

HeLa Hücrelerinde Sisplatinin MTOR, AKT, CCND1 ve STAT3 mRNA İfadesi Üzerine Etkileri

The Effects of Cisplatin on MTOR, AKT, CCND1 and STAT3 mRNA Expressions on HeLa Cells

Ebru Alp¹, Akın Yılmaz², Hacer İlke Önen³, Ece Konaç³, Abdullah Ekmekçi³, Emine Sevda Menevşe³, Adnan Menevşe³

¹Giresun Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Giresun, Türkiye

²Hitit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 19030, Corum, Türkiye

³Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 06510, Beşevler, Ankara, Türkiye

ÖZET

Giriş: Serviks kanseri, kadınlarda gözlenen malign tümörler arasında en yaygın görülen ve kadınlarda kanser sonucu gözlenen ölümler arasında ikinci sırada bulunan önemli bir hastalıktır. Platin temelli bir bileşik olan sisplatin (CDDP) bu kanserin tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapötik ajanlardan birisidir ve sarkomlar ile solid tümörlerin tedavisinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır. CDDP DNA'ya çapraz bağlanıp replikasyonu engelleyerek hasar oluşumuna neden olur. Bunun sonucunda da apoptotik yollar aktive olur ve hücre ölümü gerçekleşir. Çalışmamızda CDDP'nin, mTOR, AKT, Siklin D1 (CCND1) ve STAT3 genlerinin mRNA ifadesindeki etkisini serviks kanseri hücre hattı HeLa üzerinde araştırmayı amaçladık.

Yöntem: Bu çalışmada HeLa hücrelerine 24 ve 48 saat süre ile değişen konsantrasyonlarda sisplatin uygulandı. Hücre canlılığı XTT yöntemi ile belirlendi. Ayrıca, seçilen CDDP dozlarının uygulanmasından sonra, mTOR, AKT, CCND1 ve STAT-3 genlerinin mRNA ifadesi qPCR yöntemi ile araştırıldı.

Bulgular: CDDP'nin IC₅₀ değerinin 24 saat için yaklaşık 60 µM, 48 saat için ise yaklaşık 8 µM olduğunu belirledik. Ayrıca, analizi yapılan genlerin ifadelerinin sadece 24 saat uygulamadan sonra azaldığını bulduk. Diğer taraftan, 48 saat CDDP uygulamasının mRNA ifadesi açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığa neden olmadığını gösterdik.

Sonuç: Sonuç olarak, CDDP uygulamasından sonra, uygulama süresi açısından değişen, farklı mRNA ifade örüntülerinin olduğunu bulduk. Konvensiyonel kemoterapötik olan CDDP'nin hücre sağkalım yolları üzerindeki etkisinin ortaya çıkarılması açısından çalışmamız literatüre katkı sağlamaktadır.

Anahtar Sözcükler: Sisplatin, mTOR, AKT, CCND1, STAT3, mRNA, Serviks Kanseri

Geliş Tarihi: 30.06.2018

Kabul Tarihi: 28.08.2019

ABSTRACT

Objective: Cervical cancer is one of the most tumors seen in womans and second leading cause of cancer death in women. Cisplatin (CDDP), a platin based compound, is the most important chemotherapeutic agent and effectively used for the treatment of sarcomas and solid tumors. It binds to the DNA with crosslinks and leads inhibition of replication, causing DNA damage. As a result of this action, apoptotic pathways are induced and cell death occurs. In our study, we aimed to investigate the effect of CDDP on relative mRNA expression of mTOR, AKT, Cyclin D1 (CCND1) ve STAT3 on cervical cancer cell line.

Method: In this study, HeLa cells were treated with different concentrations of CDDP at 24 and 48 hours. Cell viability was determined by XTT method. Moreover, after treatment with selected doses of cisplatin, quantitative mRNA expression of mTOR, AKT, CCND1 and STAT-3 genes was analyzed using Real-Time PCR.

Results: IC₅₀ concentration of CDDP was found to be about 60 µM for 24h and 8 µM for 48h treatment. Moreover, all analyzed genes' expression was shown to diminish only after 24 h treatment. On the other hand, no statistically significant change was found after 48 h cisplatin exposure with respect to quantitative mRNA expression.

Conclusion: In summary, different mRNA expression pattern was found after CDDP treatment regarding to exposure time. Our study has been contributed the literature in terms of detecting the effect of conventional chemotherapeutic CDDP on cell survival pathways.

