

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**NORMAL VE TÜMORAL ADRENAL DOKULARDA PXR-CYP3A4 EKSPRESYONU VE
MİTOTANE ARASINDAKİ İLİŞKİ**

TSA-2014-5073

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç.Dr. Züleyha Cihan ÖZDAMAR KARACA

Endokrinoloji ve Metabolizma A.D

Araştırmacılar

Prof.Dr. LEO HOFLAND

Prof.Dr. Hasan Fahrettin KELEŞTEMUR

Prof.Dr. Alper Celal AKCAN

Prof.Dr. Fatih TANRIVERDİ

Arş.Gör. Armağan CANER

Kasım 2017

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

TSA-2014-5073 kodlu normal araştırma projemiz Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler birimi tarafından desteklenmiştir. Projemiz Erasmus Medical Center Nöroendokrinoloji bölümü başkanı Prof. Dr. Leo Hofland ve ekibinin katkıları ile hazırlanarak sonuçlandırılmıştır.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	4
ABSTRACT	5
1. GİRİŞ	6
2.GENEL BİLGİ	7
3. YÖNTEM	9
4. BULGULAR	12
5.TARTIŞMA	49
6. KAYNAKLAR	51

ÖZET:

Adrenokortikal karsinoma (AKK) nadir görülen bir kanser türüdür. Hızla ilerlemesi ve metastatik olmasından dolayı agresif bir kanserdir. Tedavisi için kemoterapi ilaçları yanında yan tedavi olarak Mitotane uygulanmaktadır. CYP3A4 ve PXR, çoklu ilaç direnci mekanizmasında görev alan enzim ve reseptördür. Çalışmamızda SW13 ve H295 AKK hücre hatları üzerinde Mitotane, Etiposide, Cisplatine ve Doxorubicine ilaçlarının yanı sıra Kortikosteroid, Hidrokortizol, Aldosteron ve Dexamethasone gibi steroidlerin etkileri incelendi. Aynı zamanda CYP3A4 ve PXR üzerindeki etkilerine bakıldı. Mitotane ve diğer kemoterapi ilaçları SW13 ve H295 hücrelerini inhibe ederken, steroidlerin SW13 ve H295 hücreleri üzerinde etkisi görülmedi. Yapılan IHC çalışması ile 18 AKK ve adrenal hiperplaziye sahip hastaların yaklaşık 250 doku kesiti üzerinde CYP3A4 ve PXR ekspresyonları tespit edildi. PXR aktif olan dokuların hiçbirinde CYP3A4'ün eksprese olmadığı gösterildi.

ABSTRACT

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare type of cancer. It is an aggressive cancer because of its rapid progression and its metastatic nature. Addition to chemotherapy drug, Mitotane is administered as a side treatment. CYP3A4 and PXR are enzymes and receptors involved in the mechanism of multidrug resistance. In our study, the effects of steroids such as Corticosteroid, Hydrocortisol, Aldosterone and Dexamethasone as well as Mitotane, Etoposide, Cisplatin and doxorubicine drugs on AKK cell lines (SW13 and H295) were investigated. We also looked at the effects on CYP3A4 and PXR. Mitotane and other chemotherapeutic drugs inhibited SW13 and H295 cells, whereas SW13 and H295 cells of steroids were not affected. With the IHC study performed, CYP3A4 and PXR expressions were detected on approximately 250 tissue sections of 18 patients with ACC and adrenal hyperplasia. We Show that there is not any expression of CYP3A4 in tissues which are expression of PXR.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Popülasyona göre dağılımına bakıldığında zaman nadir görülen bir kanser türü olan adrenokortikal karsinoma (AKK), ilerlemesi ve sağ kalım süresinin az olmasından dolayı agresif bir kanser türüdür. Böbrek üstü bezlerinin üzerine yerleşmiş olan adrenal bezin korteks kısmının tümörleşmesinden kaynaklanır. Metastatik bir kanserdir. Genellikle cerrahi ile adrenal bezin alınması tavsiye edilir. Nüks etme olasılığı çok yüksek olduğundan dolayı kemoterapi veya yan tedavi olan Mitotane ile nüks etme durumu azaltılmaya çalışılır. Mitotane diğer adı ile O,p'DDT'nin adrenal dokuya nasıl etki ettiği tam olarak bilinmemektedir. Çeşitli varsayımlar vardır ama net bir bilgi olmadığı için hala belirsizliğini korumaktadır. İlaç mekanizması ile ilgili yollar Mitotane'nin nasıl etki ettiğini göstermesi açısından çalışmamızda çoklu ilaç direnci olarak adlandırılan MDR ailesinin üyeleri PXR (pregnane X reseptör) ve CYP3A4 üzerinde çalışıldı.

CYP3A4 karaciğerde ekspresyonunun çok yüksek olduğu bilinen ilaç direnç mekanizmasının belki de ilk akla gelecek CYP450 ailesinin bir üyesidir. CYP3A4'ün eksprese olması için PXR'in aktive olması gerekmektedir. PXR nükleer bir reseptördür ve aynı CYP3A4 gibi karaciğerde ekspresyonu çok yüksektir. İlaçlara karşı direnç oluşturmada PXR görev alır. İlaçların etkisini artırmak için PXR'in inhibe olması yeterlidir. PXR inhibe olursa CYP3A4 de inhibe olacağı için aslında toksik olan birçok ilaç etkisini daha kuvvetli gösterecektir.

Çalışmamızdaki amacımız AKK hücrelerinde Mitotane'nin CYP3A4 yolağını kullanarak nasıl bir etkiye sahip olduğunu belirlemek, aynı zamanda AKK hücrelerinde PXR'in etkisinin olup olmadığını görmektir. Bu yönde ilerlerken Mitotane çeşitli kemoterapi ilaçları ile AKK hücrelerindeki etkisi ve steroidlerin Mitotane ve CYP3A4/PXR yollarındaki rolü de incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİ

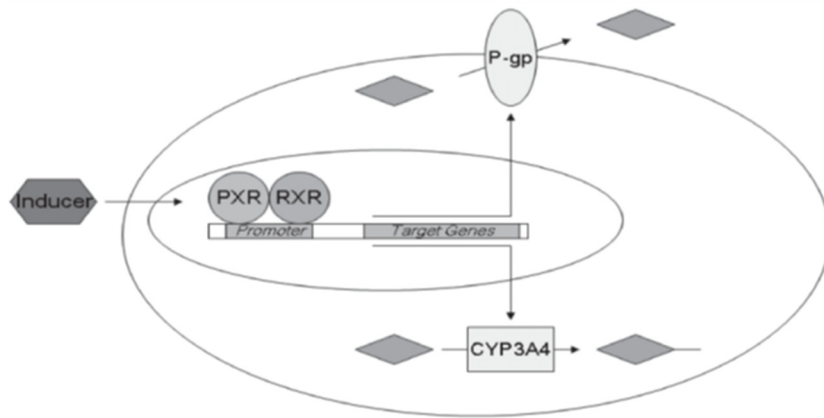
Adrenal kanserler çok agresif ilerleyen ve nadir olarak görülen tümörlerdir (1,2). Adrenal tümörün kolay lokalizasyonu yüzünden cerrahi olarak alınıp çıkarılması kolay ve tek tedavi yoludur (3). Tümörün tamamen çıkarılması metastasik durumlarda kesin bir çözüm değildir. Mitotane terapisi ile takip edilir (1). Mitotane (O,p’DDT) AKK’li hastaların tedavisinde kullanılan tek ilaçtır (4). O,p’DDD [1-(2-chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane], adrenal bezlerde konsantre olan yüksek lipofilik bir bileşendir. Adrenal kortekse zarar verir ve mitokondrial dejenerasyonu tetikler (5). Mitotane adrenal korteks için sitotoksik etkiye sahiptir. Mitotane ayrıca hepatik kortizol metabolizmasını da artırır (4).

Sitokrom P450 3A4 (CYP3A4, cytochrome P450 3A4), insan karaciğer ve bağırsaklarından aşırı eksprese olur (4,6,7). Sitokrom “hem” grubu içeren elektron taşıyıcı proteinlerdir. Hem içeren proteinler çeşitli lipofilik endojen moleküller ve ekzojen substratların biyo transferine yardımcı olurlar (7). CYP izoformları, 3A ailesine aittir ve bu aile oksidatif özellikleri sebebiyle ilaç metabolizasyonunda yer alan önemli enzim grubudur. İnsanda CYP3A izoformunun 3A3, 3A4, 3A5 ve 3A7 alt birimleri eksprese olur (6,7). İnsanda bağırsaklarda en çok eksprese olan CYP izoformu 3A7 dir (7). Hepatik ve bağırsaklardaki CYP3A4 ekspresyonunun ilaç metabolizasyonundaki önemli rolünün yanı sıra, tümöral CYP3A4 ekspresyonu ilaç tedavilerinin tümör üzerindeki etkinliği açısından da önemlidir. Örneğin, meme kanserinde, CYP3A4 negatif tümörlü olan hastalarda, pozitif olan hastalara göre ilaca cevap oranının önemli ölçüde yüksek olduğu görülmüştür (8). Böylece, tümöral CYP3A4 ekspresyonu, CYP3A4’ün substratı olan anti-kanser ilaçları ile tedavide hassas işaretleyiciler olabilirler.

Nükleer pregnane X reseptörü (PXR, ayrıca SXR olarakta isimlendirilir), xenobiotic ve endobiotik metabolizmasında genlerin anahtar düzenleyicisi ve ligand bağımlı transkripsiyonel faktörlerin nükleer reseptör ailesinin bir üyesidir. PXR fonksiyonunu retinoic X reseptör (RXR) ile birlikte gösterir. RXR ile birlikte bir heterodimer oluşturarak hedef genin promotor bölgelerine bağlanır (şekil 2.1). PXR birçok xenobiotiklerle aktive olur. Doğal olarak meydana gelen steroidler ki bunların içerisinde progesteron ve kolesterol PXR’in aktive olmasında çok etkilidir. PXR aktivasyonu için gerekli olan tek steroid konsantrasyonu (11-50uM), biyolojik numunelerde tespit edilenlerden daha fazladır. PXR’in yüksek afiniteli ligandlara sahip olup olmadığı da kesinleşmemiştir. Bu sebeple, CYP3A4 yöneten PXR pesticide ve poliklorine gibi steroidlere ve xenobiotiklere maruz kaldığında nasıl bir etkiye sahip olacağı net değildir. PXR ayrıca pregnane ve diğer metabolik steroidler ile de aktive olmaktadır. PXR ilaç

metabolizmasını düzenleyen bir xenobiotik reseptör gibi görünmesine rağmen, endojen bileşenlere cevap vermesinden dolayı “steroid ve xenobiotik reseptör” gibi düşünülmelidir. Endojen steroidler (dihidrotestosterone, progesterone, testosterone, pregnenolone, kortikosteron, östrojen) ve steroid gibi olan bileşenler deksametazon gibi fare, rat ve insan karaciğer, kolon ve ince bağırsaklarında PXR için agonistik aktiveye sahip oldukları gösterilmiştir. PXR, CYP3A4 ve Pgp (P-glikoprotein, hücre membranında bulunan hücre içindeki yabancı maddeleri hücre dışına pompalayan bir proteindir.)’nin önemli düzenleyicisidir. İki tane önemli PXR hedef geni vardır; CYP3A ve SULT2A1. Bunların androjenlerin metabolik deaktivasyonunda rol oynadığı bilinmektedir (9). CYP3A4’ün Mitotane ile indüklenmesi başlangıç olarak PXR tarafından yönetilir (10). Etoposide, doxorubicin ve cisplatin gibi sitostatik ilaçlar AKK’li hastaların tedavisinde halen kullanılmaktadır.

Adrenal kanserli hastalarda, mitotane ile tedavi CYP3A4 ekspresyonunun artmasını indüklemekte ve ilaç metabolizasyonunu artırmaktadır (4). Birlikte kullanıldığı zaman mitotane diğer ilaçların da etkinliğini de değiştirebilir (11). Karaciğer ve ince bağırsak CYP3A4 için primer kaynakken adrenal bez gibi diğer dokularda da CYP3A4 eksprese olmaktadır (12,13). Lokal (tümöral) CYP3A4 ekspresyonu da ilaç hassasiyetinde etkilidir. Bizim ilk sonuçlarımız, CYP3A4’ün AKK dokularında yüksek seviyede eksprese olduğunu göstermektedir (şekil 2.2). CYP3A4’ün bu yüksek ekspresyonunun ana mekanizması bilinmemektedir. Bildiğimiz kadarıyla, PXR’in adrenal bezler de eksprese olup olmadığı ortaya çıkarılmamıştır.



Şekil 2.1. CYP3A4 ve MDR-1(Pgp) ekspresyonunda PXR’in rolü.

3.3. Hücre Gelişim Deneyleri

SW13 ve H295 hücreler, 3 ve 7 gün inkübe edilmesi için 24 kuyucuklu platelere ekildi. H295 hücreleri 3 gün için her bir kuyucuğa 5.10^5 hücre, 25.10^4 hücre, 125.10^3 hücre, 625.10^2 hücre, 31250 hücre, 15625 hücre ekildi. 7 gün her bir kuyucuğa 1.10^5 hücre, 5.10^4 hücre, 25.10^3 hücre, 12500 hücre 6250 hücre, 3125 hücre ekildi.

SW13 hücreler, 3 gün için her bir kuyucuğa 1.10^5 hücre, 5.10^4 hücre, 25.10^3 hücre, 12500 hücre 6250 hücre, 3125 hücre ekildi. 7 gün için her bir kuyucuğa 1.10^5 hücre, 5.10^4 hücre, 25.10^3 hücre, 12500 hücre 6250 hücre, 3125 hücre ekildi.

En az üç deney yapıldı. 3 ve 7 gün sonrasında hücre lizis çözeltisi eklenerek her bir kuyucukdaki hücreler sonifikatör ile parçalandı. Parçalanmış hücrelere DNA ölçüm tampon çözeltisi eklendi. Her bir kuyucukdaki hücre solüsyonları 96 kuyucuklu siyah platelere alındı ve üzerlerine HOECHST 33342 solüsyonu eklendi. ProMega Multi plate okuyucuda 361/497nm (Uyarı/emisyon) dalga boylarında okunarak elde edilen verilere göre DNA kuyucuklardaki DNA miktarı hesaplandı.

3.3. İlaç ve Steroidlerin Hücreler Üzerine Etkileri

H295 ve SW13 hücreleri, 3 ve 7 gün için belirlenen sayılarda 24 kuyucuklu platelere ekildi. Bir gün sonrasında aşağıdaki tabloda gösterilen konsantrasyonlarda ilaç ve steroidler her iki hücre hattındaki hücrelere uygulandı.

Tablo 3.1. İlaç ve steroidlerin konsantrasyonları.

İlaçlar ve steroidler	Konsantrasyonlar (M)					
Etoposide	Kontrol	10^{-5}	10^{-6}	5×10^{-7}	10^{-7}	10^{-8}
Cisplatin	Kontrol	10^{-5}	10^{-6}	5×10^{-7}	10^{-7}	10^{-8}
Doxorubicine	Kontrol	10^{-5}	10^{-6}	5×10^{-7}	10^{-7}	10^{-8}
Mitotane	Kontrol	10^{-4}	5×10^{-5}	10^{-5}	5×10^{-6}	10^{-6}
Aldosteroid	Kontrol	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Kortikosteroid	Kontrol	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Hidrokortizol	Kontrol	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Dexamethasone	Kontrol	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}

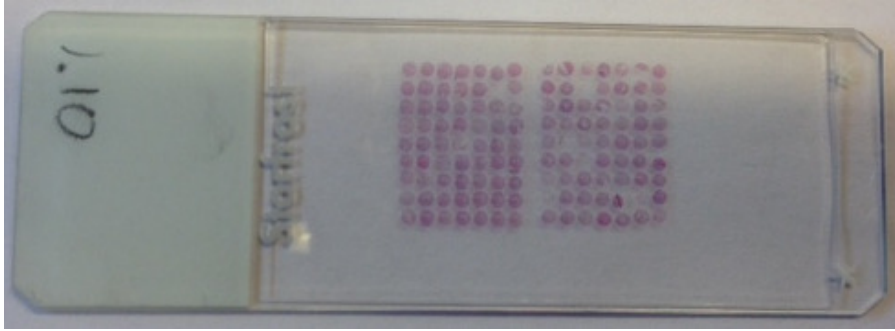
Her bir hücre hattı için 3 ve 7 günlük IC50 yani bu hücreleri %50 inhibe eden konsantrasyon hesaplandı.

3.4. RTqPCR

H295 ve SW13 hücreleri için her bir ilaç ve steroidin IC50 değeri belirlendikten sonra bu miktarlar hücrelere uygulanarak 24 ve 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. Hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı ve cDNA elde edildi. Elde edilen cDNA ile CYP3A4 ve PXR genlerine, ilaçlar ve steroidlerin etkileri belirlendi ve belirlenmeye devam etmektedir.

3.5. İmmunohistokimya

İmmunohistokimya çalışması için Hollanda Erasmus Medikal Center Endokrinoloji bölümünde hazırlanan doku kesit preparatları kullanıldı. Microtissue array olarak da bilinen teknik ile adrenalın çeşitli kısımlarından mikrokeseitler alınarak tekbir parafin bloğa mikrokeseitler şeklinde gömüldü. Bu parafin bloktan kesitler alındığı zaman tek bir slayt üzerinde 100 kadar doku kesiti ile tek sefer de çalışılabilir.



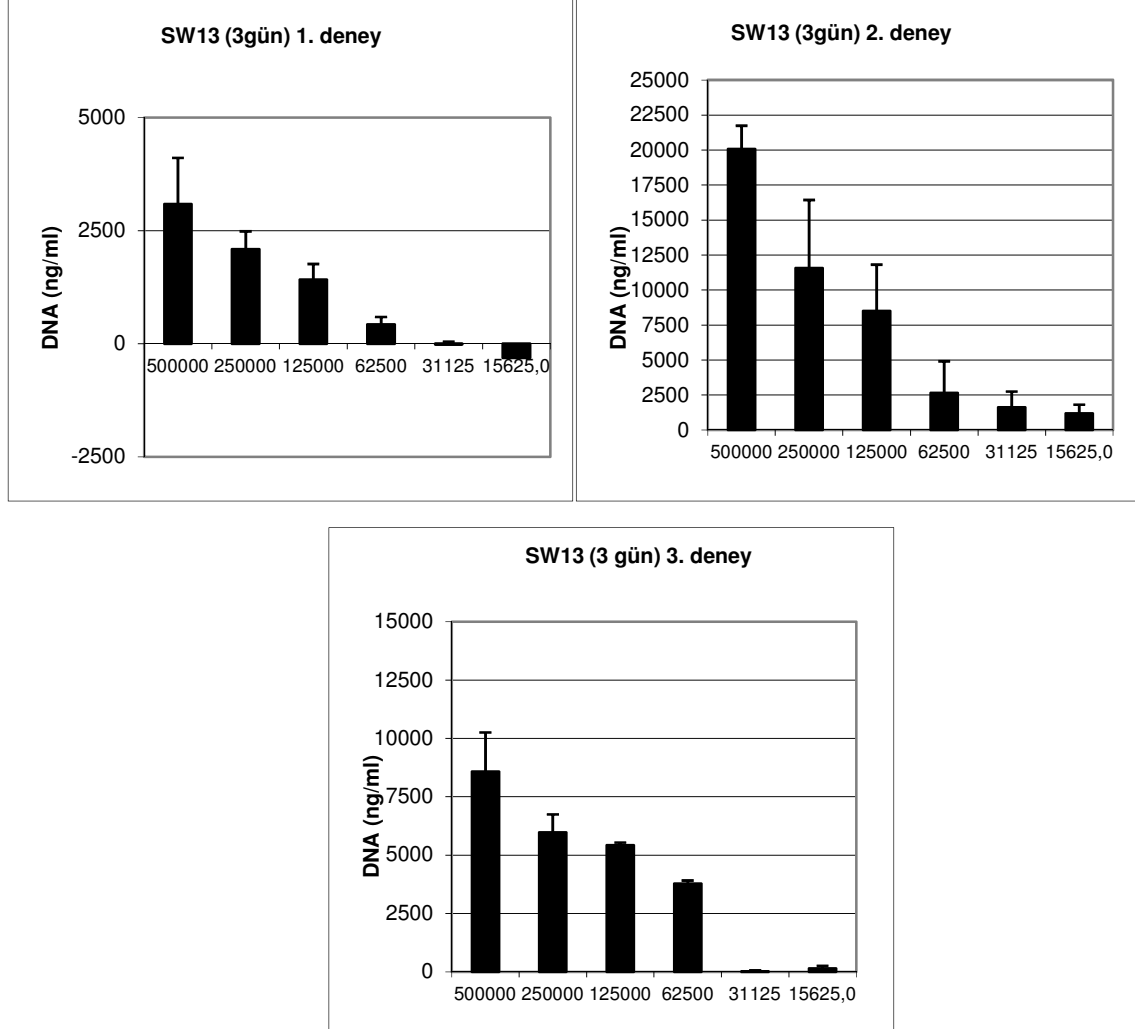
Şekil 3.1. Kullanılan doku slaydının boyanmadan önceki görüntüsü.

CYP3A4 ve PXR antibodyleri ile adrenal ve adrenal kanser doku kesitleri boyandı. Her bir kesitin fotoğrafı çekilerek immunorekatif skorları belirlendi.

