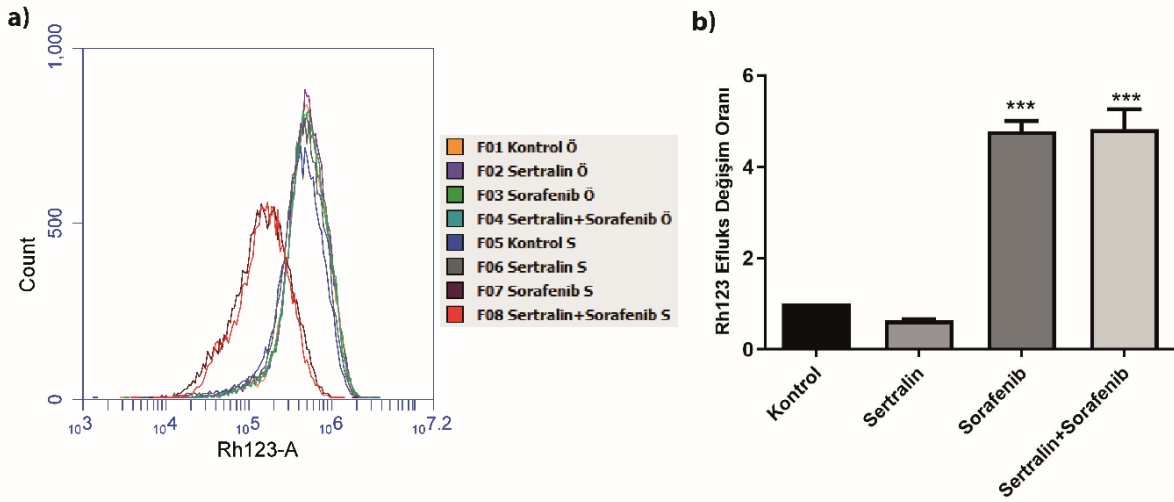


Şekil 2: İlaç uygulanmamış (kontrol) veya sertralin, sorafenib veya sertralin+sorafenib uygulamasına 24 saat boyunca maruz bırakılmış HepG2 hücrelerinde hücre içi rh123 birikimi akış sitometrisi analizi ile ölçülmüştür. Temsili histogram (a) ve hücrelerde rh123 birikimi değişim oranları ortalama \pm standart sapma olarak (b) gösterilmektedir. Gruplar arasındaki farklar, tek yönlü Anova ve post-hoc Tukey testi kullanılarak analiz edilmiştir. **** $P < 0.0001$ (kontrol grubuna göre).

Sertralin ve sorafenib uygulamalarının rh123 efluksuna etkileri

Herhangi bir ilaç uygulanmadan önce, HepG2 hücrelerinde rh123 birikimi buz üzerinde ölçülmüştür. Sonrasında ise, hücreler rh123 dışı atımını başlatmak ve ilaçların olası inhibitör aktivitesini belirlemek için tek başına veya kombinasyon halinde 5 dakika boyunca 37°C'de sertralin ve sorafenib'e maruz bırakılmıştır. Bunu takiben, hücrelerdeki rh123 birikimi tekrar ölçülmüştür. Medyan floresan değerlerindeki kaymalar iki ölçüm arasındaki değişikliği göstermektedir (Şekil 3a). Her ilaç grubu için bu farklar

(önce/sonra ölçümleri), kontrol grubuna göre rh123 efluksu değişim oranlarını elde etmek için kullanılmıştır (Şekil 3b). Kontrol ve sertralin grupları için öncesi ve sonrası medyan floresans değerlerinde herhangi bir değişiklik elde edilmemiştir. Sertralin grubunda, medyan floresan değerleri, kontrol grubu değerleri ile benzerdir ve rh123 dışı atımında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.5224$). Öte yandan, sorafenib tek başına veya sertralin ile birlikte uygulandığında, kontrol grubuna göre, 5 dakika sonra hücrelerde sırasıyla 4.78 ± 0.22 kat ($p=0.0004$) ve 4.82 ± 0.43 kat ($p=0.0003$) değişim oranı ile anlamlı ölçüde daha az rh123 birikmesini sağlamıştır.