Key Words: Cisplatin, mTOR, AKT, CCND1, STAT3, mRNA, Cervical Cancer

Received: 06.30.2018

Accepted: 08.28.2019

ORCID ID. E.A. 0000-0001-7303-666X, A.Y. 0000-0002-4368-0777, H.İ.Ö. 0000-0002-7220-0066, E.K. 0000-0001-5129-2515, S.M. 0000-0002-1136-4884

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Dr. Ebru Alp Giresun Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Giresun, Türkiye E-posta: ebrualmaz@hotmail.com

©Telif Hakkı 2020 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi - Makale metnine <http://medicaljournal.gazi.edu.tr/> web adresinden ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by Gazi University Medical Faculty - Available on-line at web site <http://medicaljournal.gazi.edu.tr/>

doi:<http://dx.doi.org/10.12996/gmj.2020.02>

GİRİŞ

Serviks kanseri 20-39 yaş arası kadınlarda kanser nedeni gözlenen ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır(1). Bu kanserin insidansının yüksek olmasına rağmen, tedavideki yeni gelişmeler sayesinde hastaların sağkalım oranları son zamanlarda artmaktadır (2). İleri evre serviks kanseri tedavisinde platinüm bileşikleriyle ile kemoradyoterapi uygulandığında daha başarılı sonuçlar elde edilmektedir (3,4). Platin bazlı bileşiklerden olan cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II, CDDP) en önemli kemoterapotik ajanlardan biridir ve klinik olarak sarkom, yumuşak doku ve kemik kanserleri gibi farklı tipteki kanserleri başarılı bir şekilde tedavi etmektedir. Ancak, nefrotoksisite, nörotoksisite immün cevabın azalması gibi yan etkilerinin yanında tedavi sırasında ilaca karşı oluşan dirençten dolayı kullanımı sınırlıdır (5,6,7).

CDDP DNA'da guanin sitozin bağlanma bölgesinde çapraz bağ oluşturur ve çeşitli sinyal yollarını aktive eder (8). DNA ve CDDP arasında oluşan bu kovalent bağ ile DNA replikasyonu ve transkripsiyonu engellenir (9). Bunun sonucunda apoptotik yollar indüklenir ve kanser hücrelerinin ölümü gerçekleşir(5,7).

AKT/PKB bir serin treonin kinazdır ve AKT1, AKT2 ve AKT3'ü de içeren bir protein ailesi üyesidir. AKT yolu hücre çoğalması, farklılaşması, apoptoz ve tumorigenez gibi çeşitli hücrel süreçleri düzenler (10,11,12). AKT'nin aktivasyonu hücre sağkalımını uyarırken, AKT aktivasyonunun baskılanması çeşitli tipteki kanser hücrelerinde apoptoz oranını artırır (12,13). JAK/STAT yolu ve AKT'nin rolü her ne kadar bilinsede AKT'nin transkripsiyonel düzenlenmesi tam olarak bilinmemektedir (12).

Sinyal iletilicileri ve transkripsiyon aktivatörleri (STAT) tümör hücre sağkalımı ve çoğalmasında önemli rol oynar (14). STAT ailesi üyelerinden STAT3 diğerlerine göre yüksek derecede korunmuştur (4). STAT'lar arasında STAT3 çeşitli kanserlerde sıklıkla aktif durumdadır. Aktifleşen STAT3 dimer oluşturur ve nükleusa geçerek antiapoptotik (Bcl-2, Mcl1, cIAP2, vb) ve proliferasyon [Siklin D1 (CCND1), c-myc, vb] ile ilgili özgül genlerin düzenlenmesini sağlar (4,14).

Yapılan çalışmalarda STAT3'ün önemli bir onkogen olduğu bildirilmiştir. STAT3'ün sürekli aktivasyonu mezenşimal ve kök hücreye benzer özellikleri arttırabilirdiği gibi tümör hücrelerinin sağkalımını, invazyonunu ve göçünü teşvik edebilir. Son on yılda, çok sayıda tümör kaynaklı hücre dizisinin yanı sıra birçok primer insan kanseri dokusunda STAT3'ü aşırı sentezlendiği veya sürekli olarak aktif durumda olduğu bildirilmiştir (4,15). Son zamanlardaki çalışmalar, STAT ailesinden proteinlerin ve en belirgin olarak STAT3'ün ilaç hedefleri için umut vadeden adaylar olduğunu ortaya koymuştur (2).

