

Zoledronik Asidin BCPAP Tiroid Papiller Karsinomu Hücre Hattında Etkileri

Effects of Zoledronic Acid in BCPAP Thyroid Papillary Carcinoma Cell Line

İlgin Yıldırım Sımsır¹, Gökçen Ünal Kocabaş¹, Çığır Buray Avcı², Füsün Saygılı¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Ana Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

ÖZ

GİRİŞ ve AMAÇ: Türkiye’de sıklığı %3.7 olarak tanımlanan tiroid kanserleri en sık görülen endokrin neoplazilerdir. Mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yolağındaki proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyon ve yeniden düzenlemeler, diferansiye tiroid kanseri gelişimi ve ilerlemesi için giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Bisfosfonatlar invitro olarak; tümör hücre proliferasyonunu azaltır, hücre viabilitesini azaltır, tümör hücre apoptosisini uyarır, hücre adezyonu inhibisyonu yapar, anjiyogeneze inhibisyon ve metastatik potansiyelde azalma yaparlar. Çalışmamızda zoledronik asit monohidratın tiroid papiller karsinomu hücre hattında sitotoksikite ve apoptozis üzerine etkileri araştırılmıştır.

YÖNTEM ve GEREÇLER: İnsan kökenli bir papiller tiroid karsinomu hücre hattında (BCPAP) bisfosfonat olarak zoledronik asit monohidratın 10-100 µM şeklinde artan dozları kullanıldı.

BULGULAR: BCPAP hücre hattında zoledronik asit monohidratın IC50 değeri 1. deneyde 48. saatte 55 µM olarak saptandı. Ancak 2, 3 ve 4. deneylerde sonuç alınamadı. Bu nedenle apoptozis deneyleri kurulmadı.

TARTIŞMA ve SONUÇ: Zoledronik asit, çalıştığımız doz aralığında tiroid papiller karsinomu hücre hattında etkisiz bulunmuştur..

Anahtar Kelimeler: papiller tiroid karsinomu, BCPAP hücre hattı, zoledronik asit

ABSTRACT

INTRODUCTION: Thyroid cancer is the most common endocrine neoplasm with an incidence of 3.7% in Turkey. Mutations and re-arrangements in genes encoding proteins of the the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway for the development and progression of differentiated thyroid cancer, gain more and more importance. Bisphosphonates decrease tumor cell proliferation, reduce cell viability, stimulate apoptosis in tumor cell, inhibit cell adhesion and angiogenesis, and decrease metastatic potential in vitro. In our study, the effects of zoledronic acid monohydrate on cytotoxicity and apoptosis in thyroid papillary carcinoma cell line were investigated.

METHODS: Zoledronic acid monohydrate with increasing doses of 10 to 100 µM was used on a papillary thyroid carcinoma cell line of human origin named BCPAP.

RESULTS: IC50 value with zoledronic acid monohydrate was found in first experiment at 48th hour to be 55 µM, but 2nd, 3rd and 4th experiments were failed. Therefore, apoptosis assays were not to be established.

DISCUSSION and CONCLUSION: Zoledronic acid was found to be ineffective in the thyroid papillary carcinoma cell line at the dose range we were working with

Keywords: papillary thyroid carcinoma, BCPAP cell line, zoledronic acid

İletişim / Correspondence:

Dr. İlgin Yıldırım Şimşir

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

E-mail: ilginyildirim@hotmail.com

Başvuru Tarihi: 06.02.2019

Kabul Tarihi: 13.03.2019

GİRİŞ

Tiroid kanserleri en sık görülen endokrin malignitelerdir. Türkiye’de yapılan bir otopsi serisinde sıklığı %3.7 olarak bulunmuştur (1). Tiroid kanserlerinin prevalansı bölgede iyot eksikliği olup olmamasına, guatr sıklığına, yaşa ve cinsiyete göre değişmektedir (2). Tiroid kanserli hastaların klinik başvuru bulgusu tiroid nodülü şeklinde olur ve tüm nodüllerin ortalama %4-6.5’i kanserdir (3-6). Papiller tiroid kanseri patolojik tanısı alan vakalarda total tiroidektomi seçilecek tedavi yöntemidir.

