

Flukonazol'un SH-SY5Y Nöroblastom ve MCF-7 Meme Adenokarsinom Hücreleri Üzerine Etkisinin Araştırılması

Investigation of the effect of fluconazole on SH-SY5Y Neuroblastoma and MCF-7 Breast Adenocarcinoma cells

 Talha ÖZSARI¹,
 Fatih YULAK^{2,3},
 Bilal ŞAHİN²

¹Sivas Cumhuriyet Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dönem 2, Sivas,
Türkiye

²Sivas Cumhuriyet Üniversitesi
Tıp Fakültesi, Fizyoloji
Anabilim Dalı Sivas, Türkiye

³Sivas Cumhuriyet Üniversitesi,
Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi
(CÜTFAM), Sivas, Türkiye

Corresponding author:

Talha ÖZSARI, Sivas
Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp
Fakültesi Dönem 2, Sivas,
Türkiye

E-mail:

talhaozsari@gmail.com

Received/Accepted: May 2021

Conflict of interest: There is not
a conflict of interest.

How to Cite

Ozsari, T., Yulak, F., Sahin, B.
(2021). Flukonazol'un SH-SY5Y
Noroblastom ve MCF-7 Meme
Adenokarsinom Hücreleri
Uzerine Etkisinin Arastirilmesi.
Health Sciences Student Journal,
1(2), 35-39.

<https://hssj.cumhuriyet.edu.tr/flukonazolun-sh-sy5y-noroblastom-ve-mcf-7-meme-adenokarsinom-hucreleri-uzerine-etkisinin-arastirilmesi/>

ÖZET

Amaç: Azol türevi bileşikler son zamanlarda antikanser etkileriyle ön plana çıkmaktadır. Bizim de amacımız bir azol türevi olan flukonazolün antikanser etkisini SH-SY5Y nöroblastom ve MCF-7 Meme adenokarsinom hücreleri üzerinde araştırmaktır.

Yöntem: SH-SY5Y ve MCF-7 hücre kültüründe kontrol grubu ve ilaç grubu olmak üzere 2 grup planlanmıştır. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmazken ilaç grubuna çeşitli konsantrasyonlarda (1.56; 3.125; 6.25; 12.5 ve 25 µM) flukonazol 24 saat boyunca uygulanmıştır. XTT hücre canlılığı testi ile flukonazolün hücre proliferasyonu üzerine etkisi belirlenmiştir.

Bulgular: Elde edilen veriler, çalıştığımız dozlardaki flukonazolün, SH-SY5Y nöroblastom ve MCF-7 meme adenokarsinom hücreleri üzerine hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmamıştır ($p>0.05$).

Sonuçlar: XTT hücre canlılığı sonuçları değerlendirildiğinde, flukonazolün SH-SY5Y nöroblastom ve MCF-7 meme adenokarsinom hücrelerinin hücre canlılığı üzerine etkisi gözlenmemiştir. Bu etkisizlik durumu uygulanan flukonazol dozu ile ilişkilendirilebilir.

Anahtar kelimeler: Flukonazol, hücre canlılığı, kanser, MCF-7 meme adenokarsinom, SH-SY5Y nöroblastom.

ABSTRACT

Objective: Azole derivatives have recently come to the fore with their anticancer effects. Our aim is to investigate the anticancer effect of fluconazole, an azole derivative, on SH-SY5Y neuroblastoma and MCF-7 breast adenocarcinoma cells.

Method: In SH-SY5Y and MCF-7 cell culture, 2 groups were planned as the control group and the drug group. While no application was made to the control group, various concentrations of fluconazole (1.56; 3.125; 6.25; 12.5 and 25 µM) were administered to the drug group for 24 hours. The effect of fluconazole on cell proliferation was determined by the XTT cell viability test.

Results: The obtained data showed that no statistically significant difference was found in terms of cell viability of fluconazole at the doses we studied on SH-SY5Y neuroblastoma and MCF-7 breast adenocarcinoma cells ($p>0.05$).

Conclusions: When the XTT cell viability results were evaluated, no effect of fluconazole on the cell viability of SH-SY5Y neuroblastoma and MCF-7 breast adenocarcinoma cells was observed. This ineffectiveness may be related to the dose of fluconazole administered.

Keywords: Cancer, cell viability, fluconazole, MCF-7 breast adenocarcinoma, SH-SY5Y neuroblastom.

