

## Kapsaisinin H2452 Mezotelyoma Hücre Hattından Seçilen Klonlarda Sitotoksitesinin ve Kaspaz-3 Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Gizem CEYLAN<sup>1\*</sup>, Sabahattin CÖMERTPAY<sup>2</sup>

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 46100, Kahramanmaraş

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0002-9627-5492>, <sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0002-2364-8171>

✉: gizemkksal@hotmail.com

### ÖZET

Mezotelyoma; kalp, akciğer ve karın gibi iç organların yüzeyini kaplayan mezotelyum dokusundan gelişen bir kanser türüdür ve tümörlerinin poliklonal kökene sahip olduğu düşünülmektedir. Kapsaisinin kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri bilinmektedir. Bu çalışmada; H2452 mezoteliyomahücre hattından seçilmiş dört (I, II, III ve IV numaralı) Klon üzerinde kapsaisinin sitotoksitesini ve kaspaz-3 ifadesine ve aktivasyonuna etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla; öncelikle, Klonların IC<sub>50</sub> değerleri MTS [3-(4,5)-dimetiltiazol-2-il]-5-(3-karboksümetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum] tuzunun formazana indirgenmesi yoluyla belirlenmiş ve kapsaisin sitotoksitesinin bazı Klonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdiği (p<0.01) ortaya konulmuştur. Daha sonra, seçilen Klonlara ortalama IC<sub>50</sub> derişiminde (251.6 µM) kapsaisin uygulanmış ve hücre büyüme eğrileri çizilmiştir. Buna göre; 72 saat sonunda, Klon I'nin diğer Klonlardan daha yüksek sayıda (p<0.001) canlı hücre içerdiği gözlenmiştir. Bunu takiben gerçekleştirilen qRT-PCR ve Western Blotlama ile; kapsaisin uygulanmış (KAP), etanol uygulanmış (EtOH) ve herhangi bir uygulama görmemiş, kontrol grubu hücrelerinde kaspaz-3 molekülünün sırasıyla mRNA ve protein seviyesindeki değişimler tespit edilmiştir. Sonuç olarak; kapsaisin sitotoksitesinin seçilen Klon ile anlamlı bir değişiklik gösterdiği tespit edilmiş, ve kaspaz-3 proteininin inaktif ve aktif biçimlerinin miktarı ile bağlı kaspaz-3 mRNA seviyesi her bir Klon için diğerlerinden farklı sonuçlar ortaya koymuştur. Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, mezotelyoma tümörlerini oluşturan hücre popülasyonlarının poliklonal kökene sahip olabileceği fikri destekleniyor görülmektedir.

### Araştırma Makalesi

#### Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 15.01.2020

Kabul Tarihi : 13.03.2020

#### Anahtar Kelimeler

Mezoteliyoma

Kapsaisin

KAP

Tümör heterojenitesi

Apoptoz

## Determination of the Cytotoxicity of Capsaicin and its Effects on Caspase-3 in the Clones Selected from H2452 Mesothelioma Cell Line

### ABSTRACT

Mesothelioma is a type of cancer that develops from the mesothelium tissue that covers the surface of the internal organs such as the heart, lungs and abdomen, and its tumors are thought to have polyclonal origin. Apoptotic effects of capsaicin on cancer cells are known. In this study; we tried to determine the cytotoxicity of capsaicin and its effects on caspase-3 expression and activation on four (clone-I, -II, -III and -IV) clones selected from the H2452 mesothelioma cell line. For this purpose; firstly, capsaicin cytotoxicity, i.e. IC<sub>50</sub> values of clones were determined by the method of reduction of MTS [3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl]-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] salt to formazan. It has been demonstrated that the type of the clones was affecting the IC<sub>50</sub>'s of capsaicin statistically significantly (p < 0.01). Subsequently, capsaicin was applied to selected clones at an average concentration of IC<sub>50</sub> (251.6 µM) and cell growth curves were plotted. Accordingly; after 72 hours of capsaicin treatment, clone-I was observed to contain a higher

### Research Article

#### Article History

Received : 15.01.2020

Accepted : 13.03.2020

#### Keywords

Mesothelioma

Capsaicin

CAP

Tumor heterogeneity

Apoptosis

number of viable cells ( $p < 0.001$ ) than other clones. By qRT-PCR and Western blotting performed following the application, mRNA and protein levels of caspase-3 molecule were determined in capsaicin-treated (KAP), ethanol-treated (EtOH) and untreated control cells. As a result, the capsaicin cytotoxicity was found to differ significantly between the selected clones, and the amount of inactive and active forms of the caspase-3 protein and the relative caspase-3 mRNA levels showed different results for each clone. When all the findings were evaluated together, the idea that the cell populations forming mesothelioma tumors may have a polyclonal origin appears to be supported.