Moleküler ve hücrel düzeyde tümörü anlamamız moleküler hedefli terapinin önemini arttırmaktadır. Rapamisinin memeli hedefi (mammalian target of rapamycin, mTOR) son çalışmalarda malign tümörlerin popüler terapötik hedefleri arasındadır (16). mTOR, tüm memelilerde homologları olan fosfoinositid 3-kinazla ilişkili kinaz (PI3K) ailesinin bir üyesidir ve mTOR'un aktivitesi hücre büyümesi, çoğalması, sağkalımı, transkripsiyon ve diğer hücrel metabolik süreçlerle bağlantılıdır (17). mTOR aktivasyonu, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) ve Akt aktivasyonunu içeren çok basamaklı bir süreç yoluyla gerçekleşir (18). mTOR'nin aktivasyonu bir dizi sinyal iletim yolunu düzenler; bu da protein sentezi ve hücre büyümesi için gerekli olan genlerin transkripsiyonuna neden olur (17,19). Gittikçe artan veriler, mTOR'un sadece hücre büyümesi için değil, aynı zamanda kanserin invazyonu ve metastazı için merkezi bir role sahip olduğunu göstermiştir (17). mTOR, farklı kanserlerde ifade düzeyi ve aktivasyonu değişen bir proteindir.

Buna ek olarak, mTOR inhibisyonunun otofaji de dâhil olmak üzere çeşitli süreçleri indüklediği gözlenmiştir (20).

Çalışmamızda önemli bir antikanser ilacı olan CDDP'nin, hücre sağkalım yolları üzerinde etkili olan mTOR, AKT, CCND1 ve STAT3 genlerinin mRNA ifadesi üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü

Çalışmamızda insan servikal kanser hücre hattı HeLa kullanıldı. Hücreler %10 fetal dana serumu (FCS), 200 mM L-glutamin, 100U/ml penisilin, 200 µg/ml streptomisin içeren Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640) besiyerinde %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş ortamda 37°C'de kültüre edildi. Üç günde bir kültür besiyeri tazelandı.

XTT yöntemi ile hücre canlılığının belirlenmesi

Aynı pasaj numarasına sahip HeLa hücreleri, flakların %70'ini kapladığında RPMI 1640 besiyeri uzaklaştırıldı ve Tripsin-EDTA karışımı kullanılarak hücrelerin tabandan ve birbirlerinden ayrılması sağlandı. Her kuyucuğa 1x10⁴ hücre gelecek şekilde 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekildi. Hücreler 37 °C ve % 5 CO₂'li etüvde 24 saat inkübe edildikten sonra besiyerleri uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler 24 saat için 5-80 µM cisplatin, 48 saat için 0,5-16 µM CDDP olacak şekilde %10'luk FCS içeren besiyerinde 37 °C de % 5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. 24 saat' lik konsantrasyonlar HeLa hücrelerine 48 saat süre ile uygulandığında canlılık gözlenmedi. Bu nedenle, 48 saat' te daha düşük CDDP (1/10 oranında azaltılarak) konsantrasyonları HeLa hücrelerine uygulandı. Hücre canlılığı Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche Diagnostics, Almanya) ile belirlendi. Belirtilen sürelerin sonunda her bir kuyucuğa 50 µl gelecek şekilde XTT karışımı eklendi ve formazan ürününün oluşturduğu renk değişimi 4 saat sonra mikroplole ELISA okuyucu (BioTek ELx800, ABD) ile 450-500 nm dalga boyu aralığında belirlendi. Her bir konsantrasyon ve süre için deney üç kez tekrarlanarak ortalama değerler elde edildi.

RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

HeLa hücreleri, belirtilen dozlarda CDDP ile 24 ve 48 saat inkübe edildikten sonra "High Pure RNA Isolation Kit" (Roche, Almanya) kullanılarak, üretici firmanın önerdiği protokole göre RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, ABD) 260 nm dalga boyunda ölçülerek µl/µg değerleri belirlendi. cDNA sentezi, 1µg total RNA'dan random heksamer primerler kullanılarak "Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti" (Roche, Almanya) ile üretici firmanın protokolü takip edilerek yapıldı.

Kantitatif Real-Time PCR yöntemi ile mRNA'ların ifade (ekspresyon) oranlarının belirlenmesi

mTOR, AKT, CCND1, STAT-3 genlerinin mRNA ifade düzeyleri, elde edilen cDNA örneklerinden UPL (Roche, Almanya) probolar kullanılarak Real Time PCR yöntemi ile Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Almanya) cihazı kullanılarak belirlendi. Genlerin normalizasyonu için housekeeping gen olan GAPDH mRNA ifade düzeyi referans olarak kullanıldı. Universal Probe Library (UPL) prob numaraları ve genlerin cDNA'larına özgül olan primer dizileri Tablo 1'de verilmiştir. 20 µl toplam tepkime hacmi içerisinde; mRNA'ya özgü primerler, LightCycler TaqMan Master karışımı (Roche, Almanya), cDNA, UPL probu ve distile su kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirildi. Her bir konsantrasyon için deney üç kez tekrarlandı.