Bifosfonatlar, invitro olarak tümör hücre proliferasyonunu ve viabilitesini azaltır, tümör hücrelerinde apoptozisi uyarır, adezyon inhibisyonu yapar, metastatik potansiyelde azalma sağlar ve anjiyogenezde inhibisyon yaparlar. Hem osteoporoz tedavisinde hem de profilaksisinde en çok kullanılan ajan, bifosfonatlardır. Ayrıca multipl myelom, meme karsinomu, prostat karsinomu, pankreas karsinomu, akciğer karsinomu ve osteosarkom üzerine etkileri gösterilmiştir. Amin içerikli bifosfonatlar HMG-CoA redüktaz yolağı enzimi olan farnesyl pirofosfat (FPP) sentazı bağlayıp bloke ederek FPP ve metaboliti olan geranilgeranil pirofosfat (GGPP) oluşumu engeller, böylece kemik metabolizması üzerine etki eder. FPP ve GGPP, küçük GTP-bağlayıcı proteinlerin izoprenilasyonu için gereklidirler. İzoprenilasyon, proteinlerin hidrofobik izopren grupları ile hücre zarında sabitlenmesi işlemidir. GTP-bağlayıcı proteinler; ras, rho, rab, rap, rad, ran, rheb, rit ve arf olarak sınıflandırılmışlardır (7).

Diferansiye tiroid karsinomlu hastaların tedavisi cerrahi, radyoaktif iyot ve tiroid hormon tedavisini içerir. Metastatik hastalık oluştuğunda radyoaktif iyot daha küçük bir hasta grubunda tedavi edici olabilir ve tiroid stimulan hormon (TSH) supresif tiroid hormon tedavisi hastalığın ilerleyişini yavaşlatabilir. Bazı hastalarda eksternal radyoterapi faydalı olabilir. Radyoiyot ve TSH supresif tiroid hormon tedavisine rağmen ilerleyen metastatik diferansiye tiroid karsinomlu hastalarda tedavi seçenekleri sınırlıdır. Pek çok tedavi hala araştırma safhasında olmasına rağmen kemoterapiler, progresif hastalık için etkili bir alternatif olabilir.

Metastatik iyi diferansiye tiroid kanseri olan hastalar için en iyi tedavi olan radyoiyot, kemik metastazı olan hastalarda daha az etkilidir. Kemik metastazı olan hastalarda radyoiyot tedavisinin bu umut kırıcı sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, agresif bir cerrahi yaklaşım tavsiye edilir (8). Ama ne yazık ki, tüm kemik metastazları cerrahi rezeksiyona uygun olmayabilir. Bu yüzden, rezeke edilemeyen kemik metastazları ya da multipl kemik metastazı olan hastalarda radyoiyot tedavisine ek olarak RT önerilmektedir. Ağrılı kemik metastazı olan tüm hastalar ağrı kontrolüne yardımcı olması için RT’ye yönlendirilmelidir (8).

Diğer malignitelerle kıyaslandığında oldukça iyi prognostik özellikleri olan diferansiye tiroid kanserleri dediferansiye olduklarında ve/veya iyot tutmayan metastatik durumlarda tedavileri zorlaşmaktadır. Bu durumda ya da kötü prognostik alt gruplarının tedavileri için yan etki potansiyeli az olan ajanlara ihtiyaç vardır. Bu düşünceden hareketle oluşturulan hipotezle yan etki potansiyeli oldukça az ve kabul edilebilir zoledronik asit monohidratın tiroid papiller karsinomu hücre hattında sitotoksikite ve apoptozis üzerine etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İnsan kökenli papiller tiroid karsinomu hücre hattında (BCPAP) bifosfonat olarak etki gücü etidronata göre en yüksek olan zoledronik asit monohidratın 10-100 µM şeklinde artan dozları ile sitotoksikite ve apoptozis değerlendirilmiştir.

