

Sisplatin'in SH-SY5Y Hücre Hattında Fetuin A'nın Üzerine Etkisinin Araştırılması

Investigation of the Effect of Cisplatin on Fetuin A in the SH-SY5Y Cell Line

Wissam ALKALİŞ¹,
Yasir UBEYİD¹
Abdurrahman HASAN¹
Ahmet Kemal FİLİZ²
Ziad JOHA³

¹ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dönem 4, Sivas,
Türkiye

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

³ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi, Eczacılık
Meslek Bilimleri Bölümü,
Farmakoloji, Sivas, Türkiye

Corresponding author:

Wissam ALKALİŞ, Sivas
Cumhuriyet Üniversitesi Tıp
Fakültesi Dönem 4, Sivas,
Türkiye

E-mail:

wissamalkalesh@gmail.com

Received/Accepted: Dec 2022

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

How to Cite

Alkalish, W., Ubeyid Y., Hasan
A., Filiz A. K., Joha Z. (2022).
Sisplatin'in SH-SY5Y Hücre
Hattında Fetuin A'nın Üzerine
Etkisinin Araştırılması. *Health
Sciences Student Journal*, 2(3),
54-58.

<https://www.healthssj.com/sisplatin-sh-sy5y-hucre-hattinda-fetuin-anin-uzerine-etkisinin-arastirilmesi/>

ÖZET

Amaç: Fetuin-A, esas olarak karaciğer ve yağ dokusunda sentezlenen ve daha sonra kan dolaşımına salınan bir glikoproteindir. Fetuin-A, farklı mekanizmalarla tümör ilerlemesi, kalsifikasyon, diyabet, obezite, böbrek hastalıkları ve koroner arter hastalığında önemli roller oynar. Fetuin-A, tümör hücrelerine endositoz yoluyla alınır ve hücre içindeyken eksozomların salgılanmasını artırır. Son zamanlarda yapılan bir dizi çalışma, prostat, pankreas ve multiform glioblastoma gibi tümör hücrelerinin bir alt kümesinin, ilerlemelerini destekleyen ektopik fetuin-A'yı sentezlediğini göstermiştir. Sisplatin, anti-kanser bir kemoterapi ilacıdır. Bu ilaç bir alkilleyici ajan olarak sınıflandırılır. Birkaç kanseri tedavi etmek için kullanılır. Bunlar meme kanseri, testis kanseri, mesane kanseri, mezotelyoma, serviks kanseri, over kanseri, akciğer kanseri, baş ve boyun kanseri, özefagus kanseri, beyin tümörleri ve nöroblastomayı içerir. Bu çalışmanın amacı sisplatinin SH-SY5Y hücre hattındaki fetuin A düzeyine etkisini araştırmaktır.

Yöntem: Bu çalışmada insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hattı kullanıldı. Sisplatinin fetuin A düzeyine etkisini araştırmak için iki hücre grubu hazırlandı. Kontrol grubu herhangi bir tedavi görmedi. Sisplatin grubundaki hücreler 24 saat 10 µM sisplatin ile muamele edildi. Hücreler donduruldu ve eksplozyona uğrayana kadar 3 kez çözüldü. Daha sonra santrifüj edildi ve süpernatantlar toplandı. Daha sonra fetuin A düzeyini belirlemek için ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) yöntemi uygulandı.

Bulgular: Sisplatin grubunda kontrol grubuna göre fetuin A düzeyinde anlamlı bir artış saptandı. (p < 0,05)

Sonuçlar: Sisplatinin SH-SY5Y hücre hattında fetuin A seviyesini arttırdığı bulundu.

Anahtar kelimeler: Fetuin A, Sisplatin.

ABSTRACT

Objective: Fetuin-A is a glycoprotein synthesized mainly in the liver and adipose tissue and then released into the bloodstream. Fetuin-A plays important roles in tumor progression, calcification, diabetes, obesity, kidney diseases and coronary artery disease through different mechanisms. Fetuin-A is taken into tumor cells by endocytosis, and while inside the cells, it increases the secretion of exosomes. Lately a number of studies have shown that a subset of tumor cells such as prostate, pancreatic and glioblastoma multiform synthesize ectopic fetuin-A, which promotes their progression. Cisplatin is an anti-cancer chemotherapy drug. This medication is classified as an alkylating agent. It is used to treat a number of cancers. These include breast cancer, testicular cancer, bladder cancer, mesothelioma, cervical cancer, ovarian cancer, lung cancer, head and neck cancer, esophageal cancer, brain tumors and neuroblastoma. The aim of this study was to investigate the effect of cisplatin on the fetuin A level in the SH-SY5Y cell line.