Tablo 1. Çalışılan genlerin mRNA'larına özgü primer dizileri ve UPL prob numaraları

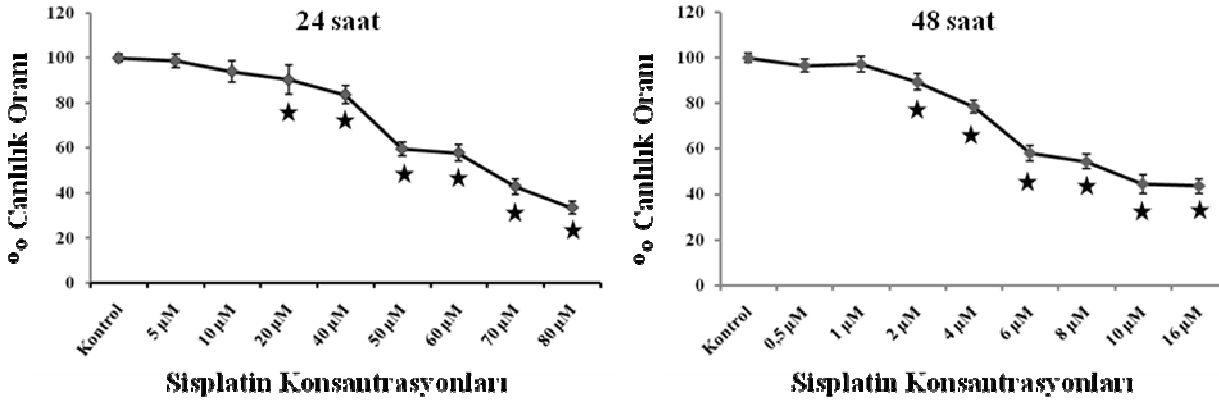
Gen	Forward primer	Reverse primer	UPL prob no
CCND1	5'- TGTCTACTACCGCTCACA -3'	5'- CAGGGCTTCGATCTGCTC -3'	16
mTOR	5'-TGCTGGAAGCCTTTGTCTATG-3'	5'-CGCTTGTTCCTTTGGTATT-3'	75
STAT3	5'-CGGAGGAGGATTTACGGGAAATGCTG-3'	5'-CTGAGCGTGAAGAAGTGG-3'	18
AKT	5'-CTGTCATCGAACGCACCTT- 3'	5'-GTCTGGATGGCGTTGTC- 3'	52
GAPDH	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	5'-GCCAATACGACCAATCC-3'	60

İstatistik Analizler

Hücre canlılığı ile ilgili elde edilen veriler, "tek yönlü Anova (post-hoc Tukey)" testi kullanılarak SigmaStat v3.5 istatistik programıyla değerlendirildi. CDDP dozlarına bağlı olarak değişen, mTOR, AKT, CCND1 ve STAT-3 mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar "REST (2009 V2.0.13)" istatistik programı ile karşılaştırıldı (21). $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

HeLa hücrelerinde CDDP'nin doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığında azalmaya neden olduğu XTT yöntemi ile gösterildi. CDDP uygulamasından sonra IC_{50} dozunun 24 saat için yaklaşık $60 \mu M$, 48 saat için ise $8 \mu M$ olduğu belirlendi (Şekil 1). En yüksek CDDP konsantrasyonu olan $80 \mu M$ ' da hücre canlılığının 24 saatlik süre sonunda yaklaşık % 33 olduğu bulundu. Ayrıca $16 \mu M$ cisplatinin 48 saat süre ile uygulanmasının hücre canlılığını yaklaşık %43'e düşürdüğü gözlemlendi. Bu sonuçlara göre daha uzun süreli CDDP uygulamasının düşük dozlarda bile hücre canlılığı üzerine daha etkili olduğu gözlemlendi.