BCPAP Hücre Hattı ve Özellikleri

BCPAP hücre hattı; 76 yaşında, metastatik papiller tiroid karsinomlu bir bayanın tümör dokusundan 1992 yılında üretilmiştir. İnsan kökenli bir tiroid karsinoma hücre hattıdır. İğsi veya yuvarlak şekillidir ve tek katmanlı olarak tutunarak çoğalırlar. BCPAP hücreleri, BRAF V600E mutasyonunu homozigot olarak taşır (9), sodyum iyot simporteri (NIS) endojen olarak eksprese etmektedirler (10). BCPAP hücreleri TSH reseptörü ve tiroglobulin (Tg) negatiftir.

Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi desteği (proje takip no 2.100.2012.0175, proje no

13-TIP-002) ile BCPAP hücre hatları DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)'den satın alınmıştır.

Hücre kültürlerinde hem deney kurarken gerekse hem de zoledronik asidin sitotoksik etkilerini belirlerken hücreye ait canlılık parametreleri ölçüldü.

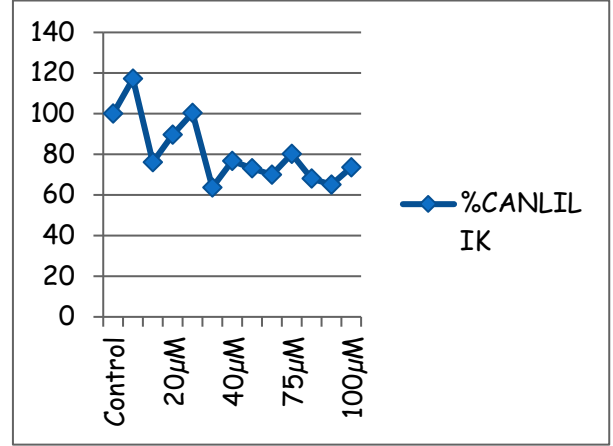
Sitotoksosite Değerlendirilmesi

Zoledronik asid monohidratın 24-48 ve 72. saatlerdeki sitotoksik etkilerini değerlendirmek için Water Soluble Tetrazolium (WST)-1 hücre canlılık kiti kullanıldı. Zoledronik asid monohidrat ile muamele edilen hücreler 96 kuyucuklu plaklara pipetlendi. Her kuyucukta 100 µl hücre olacak şekilde pipetleme yapıldıktan sonra her kuyucuğa 10µl WST-1 hücre canlılık kiti eklendi. Hücreler 3-4 saat inkübatörde bekletildi. WST-1 konulduktan sonra her kuyucuğun absorban değeri spektrofotometrik olarak mikropilaka okuyucuda 480 nm'de ölçüldü. Her deney 3 kez tekrarlandı. Yüzde canlılık ve dolaylı olarak sitotoksosite değerleri hesaplandı.

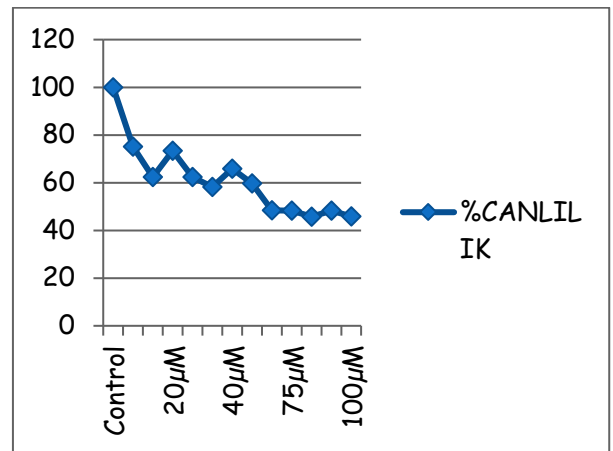
Maksimum inhibitör konsantrasyonun yarısını ifade eden IC50 değeri hesaplanması için sitotoksosite değerleri CalcuSyn 2.0 programına girildi. Zoledronik asid monohidratın 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 55, 75, 80, 90 ve 100 µM şeklinde artan dozları kullanıldı. Her konsantrasyon için üç kuyucuk kullanıldı. İlaç konulmayan sadece hücre ve besiyeri içeren kuyucuklar pozitif kontrol olarak kabul edildi. Hücre ve ilaç içermeyen kuyucuklar ise sadece besiyeri eklenerek negatif kontrol olarak kullanıldı.