GİRİŞ

Kanser, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında hücrelerin hızlı ve kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması sonucu meydana gelen kompleks bir hastalıktır. İnsan vücudundaki sağlıklı hücreler, vücudun ihtiyacına göre yeni hücreler oluşturmak amacıyla sürekli olarak bölünmekte ve büyümektedirler. Hücreler yaşlanmaya başladıkça, çeşitli sinyaller ve yolaklar ile programlı bir şekilde ölmekte ve yerini yeni hücrelere bırakmaktadırlar. Ancak kanser hücrelerinin kromozomal anormallikler ve genomik kararsızlık (instabilite) göstermelerinden dolayı, hücre çoğalması, programlı hücre ölümü (apoptoz) ve hücre-hücre bağlantılarını kontrol eden özel genlerde mutasyonlar meydana gelmektedir. Bunun sonucunda hücrenin anormal bir şekilde çoğalması gerçekleşmektedir¹. Bu anormal oluşumlar sonucunda hücrede, translokasyon, anöploidi, kromozom kaybı, DNA (Deoksiribo nükleik asit) çoğalması (amplifikasyonu) ve delesyonlar gibi oldukça önemli ve büyük genetik kusurların oluşumu gözlemlenir. Oluşan bu yeni hücreler kontrolsüz bölünme göstererek tümör oluşumunu başlatmaktadırlar².

Beyin dokularında meydana gelen anormal ve kontrolsüz büyüme sonucunda beyin tümörü oluşumu gerçekleşmektedir^{3,4}. Beyin tümörlerinin görülme sıklığı diğer kanser türlerine nazaran daha az olmakla birlikte özellikle çocuklar başta olmak üzere ölüm oranı oldukça yüksek olan bir kanser türüdür⁵. Nöroblastom, embriyonik gelişimin dördüncü haftasında görülmeye başlayan, normalde adrenal medulla veya sempatik ganglionlarda bulunan ve primordial nöral krest hücrelerinden köken alan bir kanser türüdür⁶. Çocukluk çağında

en sık karşılaşılan ekstrakranial solid tümör çeşitlerinden biridir ve görülme sıklığı tüm çocukluk çağı tümörlerinin %8-10'unu oluşturmaktadır.

Meme kanseri, dünya çapında en yaygın ikinci kanserdir. Kadınlarda tüm kanserlerin% 25'ini oluşturur ve kadınlar arasında kanser ölümlerinin birincil nedenidir⁷. Göğüs kanseri hücrelerinin temel özelliklerinden biri, yakın dokuları istila etme yetenekleridir. Bu mobil kanser hücreleri lenf düğümlerine ulaşabilmekte ve buradan kemikler, karaciğer veya akciğerler gibi diğer organlara yapışarak meme kanserine bağlı ölümün birincil nedeni olan metastazlara yol açabilmektedir⁸. Bu nedenle, meme kanserini metastaz gelişmeden erken teşhis etmek ve tedavi etmek çok önemlidir.

Flukonazol, özellikle kandida enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan triazol türevi bir antifungaldir. Suda iyi çözünen bir bileşiktir. Hem oral hem de intravenöz formunun olması, hepatik, gastrik ve endokrinolojik yan etkilere düşük oranda yol açması ve BOS'a iyi geçmesi başlıca avantajlarıdır. Flukonazol tedavisine bağlı yan etkiler nadirdir ve allerjik reaksiyonlar, anjiyoödem, trombositopeni ve alopesi şeklinde olabilmektedir^{9,10}.

Azol türevi ilaçlar öncelikle antifungal ajanlar olarak kullanılsa da, son zamanlarda bazı azol grubu ilaçların antitümör etkinlikleri gösterilmiştir¹¹. Bir başka çalışmada da klotrimazol (CTZ) ve ketokonazol (KCZ)'ün p53 ve p27 proteinlerinin ekspresyonunun ve PARP proteininin bölünmesinin arttığını göstermiştir¹². Bir diğer çalışma da, DNA hasarının neden olduğu PARP bölünmesinin, apoptoza neden olan p53 aktivitesini artırdığını bildirmiştir¹³. Ayrıca,

bir hücre döngüsü mitojeni olan CDK4'ün ekspresyonu, CTZ veya KCZ ile uygulamadan sonra azalmıştır¹⁴. Yapılan çalışmalar azol türevi bileşiklerin kanser hücrelerinde çoklu sinyal yollarında rol oynadığını göstermektedir. Çalışmamızda flukonazolün insan nöroblastom hücre hattı (SH-SY5Y) ve insan meme adenokarsinom hücre hattı (MCF-7) üzerine antikanser etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEM ve BULGULAR