Method: In this study, the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line was used. Two cell groups were prepared to investigate the effect of cisplatin on the fetuin A level. The control group did not undergo any treatment. Cells in the cisplatin group were treated with 10 µM cisplatin for 24 hours. Cells were frozen and re-thawed 3 times to burst. It was

then centrifuged and the supernatants were collected. After that ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) method was applied to determine the level of fetuin A. Statistical evaluation of the data was performed by independent t-test, Statistical significance was defined at $p < 0.05$.

Results: There was a significant increase in fetuin A level in the cisplatin group compared to the control. (p < 0.05).

Conclusions: Cisplatin was found to increase the level of fetuin A in the SH-SY5Y cell line.

Keywords: Fetuin A, Cisplatin.

GİRİŞ

Fetuin'in 1944'te keşfedilmesinden bu yana altmış altı yıl geçti, ancak memeli fizyolojisindeki önemi yakın zamanda fark edildi. İlk olarak fetal sığır serumundan izole edildi. Şimdi en yaygın olarak fetuin-A, alfa-2-HS-glikoprotein veya α 2-Heremans-Schmid glikoprotein olarak bilinir. Fetuin-A, esas olarak hepatositlerden sentezlenen ve kan dolaşımına salınan bir glikoproteindir. Karaciğere ek olarak yağ dokusu, dolaşımdaki fetuin-A konsantrasyonuna katkıda bulunan önemli dokulardan biridir. Fetuin-A, uzun A zinciri (282 amino asit) ve kısa B zincirinden (27 amino asit) oluşur ve bu iki zincir 40 amino asitlik bir peptidle bağlanır. Molekül ağırlığı 60 kd olan Fetuin-A'nın serum konsantrasyonu 0,5 ile 1,0 g / L arasındadır.

Yapılan çalışmalara göre, serum fetuin-A ile bozulmuş glukoz toleransı (IGT), insülin direnci ve Tip 2 diyabet riski arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir.¹ Fetuin-A'nın, insülin reseptörü olan tirozin kinazın endojen inhibisyonu yoluyla insülin direnci gelişimine neden olarak obezite riskini artırdığı bilinmektedir.² Fetuin-A, kemik mineralizasyonunu inhibe etmeden dolaşımdaki istenmeyen kalsifikasyonu inhibe edebilir.³ Fetuin-A'nın serumdaki aktif hücre büyümesini destekleyici ve ana hücre adezyon molekülü olduğundan uzun süredir şüphelenilmektedir. Fetuin-A, tümör hücrelerine endositoz ile alınıp ekzozomların salgılanmasını artırır. Ekzozomlar ekstrasellüler ortama salgılandıktan sonra hücre invazyonunu ve adezyonunu indükler. Fetuin-A varlığında hücreler daha yüksek adezyon ve invazyon eğilimine sahiptir. Fetuin-A'yı sentezlemeyen ve salgılamayan hücreler zayıf bir şekilde invaze ve adheze olur.⁴

Fetuin-A hücre yüzeyine bağlanarak fosfatidilinozitol 3 (PI3) kinaz / Akt sinyal yolunu ve hücre proliferasyonunu indüklemektedir.⁵ Karsinom hücrelerinin plazma membranlarında bulunan aneksinlerin, karsinom hücresinin fetuin-A'ya bağlanmasını sağladığı belirtilmektedir.⁶ Son zamanlarda bir dizi laboratuvar, pankreas, prostat ve glioblastoma multiform gibi bazı tümör hücrelerinin, ilerlemelerine neden olan ektojik fetuin-A sentezlediğini göstermiştir. Fetuin-A'nın bir kemoatraktan olduğu gözlemine dayanarak^{7,8}, tümör hücrelerini kemik metastatik nişine çeken anahtar moleküllerden biri olduğu düşünülebilir. İlginç bir şekilde, kemiği kolonize eden prostat kanseri hücrelerinin ektojik fetuin-A sentezlediği ve salgıladığı bildirilmiştir.⁹ Fetuin-A, kemikteki tümör hücrelerinin büyümesini indüklemesinin yanı sıra, mikro-ortamdaki yüksek kalsiyum ve fosfat konsantrasyonu göz önüne alındığında, kemiğin remodellingi sırasında yeni kemik oluşumunu da yavaşlatabilir.¹⁰ Ek olarak fetuin-A, tümör hücreleri büyüdükçe nişi genişletmek için üzerinde hidroksiapatitin biriktiği iskele olan¹¹ kollajeni parçalamak için matris metaloproteinazların aktivitesini stabilize edebilir ve koruyabilir.