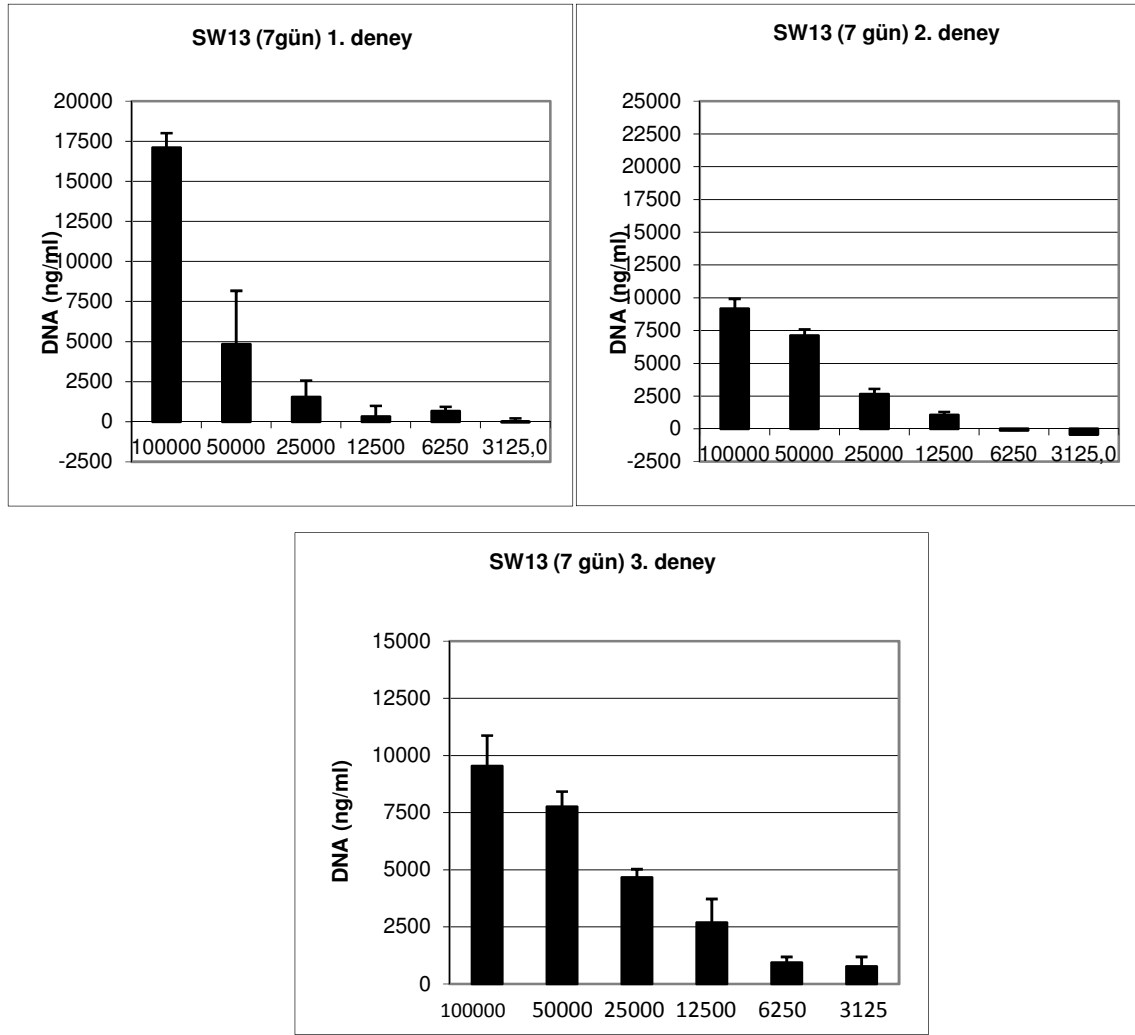
4. Sonuçlar:

4.1. Hücrelerin 3 ve 7 günlük gelişim eğrileri

Hücreler belirli sayıda ekildikten sonra, standarta göre gelişin grafikleri çizildi. Şekil 4.1-2 de SW13 hücrelerinin 3 günlük ve 7 günlük gelişim grafiği görülmektedir.



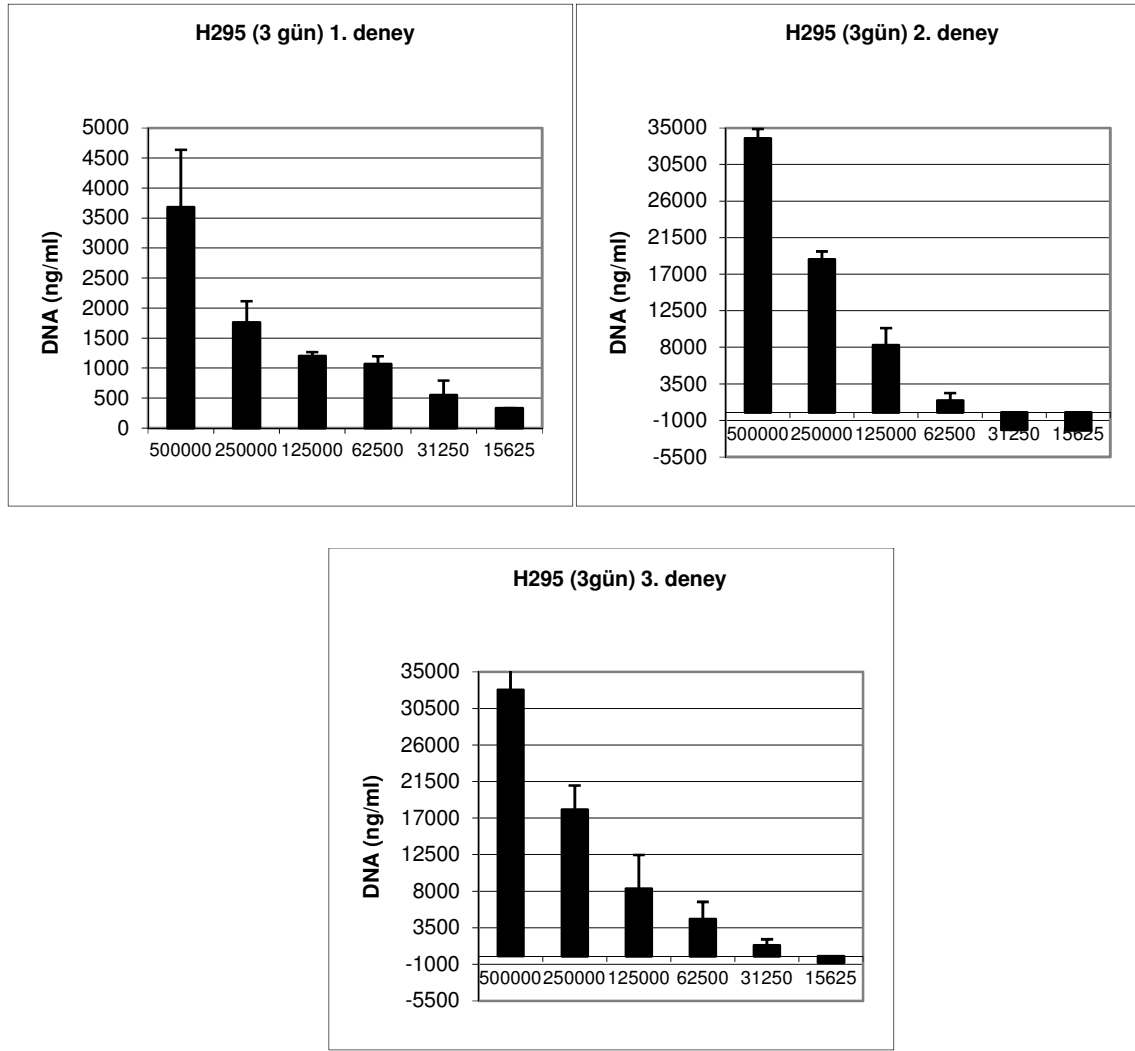
Şekil 4.1. SW13 hücrelerinin 3 günlük gelişim eğrilerini gösteren grafikler.



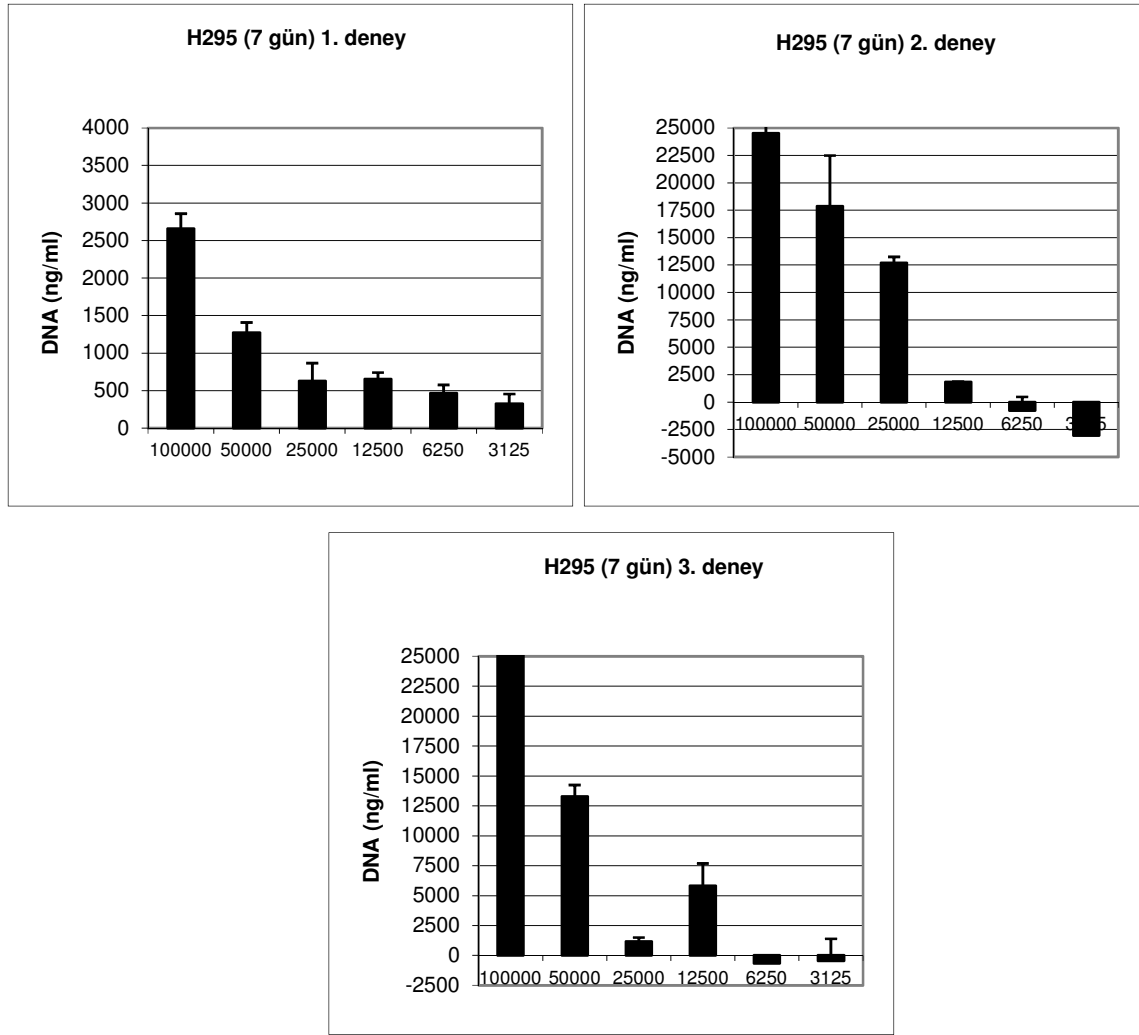
Şekil 4.2. SW13 hücrelerinin 7 günlük gelişim eğrilerini gösteren grafikler.

Yapılan SW13 hücre gelişim deneylerinden sonra elde edilen bu grafiklerden 3 ve 7 gün inkübe edilen hücrelerin bu günlerin sonunda kuyucukları %50 oranında dolduran hücre sayısı belirlendi. SW13, 3 gün için her kuyucuğa 1.10^5 hücre, 7 gün için her kuyucuğa 5.10^4 hücre ekilmesi belirlendi.

Aynı şekilde H295 hücreleri için 3 ve 7 günlük gelişim eğrileri belirlendi.



Şekil 4.3. H295 hücrelerinin 3 günlük gelişim eğrilerini gösteren grafikler.

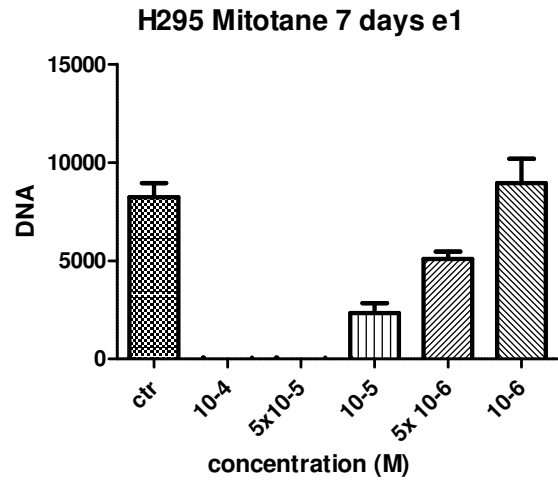
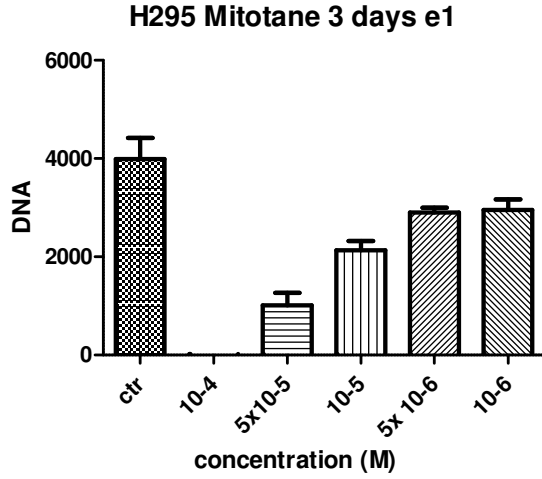


Şekil 4.4. H295 hücrelerinin 7 günlük gelişim eğrilerini gösteren grafikler.

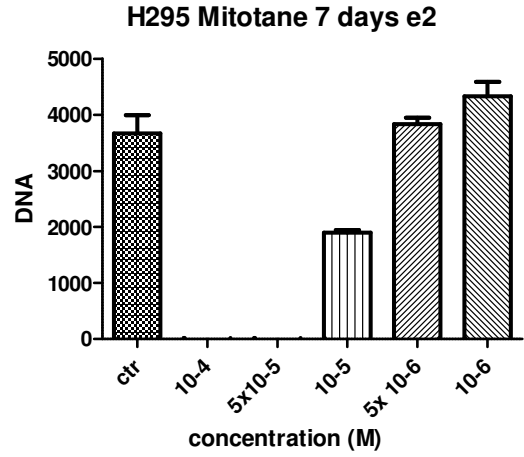
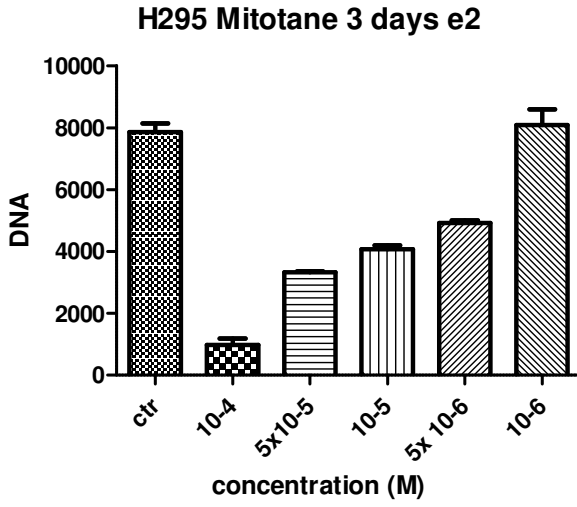
H295 hücre gelişim deneylerinden sonra elde edilen bu grafiklerden 3 ve 7 gün inkübe edilen hücrelerin bu günlerin sonunda kuyucukları %50 oranında dolduran hücre sayısı belirlendi. H295 hücreleri 3 gün için her bir kuyucuğa 8.10^4 hücre, 7 gün için 35000 hücre ekilmesi belirlendi.

4.2. İlaç ve Steroidlerin H295 ve SW13 Hücreleri Üzerine Etkileri

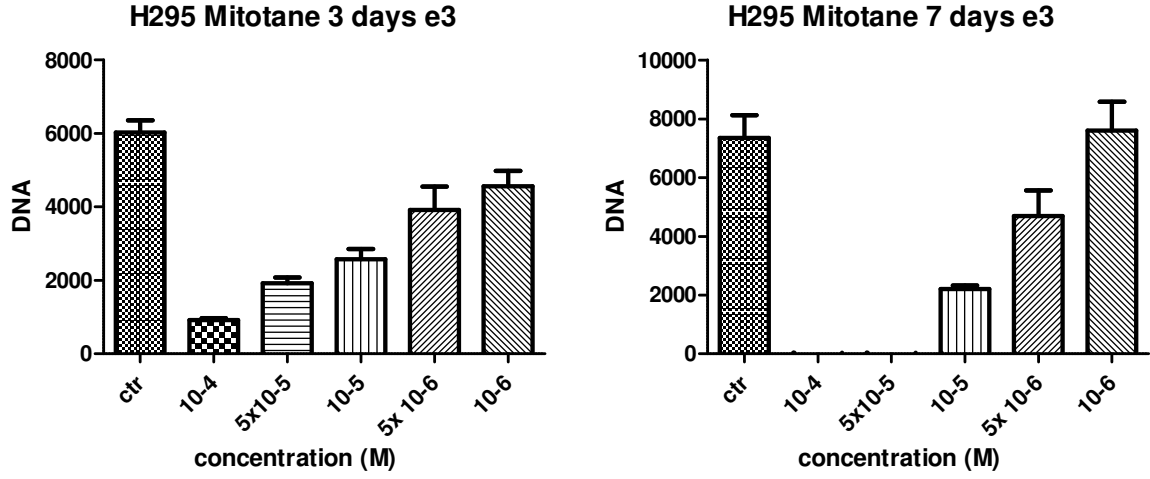
H295 ve SW13 hücreleri 3 ve 7 gün için ilaçlar Mitotane, Etiposide, Cisplatin ve Doxorubicine etkileri aşağıdaki grafiklerde gösterildi.



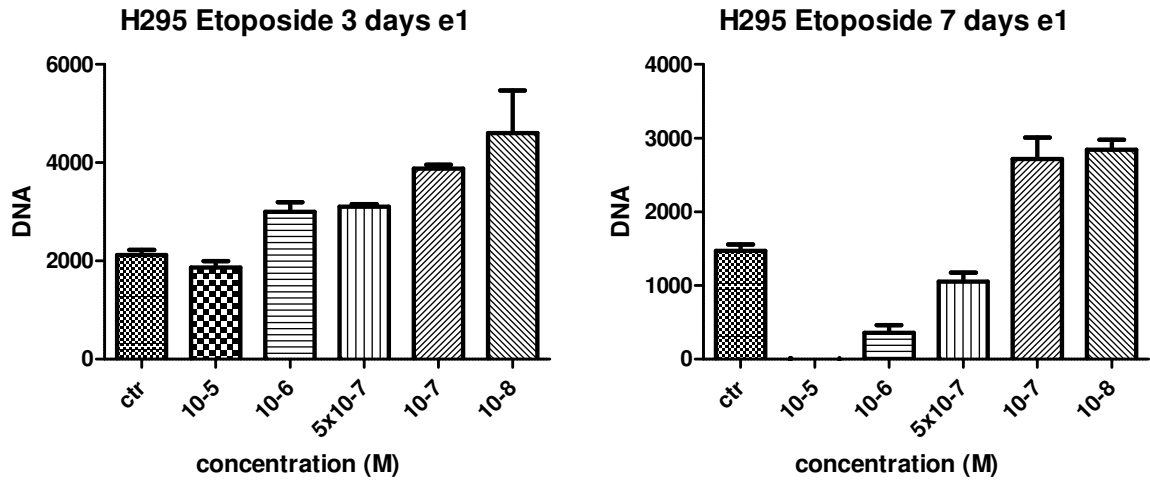
Şekil 4.5. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Mitotane konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 1.deney.



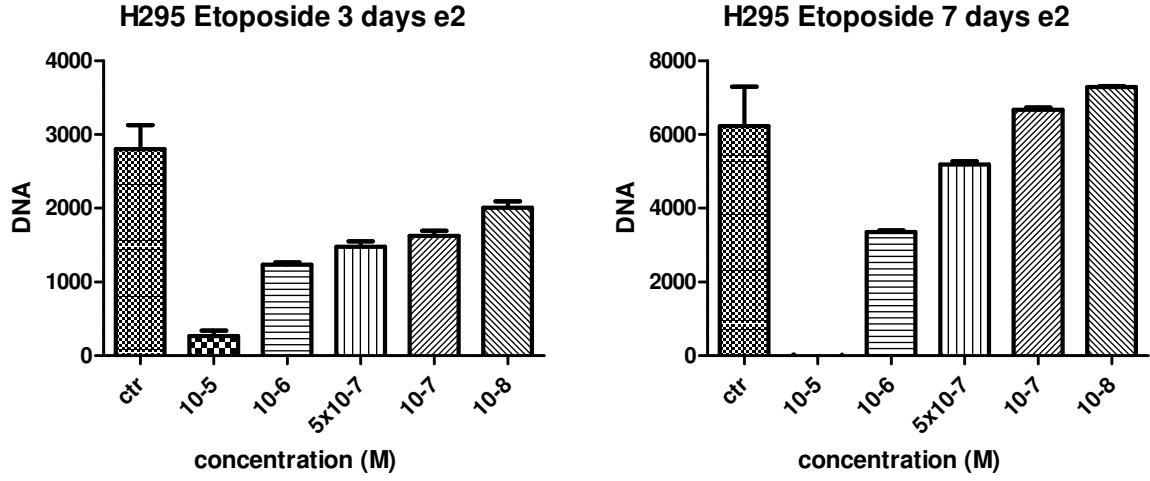
Şekil 4.6. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Mitotane konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 2.deney.