BULGULAR

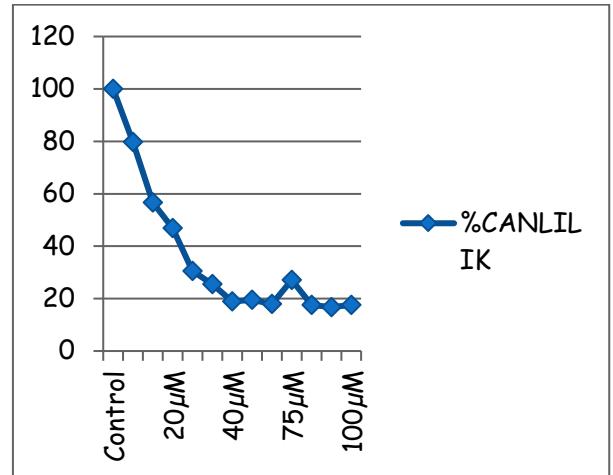
BCPAP hücre hattında zoledronik asid monohidratın IC50 değeri, birinci deneyde 48. saatte 55 µM olarak hesaplandı (Grafik 1, 2 ve 3). Ancak tekrarlanan 2, 3 ve 4. deneylerde sonuç alınamadı. BCPAP hücre dizisi üzerinde zoledronik asidin etkilerini göstermek amacıyla yaptığımız bu çalışma iki aşamadan oluştu; tripan mavisi ile hücre canlılığının değerlendirilmesi ve WST-1 yöntemi ile sitotoksitenin değerlendirilmesi yapıldı. Tekrarlanan deneylerde IC50 dozu bulunamadığı yani sitotoksik etki gösterilemediği için apoptozis değerlendirilemedi.



Şekil 1. Zoledronik Asid Monohidratın BCPAP hücrelerinde 24. saatte doz cevap eğrisi



Şekil 2. Zoledronik Asid Monohidratın BCPAP hücrelerinde 48. saatte doz cevap eğrisi



Şekil 3: Zoledronik Asid Monohidratın BCPAP hücrelerinde 72. saatte doz cevap eğrisi

TARTIŞMA

Çalışmamızda; 48. saatte zoledronik asid monohidratın 55 µM dozunda IC50 elde edebildik, sitotoksik etkisini gördük. Ancak tekrarlanan deneylerde aynı sonuçları elde edemedik. Bu nedenle apoptozis deneyleri kurulmadı. Sadece tek

deneyde sitotoksiste gözlemlememiz hücrelerin yaşlı ve yetersiz olması nedeniyle apoptozisten çok nekroz gelişmesi ya da zoledronik asidin etkisizliği olabilir. Zoledronik asit, uzun etkili olmasına rağmen hücre düzeyinde bu uzun etki kötü sonuçlara sebep olmuş olabilir. Yine negatif sonuçlanma ile ilgili olası hipotezlerimiz; BCPAP hücre hattının TSH reseptörü ve Tg negatif olması nedeniyle zoledronik asidin hücre içinde etkisi engellenmiş olabilir. NIS ekspresyonu zoledronik asidin hücre içine alınmasını engelliyor ya da hücre dışına atılımına sebep oluyor olabilir. Mutlaka başka deneylerde zoledronik asidin daha yüksek dozları denenmelidir.