Sakwe ve ark. (2010), fetuin-A'nın memede kanserli hücrelere etkin bir şekilde alındığını ve tümör hücrelerinde büyüme sinyaline aracılık eden önemli bir serum yapışkan proteini olduğunu göstermiştir.¹² Sisplatinin kanser hücreleri üzerindeki etkisi, DNA'daki pürin bazlarla çapraz bağlanma kabiliyetine bağlıdır; DNA onarım mekanizmalarına müdahale ederek DNA hasarına neden olur ve daha sonra kanser hücrelerinde programlı hücre ölümü. (apoptoz) tetikler¹³. Fetuin A'nın

kanserde önemli rol oynamasına rağmen antikanser ilaçların fetuin A üzerinde etkisi pek incelenmemiştir. Bu bağlamda bu çalışmamızın amacı sisplatinin SH-SY5Y hücre hattındaki fetuin-A düzeyine etkisini değerlendirmektir.

YÖNTEM ve BULGULAR

Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hattı, penisilin/streptomisin (10,000U/mL), DMEM/Besleyici Karışımı DMEM (1:1 karışım), Fetal Sığır Serumumu (FBS), Tripsin-EDTA çözeltisi, Sisplatin (Sigma-Alrich) ve hücre kültürü için gerekli çeşitli sarf malzemeleri kullanıldı.

Hücre Kültürü

ATCC'den temin edilmiş olan Nöroblastoma (SH-SY5Y) hücreleri steril koşullar altında 37°C ve %5 CO₂'li ortamda, 25 cm²'lik flasklarda, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %10 fetal sığır serumu içeren DMEM (1:1) hücre kültür besisi yerinde proliferasyon sağlandı. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında pasaj yapılacak ve üçüncü pasajın ardından çalışmalara başlandı.

Deneysel Protokolü

Bu çalışmada insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hattı kullanıldı. Sisplatinin fetuin A düzeyine etkisini araştırmak için iki hücre grubu hazırlandı. Kontrol grubu herhangi bir tedavi görmedi. Sisplatin grubundaki hücreler 24 saat 10 µM sisplatin ile muamele edildi. Her grup için hücreler steril tüplerle toplandı. 2000 RPM'de yaklaşık 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar çıkarıldı. Tüplerin altındaki hücre bileşenleri, hücre süspansiyonunu yaklaşık 1 milyon/ml hücre konsantrasyonuna seyreltmek için PBS (pH: 7.4) kullanılarak süspansiyon edilir. Hücreler, iç bileşenlerin dışarı çıkmasına izin vermek için tekrarlanan donma

çözülme döngüleri yoluyla hasar gördü. 4°C'de 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra, biyokimyasal analiz için süpernatantlar toplandı. Her grup için hücre süpernatantlarındaki fetuin A seviyeleri, insan ELISA ticari kitleri (YL Biont, Shanghai, China) kullanılarak ölçüldü. Operasyon protokolleri, üreticinin talimatlarına göre yapıldı. Kısaca standart ve doku örnekleri plaklara eklendi ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Yıkama adımından sonra boyama solüsyonları eklendi ve 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. Stop solüsyonu eklendi ve 450 nm'de okundu. Numunelerin değerini belirlemek için standart eğriler çizildi. Plakalar içindeki ve arasındaki varyasyon katsayıları %10'dan azdı. Örneklerdeki toplam protein düzeylerinin belirlenmesinde Bradford protein assay kiti (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) kullanıldı.¹⁴

İstatistiksel analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi için SPSS paket programı kullanıldı ve bağımsız t-testi ile uygulandı, İstatistiksel anlamlılık p<0,05 olarak belirlendi.