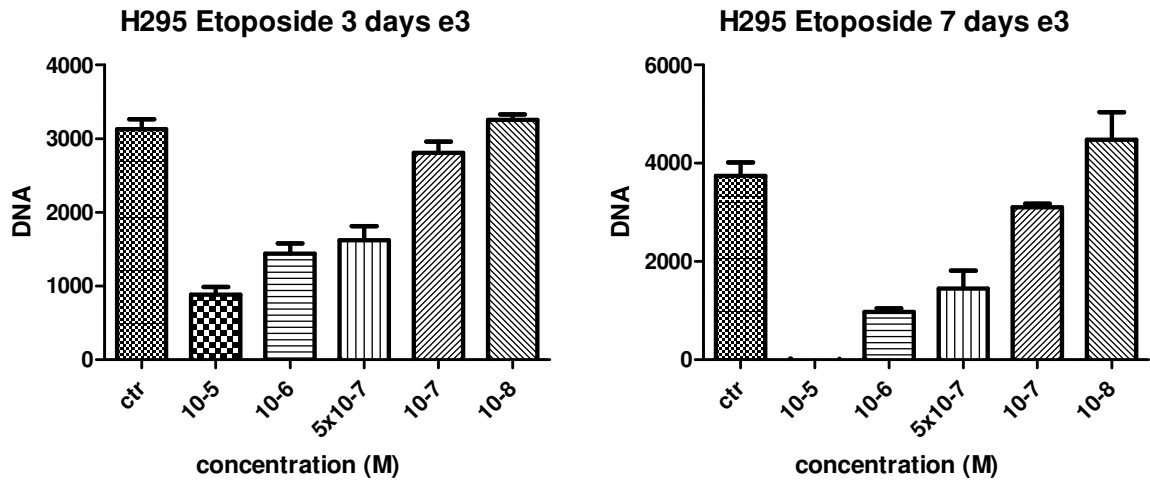
Şekil 4.7. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Mitotane konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 3.deney.



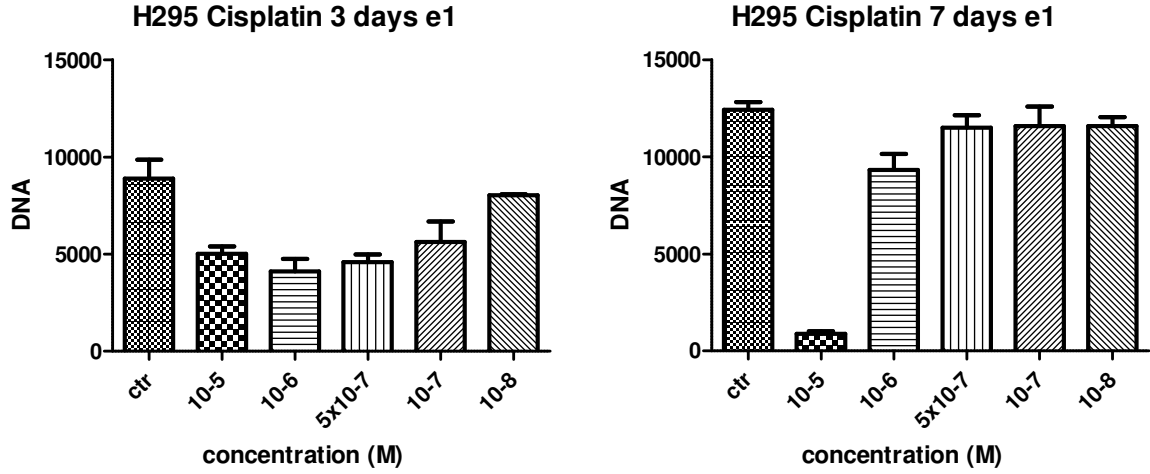
Şekil 4.8. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Etoposide konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 1.deney.



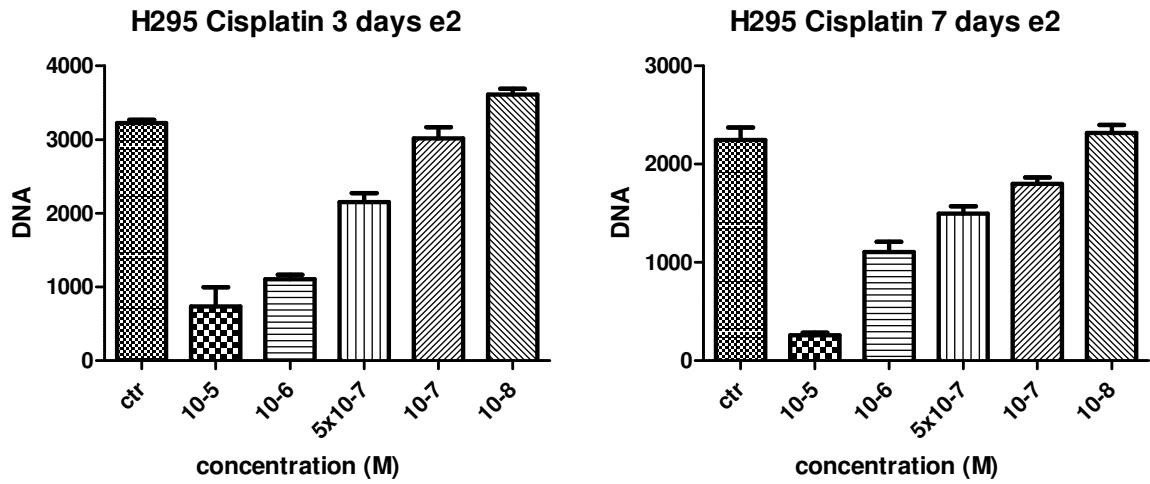
Şekil 4.9. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Etoposide konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 2.deney.



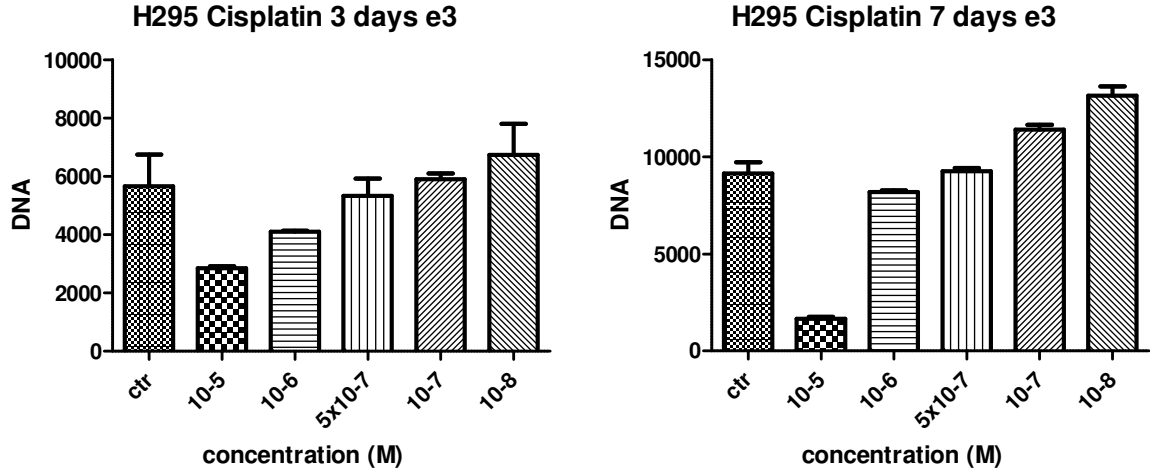
Şekil 4.10. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Etoposide konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 3.deney.



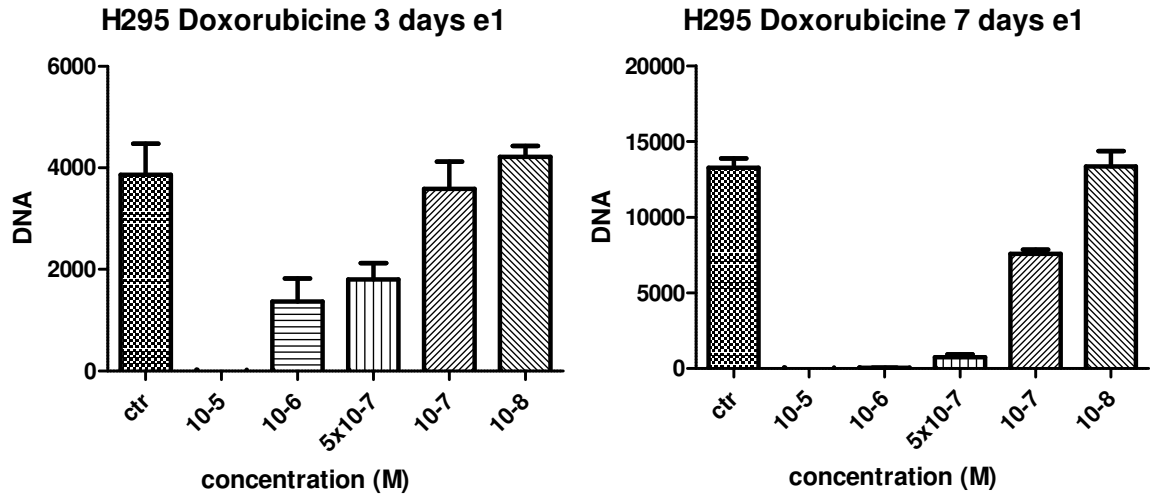
Şekil 4.11. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Cisplatin konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 1.deney.



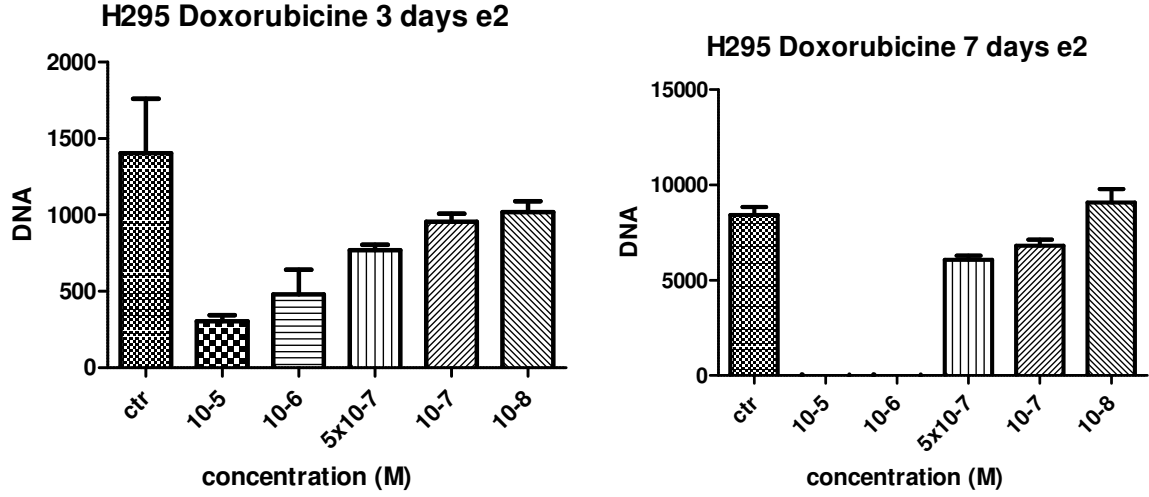
Şekil 4.12. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Cisplatin konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 2.deney.



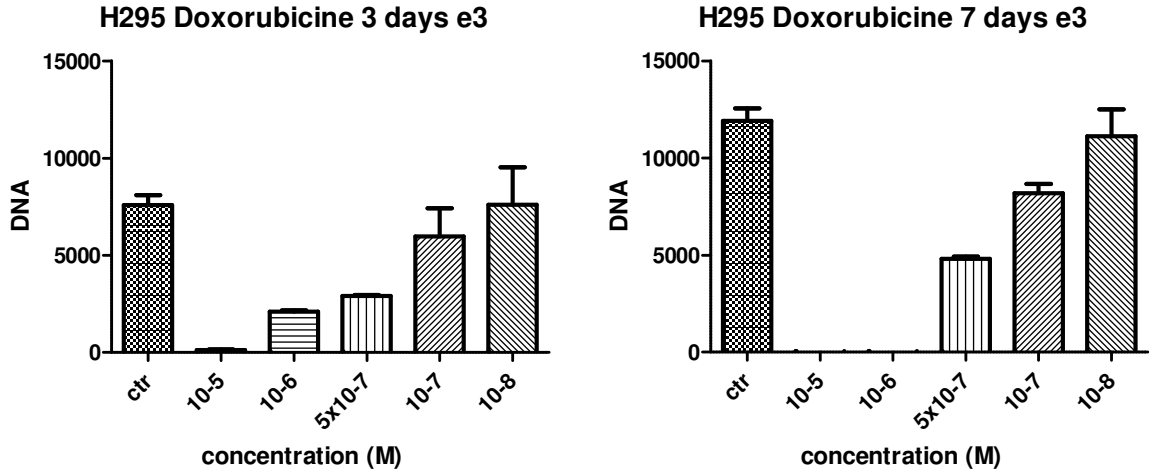
Şekil 4.13. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Cisplatin konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 3.deney.



Şekil 4.14. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Doxorubicine konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 1.deney.

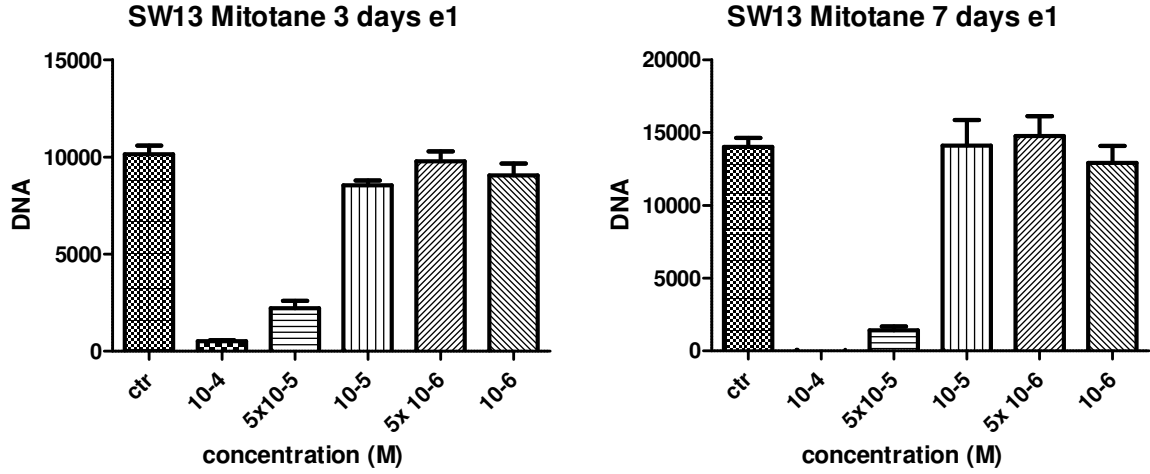


Şekil 4.15. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Doxorubicine konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 2.deney.

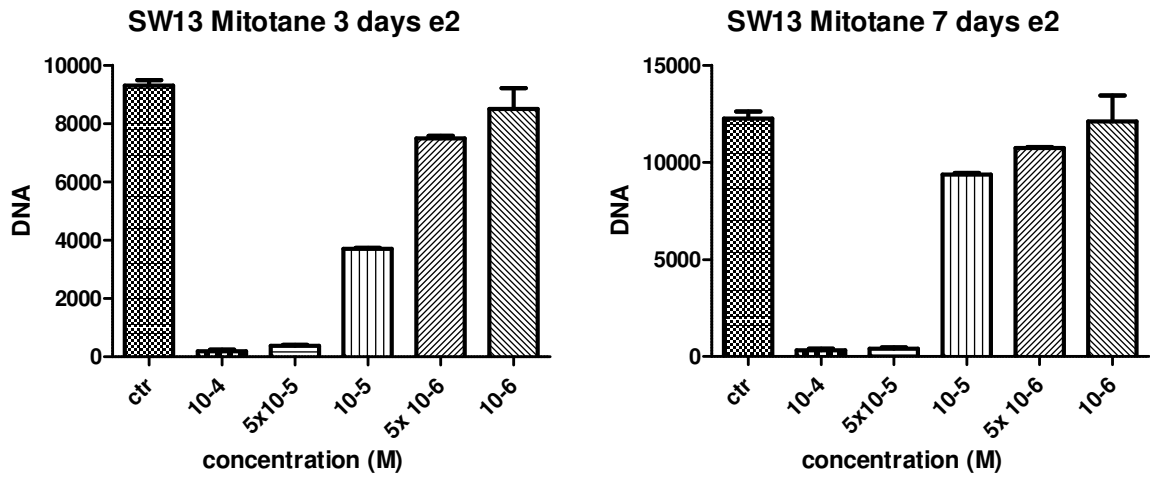


Şekil 4.16. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Doxorubicine konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 3.deney.

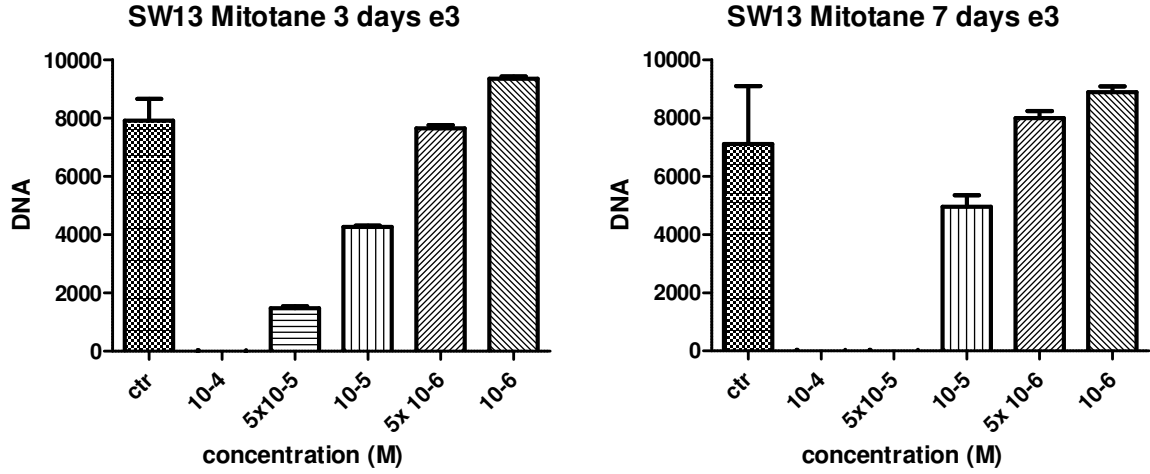
Aynı şekilde SW13 hücreleri için ilaçların etkileri aşağıdaki grafiklerde gösterildi.



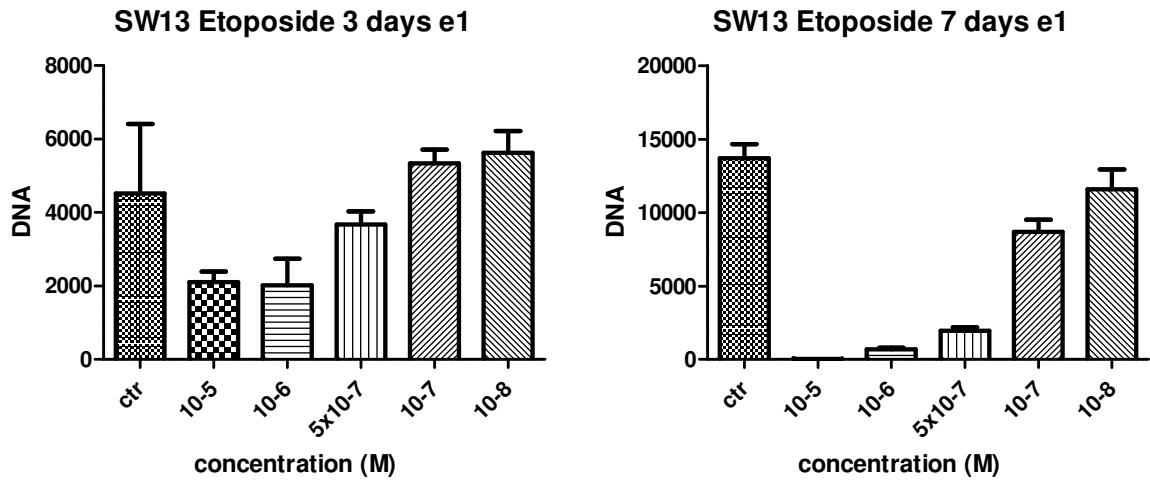
Şekil 4.17. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Mitotane konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 1.deney.