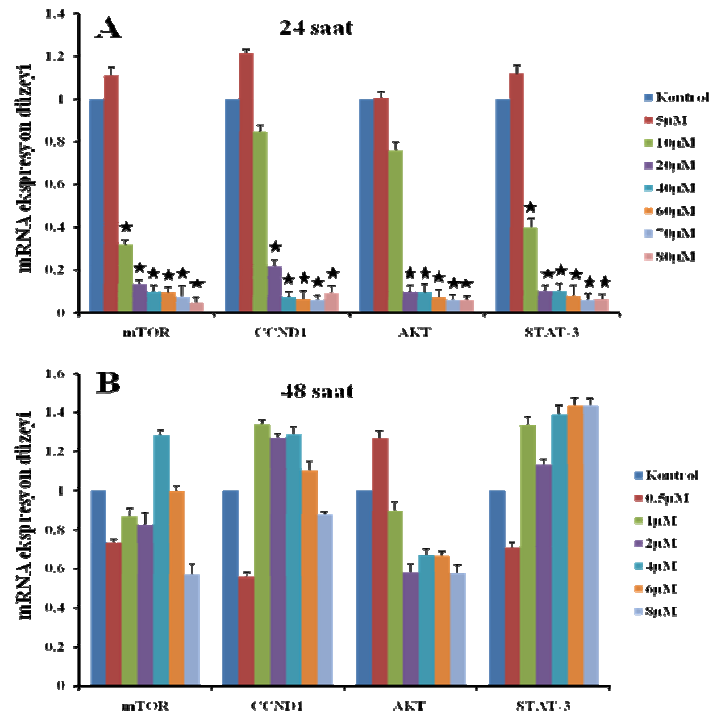
Şekil 1. HeLa hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) CDDP ile 24 (A) ve 48 (B) saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılığı oranları. *: $p < 0,05$

CDDP'nin mTOR, AKT, CCND1 ve STAT-3 mRNA ifadesi üzerindeki etkileri qPCR yöntemi ile araştırıldı. HeLa hücrelerinde 24 saat sonunda CDDP uygulamasının mTOR, CCND1, AKT ve STAT-3 genlerinin mRNA ifade düzeylerini kontrole göre doza bağımlı olarak azalttığı gözlemlendi.

CDDP uygulanmayan kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, $10 \mu M$ ve üzerindeki dozlarda CDDP uygulamasının mTOR ve STAT-3 genlerindeki mRNA ifadenme düzeylerini istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde düşürdüğü gözlemlendi ($p < 0,05$). Buna karşın, CCND1 ve AKT genlerinin mRNA ifade düzeylerinin ise $20 \mu M$ ve üzerindeki cisplatin konsantrasyonlarında anlamlı bir şekilde düştüğü belirlendi ($p < 0,05$) (Şekil 2A).

$80 \mu M$ CDDP'nin 24 saat uygulanmasından sonra mTOR, CCND1, AKT ve STAT-3 mRNA ifade oranlarındaki azalmanın kontrol hücrelerine oranla sırasıyla 23.8, 11.1, 17.2 ve 16.9 kat olduğu belirlendi ($p < 0,05$).

48 saat süre ile CDDP uygulanan HeLa hücrelerinde ise genel olarak mTOR, AKT, CCND1 ve STAT-3 genlerinin mRNA ifade düzeylerinde kontrole göre artma ve azalmaların olduğu ancak bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p > 0,05$) (Şekil 2B).



Şekil 2. CDDP uygulaması sonucunda mTOR, AKT, Cyclin D1 ve STAT-3 mRNA ifade düzeylerinin 24 (A) ve 48 (B) saatte kontrole göre doza bağımlı olarak değişimi. *: $p < 0,05$

TARTIŞMA

Moleküler genetik çalışmalar sayesinde hücre çoğalması ve sağkalımının düzenlenmesinde görev alan sinyal iletim yollarının kanser hücrelerinde değiştiği görülmüştür. Kanser gelişim mekanizmasında etkili olduğu bilinen moleküller üzerinde, CDDP gibi konvansiyonel kemoterapi ilaçlarının etkisinin araştırılması, yeni hedef moleküllerin ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Platin bazlı bileşikler, DNA sentezi ve tamir ile ilişkili bazı yolları etkileyerek apoptozu uyarır. Bu bileşiklerden biri olan CDDP, DNA zincirlerinin arasına girerek hücre döngüsünün durmasına neden olur. Bu süreçte hücreler apoptoza yönlendirilir (5,7). CDDP servikal kanser gibi solid tümörlerde ilk aşamada kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadır (5).