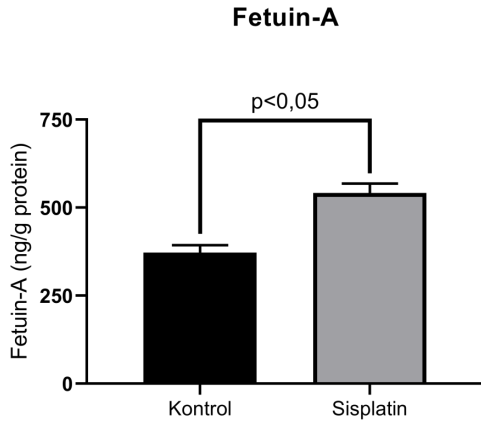
BULGULAR

Fetuin konsantrasyonu kontrol grubunda 375 ± 15 (ng/g protein) ve sisplatin grubunda 550 ± 15 (ng/g protein) bulundu (şekil 1) . Bu çerçevede SH-SY5Y hücre hattında sisplatin'nin fetuin A'nın düzeyini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı tespit edildi (p < 0,05).

SONUÇ ve TARTIŞMA

Glikoprotein olan Fetuin-A, genelinde hepatositlerden sentezlenir ve kan dolaşımına salıverilir. Fetuin-A hücrelerin adezyonunu ve invazyonunu indükler.⁴

Şekil 1. Sisplatinin fetuin A'nın konsantrasyon üzerindeki etkisi.



Akciğer kanserinde Fetuin-A hücre yüzeyine bağlanarak fosfatidilinozitol 3 (PI3) kinaz / Akt sinyal yolunu ve hücre proliferasyonunu indüklemektedir.⁵ Uzun yıllardır bilim adamları, kanserin ilerlemesi sırasında serum veya tümör mikroçevresindeki fetuin-A konsantrasyonunu ölçtüler. Daha önceki çalışmaların çoğu, özellikle hematolojik malignitelerde, tümörler ilerledikçe fetuin-A'nın serum konsantrasyonunda bir azalma olduğunu göstermiştir^{15,16}, ancak bu düşüşün karaciğer tarafından azalan sentezden mi (fetuin-A negatif bir akut faz proteindir) ya da tümör hücrelerinin fetuin-A'yı mikroçevreden ve nihayetinde kandan aktif olarak tüketip tüketmediğinden mi olduğu açık değildi. Tümör hücrelerinin fetuin-A'yı kana önemli ölçüde eklemesi veya kandan çıkarması olası değildir. Örneğin, tümör hücreleri tarafından sentezlenen ve hücre dışı ortama salgılanan fetuin-A konsantrasyonu, ~0.5 mg/mL olan kan seviyelerinden çok daha azdır.¹⁷ Bununla birlikte, fetuin-A'nın fukosile edilmiş formları gibi değiştirilmiş formlarının ortaya çıkmasıyla gelecekte kanserin teşhisi veya evrelemesi için güvenilir tümör biyobelirteçleri haline gelmesi mümkündür. Şu ana kadar sisplatinin fetuin A'nın SH-SY5Y hücre hattında düzeyinin üzerine

etkisi araştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı sisplatinin SH-SY5Y hücre hattındaki fetuin A düzeyine etkisini araştırmaktır. SH-SY5Y hücre hattında sisplatinin fetuin A'nın düzeyini arttırdığı bulundu. Fetuin A kanser hücrenin büyümesini indükler. Sisplatin'in uygulanmasına bağlı fetuin A'nın artışı hücrenin ilaca karşı yaptığı savunma ile ilişkilendirilebilir.