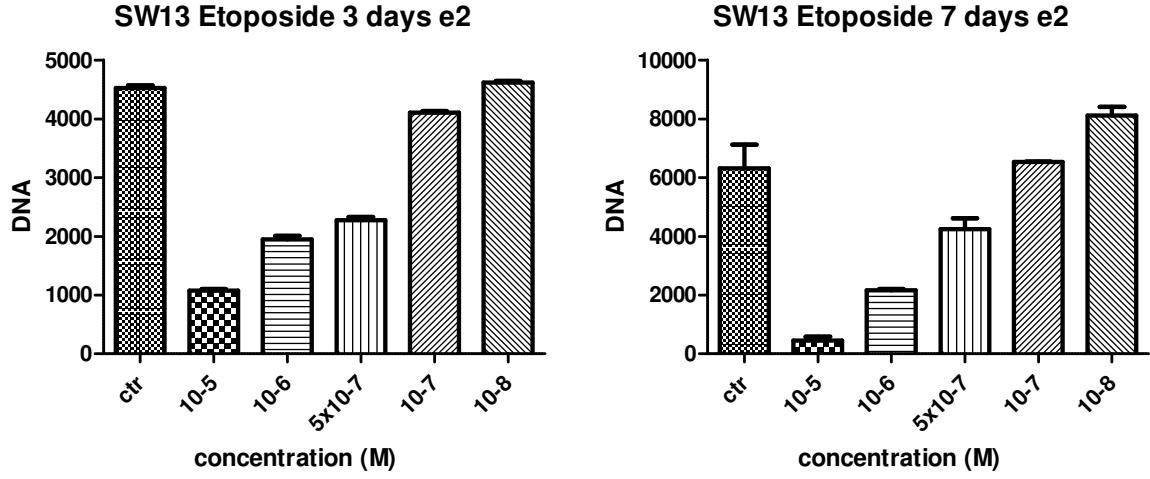
Şekil 4.18. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Mitotane konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 2.deney.



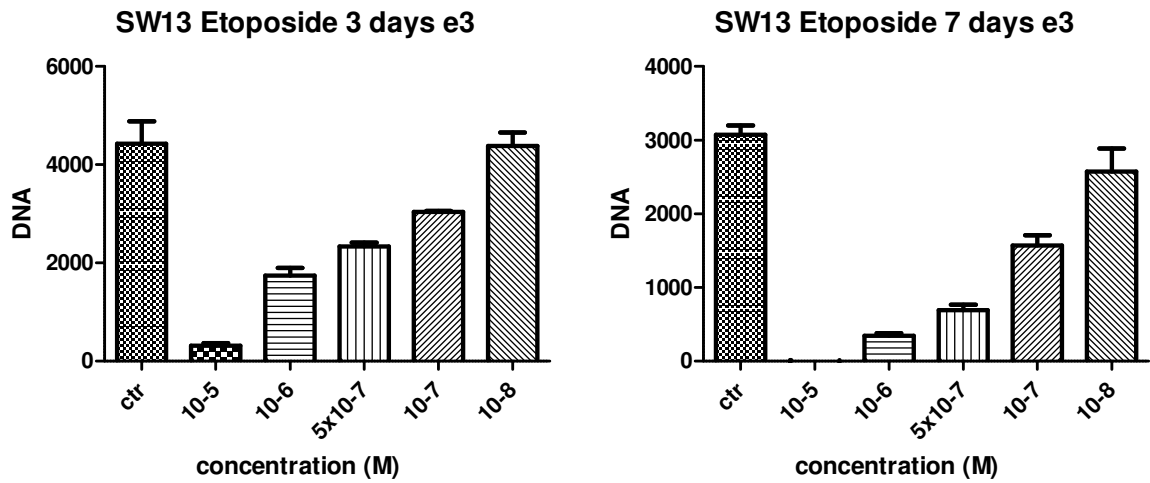
Şekil 4.19. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Mitotane konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 3.deney.



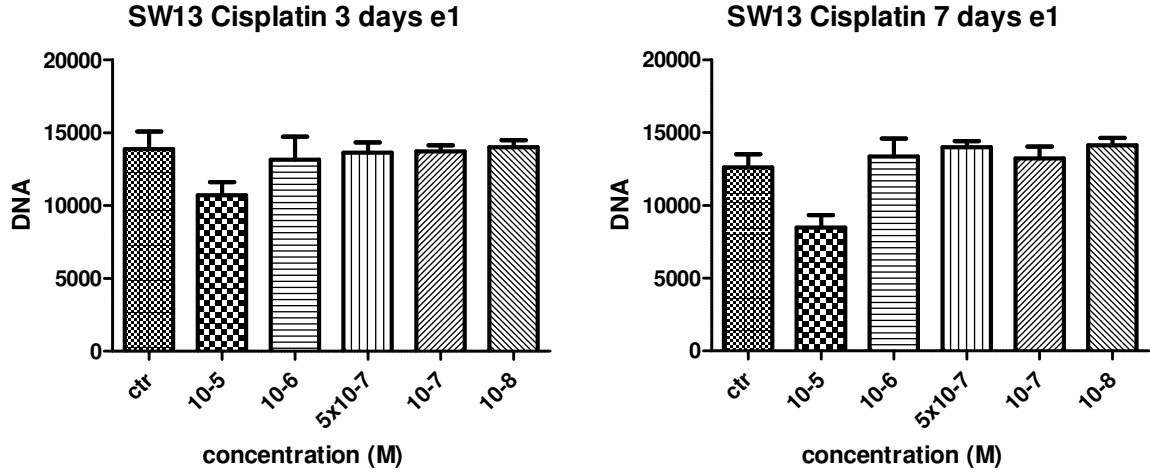
Şekil 4.20. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Etoposide konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 1.deney.



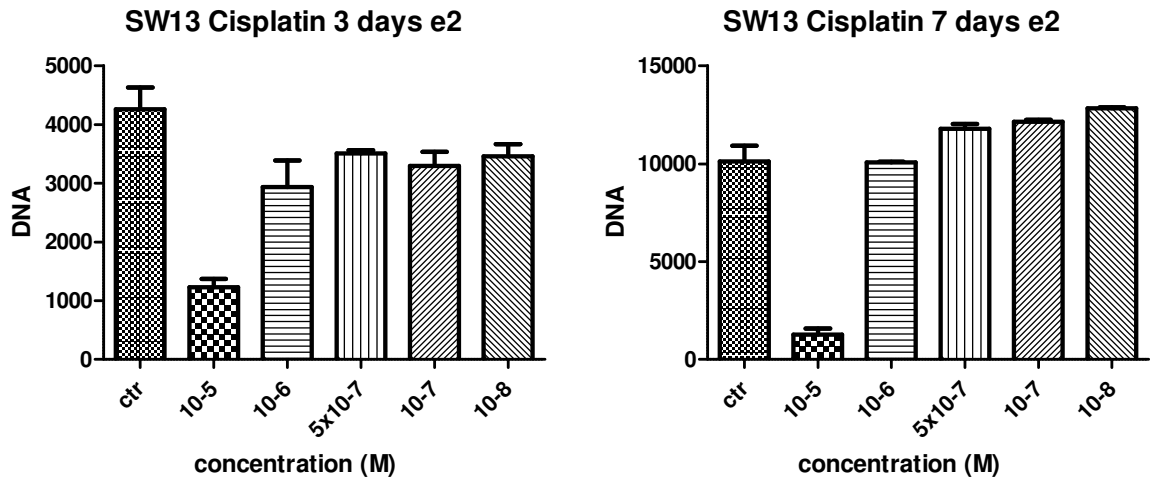
Şekil 4.21. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Etoposide konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 2.deney.



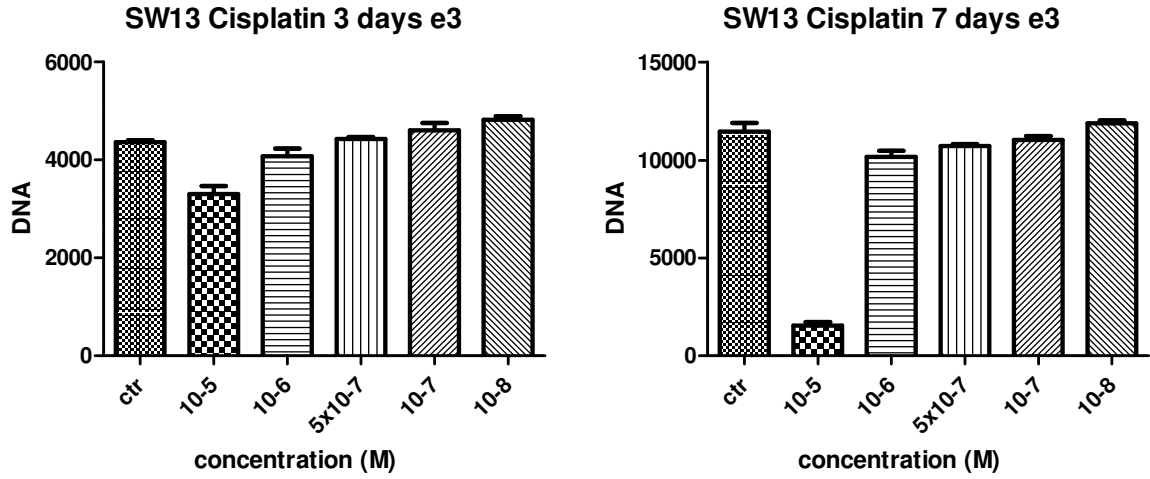
Şekil 4.22. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Etoposide konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 3.deney.



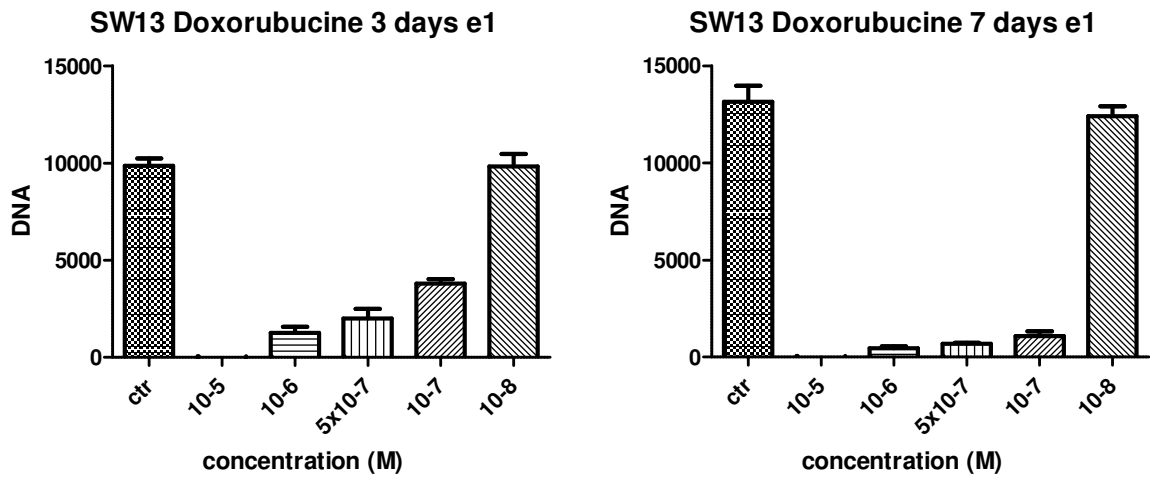
Şekil 4.23. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Cisplatine konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 1.deney.



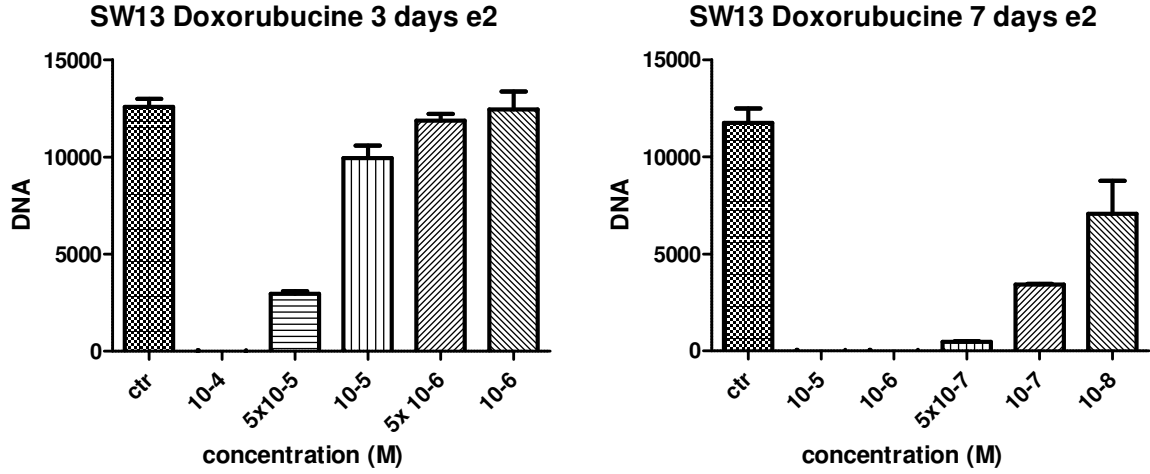
Şekil 4.24. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Cisplatine konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 2.deney.



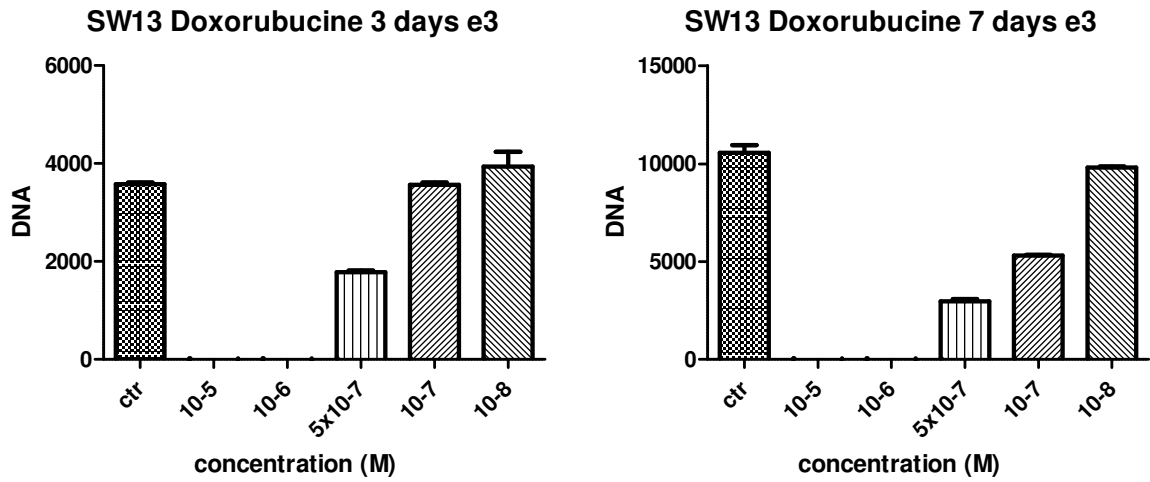
Şekil 4.25. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Cisplatine konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 3.deney.



Şekil 4.26. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Doxorubicine konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 1.deney.



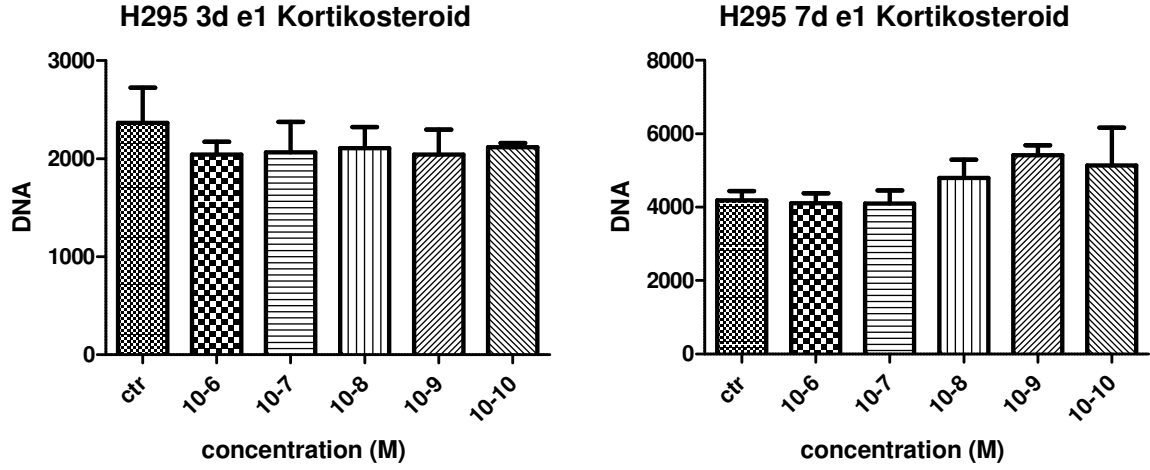
Şekil 4.27. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Doxorubicine konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 2.deney.



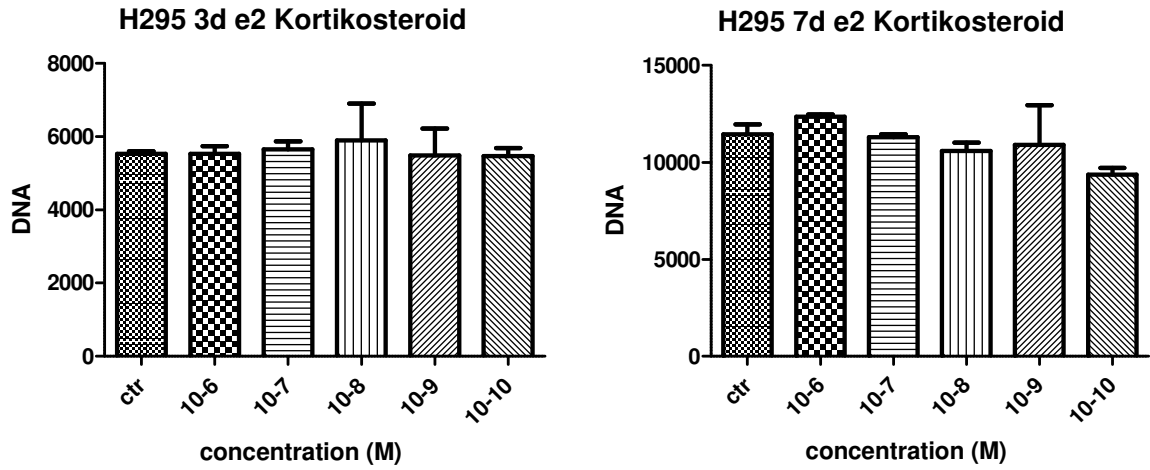
Şekil 4.28. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Doxorubicine konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 3.deney.

İlaçların yanı sıra steroidlerinde farklı konsantrasyonlarda hücreleri nasıl etkilediğine baktık.

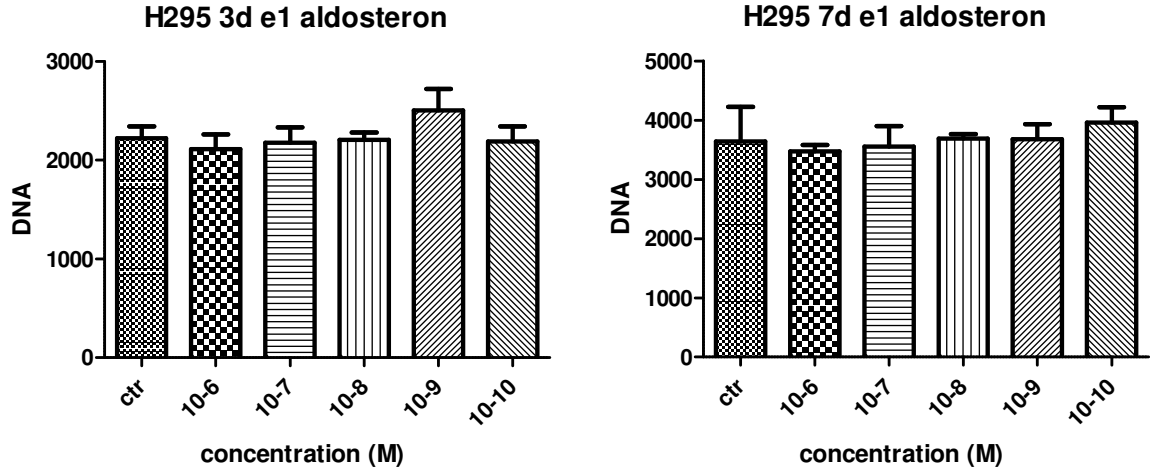
H295 hücreleri için steroidlerin hücrelere etki grafiği aşağıda gösterildi.



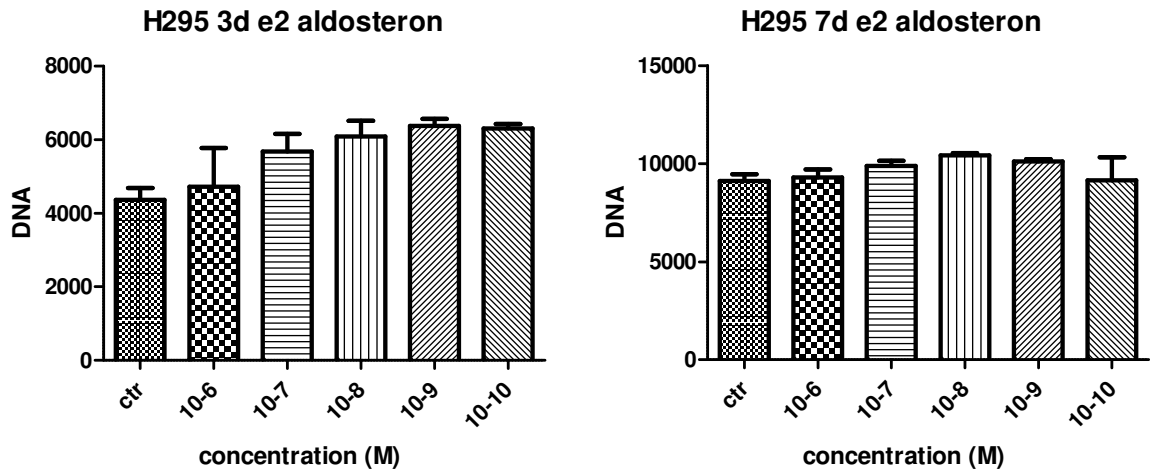
Şekil 4.29. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Kortikosteroid konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 1.deney.