In vitro Çalışmalar

Hücre kültürü

SH-SY5Y (CRL-2266) nöroblastom ve MCF-7 (HTB-22) meme adenokarsinom hücre hattı Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC, Manassas, VA, USA) temin edildi ve % 10'luk Fetal Sığır Serum (FBS) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA), %1'lik penisilin/streptomisin (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, USA) ve %1'lik L-glutamin içeren DMEM'de (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) kültüre edildi. Uygun koşullar sağlanarak inkübatörde (37°C ve %5 CO₂ ile nemlendirilmiş atmosfer ortamı) bekletildi. Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaşınca pasajlandı. Üçüncü pasajın ardından hücreler 96'lı plate her kuyucukta 1x10⁴ yoğunlukta hücre olacak şekilde ekim yapıldı.

Hücre canlılık değerlendirilmesi

Hücre canlılığı, XTT testi (Roche Diagnostic, MA, USA) kullanılarak değerlendirildi. Başlangıçta SH-SY5Y nöroblastom ve MCF-7 meme adenokarsinomu hücreleri oyuk başına 100 µL DMEM içinde 1 x 10⁴ hücre yoğunluğunda 96 oyuklu plaklara ekildi ve 24 saat inkübe edildi. Hücreler kontrol grubun ve ilaç grubu olarak sınıflandırıldı. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı.

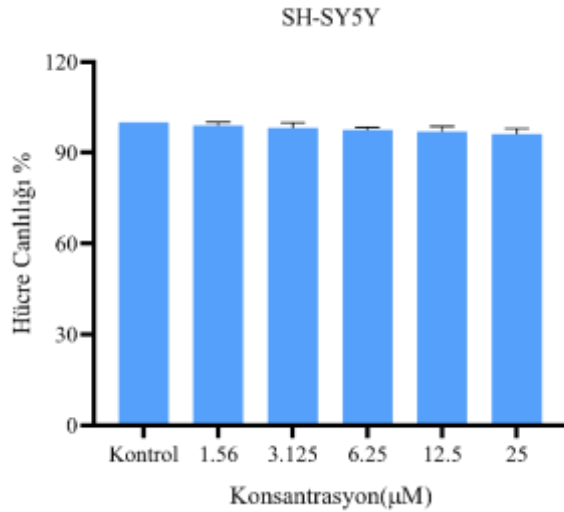
İlaç grubundaki hücreler, 24 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (1.56; 3.125; 6.25; 12.5 ve 25 µM) flukonazol uygulanarak inkübatörde bekletildi. İnkübasyondan sonra 96'lı plaka çıkarılıp oyuklar fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Daha sonra tüm kuyucuklara fenol kırmızısı içermeyen 100 µL DMEM ve 50 µL XTT solüsyonu ilave edildi ve ardından plakalar 4 saat 37 °C'de tutuldu. Numunelerin absorbanansı, 450 nm'de bir ELISA mikro plaka okuyucu (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) kullanılarak tespit edildi. Tüm deneyler üç kez gerçekleştirildi ve hücre canlılığı, kontrol grubuna (tedavi uygulanmamış hücreler) kıyasla canlı hücre yüzdeleri olarak ölçüldü.

İstatistiksel analiz

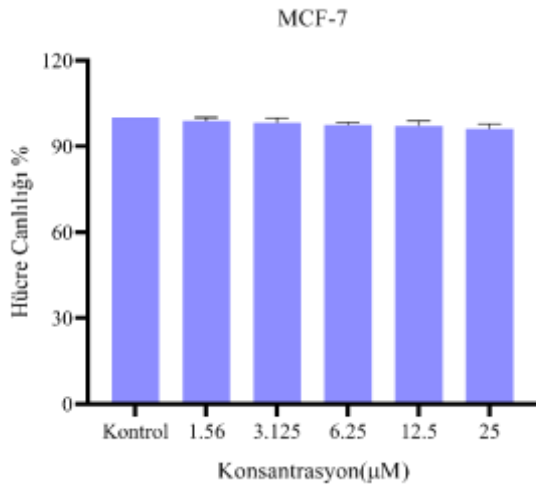
Sonuçlar, ortalamanın (SEM) ortalama ± standart hatası olarak ifade edildi. Veri analizleri Windows için SPSS Sürüm 23.0 ile yapılmıştır. Veriler, tek yönlü bir varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirildi. Deney grupları arasındaki farklılıkları belirlemek için post hoc Tukey testi kullanıldı, p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