KAYNAKÇA

1. Mori, K., Emoto, M., Yokoyama, H., Araki, T., Teramura, M., Koyama, H., ... & Nishizawa, Y. (2006). Association of serum fetuin-A with insulin resistance in type 2 diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes care*, 29(2), 468-468.
2. Mathews, S. T., Rakhade, S., Zhou, X., Parker, G. C., Coscina, D. V., & Grunberger, G. (2006). Fetuin-null mice are protected against obesity and insulin resistance associated with aging. *Biochemical and biophysical research communications*, 350(2), 437-443.
3. Schäfer, C., Heiss, A., Schwarz, A., Westenfeld, R., Ketteler, M., Floege, J., ... & Jahn-Dechent, W. (2003). The serum protein α 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *The Journal of clinical investigation*, 112(3), 357-366.
4. Nangami, G. N., Sakwe, A. M., Izban, M. G., Rana, T., Lammers, P. E., Thomas, P., ... & Ochieng, J. (2016). Fetuin-A (α 2 HS glycoprotein) modulates growth, motility, invasion, and senescence in high-grade astrocytomas. *Cancer medicine*, 5(12), 3532-3543.
5. Kundranda, M. N., Henderson, M., Carter, K. J., Gorden, L., Binhazim, A., Ray, S., ... & Ochieng, J. (2005). The serum glycoprotein fetuin-A promotes Lewis lung carcinoma tumorigenesis via adhesive-dependent and adhesive-independent mechanisms. *Cancer research*, 65(2), 499-506.
6. Kundranda, M. N., Henderson, M., Carter, K. J., Gorden, L., Binhazim, A., Ray, S., ... & Ochieng, J. (2005). The serum glycoprotein fetuin-A promotes Lewis lung carcinoma tumorigenesis via adhesive-dependent and adhesive-independent mechanisms. *Cancer research*, 65(2), 499-506.
7. Nangami, G. N., Watson, K., Parker-Johnson, K., Okereke, K. O., Sakwe, A., Thompson, P., ... & Ochieng, J. (2013). Fetuin-A (α 2HS-glycoprotein) is a serum chemo-attractant that also promotes invasion of tumor cells through Matrigel. *Biochemical and biophysical research communications*, 438(4), 660-665.
8. Malone, J. D., & Richards, M. (1987). α 2HS glycoprotein is chemotactic for mononuclear

- phagocytes. *Journal of cellular physiology*, 132(1), 118-124.
9. Mintz, P. J., Rietz, A. C., Cardó-Vila, M., Ozawa, M. G., Dondossola, E., Do, K. A., ... & Arap, W. (2015). Discovery and horizontal follow-up of an autoantibody signature in human prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(8), 2515-2520.
10. Schäfer, C., Heiss, A., Schwarz, A., Westenfeld, R., Ketteler, M., Floege, J., ... & Jahn-Dechent, W. (2003). The serum protein α 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *The Journal of clinical investigation*, 112(3), 357-366.
11. Ray, S., Lukyanov, P., & Ochieng, J. (2003). Members of the cystatin superfamily interact with MMP-9 and protect it from autolytic degradation without affecting its gelatinolytic activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1652(2), 91-102.
12. Kundranda, M. N., Ray, S., Saria, M., Friedman, D., Matrisian, L. M., Lukyanov, P., & Ochieng, J. (2004). Annexins expressed on the cell surface serve as receptors for adhesion to immobilized fetuin-A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1693(2), 111-123.
13. Sakwe, A. M., Koumangoye, R., Goodwin, S. J., & Ochieng, J. (2010). Fetuin-A (α 2HS-glycoprotein) is a major serum adhesive protein that mediates growth signaling in breast tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 41827-41835.
14. Taşkıran, A. Ş., & Ergül, M. (2021). The Protective Effect of Hydralazine against Hydrogen Peroxide (H₂O₂)-Induced Oxidative Damage in C6 Glial Cell Line. *Turkish Journal of Science and Health*, 2(1), 8-15.
15. Kalabay, L., Cseh, K., Benedek, S., Fekete, S., Masszi, T., Herjeczki, K., ... & Jakab, L. (1991). Serum α 2-HS glycoprotein concentration in patients with hematological malignancies. *Annals of hematology*, 63(5), 264-269.
16. Kwak, J. Y., Ma, T. Z., Yoo, M. J., Choi, B. H., Kim, H. G., Kim, S. R., ... & Kwak, Y. G. (2004). The comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for acute myeloid leukemia. *Experimental hematology*, 32(9), 836-842.
17. Nangami, G. N., Sakwe, A. M., Izban, M. G., Rana, T., Lammers, P. E., Thomas, P., ... & Ochieng, J. (2016). Fetuin-A (alpha 2 HS glycoprotein) modulates growth, motility, invasion, and senescence in high-grade astrocytomas. *Cancer medicine*, 5(12), 3532-3543.