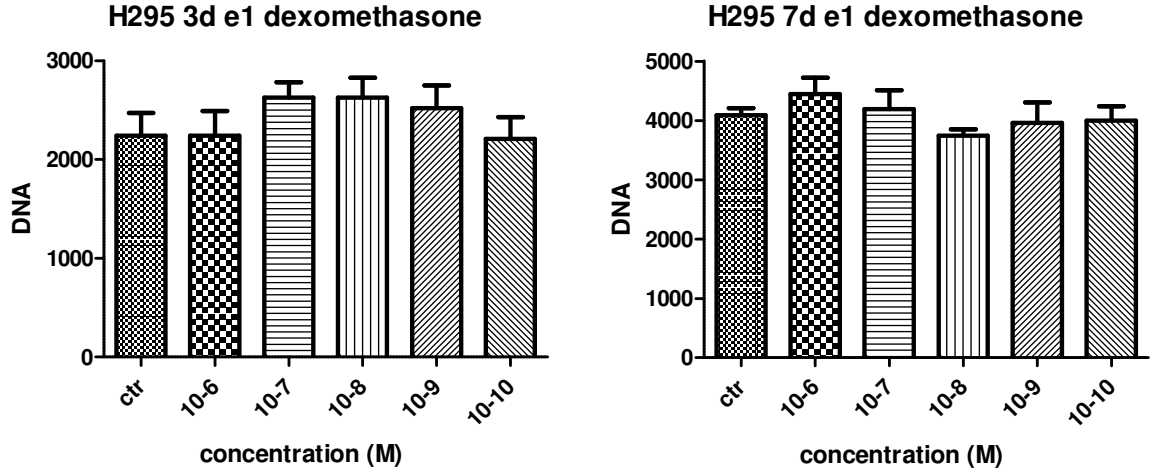
Şekil 4.30. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Kortikosteroid konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 2.deney.



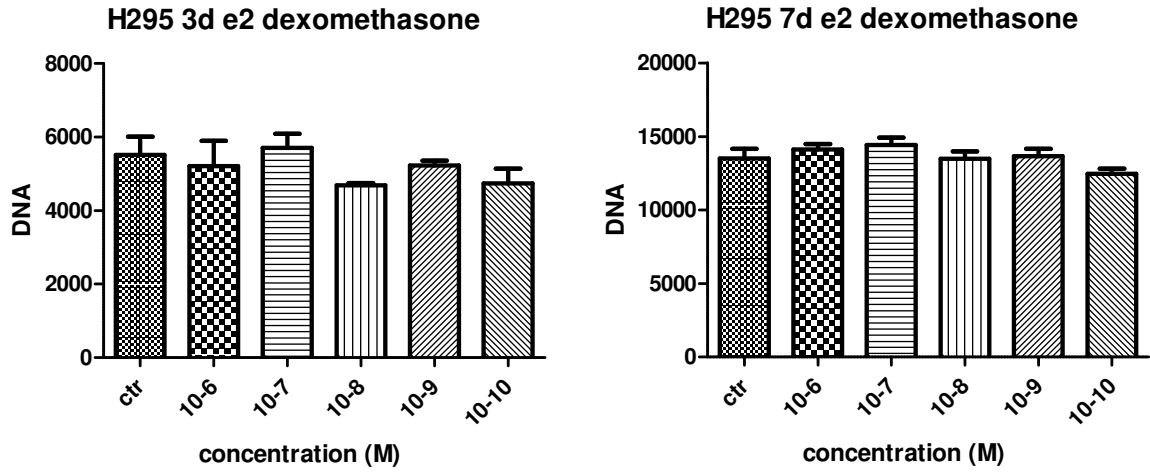
Şekil 4.31. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Aldosteron konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 1.deney.



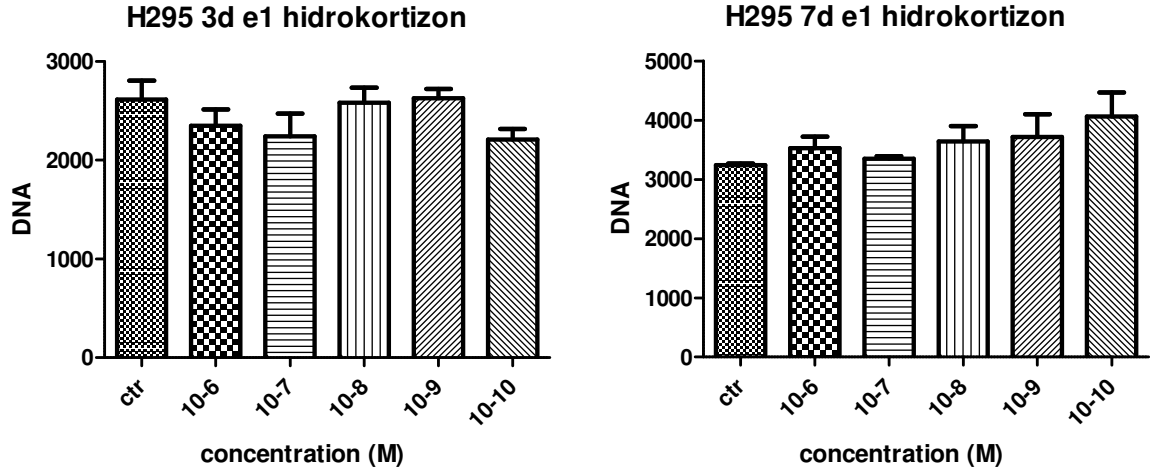
Şekil 4.32. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Aldosteron konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 2.deney.



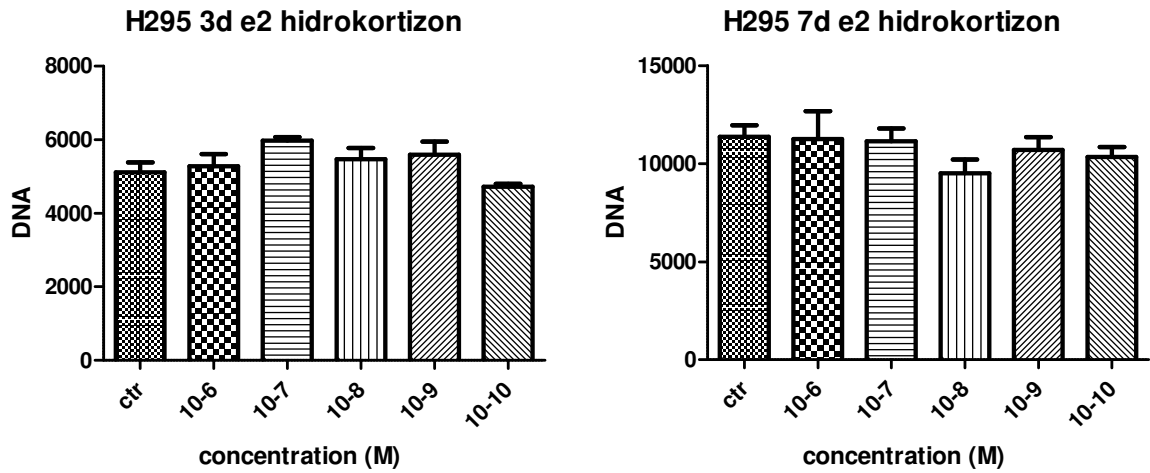
Şekil 4.33. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Dexomethasone konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 1.deney.



Şekil 4.34. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Dexomethasone konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 2.deney.

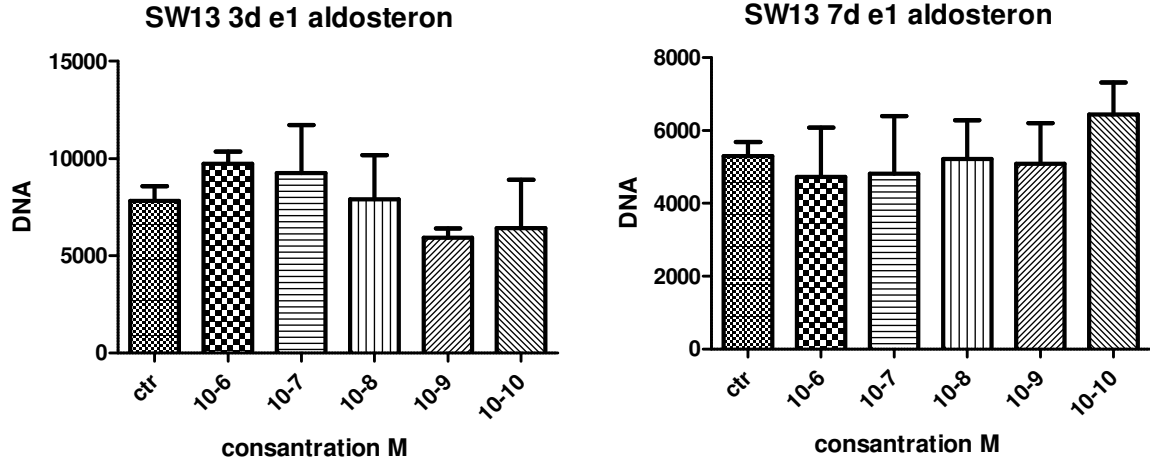


Şekil 4.35. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Hidrokortizon konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 1.deney.

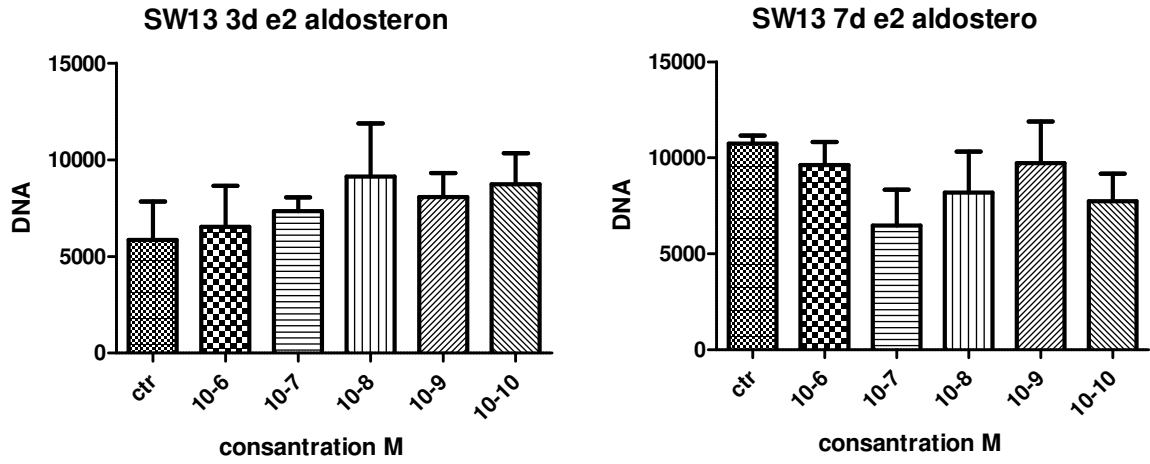


Şekil 4.36. H295 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Hidrokortizon konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 2.deney.

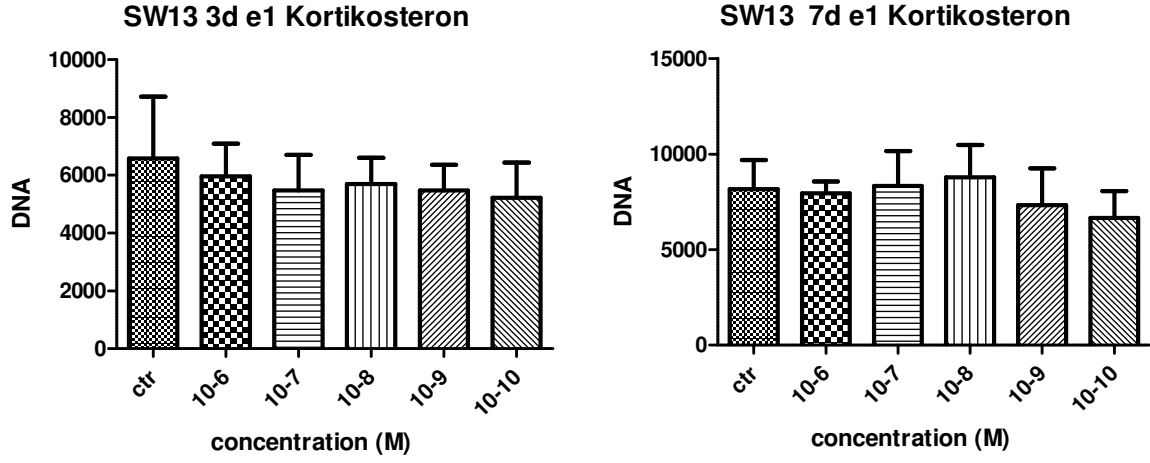
SW13 hücrelerine steroidlerin etkileri aşağıdaki grafiklerde gösterildi.



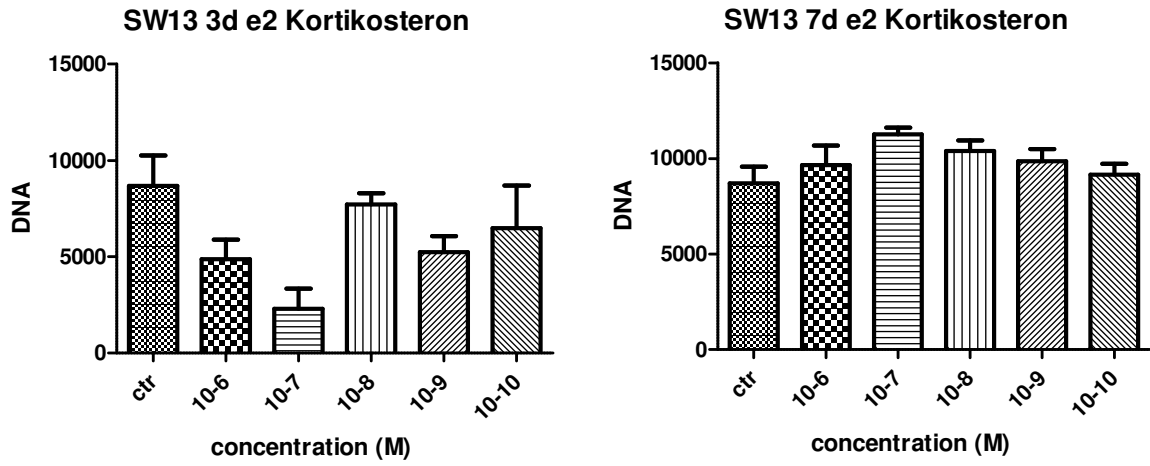
Şekil 4.37. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Aldosteron konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 1.deney.



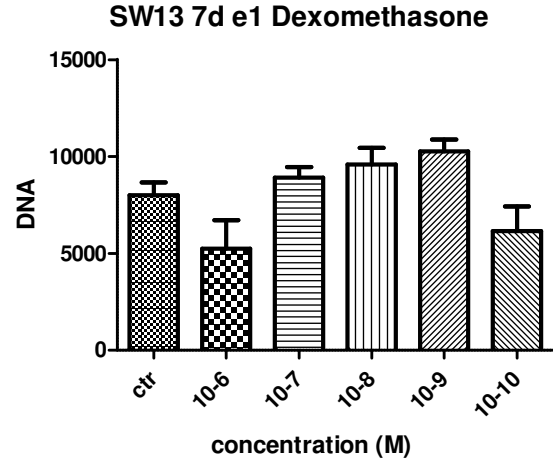
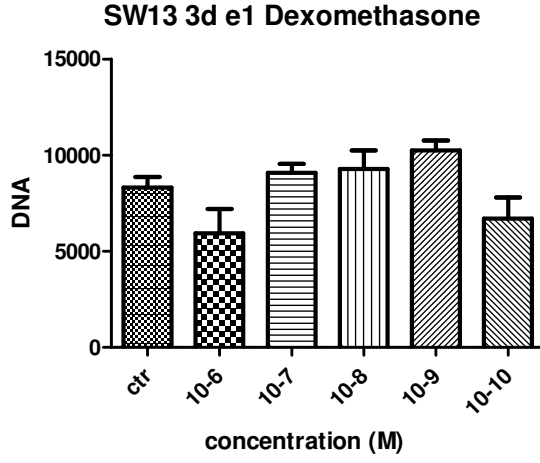
Şekil 4.38. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Aldosteron konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 2.deney.



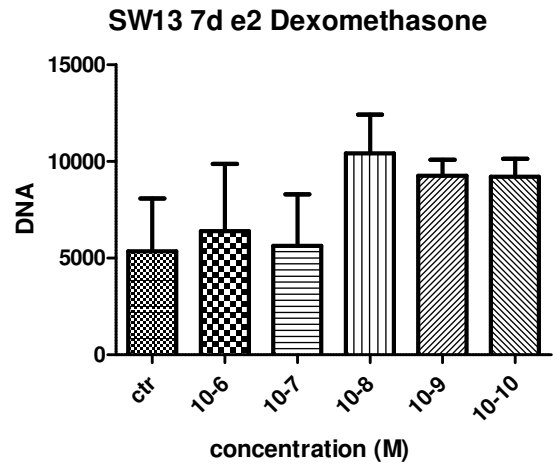
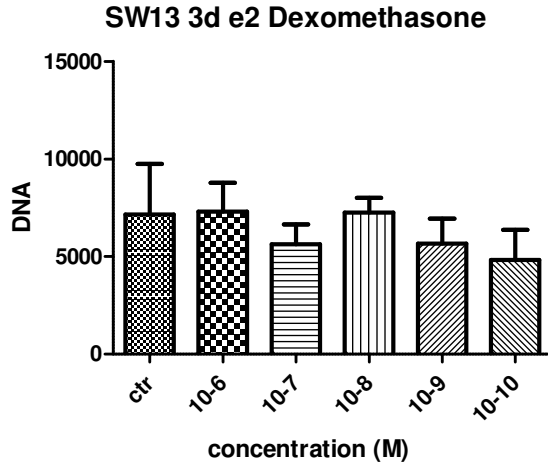
Şekil 4.39. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Kortikosteron konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 1.deney.



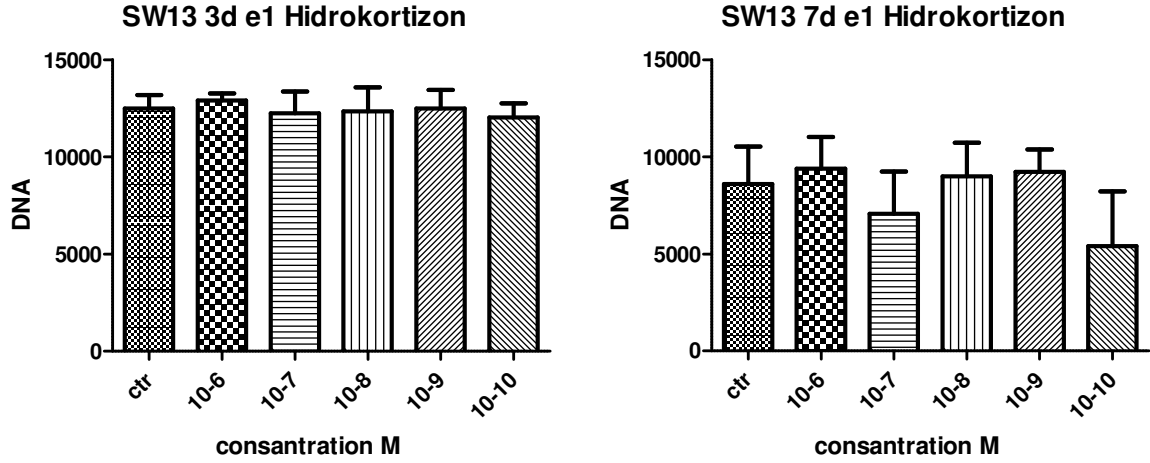
Şekil 4.40. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Kortikosteron konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 2.deney.



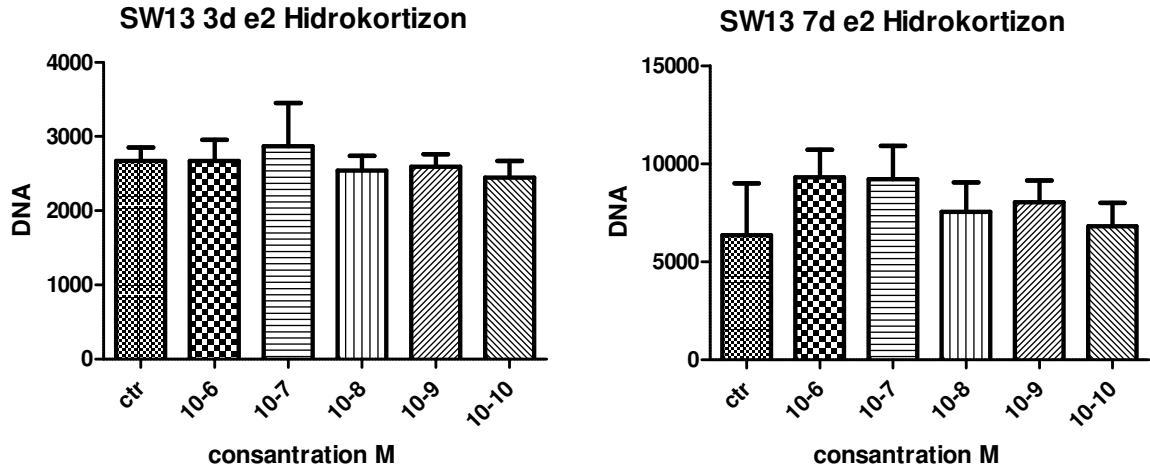
Şekil 4.41. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Dexomethasone konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 1.deney.