SONUÇLAR

Flukonazolün SH-SY5Y nöroblastom ve MCF-7 meme adenokarsinom hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi amacıyla XTT hücre canlılığı testi yapıldı. Çalışmamızda kullandığımız konsantrasyon önceki çalışmalarda flukonazolün in vitro ortamda kullanılan konsantrasyonları araştırılarak 25 µM olarak belirlenmiştir¹². Şekil 1'de gösterildiği gibi flukonazolün SH-SY5Y nöroblastom ve MCF-7 meme adenokarsinom hücreleri üzerine anlamlı bir sitotoksik etki saptanmamıştır (p>0.05) (Şekil 1-2).



Şekil 1. Flukonazolün SH-SY5Y nöroblastom hücre canlılığı üzerine etkileri. Değerler ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur ($p>0.05$).



Şekil 2. Flukonazolün MCF-7 meme adenokarsinom hücre canlılığı üzerine etkileri. Değerler ortalama \pm SEM olarak sunulmuştur ($p>0.05$).

TARTIŞMA

Yeni ilaçların geliştirilmesine yönelik geleneksel yaklaşım hem zaman alıcıdır hem de pahalıdır ve başarı oranı çok düşüktür. Bu nedenle, antitümör etkinliğine sahip olup olmadıklarını belirlemek için antifungal ajanlar olarak bilinen flukonazolü inceledik. Bu stratejiye, mevcut ilaçlar için yeni endikasyonların bulunduğu ilacın yeniden konumlandırılması adı verilir¹⁵. Yerleşik ilaçların kullanılması, geliştirme çalışmalarının

zamanını ve maliyetini azaltabilir ve başarı oranını artırabilir^{15,16}.

Azol bileşikleri tipik olarak antifungal ilaçlar olarak kullanılır. Bir sitokrom P450 (CYP) enzimi olan lanosterol 14- α -demetilaz enziminin baskılanması yoluyla ergosterol biyosentez yolunu inhibe ederler; bunun sonucunda ergosterol eksikliği membran anormalliklerine neden olur¹⁷. Yapısal olarak, azol antifungal ilaçlar bir imidazol [klotrimazol (CTZ) ve ketokonazol (KCZ)] veya bir triazol [flukonazol (FCZ) ve itrakonazol (ICZ)] halkasından oluşur. Triazol bileşikleri daha az toksiktir ve imidazol bileşiklerinden daha az yan etki üretir, çünkü triazol bileşikleri CYP için daha düşük bir afiniteye ve sterol sentezi üzerinde daha düşük önleyici etkilere sahiptir^{16,17}.

Azol ilaçları öncelikle antifungal ajanlar olarak kullanılsa da, son zamanlarda bazı azol ilaçları antitümör aktivite göstermiştir. Örneğin, CTZ'nin akciğer karsinomunda ve kolon adenokarsinom hücrelerinde tümör büyümesini inhibe ettiği ve metabolik enzimleri baskıladığı bildirilmiştir¹⁸. Benzer şekilde, KCZ'nin benign prostat hiperplazisi için dutasterid ile tedavi edilen kastrasyona dirençli prostat kanseri hastalarında CYP17A1'in inhibisyonu yoluyla androjen sentezindeki çoklu adımları bloke ettiği bildirilmiştir^{19,20}. ICZ, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde²¹ ve prostat kanseri hastalarında antitümör etkinlik göstermiştir²².

Çalışmamızın sonuçları azol türevi bileşiklerin antikanser etkilerinin birçok kanser hattında sitotoksik etki göstermesine rağmen bir triazol olan flukonazolün SH-SY5Y nöroblastom ve MCF-7 meme adenokarsinom hücrelerinde hücre canlılığı üzerine herhangi bir farklılık olmadığını

gösterdi. Antikanser aktivite değerlendirilmesi için kullanılan diğer metotlar elimizde olmadığı için değerlendirilememiş olup sadece hücre canlılığı metodu ile bu etki bakılabilmektedir. Bu sonuç flukonazol için kullanılan dozun yetersizliği ile ilişkilendirilebilir.