Şekil 3: HepG2 hücrelerinde akış sitometrisi ile rh123 dışı atımı belirlenmiştir. Temsili histogram, sertralin, sorafenib veya sertralin+ sorafenib ilaç uygulamaları öncesi -Ö- ve sonrası -S- FL-1 kanalındaki medyan floresandaki kaymaları gösterir (a). Medyan floresan değerlerindeki farklılıklar, kontrol grubuna göre değişim oranlarını hesaplamak için kullanılmıştır (b). Ortalama değerler \pm standart sapmaları ile gösterilmektedir. İlaç grupları arasındaki farklar, tek yönlü Anova ve post-hoc Tukey testi kullanılarak analiz edilmiştir. *** $p<0.001$ (kontrol grubuna göre).

Tartışma

HCC tedavisi için onaylanan ilk tirozin kinaz inhibitörü olan sorafenib, şu anda ileri evrelerdeki hastalar için birinci basamak sistemik tedaviler arasında yer almaktadır.² Bununla birlikte, sorafenib tedavi yanıtı doğal veya edinilmiş ilaç direnci nedeniyle çoğu zaman tam ve yeterli değildir.⁵ Daha önce, HepG2 hücrelerinde sorafenib ve sertralin birlikte uygulandığında artan antiproliferatif ve antiapoptotik etkiler tarafımızca bildirilmiştir.¹⁵ Bu çalışmada, sorafenib ve/veya sertralinin P-gp gen ekspresyonu ve rh123 hücre içi birikimi üzerindeki olası etkileri, qPCR ve akış sitometrisi yöntemleri ile araştırıldı.

P-gp'nin aşırı ekspresyonu, kemoterapötiklerin birikiminde azalma ile sonuçlanır ve çoklu ilaç direnci fenotipine neden olur. Bu çalışmada, HepG2 hücrelerinde 24 saat maruziyet sonrası sorafenib ile P-gp mRNA seviyelerinde anlamlı düşüş, sertralin ile ise anlamlı bir artış gösterilmiştir. Yalnız sorafenib uygulaması ile elde ettiğimiz sonuçlar önceki çalışmaların sonuçları ile uyumludur. Hoffmann ve ark., haftada iki kez sorafenib tedavisinin uygulandığı Huh7 hücrelerinde sorafenib tarafından P-gp gen ekspresyonunun baskılandığını göstermiştir.¹⁷ Başka bir çalışmada, 48 saatlik sorafenib tedavisinin HepG2 hücrelerinde NF-kB ve cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein ifadelerinin yanı sıra, P-gp'nin protein ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur.¹⁸ Ayrıca, sorafenib (4 uM) tedavisini takiben 5-florourasil dirençli hepatom BEL-7402/5 hücrelerinde P-gp gen ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir.¹⁹ Diğer yandan, bildiğimiz kadarıyla, sertralin tedavisi sonrası P-gp ifadesinin değerlendirildiği daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda, sertralin uygulaması ile gözlenen artmış P-gp ekspresyonunun sertralin+ sorafenib tedavisi ile nötralize edildiği ve P-gp mRNA seviyelerinin kontrol ve kombinasyon grupları arasında benzer olduğu gösterilmiştir. Depresyon, kanser hastalarının %10'undan fazlasını etkilemektedir ve sertralinin yer aldığı SSRI grubu ilaçlar kanser tanısı almış olan