Şekil 4.42. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Dexomethasone konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 2.deney.



Şekil 4.43. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Hidrokortizon konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 1.deney.

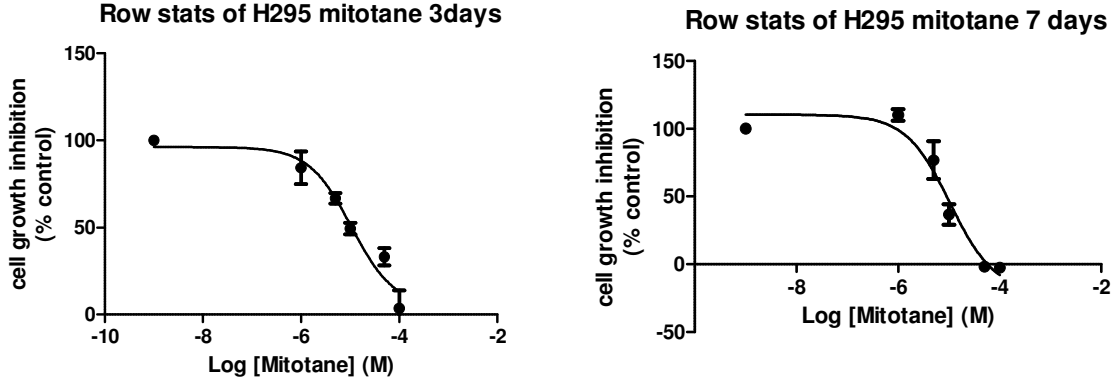


Şekil 4.44. SW13 hücrelerinin 3 ve 7 günlük Hidrokortizon konsantrasyonlarına karşı gelişim eğrisi 2.deney.

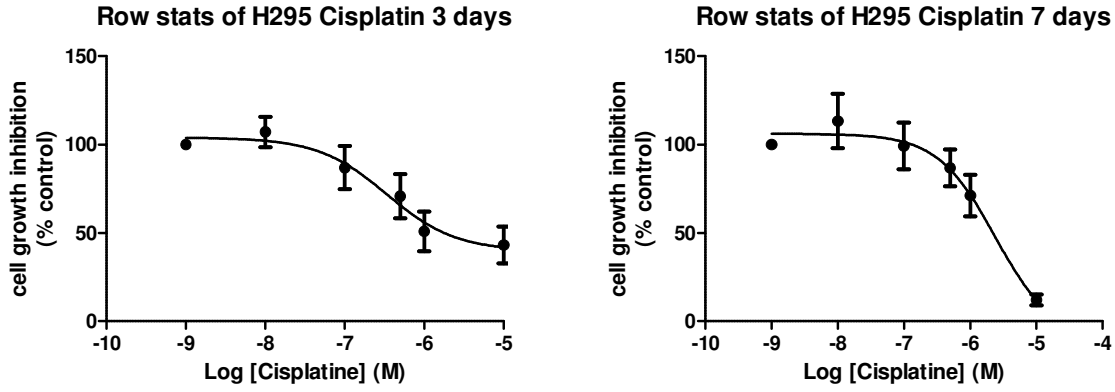
4.3. İlaç ve Steroidlerin SW13 ve H294 Hücreleri İçin IC50 Değerleri

İlaç ve Steroidlerin her bir hücre hattındaki hücreleri %50 inhibe eden konsantrasyonları hesaplandı ve grafikleri çizildi.

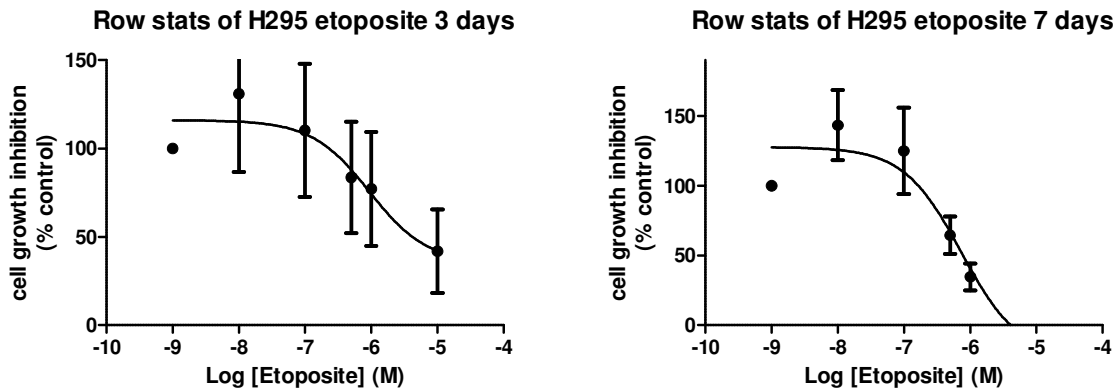
H295 hücrelerinde ilaç ve steroidlerinin IC50 grafikleri aşağıdaki gibidir.



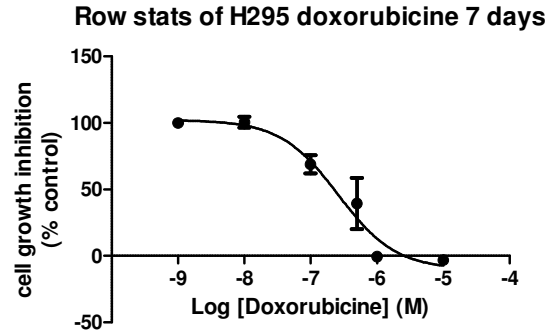
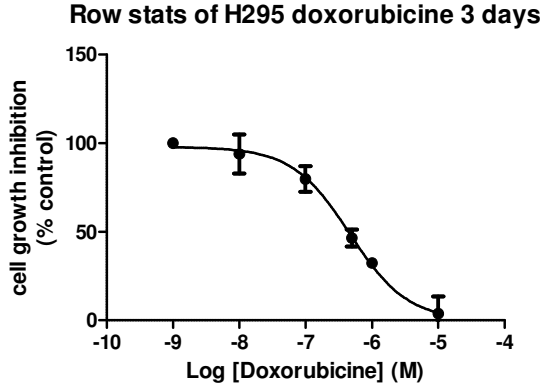
Şekil 4.45. H295 hücrelerinde Mitotane 3 ve 7 günlük IC50 değerlerini gösteren grafik.



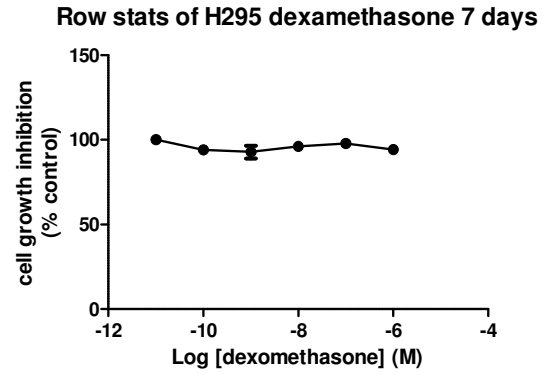
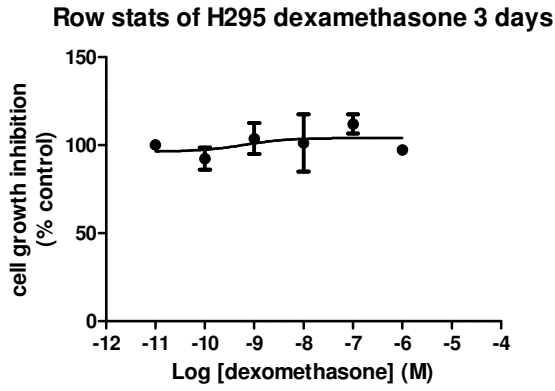
Şekil 4.46. H295 hücrelerinde Cisplatin 3 ve 7 günlük IC50 değerlerini gösteren grafik.



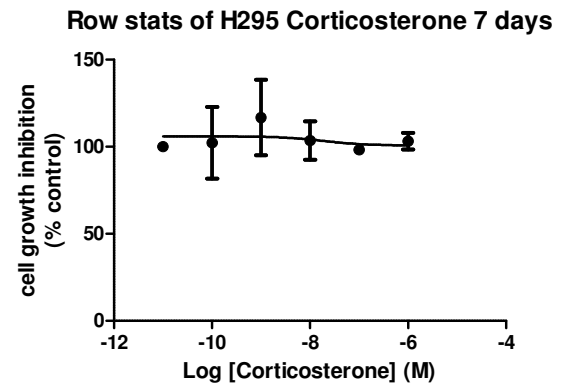
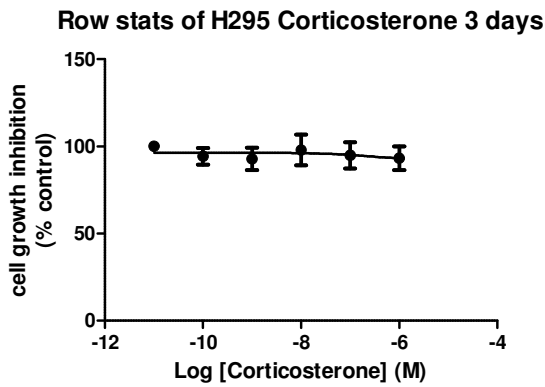
Şekil 4.47. H295 hücrelerinde Etoposide 3 ve 7 günlük IC50 değerlerini gösteren grafik.



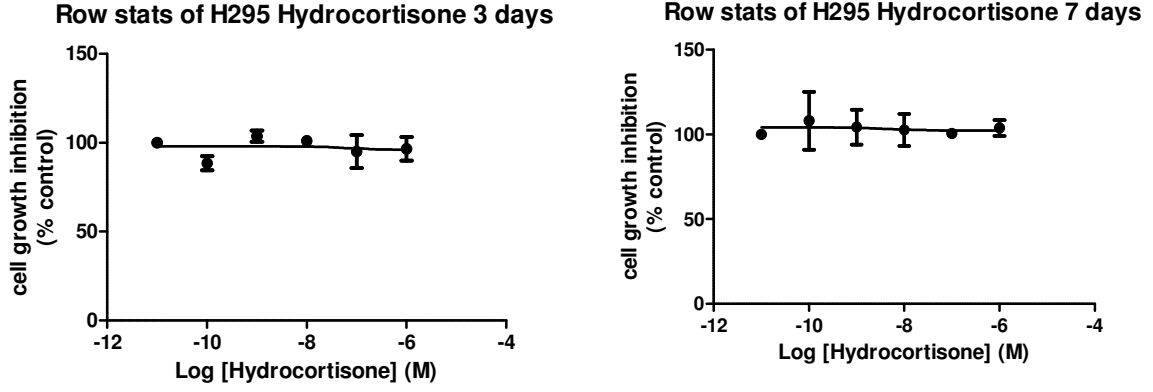
Şekil 4.48. H295 hücrelerinde Doxorubicine 3 ve 7 günlük IC50 değerlerini gösteren grafik.



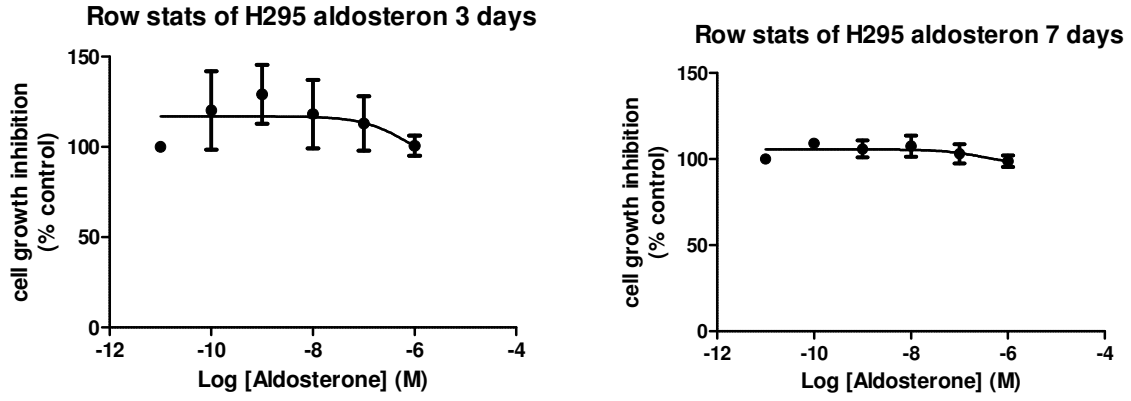
Şekil 4.49. H295 hücrelerinde Dexamethasone 3 ve 7 günlük IC50 değerlerini gösteren grafik.



Şekil 4.50. H295 hücrelerinde Kortikosteroid 3 ve 7 günlük IC50 değerlerini gösteren grafik.

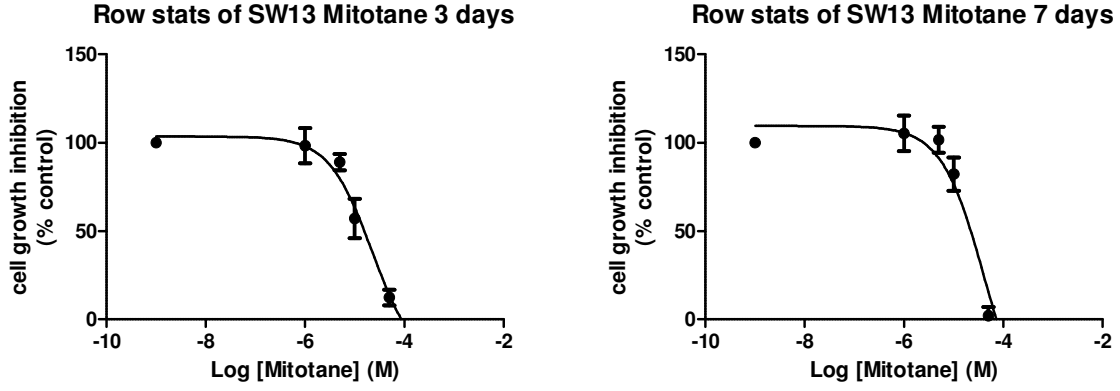


Şekil 4.51. H295 hücrelerinde Hidrokortizon 3 ve 7 günlük IC50 değerlerini gösteren grafik.

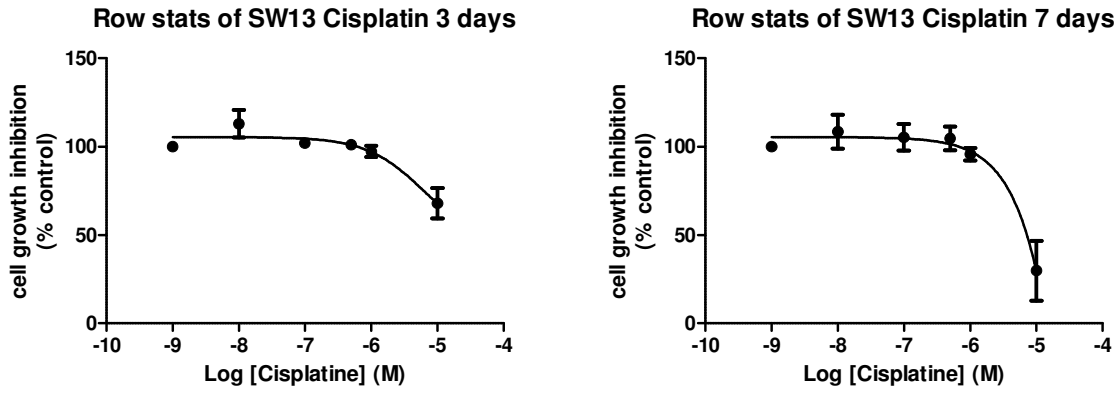


Şekil 4.52. H295 hücrelerinde Aldosteron 3 ve 7 günlük IC50 değerlerini gösteren grafik.

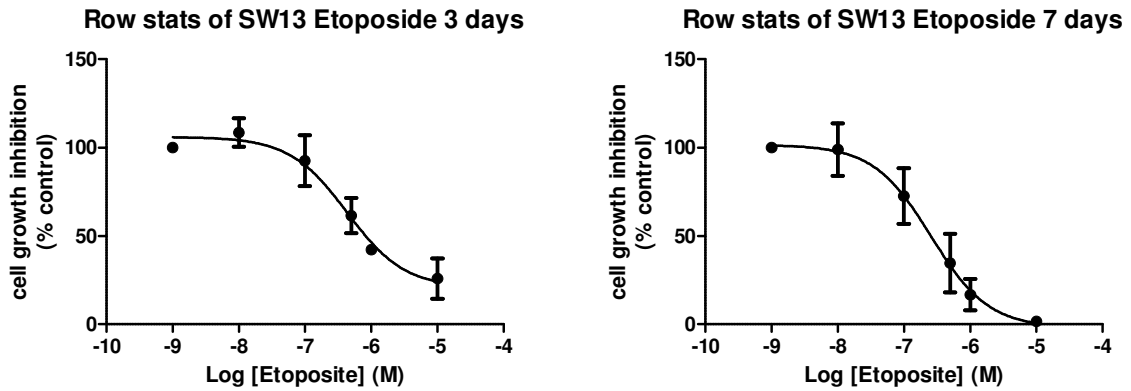
SW13 hücrelerinde ilaç ve steroidlerinin IC50 grafikleri aşağıdaki gibidir.



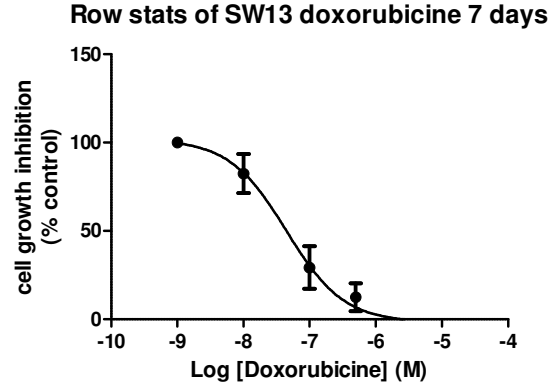
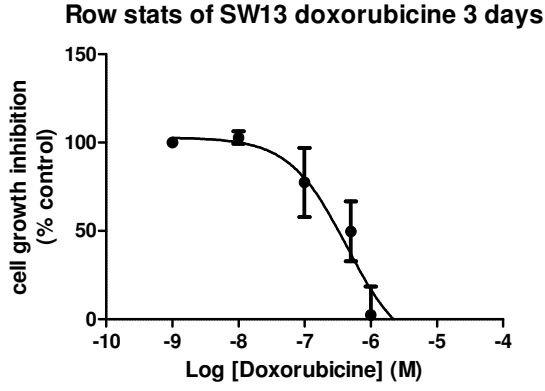
Şekil 4.53. SW13 hücrelerinde Mitotane 3 ve 7 günlük IC50 değerlerini gösteren grafik.



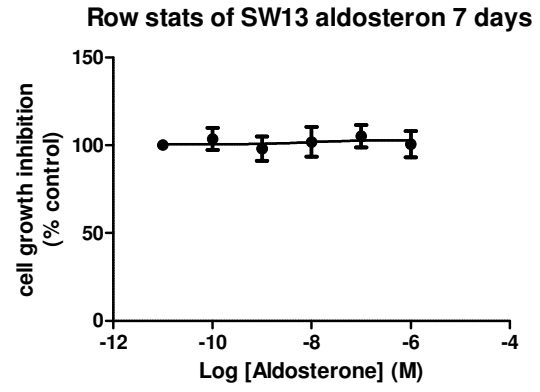
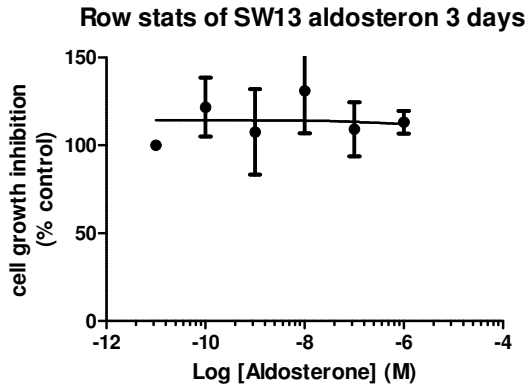
Şekil 4.54. SW13 hücrelerinde Cisplatin 3 ve 7 günlük IC50 değerlerini gösteren grafik.



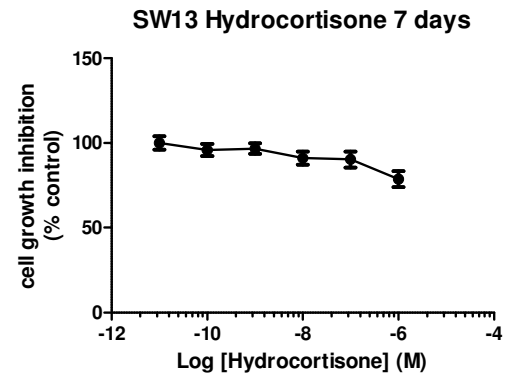
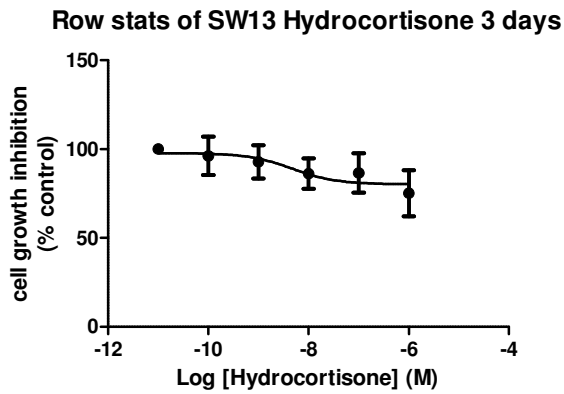
Şekil 4.55. SW13 hücrelerinde Etoposide 3 ve 7 günlük IC50 değerlerini gösteren grafik.