**To Cite :** Ceylan G, Cömertpay S 2020. Kapsaisin H2452 Mezotelyoma Hücre Hattından Seçilen Klonlarda Sitotoksitesinin ve Kaspaz-3 Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 23 (5): 1125-1134. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.673591

## GİRİŞ

Mezotelyoma akciğer, kalp ve karın zarında gelişen ve teşhisten sonra ortalama yaşam süresi 1 yıl olarak verilen, nadir ancak oldukça öldürücü bir kanser türüdür (Robinson, Musk ve Lake, 2005). Dünya Sağlık Örgütü'nün istatistiklerine göre, 2018 yılında tahmini 30443 ölüm ve 25576 yeni vaka olduğu belirtilmiştir (Bray ve ark., 2018). Malignant mezoteliyoma dünya genelinde asbestos maruziyeti ile ilişkilendirilirken, Türkiye'nin bazı bölgelerinde bu hastalığın eriyonit maruziyeti ile de oluştuğu bildirilmiştir (Metintas ve ark., 2017). Mezoteliyoma geleneksel kanser tedavileri ile tedavi edilememektedir ve hastalığa karşı etkili bir tedavi yöntemi henüz bulunamamıştır (Hiddinga ve ark., 2015). Bunun nedenlerinden birinin tümör heterojenitesi olduğu düşünülmektedir. Nitekim mezoteliyoma tümörlerinin poliklonal yapıda olduğu, yani tümörün birden fazla hücrenin başkalaşımıyla oluşan karma popülasyonlar içerdiği, temeli X kromozomunun seçimli inaktivasyonuna dayanan bir metotla ortaya konulmuştur (Comertpay ve ark., 2014).

Etkili bir tedavi yöntemi bulunmayan birçok kanser için, koruyucu ve tedavi edici yeni yöntemler gereklidir. Bu açıdan, besinlerin içerdiği etken maddelerin kullanılması, kanseri önlemek ve tedavi etmek için cazip bir alternatif oluşturmaktadır (Zhang ve ark., 2008). Kapsaisin, *Capsicum* cinsine ait bitkilerde (biber) özgün olarak üretilen ikincil bir metabolittir. Kapsaisin, anti-radikal, anti-oksidan ve DNA koruyucu etkilerinin (Bayıl-Oğuzkan ve ark., 2017; Bayıl-Oğuzkan ve Uğraş, 2019) yanı sıra kanser hücrelerini öldürdüğü de bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, kapsaisin, gastrik kanser (Huh ve ark., 2011), prostat kanseri (Mori ve ark., 2006), karaciğer kanseri (Huang ve ark., 2009) ve lösemi (Ito ve ark., 2004) hücrelerinde büyümeyi azalttığı, hatta hücre döngüsünü sekteye uğratarak kanser hücrelerini apoptoza yönlendirdiği gösterilmiştir.

Apoptoz, programlanmış hücre ölümüdür ve içsel (mitokondriyal), dışsal ve perforin ve granzim yolağı olmak üzere üç ana yoldan meydana gelir

(Martinvalet ve ark., 2005). Kaspaz bağımlı apoptotik yolların her biri kendi başlatıcı kaspazını (kaspaz 8, 9, 10) aktive etse de tüm bu apoptoz tiplerinde süreç, infaz yolağı, yani kaspaz 3'ün aktive olması, ile devam eder (Elmore, 2007).

Bu çalışmada, malignant mezotelyomanın poliklonal orijinli bir tümör olduğu gerçeğine dayanarak mezotelyomanın kanserli hücrelerinden seçilen dört klon üzerinde kapsaisin sitotoksitesinin nasıl değiştiği MTS [3-(4,5)-dimetiltiazol-2-il]-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfenil)-2H-tetrazolyum] ile, hücre büyüme hızları oluşturulan eğriler üzerinden değerlendirilirken, gözlenen ölümlerin apoptotik olup olmadığına ilişkin yorumda bulunabilmek için kaspaz-3 proteini ve onu kodlayan mRNA'nın seviyesi değerlendirilmiştir. Sonuçların kapsaisin mezotelyoma üzerinde terapötik potansiyelinin değerlendirilmesi ve mezotelyoma tümörlerinin yapısının bilinmesi açısından önemli katkılarda bulunacağı düşünülmektedir.

## MATERYAL ve METOT

### Hücre Kültürü

ATCC (American Type Cell Culture; Virjinya, ABD) firmasından satın alınan H2452 malignant mezoteliyoma hücreleri, %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 Penicilin Streptomisin içeren DMEM (Dubelco's Modification on Eagle's Medium) besiyeri (H2452 besiyeri) içerisinde, 37 °C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> basıncı sağlayan inkübatörlerde yetiştirilmiştir.