hastalarda depresyon tedavisinde sıklıkla kullanılan iki ana ilaç sınıfından biridir.²⁰ Bu çalışmada sertralin uygulaması HepG2 hücrelerinde daha yüksek P-gp ekspresyonu ile sonuçlanmıştır ve bu etkiyi sertralin ve sorafenibin birlikte uygulanması tersine çevirmiştir. Bu verilerin klinik sonuçlarını ilişkilendirmek ve yorumlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Bir P-gp substratı olan floresan boya rh123'ün eflusu, normal veya tümör hücrelerinde P-gp aktivitesini analiz etmek için akış sitometrik veya florimetrik deneylerde sıklıkla yer almaktadır. Rh123'ün ayrıca, amino asit 482'de bir mutasyona sahip olan meme kanseri direnç proteini (BCRP/ABCG2) tarafından dışarı atıldığı ve ABC efluks pompası MRP2'nin de (ABCC2) rh123'ü taşıyabildiği gösterilmiştir.¹¹ P-gp inhibitörleri hücrelerde rh123 birikimini arttırmaktadır. Bu nedenle, rh123 bir referans P-gp substratı olarak, ilaçların P-gp inhibe edici potansiyelini ve ilaç-ilaç etkileşimlerini karakterize etmek için kullanılmaktadır.¹² Bu çalışmada, 24 saat sorafenib maruziyeti sonrasında HepG2 hücrelerinde rh123 birikiminin azaldığı gözlemlenmiştir. Sertralin veya sertralin+ sorafenib uygulaması kontrol grubunda bulunana benzer rh123 birikimine yol açmıştır. Öte yandan, rh123 efluks inhibisyonu araştırıldığında, sertralin uygulaması sonrası kontrol grubuna göre bir düşüş bulunmuş, ancak bu düşüş istatistiksel bir anlamlılığa ulaşmamıştır. Sorafenib ise tek başına veya sertralin ile beraber rh123'nin hücre dışına taşınmasını kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttırmıştır. Sorafenib dahil çeşitli tirozin kinaz inhibitörlerinin ABC taşıyıcıları ile etkileşime girdiği gösterilmiştir.²¹ Sorafenib'in P-gp için orta düzeyde ve BCRP için ihmal edilebilir bir afiniteye sahip olduğu Hu ve ark.²² tarafından gösterilirken, Lagas ve ark.²³ sorafenib'in BCRP tarafından P-gp'den daha etkili bir şekilde taşındığını; Huang ve ark.²⁴ da HCC hücrelerinde BCRP'nin sorafenib efluksuna aracılık ettiğini göstermiştir. Bununla birlikte, HCC hastalarında sorafenib'e klinik yanıtın hem P-gp hem de BCRP polimorfizmleri ile ilişkili olduğu gözlenmiştir.²⁵

Bu sonuç HCC'de P-gp'nin klinik bir rolü olduğunu desteklemektedir. Bu çalışmada, sorafenib ile 24 saat maruziyet sonrasında daha düşük rh123 birikimi saptanması ve sorafenib varlığında daha yüksek bir efluks hızı gözlenmesi, sorafenibin P-gp ile indükleyici olarak olası bir etkileşimine işaret ediyor olabilir.

Son zamanlarda, sertralin, bir serin/glisin sentezi inhibitörü olarak, bu yolağa bağımlı kanserlerin tedavisi için yapılan araştırmalarda oldukça ilgi çekmektedir.¹³ Sertralin, P-gp'nin bir inhibitörü olarak bildirilmiştir.¹⁰ Bununla birlikte, sertralin bu çalışmada, rh123 birikiminde veya efluksta değişikliğe neden olmamıştır. 24 saat sertralin maruziyeti sonrası P-gp m-RNA seviyelerindeki artış, rh123 birikimi analizindeki herhangi bir değişikliği maskeleyebilir. 24 saatlik sertralin+ sorafenib uygulamasından sonra da rh123 birikiminde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gösterilmemiştir. Bu sonuç, sorafenib'in etkisinin sertralin ile tersine çevrilebileceğine işaret ediyor olabilir. Wang ve ark.²⁶ daha önce, sorafenib ile P-gp inhibitörlerinin birlikte uygulanmasının ardından ilaç-ilaç etkileşimlerinin gerçekleşebileceğini öne sürmüşlerdir. Rh123'ün aynı zamanda organik katyon taşıyıcıları (OCT'ler) 1 ve 2 için yüksek afiniteli bir substrat olması da sonuçlar değerlendirilirken dikkate alınmalıdır.¹¹ Ancak, OCT1'in sorafenib direncindeki rolü hakkında çelişkili veriler vardır. Bir yandan OCT1'in sorafenib taşınması ile ilişkili olduğu belirtilirken, başka bir çalışma, sorafenib aktivitesinin ve HCC'deki dağılımının OCT1'e bağlı olmadığını bildirmiştir.⁵