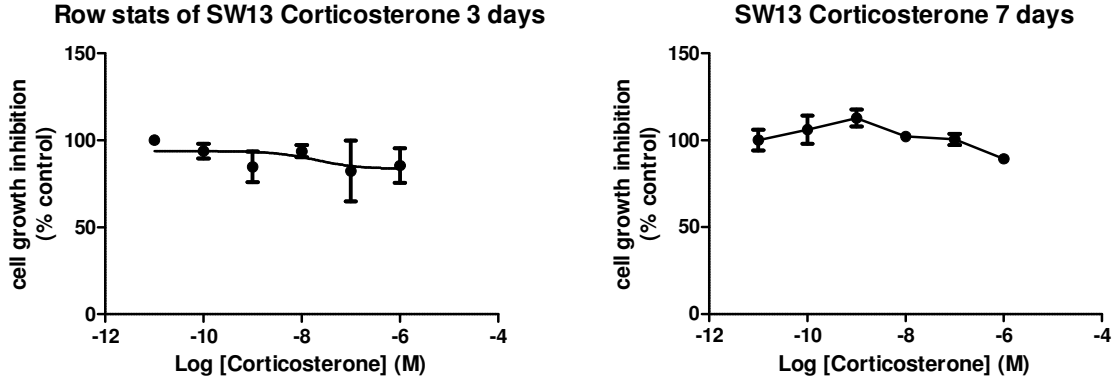
Şekil 4.56. SW13 hücrelerinde Doxorubicine 3 ve 7 günlük IC50 değerlerini gösteren grafik.



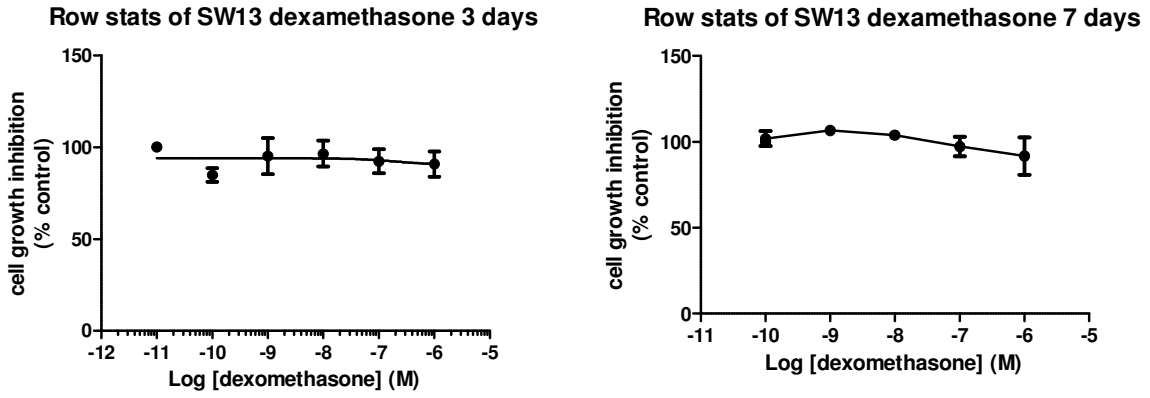
Şekil 4.57. SW13 hücrelerinde Aldosteron 3 ve 7 günlük IC50 değerlerini gösteren grafik.



Şekil 4.58. SW13 hücrelerinde Hidrokortizon 3 ve 7 günlük IC50 değerlerini gösteren grafik.



Şekil 4.59. SW13 hücrelerinde Kortikosteron 3 ve 7 günlük IC50 değerlerini gösteren grafik.



Şekil 4.60. SW13 hücrelerinde Dexamethasone 3 ve 7 günlük IC50 değerlerini gösteren grafik.

Bu grafiklere göre IC50 değerleri hesaplanarak Tablo4.1-2 de listelenmiştir.

Tablo4.1 İlaçların hücrelere göre IC50 değerleri

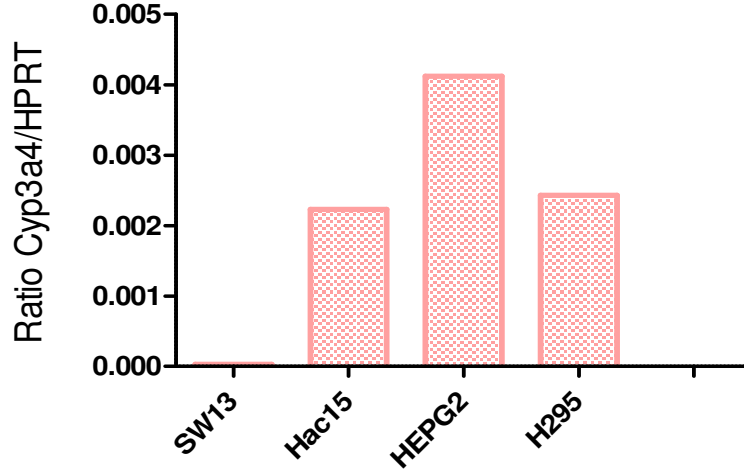
Drugs	Days	SW13 IC50 (M)	H295 IC50(M)
Mitotane	3	2,234 10 ⁻⁵	1,06 10 ⁻⁵
Mitotane	7	4,301 10 ⁻⁵	1,06 10 ⁻⁵
Cisplatine	3	6,269 10 ⁻⁶	3,386 10 ⁻⁷
Cisplatine	7	2,941 10 ⁻⁵	2,364 10 ⁻⁶
Etoposide	3	4,318 10 ⁻⁷	9,407 10 ⁻⁷
Etoposide	7	2,564 10 ⁻⁷	7,307 10 ⁻⁷
Doxorubicine	3	4,321 10 ⁻⁷	4,629 10 ⁻⁷
Doxorubicine	7	4,459 10 ⁻⁸	2,604 10 ⁻⁷

Tablo 4.2. Steroidlerin hücrelere göre IC50 değerleri.

Steroids	Days	SW13 IC50 (M)	H295 IC50(M)
Aldosteroids	3	1,547 10 ⁻⁷	6,747 10 ⁻⁷
Aldosteroids	7	9,457 10 ⁻⁹	3,373 10 ⁻⁷
Hydrocortisone	3	4,738 10 ⁻⁹	7,601 10 ⁻⁸
Hydrocortisone	7	1,9 10 ⁻⁷	5,410 10 ⁻⁹
Corticosterone	3	2 10 ⁻⁸	2,347 10 ⁻⁷
Corticosterone	7	2,815 10 ⁻⁷	1,850 10 ⁻⁸
Dexamethasone	3	2,345 10 ⁻⁷	6,358 10 ⁻¹⁰
Dexamethasone	7	1,432 10 ⁻⁷	8,463 10 ⁻⁹

4.4. RT-qPCR

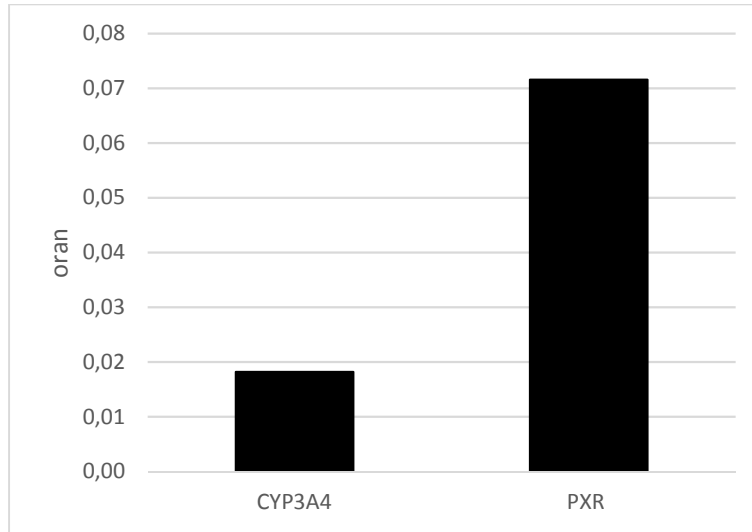
AKK hücrelerinde CYP3A4 ve PXR üzerinde ilaç ve steroidlerin nasıl bir etkisi olduğu hala araştırılmaktadır. Bununla ilgili deney sonuçları netlik kazanmadığı için burada sunulmayacaktır. Başlangıç çalışmaları için çeşitli AKKhücre hatlarında (SW13, HAC15, H295) ve karaciğer kanseri hücre hattında (HepG2) CYP3A4 ekspresyonlarına bakıldı.



Şekil 4.61. AKK ve karaciğer kanseri hücre hatlarında CYP3A4 ekspresyonu

Buna göre SW13 hücrelerinde CYP3A4 geni eksprese olmamıştır. HepG2 hücreleri karaciğer hücreleri olduğu için CYP3A4 ekspresyonu beklenildiği gibidir.

H295 hücrelerinde CYP3A4 ekspresyonları görüldükten sonra hem CYP3A4 hem de PXR ekspresyonlarına bakıldı. PXR önemli ölçüde H295 hücrelerinde eksprese oldu.

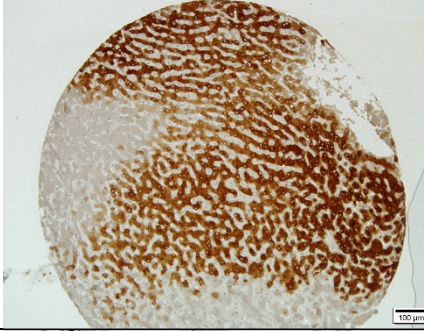
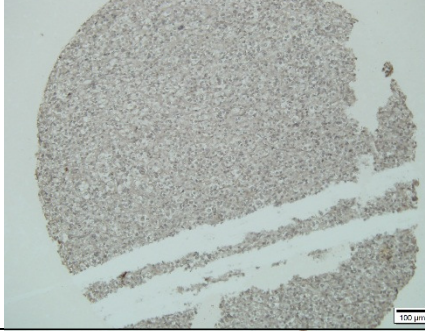
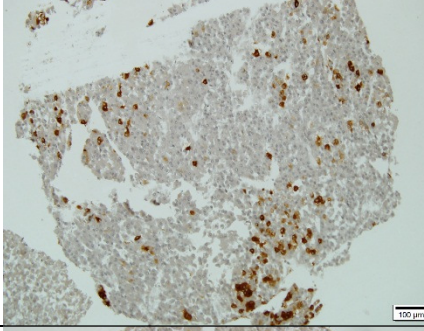
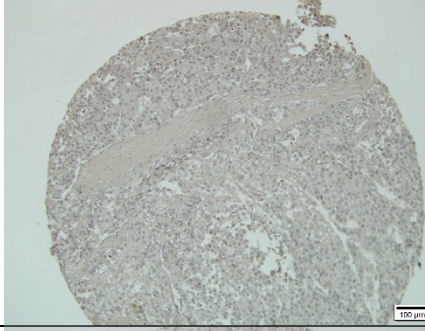
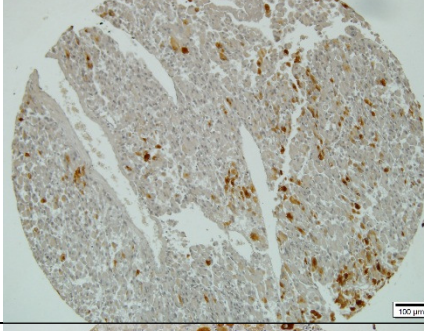
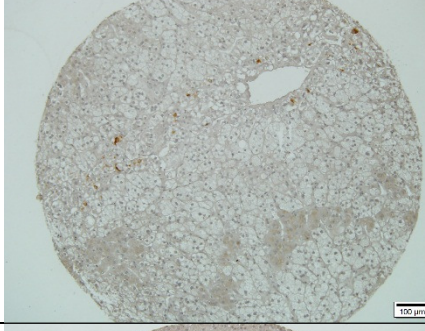
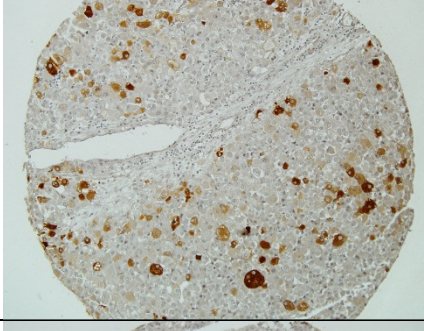
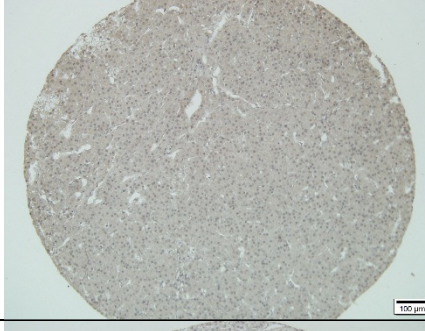
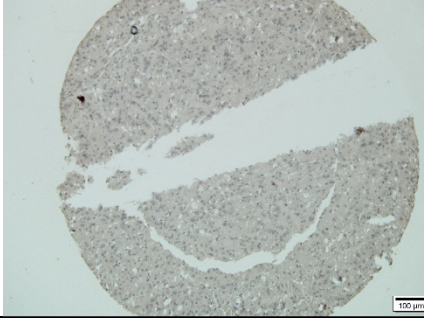
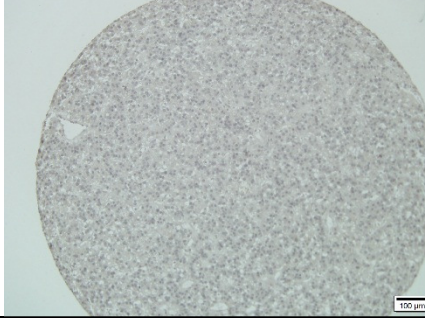


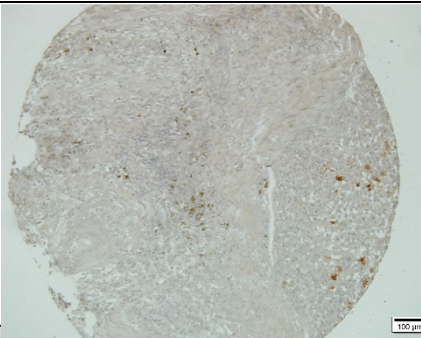
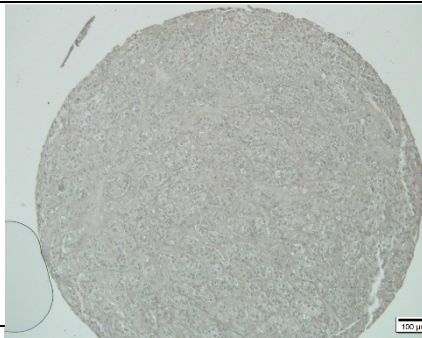
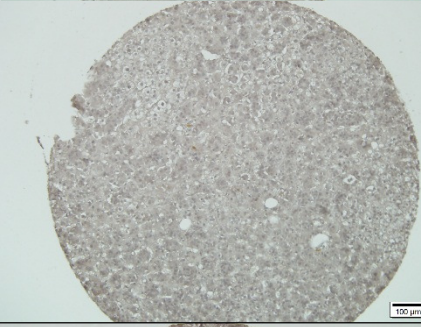
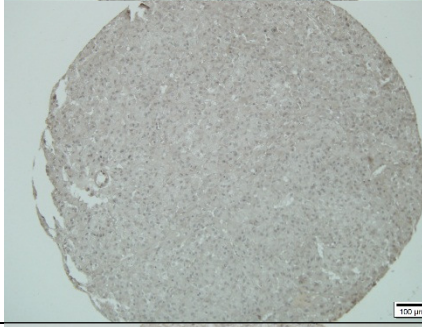
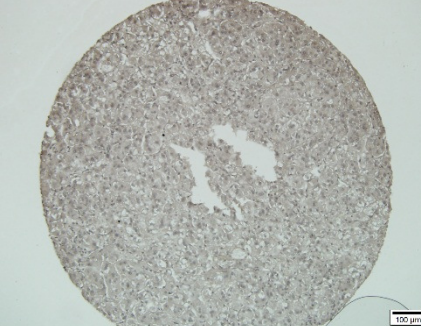
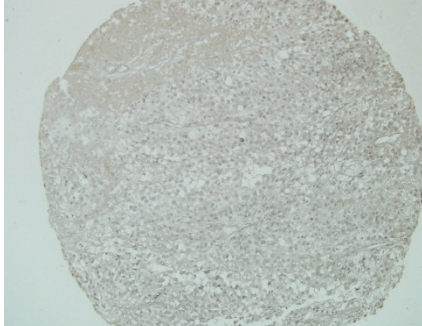
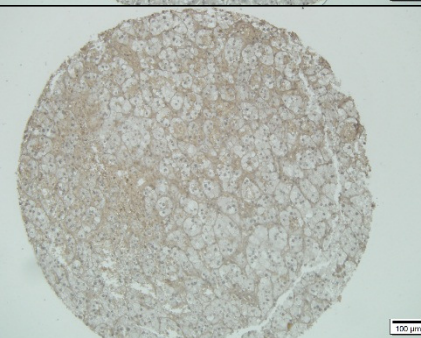
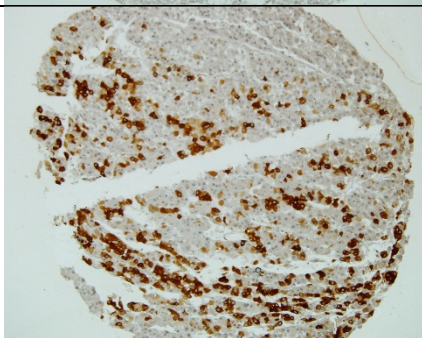
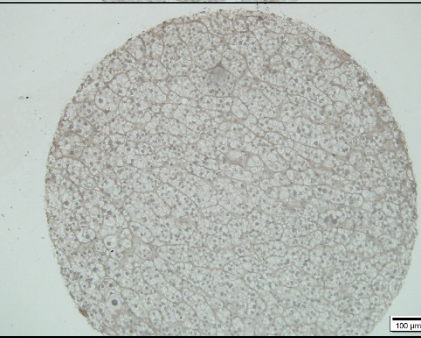
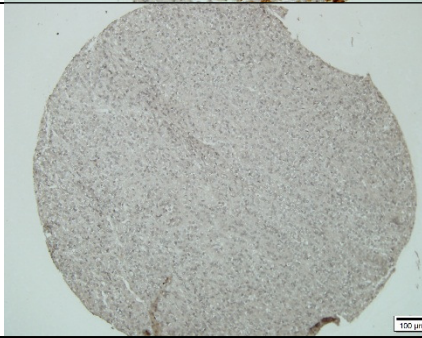
Şekil 4.62 H295 hücre hatlarında CYP3A4 ve PXR ekspresyon düzeyleri.

4.5. İmmünohistokimya

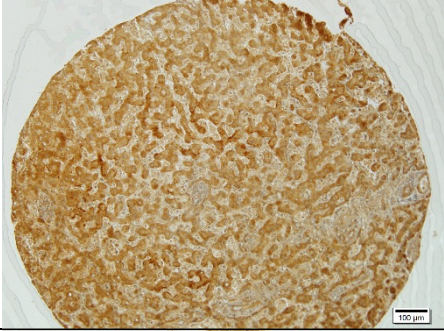
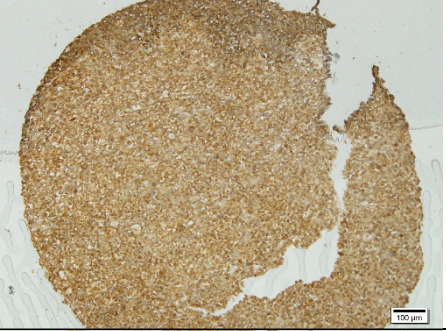
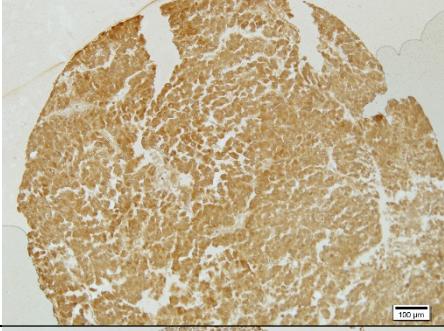
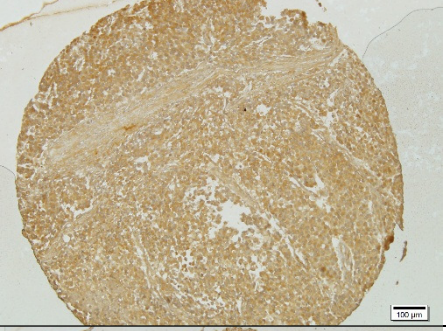
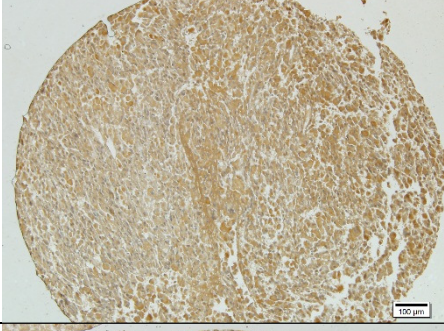
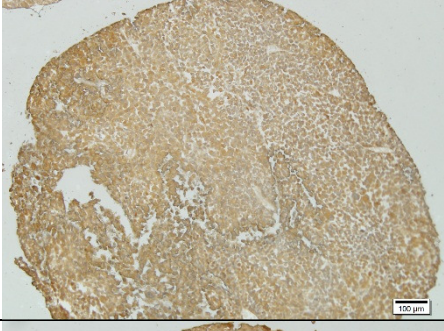
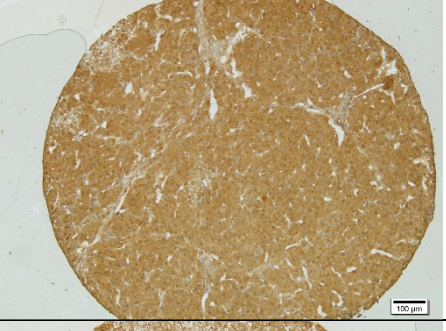
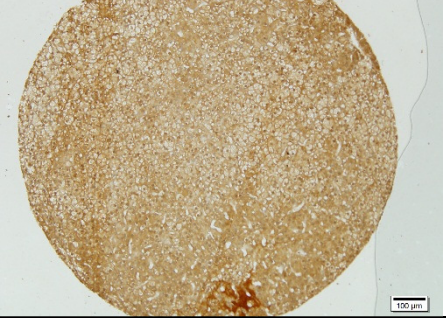
CYP3A4 ve PXR antikorları ile yapılan IHC boyamalarının sonuçları tablo halinde verildi.