CDDP'nin, başta HeLa ve diğer kanser hücrelerinin canlılıkları üzerine etkisini farklı konsantrasyon ve sürelerde araştıran çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (2,5,16,20,22,23,24,25). Bu çalışmalardan birinde, HeLa ve

CaSki servikal kanser hücrelerine 24 saat CDDP uygulamasından sonra hücre canlılıklarında azalma olduğu gözlemlense de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (20). Ancak Xu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada CDDP'nin HeLa hücre canlılığını anlamlı bir şekilde düşürdüğü gözlenmiştir (5). Benzer şekilde, Han ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, HeLa hücrelerinde 48 saat CDDP uygulamasından sonra proliferasyonun baskılanma oranının doza bağlı olarak arttığı gösterilmiştir (16). Şahin ve arkadaşlarının yaptıkları diğer bir çalışmada, 24 saat CDDP (250 nM) uygulaması sonucunda, HeLa hücrelerindeki canlılık oranı %70 olarak bulunmuştur (2). Daha önce yaptığımız çalışmalarda, CDDP'nin MSTO-211H mezotelyoma ve T24 mesane hücrelerinin canlılıklarını doza bağlı olarak düşürdüğünü belirledik (23,24,25). Bahsedilen çalışmalara benzer şekilde, HeLa hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak CDDP'nin hücre canlılığını düşürdüğünü ve daha uzun süreli CDDP uygulamasının düşük dozlarda da hücre canlılığı üzerine etkili olduğunu belirledik (Şekil 1A ve 1B).

CDDP'nin hücre canlılığı üzerine etkilerini araştıran çalışmalara ek olarak, bileşiğin hücre döngüsü ve sinyal iletim yollarında görev alan moleküller üzerindeki etkisini araştıran çeşitli çalışmalarda bulunmaktadır (26,27). Hücre döngüsünün ilerlemesi siklin ve siklin bağımlı kinazlar ile düzenlenir. Bunların arasında hücre döngüsünün kontrolünde kritik bir basamağı düzenleyen hücre döngüsü düzenleyici faktörlerden CCND1 ve siklin D3 (CCND3) bulunur (28,29). Bununla birlikte CCND1 ifadesindeki artış fibrosarkom hücre hatlarında, meme, pankreas, kolon ve akciğer kanserlerinde sisplatin direnci ile ilişkilidir (29).

Singh ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre, HeLa ve SiHa hücrelerinde 33 µM sisplatin uygulamasından sonra CCND1 protein düzeyinde bir miktar azalma olduğu gösterilmiştir (6). Daha önce yaptığımız mesane ve mezotelyoma hücre hatlarının kullanıldığı iki farklı çalışmada ise CDDP'nin MSTO-211H (23) ve T24 (25) hücrelerinde CCND1 mRNA ifadesinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığını belirledik. Bu çalışmada ise HeLa hücrelerine 24 saat CDDP uygulamasından sonra CCND1 mRNA ifade oranında anlamlı düzeyde azalma olduğunu gözledik (Şekil 2A). Elde edilen veriler, sisplatin uygulamasına cevaben farklı kanser hücrelerinde gözlenen CCND1 ifade değişikliklerinin hücre tipine ve uygulama süresine göre farklılıklar gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

Akt/mTOR sinyal iletim yolağı hücre proliferasyonu ile ilgili yollardan biridir ve malign tümörlerin gelişmesi ile yakından ilişkilidir (16). mTOR hücre büyümesinden sorumlu olan önemli bir serin treonin kinazdır ve insan kanserlerinde sıklıkla düzensizlik gösterir (30). mTOR protein miktarının servikal kanser dokularında, normal servikal dokulara ve yüksek dereceli squamoz intraepitelial lezyonlara (high-grade squamous intraepithelial lesion) göre önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir (20,31). Bununla birlikte, EC9706 xenografların kullanıldığı bir çalışmada ise CDDP uygulamasından sonrada mTOR'un mRNA düzeyinin azaldığı gözlenmiştir (17). Servikal kanser dokularına ek olarak hücre hatlarında da çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda, CDDP uygulamasının C4-1, HeLa ve CaSki hücrelerinde mTOR protein ifadenmesini önemli ölçüde düşürdüğü gösterilmiştir (20,22,30). Bu çalışma da ise, CDDP uygulamasından sonra mTOR mRNA ifadesinin 24 saat sonunda özellikle yüksek doz CDDP uygulamalarında anlamlı derecede azaldığını gösterdik. 48 saat süreli uygulamada ise mRNA ifade düzeylerinde değişiklikler olsada istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşamadık (Şekil 2A ve 2B).

AKT/mTOR sinyal iletim yolağının bir diğer üyesi olan AKT'nin ifadesindeki değişiklikler kanser hücrelerin sağkalımında etkili olabilmekte hatta hücrelerde gözlenen CDDP direncine yol açabilmektedir. Yuan ve arkadaşları CDDP uygulanmasından sonra oophoroma (malign yumurtalık tümörü) ve meme kanseri dokularında Akt aktivitesinin arttığını gözlemişlerdir (16). Zhang ve arkadaşlarının HCT-116 hücre hattında yaptıkları çalışmada, CDDP uygulamasından sonra AKT mRNA ve protein düzeyinin 6 saate kadar önemli ölçüde arttığı, 24 saate kadar ise azaldığı gösterilmiştir (12). Benzer şekilde çalışmamızda, 24 saat süre ile CDDP uygulanan HeLa hücrelerinde AKT mRNA miktarının azaldığını gözledik (Şekil 2A).