Çok sayıda kombine tedavi yaklaşımları denenmektedir. HCC'nin karmaşık moleküler patogeneze ve heterojenliğine rağmen etkili bir ilaç tedavisi ile hastalarda sağkalımı iyileştirmek hedeflenmektedir. Bu nedenle tedavilerin antineoplastik etkisini arttırmak için potansiyel mekanizmaların ve terapötik hedeflerin daha iyi anlaşılması ve tanımlanması oldukça önemlidir. Bu çalışmada kombinasyon ve kontrol gruplarında benzer P-gp gen ekspresyonu ve rh123 birikimi gösterilmesi, sorafenib ve

sertralin kombinasyonu ile gözlenen antiproliferatif sinerjistik etkide P-gp aracılı efluks dışındaki mekanizmaların rol oynayabileceğini göstermektedir. Moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması, yeni ilaç kombinasyonu yaklaşımlarının tasarlanması ve daha etkili HCC tedavisi için önemlidir.

Yazar katkısı: Yazarlar deneylerin yapılması aşamasında eşit oranda katkı sağlamışlardır. Sonuçların değerlendirilmesi ve makalenin hazırlanması: YDC, ETİ, ZGO.

Çıkar çatışması / Mali destek: Yazarlar arasında bir çıkar çatışması bulunmamaktadır. Bu çalışma, TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir (Proje numarası 1919B012001071).

Teşekkür: İstatistik analizlerinde değerli katkılarından dolayı Dr. Pınar Bıçaksız'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):6. doi:10.1038/s41572-020-00240-3
2. Tang W, Chen Z, Zhang W, et al. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):87. doi:10.1038/s41392-020-0187-x
3. Luo XY, Wu KM, He XX. Advances in drug development for hepatocellular carcinoma: clinical trials and potential therapeutic targets. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021;40(1):172. doi:10.1186/s13046-021-01968-w
4. Lang L. FDA approves sorafenib for patients with inoperable liver cancer. *Gastroenterology*. 2008;134(2):379. doi:10.1053/j.gastro.2007.12.037
5. Cabral LKD, Tiribelli C, Sukowati CHC. Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma: The Relevance of Genetic