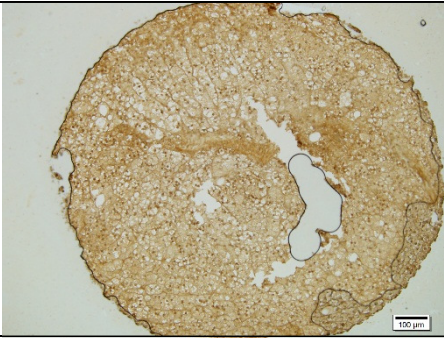
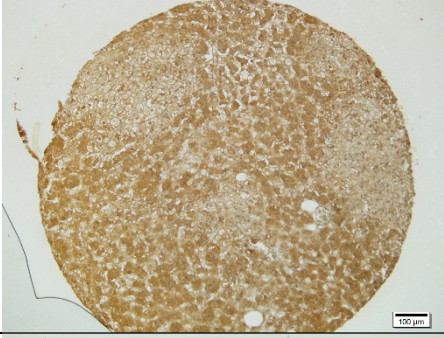
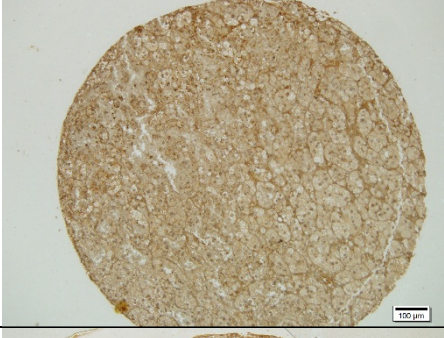
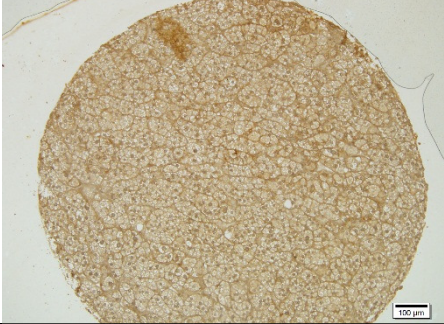
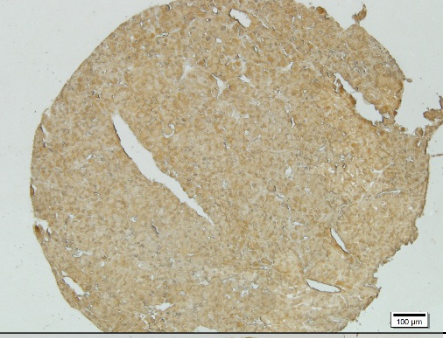
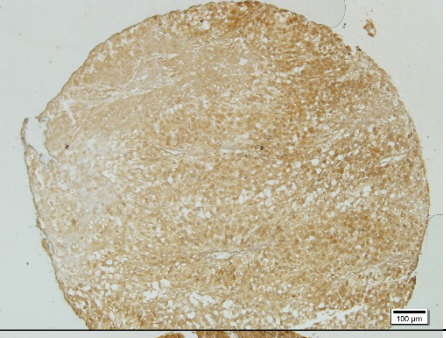
Tablo 4.3. CYP3A4 antibadileri ile adrenal dokulardaki hastalara göre IHC boyamaları

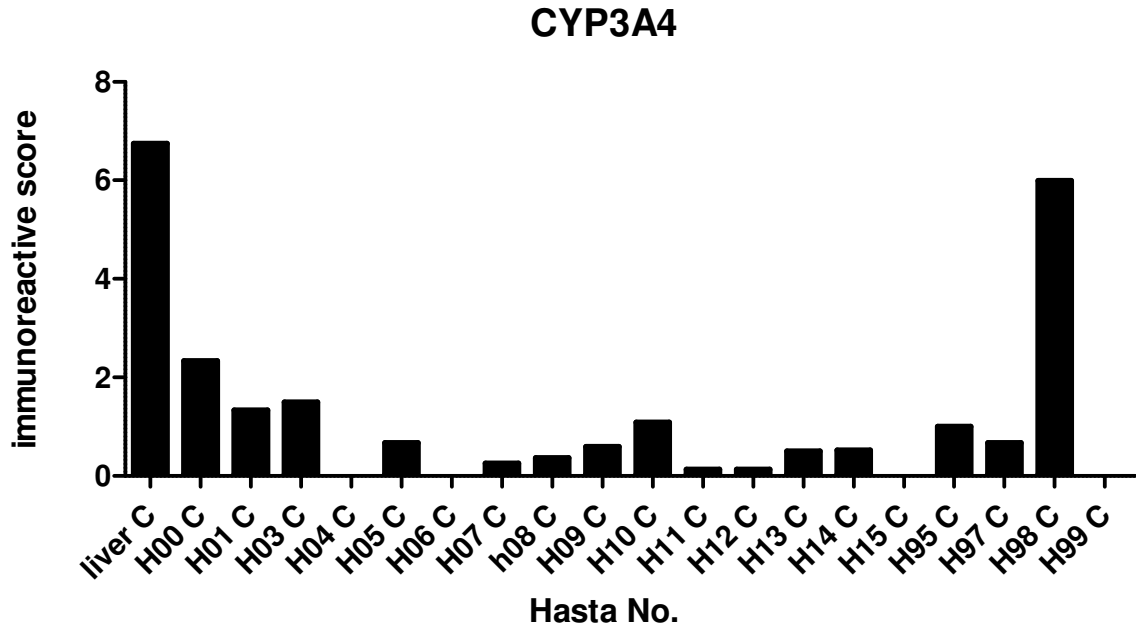
KARACİĞER CYP3A4		H05 CYP3A4	
H00 CYP3A4		H06 CYP3A4	
H01 CYP3A4		H07 CYP3A4	
H03 CYP3A4		H08 CYP3A4	
H04 CYP3A4		H09 CYP3A4	

H10 CYP3A4		H15 CYP3A4	
H11 CYP3A4		H95 CYP3A4	
H12 CYP3A4		H97 CYP3A4	
H13 CYP3A4		H98 CYP3A4	
H14 CYP3A4		H99 CYP3A4	

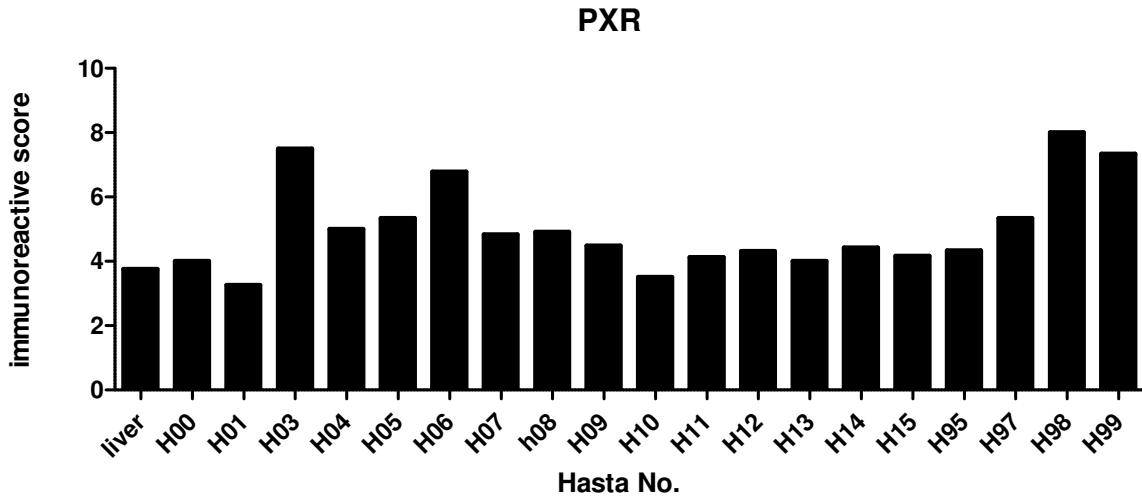
Tablo 4.4. PXR antibadileri ile adrenal dokulardaki hastalara göre IHC boyamaları

KARACİĞER PXR		H05 PXR	
H00 PXR		H06 PXR	
H01 PXR		H07 PXR	
H03 PXR		H08 PXR	
H04 PXR		H09 PXR	

H10 PXR		
H11 PXR		
H12 PXR		
H13 PXR		
H14 PXR		
H15 PXR		
H95 PXR		
H97 PXR		
H98 PXR		
H99 PXR		



Şekil 4.63. Hastalara göre CYP3A4 immunoreaktif skor grafikleri



Şekil 4.64. Hastalara göre PXR immunoreaktif skor grafikleri

5. TARTIŞMA

Adrenokortikal karsinom, her yıl 1 milyonda 0,7-2,0 oranında görülen nadir bir kanserdir. Ayrıca metastatik durumlarda %15'inden daha az AKK'li hastalarda 5 yıllık sağ kalım süresi göz önüne alınırsa kötü prognoza sahiptir ve sitotoksik tedaviye karşı yanıtıdır (14). AKK'de Mitotane'in uzun sağ kalım süresine olan etkisi, hastaların çoğunda, standart sistemik tedavinin ilk 6 ayı içinde ve hemen hemen tümü birinci yılda Mitotane'a cevap vermektedirler (15). Mitotane, adrenokortikal karsinoma tedavisinde kullanılan referans ilaçtır. Mitotane'in farmakolojik aktivitesi, o, p'-DDE (diklorodifeniletan) ve o, p'-DDA (diklorodifenilasetat) gibi iki aktif metabolitlerdeki ilaç transformasyonuna bağımlı görünmektedir (16). Bazı tedavi protokollerinde kemoterapi ilaçları yanında Mitotane verilmektedir. AKK'de etkili olduğu düşünülerek uygulanan kemoterapi ilaçları Etoposide, Cisplatin ve Doxorubicine dir (14). Çalışmamızda AKK hücreleri olan SW13 ve H295 hücrelerine çeşitli konsantrasyonlarda etoposide, cisplatine, doxorubicine uyguladığımızda yüksek konsantrasyonlarda hücre gelişimini durdurduğunu gördük. Yapılan bir çalışmada, doxorubicine ile Mitotane AKK hücrelerinde etkili olduğu belirtilmiştir (17). Bizim çalışmamızda Mitotane'nın etkisinin etoposide'in etkisi ile de kıyaslandığında AKK hücrelerinin gelişimini inhibe ettiği gösterildi. Mitotane kemoterapi ilaçları ile birlikte kullanılmadan da AKK hücreleri üzerinde etkili olduğu görüldü. Çalışmamızda steroidlerinde AKK hücreleri üzerindeki etkilerine bakıldı. Mitotane CYP3A4 ekspresyonunu indüklediği, böylece steroidler de dahil olmak üzere çeşitli ilaçların metabolik klirensini hızlandırdığı bir yayında belirtilmiştir (18). Steroidlerin AKK hücrelerinde hiçbir etkisi görülmediği çalışmamızda gösterildi ve RTqPCR çalışmaları ile de CYP3A4 üzerindeki etkisi gösterilecektir. Yapılan immunohistokimya çalışmalarında CYP3A4 çoğunlukla eksprese olmadığı ve dolayısıyla mitotane veya kemoterapi ilaçlarının CYP3A4 üzerinde inhibe edici etkisi gösterdiği IHC boyamalarında görülmüştür.

Bir yayında CYP450 ailesinin transkripsiyonel uyarıcıları ile farmakolojik ajanlar arasındaki etkileşimler, ilaç etkinliğini azaltabilir ve yan etkilere neden olabilir. Bu tür etkileşimler, pregnane X reseptörü (PXR) antagonisti kullanılarak önlenilebileceği belirtilmiştir (19). Nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesi olan PXR (NR1I2), metabolik sendrom, ksenobiyotik metabolizması, inflamatuvar yanıtlar, glikoz, kolesterol ve lipid metabolizması ve endokrin homeostaz gibi besleyici metabolizma ve metabolik detoksifikasyonun önemli bir düzenleyicisidir (20).

PXR ve CYP3A4 birlikte hareket etmektedir. PXR'in aktifleşmesi CYP3A4'ün eksprese olması demektir (21). Yaptığımız IHC boyamalarında PXR ekspresyonu çok iyi görülürken, CYP3A4 boyama skorları çok düşüktür. Bizim sonuçlarımıza göre PXR'in aktive olması CYP3A4'ü inhibe etmiştir. Aslında PXR için birçok kimyasal uygundur. Çeşitli kemoterapi ilaçlarının yanı sıra dexamethasone gibi steroidleri de tanımaktadır (22). PXR karaciğer metabolizmasının en iyi düzenleyicisi olarak bilinir (23). Çalışmamızda IHC boyamalarında kontrol doku olarak karaciğer dokusunu kullandık ve PXR karaciğerde CYP3A4'e göre daha düşük skora sahiptir. Aralarındaki ters ilişki kontrol olarak kullanılan karaciğer dokusunda da görülmüştür. Ama kaynakların çoğu CYP3A4 enzimlerinin ve genlerinin PXR ile düzenlendiğini belirtir (22). Yapılan bir çalışmada PXR'ı inhibe ederek ilaçların ovaryum kanserine nasıl etki ettiğine bakıldı ve kemoterapi ilaçlarının etkisinin belirli bir seviyede arttığı belirtildi (24). PXR adrenal steroid homeostazında önemli bir endobiyotik rol oynar. PXR aktivasyonu, kortikosteron ve aldosteronun plazma konsantrasyonunu rodentlerde artırdı. Artmış kortikosteron ve aldosteron seviyeleri, sitokrom P450 (CYP) 11a1, CYP11b1, CYP11b2 ve 3beta-hidroksisteroid dehidrojenaz da dahil olmak üzere adrenal steroidojenik enzimlerin aktivasyonu ile ilişkilendirildi. PXR aktive olan transgenik farelerde adrenal korteks hipertrofisi, glukokortikoid sirkadyen ritim kaybı ve psikojenik strese karşı glukokortikoid yanıt eksikliği görülmüştür. PXR'ı aktive olmuş transgenik farelerin ACTH'sı normal seviyelerdedir. Kortikosteronun baskılanması Dekametazonun etkisini değiştirmedi. PXR'nin, steroid homeostazı ve ilaç-hormon etkileşiminde geniş etkileri olabilecek potansiyel bir endokrin bozucu faktör olduğu bir çalışmada açıklandı (25).

Sonuç olarak çalışmamızda AKK hücreleri üzerinde kemoterapi ilaçları ve mitotane inhibe edici etkisi olduğu gösterildi. Bu etki mekanizmasında CYP3A4 ve PXR'in etkili olabileceği IHC çalışması ile kanıtlanırsa da RT-qPCR çalışmaları devam etmektedir.

Kaynaklar:

1. Allolio B, Hahner S, Weismann D, Fassnacht M Management of adrenocortical carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004 60:273-287
2. Dackiw AP, Lee JE, Gagel RF, Evans DB Adrenal cortical carcinoma. *World J Surg* 2001 25:914-926
3. Ng L, Libertino JM Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. *J Urol* 2003 169:5-11
4. Kroiss M, Quinkler M, Lutz WK, Allolio B, Fassnacht M Drug interactions with mitotane by induction of CYP3A4 metabolism in the clinical management of adrenocortical carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011 75:585-591
5. Goldwasser F, Bertagna X Chemotherapy of adrenocortical carcinoma. *Adrenal cancer* (ed Xavier Bertagna) John Libbey Eurotext, Montrouge, France 2006 pp. 59-70
6. Medina-Diaz IM, Elizondo G Transcriptional induction of CYP3A4 by o,p'-DDT in HepG2 cells. *Toxicol Lett* 2005 157:41-47
7. Patel J, Mitra AK Strategies to overcome simultaneous P-glycoprotein mediated efflux and CYP3A4 mediated metabolism of drugs. *Pharmacogenomics* 2001 2:401-415
8. Sakurai K, Enomoto K, Matsuo S, Amano S, Shiono M CYP3A4 expression to predict treatment response to docetaxel for metastasis and recurrence of primary breast cancer. *Surg Today* 2011 41:674-679
9. Ihunnah CA, Jiang M, Xie W Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. *Biochim Biophys Acta* 2011 1812:956-963
10. Takeshita A, Igarashi-Migitaka J, Koibuchi N, Takeuchi Y Mitotane induces CYP3A4 expression via activation of the steroid and xenobiotic receptor. *J Endocrinol* 2013 216:297-305
11. Van Erp NP, Guchelaar HJ, Ploeger BA, Romijn JA, Hartigh J, Gelderblom H Mitotane has a strong and a durable inducing effect on CYP3A4 activity. *Eur J Endocrinol* 2011 164:621-626
12. Nishimura M, Naito S, Yokoi T Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 2004 19:135-149

13. Yokose T, Doy M, Taniguchi T, Shimada T, Kakiki M, Horie T, Matsuzaki Y, Mukai K. Immunohistochemical study of cytochrome P450 2C and 3A in human non-neoplastic and neoplastic tissues. *Virchows Arch* 1999 434:401-411
14. Wong E, Jacques S, Bennett M, Gorolay V, Lee A, Clarke S. Complete response in a patient with stage IV adrenocortical carcinoma treated with adjuvant trans-catheter arterial chemo-embolization (TACE). *Asia Pac J Clin Oncol*. 06 Eylül 2017;
15. Vezzosi D, Do Cao C, Hescot S, Bertherat J, Haissaguerre M, Bongard V, vd. Time Until Partial Response in Metastatic Adrenocortical Carcinoma Long-Term Survivors. *Horm Cancer*. 25 Ekim 2017;
16. Cusato J, De Francia S, Allegra S, Carrella S, Pirro E, Piccione FM, vd. Circannual variation of mitotane and its metabolites plasma levels in patients with adrenocortical carcinoma. *J Pharm Pharmacol*. Kasım 2017;69(11):1524–30.
17. Borges KS, Andrade AF, Silveira VS, Marco Antonio DS, Vasconcelos EJR, Antonini SRR, vd. The aurora kinase inhibitor AMG 900 increases apoptosis and induces chemosensitivity to anticancer drugs in the NCI-H295 adrenocortical carcinoma cell line. *Anticancer Drugs*. Temmuz 2017;28(6):634–44.
18. Terzolo M, Zaggia B, Allasino B, De Francia S. Practical treatment using mitotane for adrenocortical carcinoma. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. Haziran 2014;21(3):159–65.
19. Lin Y-N, Chen C-J, Chang H-Y, Cheng W-K, Lee Y-R, Chen J-J, vd. Oleanolic Acid-Mediated Inhibition of Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor Attenuates Rifampin-Isoniazid Cytotoxicity. *J Agric Food Chem*. 04 Ekim 2017;65(39):8606–16.
20. He L, Zhou X, Huang N, Li H, Li T, Yao K, vd. Functions of pregnane X receptor in self-detoxification. *Amino Acids*. 22 Mayıs 2017;
21. Smutny T, Mani S, Pavsek P. Post-translational and Post-transcriptional Modifications of Pregnane X Receptor (PXR) in Regulation of the Cytochrome P450 Superfamily. *Curr Drug Metab*. Aralık 2013;14(10):1059–69.

22. Ratajewski M, Grzelak I, Wiśniewska K, Ryba K, Gorzkiewicz M, Walczak-Drzewiecka A, vd. Screening of a chemical library reveals novel PXR-activating pharmacologic compounds. *Toxicol Lett.* 05 Ocak 2015;232(1):193–202.
23. Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:261–311.
24. Masuyama H, Nakamura K, Nobumoto E, Hiramatsu Y. Inhibition of pregnane X receptor pathway contributes to the cell growth inhibition and apoptosis of anticancer agents in ovarian cancer cells. *Int J Oncol.* Eylül 2016;49(3):1211–20.
25. Zhai Y, Pai HV, Zhou J, Amico JA, Vollmer RR, Xie W. Activation of pregnane X receptor disrupts glucocorticoid and mineralocorticoid homeostasis. *Mol Endocrinol Baltim Md.* Ocak 2007;21(1):138–47.