STAT3'ün sürekli aktivasyonu servikal kanserin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli role sahiptir. Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 165 serviks kanseri örneğinin %22' sinde STAT3'ün sürekli aktif olduğu gösterilmiştir. Ancak klinik parametreler ile önemli bir korelasyon bulunmamıştır (4).

Son zamanlarda yapılan bir araştırmada, CDDP'nin kanser hücrelerinde JAK/STAT'ı defosforile ederek aktivasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Diğer çalışmalar da, platin içeren birçok bileşiğin, STAT3 sinyal iletimini bozduğunu ve biyolojik işlevlerini engellediği göstermiştir (14).

Yao ve arkadaşları STAT3 aktivasyon düzeyi ve CDDP'ye karşı hücrel direnç arasındaki ilişkiyi HepG2, HeLa ve K562 hücrelerinde çalışmışlardır. Yapılan çalışmada hücrelerin CDDP'ye karşı farklı duyarlılıklar gösterdiği

gözlenmiştir (özellikle 48 saat muamele sonrasında). Bazı çalışmalar, STAT3 inhibisyonunun tümör hücrelerini CDDP ile uyarılmış hücre ölümüne karşı hassaslaştırdığını göstermiştir (32,33). Çalışmaların sonuçlarına göre, STAT3'ün baskılanmasının CDDP'nin terapötik etkinliğini arttırmak için uygun bir yaklaşım olabileceği belirtilmiştir (14).

Sheng ve arkadaşlarının SKOV-3 hücrelerinde yaptıkları çalışmada, 24 saat CDDP uygulamasından sonra total ve fosforile STAT-3 düzeylerinde anlamlı düzeyde azalma olduğu gösterilmiş ve CDDP'nin STAT-3 yolağını baskıladığı belirtilmiştir (15). Bu çalışmada 24 saat' den daha kısa süreli uygulamalarda STAT-3 düzeylerinin kontrole göre arttığıda gösterilmektedir. Dolayısıyla STAT-3'ün CDDP'nin uygulama süreleri boyunca ifadesinin artma veya azalma gösterdiği görülmektedir. Bizim çalışmamızda CDDP HeLa hücrelerine 24 ve 48 saat olarak uygulanmıştır. STAT-3 mRNA ifadenmesi 24 saat sonunda 10 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarda anlamlı düzeyde azalırken 48 saat sonunda mRNA ifadesinde artma gözlenmede istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir.

Çalışmamızda HeLa hücre hattında 24 saat CDDP uygulamasından sonra mTOR, AKT, CCND1 ve STAT-3 genlerinin mRNA ifade düzeylerinde kontrole göre doza bağımlı olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. Sonuçlarımız, HeLa hücre hattında CDDP'nin ilişkili genler üzerindeki etkisiyle hücre proliferasyonunu azalttığını düşündürmektedir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2018;68:7-30.
2. Sahin K, Tuzcu M, Basak N, et al. Sensitization of Cervical Cancer Cells to Cisplatin by Genistein: The Role of NFκB and Akt/mTOR Signaling Pathways. Journal of Oncology. 2012;2012:461562.
3. Duenas-Gonzalez, A, Zarba JJ, Patel F, et al. Phase III, open-label, randomized study comparing concurrent gemcitabine plus cisplatin and radiation followed by adjuvant gemcitabine and cisplatin versus concurrent cisplatin and radiation in patients with stage IIB to IVA carcinoma of the cervix. Journal of Clinical Oncology. 2011;29:1678-85.
4. Spitzner M, Ebner R, Wolff HA, et al. STAT3: A Novel Molecular Mediator of Resistance to Chemoradiotherapy. Cancers (Basel). 2014;6:1986-2011.
5. Xu Y, Yu H, Qin H, et al. Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells. Cancer Letters. 2012; 314:232-43.
6. Singh M, Bhui K, Singh R, et al. Tea polyphenols enhance cisplatin chemosensitivity in cervical cancer cells via induction of apoptosis. Life Science. 2013;93:7-16.
7. Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. Cancers (Basel). 2011;3:1351-71.
8. Shinomiya N, Shinomiya M, Wakiyama H, et al. Enhancement of CDDP cytotoxicity by caffeine is characterized by apoptotic cell death. Experimental Cell Research. 1994;210: 236-42.
9. Pii, P, Lippard SJ. Cisplatin and Related Drugs, in: Bertino, J.R. (ed) "Encyclopedia of Cancer, vol. 1. New York, NY: Academic Press, pp. 392-410, 1997
10. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. Oncogene. 2005;24:7455-64.
11. Toker A, Yoeli-Lerner M. Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. Cancer Research. 2006;66:3963-66.
12. Zhang J, Zhang LL, Shen L, et al. Regulation of AKT gene expression by cisplatin. Oncology Letters. 2013;5:756-60.
13. Deng R, Tang J, Xie BF, et al. SYUNZ-16, a newly synthesized alkannin derivative, induces tumor cells apoptosis and suppresses tumor growth through inhibition of PKB/AKT kinase activity and blockade of AKT/FOXO signal pathway. International Journal of Cancer. 2010;127:220-9.
14. Yao X, Zhu F, Zhao Z, et al. Arctigenin enhances chemosensitivity of cancer cells to cisplatin through inhibition of the STAT3 signaling pathway. Journal of Cellular Biochemistry. 2011;112:2837-49.
15. Sheng WJ, Jiang H, Wu DL, et al. Early responses of the STAT3 pathway to platinum drugs are associated with cisplatin resistance in epithelial ovarian cancer. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2013;46:650-8.
16. Han L, Wu JL, Yang LX. Effect of combination of rapamycin and cisplatin on human cervical carcinoma HeLa cells. Contemporary Oncology (Poznań). 2012;16:512-5.