Tiroid kanserlerinin prognozu genelde oldukça iyidir. Olgu spesifik mortalite 5 yılda %2, 10 yılda %4, 20 yılda ise %5'tir. Dediferansiye olduğunda ise takip ve tedavisi ne yazık ki güçleşmektedir. Bu noktada toksisitesi az, etkili seçeneklere ihtiyaç vardır.

Statinler HMG-CoA redüktaz yolağını inhibe eden başka bir ilaç grubudur. Bifosfonatların aksine statinler, kemik yüzeyine yüksek affinite ile bağlanmaz ve bu nedenle kemiğe spesifik değildir. Statinlerin osteoporoz tedavisindeki yerleri tartışmalıdır. Antitümör etkileri ile ilgili çalışmalar vardır, ancak bu çalışmalarda HMG-CoA redüktaz yolağı üzerinden etkisinin yanında artmış oksidatif stresle ilişkisinden bahsedilmektedir (11-14).

Cohen SM ve ark.larının 2012 yılında BCPAP ve anaplastik tiroid kanseri hücre hatları üzerinde yaptıkları çalışmada, sorafenib ve withaferin A kombinasyonunun apoptozisi anlamlı olarak indüklediği gösterilmiştir. Sorafenib ve withaferinin antiproliferatif etkilerinin bilinmesinin yanında kombine kullanımları ile oluşan sinerjistik etki sorafenibin yan etkilere yol açabilecek etkili dozunun azalmasını sağlamıştır (15).

Biz çalışmamızı sürdürürken yayınlanan bir çalışmada; zeytin ağacının fenolik bir bileşeni olan oleuropein ve perasetile türevlerinin BCPAP ve TPC-1 papiller tiroid kanseri hücre hatlarında proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiş, MAPK sinyal yolağı western blot analizi ile kanıtlanmıştır (16).

Son yıllarda tekrarlayan metastatik hastalığı olan ve iyot tutmayan diferansiye tiroid kanserlerinde tirozin kinaz reseptörünün katalitik aktivitesini inhibe eden ve antiproliferatif etki oluşturan tirozin kinaz inhibitörü ilaçlar da başarılı sonuçlarla kullanıma girmiştir. Zoledronik asit ile tirozin kinaz inhibitörlerinin kombinasyonları apoptozis üzerinde farklı yollardan etki eden, çalışması uygun ajanlardır. Literatürde anjiogenez inhibitörleri, immünmodülatör ilaçlar ve gen tedavisi devam eden çalışmalardır.

SONUÇ

Papiller tiroid karsinomunun MAPK yolağı üzerinden ilerlemesi nedeniyle yine bu yolağı inhibe ederek etki gösteren bifosfonatların tümör hücre proliferasyonunu azaltacağı hipotezimiz sonuçsuz kalsa da ileride yapacağımız yeni çalışmaları planlarken yol gösterici olacaktır. BCPAP dışında birkaç farklı papiller tiroid karsinomu hücre hattı (KTC-1, K1 ve TPC1) ile deneyin tekrarı, sonuç alınırsa MAPK/ERK yolağındaki protein ekspresyonlarının incelenmesi ve atorvastatin, rosuvastatin, fluvastatin ve simvastatin ile zoledronik asid monohidratın kombinasyonları bir sonraki çalışmamızı oluşturacaktır. Statinler de HMG-CoA redüktaz yolağı üzerinden etki gösterdikleri için zoledronik asit ile kombinasyonu sonucu additif bir etki beklenmektedir. Klinikimizde şu anda yürütülmekte olan farklı bir tiroid kanseri hücre hattı ile gerçekleştirilen bir çalışmada atorvastatin ile IC50 elde edilip sitotoksik etkisi gösterilmiştir. Bu çalışmanın ön sonuçları, sonraki çalışmamızda beklenen additif etki için ümit uyandırmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Tanriover O, Comunoglu N, Eren B, Comunoglu C, Turkmen N, Dogan M, et al. Occult papillary thyroid carcinoma: prevalence at autopsy in Turkish people. Eur J Cancer Prev 2011 Jul; 20(4): 308-12.
2. Kabalak T. Tiroid El Kitabı. İzmir: Güneş Tıp Kitapevi; 2012. 1. Cilt
3. Werk EE Jr, Vernon BM, Gonzalez JJ, Ungaro PC, McCoy RC. Cancer in thyroid nodules. A community hospital survey. Arch Intern Med 1984; 144(3): 474-6.