KAYNAKÇA

- Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. ASM Press ; 2004.
- Genetik Kavramlar - 11. Baskı (Klug-Cummings) — E-kitap — Turcademy. Accessed May 3, 2021. <https://www.turcademy.com/tr/kitap/genetik-kavramlar-11-baski-klug-cummings-9786053558811>
- IARC Publications Website - World Cancer Report 2008. Accessed May 3, 2021. <https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2008>
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90. doi:10.3322/caac.20107
- Vet Y, Derg F. *Apoptosis*. Vol 19.; 2008. Accessed May 3, 2021. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/yyuvfd/166307>
- Whittle SB, Smith V, Doherty E, Zhao S, McCarty S, Zage PE. Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2017;17(4):369-386. doi:10.1080/14737140.2017.1285230
- FERLAY, J. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer incidence and mortality world-wide : IARC Cancer Base No. 10. <http://globocan.iarc>. Published online 2010.
- Steeg PS. Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med.* 2006;12(8):895-904. doi:10.1038/nm1469
- Manual of clinical microbiology (Book, 2007) [WorldCat.org]. Accessed May 3, 2021. <https://www.worldcat.org/title/manual-of-clinical-microbiology/oclc/63195972>
- Medical Microbiology - 8th Edition. Accessed May 3, 2021. <https://www.elsevier.com/books/medical-microbiology/murray/978-0-323-29956-5>
- S K. Clotrimazole as a Cancer Drug:A Short Review. *Med Chem (Los Angeles)*. 2014;4(11):722-724. doi:10.4172/2161-0444.1000219
- Bae SH, Park JH, Choi HG, Kim H, Kim SH. Imidazole antifungal drugs inhibit the cell proliferation and invasion of human breast cancer cells. *Biomol Ther.* 2018;26(5):494-502. doi:10.4062/biomolther.2018.042
- Ho YS, Tsai PW, Yu CF, Liu HL, Chen RJ, Lin JK. Ketoconazole-induced apoptosis through P53-dependent pathway in human colorectal and hepatocellular carcinoma cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998;153(1):39-47. doi:10.1006/taap.1998.8467
- Bockstaele L, Coulonval K, Kooken H, Paternot S, Roger PP. Regulation of CDK4. *Cell Div.* 2006;1:1-16. doi:10.1186/1747-1028-1-25
- Shim JS, Liu JO. Recent advances in drug repositioning for the discovery of new anticancer drugs. *Int J Biol Sci.* 2014;10(7):654-663. doi:10.7150/ijbs.9224
- Tsubamoto H, Ueda T, Inoue K, Sakata K, Shibahara H, Sonoda T. Repurposing itraconazole as an anticancer agent (Review). *Oncol Lett.* 2017;14(2):1240-1246. doi:10.3892/ol.2017.6325
- Essentials of Medical Pharmacology - KD Tripathi - Google Kitaplar. Accessed May 3, 2021. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=FfG8AQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&ots=OFsGCi350t&sig=R715UDdXCodMsGeQCMo6LQ10wio&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- S K. Clotrimazole as a Cancer Drug:A Short Review. *Med Chem (Los Angeles)*. 2014;4(11). doi:10.4172/2161-0444.1000219
- Taplin ME, Regan MM, Ko YJ, et al. Phase II study of androgen synthesis inhibition with ketoconazole, hydrocortisone, and dutasteride in asymptomatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(22):7099-7105. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1722
- Vasaitis TS, Bruno RD, Njar VCO. CYP17 inhibitors for prostate cancer therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;125(1-2):23-31. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.11.005
- Aftab BT, Dobromilskaya I, Liu JO, Rudin CM. Itraconazole inhibits angiogenesis and tumor growth in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2011;71(21):6764-6772. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0691
- Antonarakis ES, Heath EI, Smith DC, et al. Repurposing Itraconazole as a Treatment for Advanced Prostate Cancer: A Noncomparative Randomized Phase II Trial in Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Oncologist.* 2013;18(2):163-173. doi:10.1634/theoncologist.2012-314