- Heterogeneity. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6). doi:10.3390/cancers12061576
6. Wang Z, Zhao Z, Wu T, Song L, Zhang Y. Sorafenib-irinotecan sequential therapy augmented the anti-tumor efficacy of monotherapy in hepatocellular carcinoma cells HepG2. *Neoplasma*. 2015;62(2):172-9. doi:10.4149/neo_2015_022
 7. Abou-Alfa GK, Johnson P, Knox JJ, et al. Doxorubicin plus sorafenib vs doxorubicin alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a randomized trial. *Jama*. 2010;304(19):2154-60. doi:10.1001/jama.2010.1672
 8. Liu Y, Yue H, Xu S, et al. First-line gemcitabine and oxaliplatin (GEMOX) plus sorafenib, followed by sorafenib as maintenance therapy, for patients with advanced hepatocellular carcinoma: a preliminary study. *Int J Clin Oncol*. 2015;20(5):952-9. doi:10.1007/s10147-015-0796-5
 9. Seelig A. P-Glycoprotein: One Mechanism, Many Tasks and the Consequences for Pharmacotherapy of Cancers. *Front Oncol*. 2020;10:576559. doi:10.3389/fonc.2020.576559
 10. Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica*. 2008;38(7-8):802-32. doi:10.1080/00498250701867889
 11. Jouan E, Le Vee M, Denizot C, Da Violante G, Fardel O. The mitochondrial fluorescent dye rhodamine 123 is a high-affinity substrate for organic cation transporters (OCTs) 1 and 2. *Fundam Clin Pharmacol*. 2014;28(1):65-77. doi:10.1111/j.1472-8206.2012.01071.x
 12. Jouan E, Le Vée M, Mayati A, Denizot C, Parmentier Y, Fardel O. Evaluation of P-Glycoprotein Inhibitory Potential Using a Rhodamine 123 Accumulation Assay. *Pharmaceutics*. 2016;8(2):12.
 13. Geeraerts SL, Kampen KR, Rinaldi G, et al. Repurposing the Antidepressant Sertraline as SHMT Inhibitor to Suppress Serine/Glycine Synthesis-Addicted Breast Tumor Growth. *Mol Cancer Ther*. 2021;20(1):50-63. doi:10.1158/1535-7163.Mct-20-0480
 14. Stapel B, Melzer C, von der Ohe J, et al. Effect of SSRI exposure on the proliferation rate and glucose uptake in breast and ovary cancer cell lines. *Sci Rep*. 2021;11(1):1250. doi:10.1038/s41598-020-80850-9
 15. Ozunal ZG, Donmez Cakil Y, Isan H, Saglam E, Aktas RG. Sertraline in combination with sorafenib: A promising pharmacotherapy to target both depressive disorders and hepatocellular cancer. *BioFut*. 2019;70(4):341-348. doi:10.1556/019.70.2019.39
 16. Dönmez Cakil Y, Khunweeraphong N, Parveen Z, et al. Pore-exposed tyrosine residues of P-glycoprotein are important hydrogen-bonding partners for drugs. *Mol Pharmacol*. 2014;85(3):420-8. doi:10.1124/mol.113.088526
 17. Hoffmann K, Franz C, Xiao Z, et al. Sorafenib modulates the gene expression of multi-drug resistance mediating ATP-binding cassette proteins in experimental hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*. 2010;30(11):4503-8.
 18. Ye CG, Yeung JH, Huang GL, et al. Increased glutathione and mitogen-activated protein kinase phosphorylation are involved in the induction of doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatol Res*. 2013;43(3):289-99. doi:10.1111/j.1872-034X.2012.01067.x
 19. Wei L, Huang N, Yang L, et al. [Sorafenib reverses multidrug resistance of hepatoma cells in vitro]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2009;29(5):1016-9, 1023.
 20. Smith HR. Depression in cancer patients: Pathogenesis, implications and treatment (Review). *Oncol Lett*. 2015;9(4):1509-1514. doi:10.3892/ol.2015.2944
 21. Beretta GL, Cassinelli G, Pennati M, Zuco V, Gatti L. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as

- multitargeting agents. *Eur J Med Chem.* 2017;142:271-289.
doi:10.1016/j.ejmech.2017.07.062
22. Hu S, Chen Z, Franke R, et al. Interaction of the multikinase inhibitors sorafenib and sunitinib with solute carriers and ATP-binding cassette transporters. *Clin Cancer Res.* 2009;15(19):6062-9.
doi:10.1158/1078-0432.Ccr-09-0048
23. Lagas JS, van Waterschoot RAB, Sparidans RW, Wagenaar E, Beijnen JH, Schinkel AH. Breast Cancer Resistance Protein and P-glycoprotein Limit Sorafenib Brain Accumulation. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2010;9(2):319-326.
doi:10.1158/1535-7163.Mct-09-0663
24. Huang WC, Hsieh YL, Hung CM, et al. BCRP/ABCG2 inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib. *PLoS One.* 2013;8(12):e83627.
doi:10.1371/journal.pone.0083627
25. Tandia M, Mhiri A, Paule B, et al. Correlation between clinical response to sorafenib in hepatocellular carcinoma treatment and polymorphisms of P-glycoprotein (ABCB1) and of breast cancer resistance protein (ABCG2): monocentric study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;79(4):759-766.
doi:10.1007/s00280-017-3268-y
26. Wang X, Zhang X, Huang X, Li Y, Wu M, Liu J. The drug-drug interaction of sorafenib mediated by P-glycoprotein and CYP3A4. *Xenobiotica.* 2016;46(7):651-658.
doi:10.3109/00498254.2015.1109160