4. Belfiore A, Giuffrida D, La Rosa GL, Ippolito O, Russo G, Fiumara A, et al. High frequency of cancer in cold thyroid nodules occurring at young age. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989; 121(2): 197-202.
5. Hegedüs L. Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med* 2004; 351(17): 1764-71.
6. Lin JD, Chao TC, Huang BY, Chen ST, Chang HY, Hsueh C. Thyroid cancer in the thyroid nodules evaluated by ultrasonography and fine-needle aspiration cytology. *Thyroid* 2005; 15(7): 708-17.
7. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 2005 March 1; 118(Pt 5): 843-6.
8. Proye CA, Dromer DH, Carnaille BM, Gontier AJ, Goropoulos A, Carpentier P, et al. Is it still worthwhile to treat bone metastases from differentiated thyroid carcinoma with radioactive iodine? *World J Surg* 1992; 16(4): 640-5.
9. Pilli T, Prasad KV, Jayarama S, Pacini F, Prabhakar BS. Potential utility and limitations of thyroid cancer cell lines as models for studying thyroid cancer. *Thyroid* 2009 Dec; 19(12): 1333-42.
10. Puppin C, D'Aurizio F, D'Elia AV, Cesaratto L, Tell G, Russo D, et al. Effects of histone acetylation on sodium iodide symporter promoter and expression of thyroid-specific transcription factors. *Endocrinology* 2005 Sep; 146(9): 3967-74.
11. Wang W, Le W, Cho DY, Hwang PH, Upadhyay D. Novel effects of statins in enhancing efficacy of chemotherapy in vitro in nasopharyngeal carcinoma. *Int Forum Allergy Rhinol* 2011 Jul-Aug; 1(4): 284-9.
12. Riganti C, Pinto H, Bolli E, Belisario DC, Calogero RA, Bosia A, et al. Atorvastatin modulates anti-proliferative and pro-proliferative signals in Her2/neu-positive mammary cancer. *Biochem Pharmacol* 2011; 82(9): 1079-89.
13. Zhong WB, Wang CY, Chang TC, Lee WS. Lovastatin induces apoptosis of anaplastic thyroid cancer cells via inhibition of protein geranylgeranylation and de novo protein synthesis. *Endocrinology* 2003; 144(9): 3852-9.
14. Sánchez CA, Rodríguez E, Varela E, Zapata E,
15. Páez A, Massó FA, et al. Statin-induced inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation is related to cell cycle arrest and apoptotic and necrotic cell death mediated by an enhanced oxidative stress. *Cancer Invest* 2008; 26(7): 698-707.
16. Cohen SM, Mukerji R, Timmermann BN, Samadi AK, Cohen MS. A novel combination of withaferin A and sorafenib shows synergistic efficacy against both papillary and anaplastic thyroid cancers. *Am J Surg* 2012 Dec; 204(6): 895-900.
17. Bulotta S, Corradino R, Celano M, Maiuolo J, D'Agostino M, Oliverio M, et al. Antioxidant and antigrowth action of peracetylated oleuropein in thyroid cancer cells. *J Mol Endocrinol* 2013 Jun 29; 51(1): 181-9.