17. Hou G, Yang S, Zhou Y, et al. Targeted inhibition of mTOR signaling improves sensitivity of esophageal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. *J Immunology Research*. 2014;2014:845763.
18. P'opulo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13:1886-918.
19. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR mediated translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009;10:307-18.
20. Leisching GR, Loos B, Botha MH, et al. The role of mTOR during cisplatin treatment in an in vitro and ex vivo model of cervical cancer. *Toxicology*. 2015;335:72-8.
21. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. 2002;30:e36.
22. Faried LS, Faried A, Kanuma T, et al. Expression of an activated mammalian target of rapamycin in adenocarcinoma of the cervix: A potential biomarker and molecular target therapy. *Molecular Carcinogenesis*. 2008;47:446-57.
23. Gultekin KE, Yurdakonar MK, Yaman E, et al. Effects of cisplatin and panobinostat on human mesothelial(Met-5A) and malignant pleural mesothelioma (MSTO-211H) cells. *Genetics and Molecular Research*. 2013;12:5405-13.
24. Onen HI, Yilmaz A, Alp E, et al. EF24 and RAD001 potentiates the anticancer effect of platinum-based agents in human malignant pleural mesothelioma (MSTO-211H) cells and protects nonmalignant mesothelial (MET-5A) cells. *Human and Experimental Toxicology*. 2015;34:117-26.
25. Varol N, Konac E, Onen IH, et al. The epigenetically regulated effects of Wnt antagonists on the expression of genes in the apoptosis pathway in human bladder cancer cell line (T24). *DNA and Cell Biology*. 2014;33:408-17.
26. Zhang HY, Zhang PN, Sun H. Aberration of the PI3K/AKT/mTOR signaling in epithelial ovarian cancer and its implication in cisplatin-based chemotherapy. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*. 2009;146:81-6.
27. Gagnon V, Mathieu I, Sexton E, et al. AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells. *Gynecological Oncology*. 2004;94:785-95.
28. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development*. 1999;13:1501-12.
29. Zhang P, Zhang Z, Zhou X, et al. Identification of genes associated with cisplatin resistance in human oral squamous cell carcinoma cell line. *BMC Cancer*. 2006;6:224.
30. Zhu H, Wu J, Zhang W, et al. PKM2 enhances chemosensitivity to cisplatin through interaction with the mTOR pathway in cervical cancer. *Scientific Reports*. 2016;6:30788.
31. Ji J, Zheng PS. Activation of mTOR signaling pathway contributes to survival of cervical cancer cells. *Gynecological Oncology*. 2010;117:103-8.
32. Sims JT, Ganguly S, Fiore LS, et al. STI571 sensitizes breast cancer cells to 5-fluorouracil, cisplatin and camptothecin in a cell type-specific manner. *Biochemical Pharmacology*. 2009;78:249-60.
33. Liu T, Peng H, Zhang M, et al. Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. *European Journal of Pharmacology*. 2010;641:15-22.