### Klon Seçimi

Klon seçiminde, temel olarak hücrelerin buldukları kabın içerisine tek bir hücre gelecek şekilde seyreltilmesi ve bu hücrenin bölünmesiyle oluşacak popülasyonun kullanımı yaklaşımı izlenmiştir. Bunun için Ceylan (2019) tarafından verilen metod kullanılmıştır. Özet olarak; sayılan hücreler 96 kuyucuklu tabağın her bir kuyucuğuna bir hücre gelecek şekilde seyreltilmiştir. Kuyucuklara hücre ekimini takiben bir gece beklendikten sonra, içerisinde

1 adet hücre olan kuyucuklar işaretlenmiştir. Klon deneyleri için bu kuyucukların büyümeleri takip edilmiştir. Sayılarını arttıran Klon lar, tripsinlenip sırayla 12 kuyucuklu tabaka, 6 kuyucuklu tabaka, T25 flask ve T75 flask içerisine alınmış ve kademeli olarak büyütülmüştür. Klon ların morfolojik yapıları 6 kuyucuklu tabaka içerisindeyken çekilen fotoğraflarla belirlenmeye çalışılmıştır. Fotoğraf çekimlerinde kameralı mikroskop (Juli Br, Güney Kore) kullanılmıştır. Bu çekimlere ilişkin ölçek fotoğraflar üzerinde gösterilmiştir.

### **Kapsaisin ve Etanol Uygulaması**

Çalışmada kullanılan kapsaisin Cayman Chemicals (Michigan, ABD) firmasından satın alınmıştır. Toz halinde ulaştırılan,  $\geq 95$  saflıklaki bu ürün etanolde çözülünceye kadar  $+4$  °C'de saklanmıştır. Deney kullanımlarında, kapsaisin Merck firmasından (Darmstadt, Almanya) satın alınan yüksek saflıktaki ( $>99.5$ , absolute) etanol içerisinde çözünmüş, böylece 65 mM'lik stok çözelti elde edilmiştir. Bu çözelti 100  $\mu$ L'lik kısımlara ayrılarak çalışma çözeltileri hazırlanmaya dek  $-20$  °C'de tutulmuştur. Etanol uygulanacak grup için, besiyerine, yine bu saf etanolden, hesaplanan miktarda eklenmiştir.

### **MTS (3-(4,5)-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksi fenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum) Metodu**

Metod, Helvacı ve Cömertpay (2018)'in tarifinde gerekli bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. 96 kuyucuklu tabağa, her bir kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde ekilen hücreler, ertesi gün 0-800  $\mu$ M arasında 100  $\mu$ M'lik farklarla değişen kapsaisininle 24 saat boyunca muamele edilmişlerdir. Bu deneylerde, ek bir 96 kuyucuğun, her sütundaki ilk dört kuyucuğuna ekilen hücrelere, her bir kapsaisin derişimini çözen miktarda etanol eklenmiş besiyeri uygulanmıştır. Her sütunda hücresiz bırakılan iki kuyucuğa ilgili kapsaisin derişimlerini içeren besiyeri, diğer ikisine ise ilgili etanol derişimini içeren besiyeri eklenmiştir. Bu tabaka, etanolün hücrelere yaptığı etkiyi, kapsaisin ve etanol çözeltilerinin hücre olmadan yaptıkları absorbansları anlayabilmek için deneylere dahil edilmiştir. Muamele sonunda 1:1 oranında seyreltilmiş MTS çözeltisinden 10  $\mu$ L her bir kuyucuğa eklenmiş ve hücreler 4 saat boyunca inkübatörde bekletilmiştir. Bu süre içerisinde MTS tuzunun formazana dönüşmesiyle oluşan mor renkli bileşiğin 490 nm'de absorbansı ölçülmüş ve bu değerlerden, hücresiz kapsaisin çözeltilerinin yaptığı absorbans değerleri çıkarılmıştır. Kapsaisin muamelesi görmemiş (0  $\mu$ M) hücrelerin canlılıkları %100 kabul edilerek, tüm derişimlerdeki canlı hücre oranı % biçiminden ifade edilmiştir. Hesaplanan hücre canlılıkları, kapsaisin derişimine karşı GraphPad Prism XY tablosunda grafiğe geçirilmiş ve yazılımın gerekli fonksiyonları kullanılarak IC<sub>50</sub> değerleri

hesaplanmıştır. Her bir klon için ayrı ayrı belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerinin aritmetik ortalaması alınmış, bu değer, büyüme eğrisi, kaspaz-3 protein ve mRNA seviye tespiti deneylerinde kullanılacak ortak IC<sub>50</sub> değeri olarak belirlenmiştir.

### **H2452 Hücrelerinden Seçilen Klon lar ve Karma Hücre Popülasyonu İçin Çizilen Büyüme Eğrisi Grafikleri**

Seçilen dört H2452 hücre klonu ve klon seçimi yapılmamış karma popülasyon hücreleri, 96 lık tabaklara, her kuyucukta 5000 adet hücre olacak şekilde ekildikten sonra 16 saat beklenmiş ve bu süre sonunda hücre fotoğrafları çekilir çekilmez (0 saat) besiyerleri ortak IC<sub>50</sub> değerinde (251.6  $\mu$ M) kapsaisin (KAP), eşlenik miktarda etanol (EtOH) ve ya da hiçbir muamele içermeyen (Kontrol) besiyerleriyle değiştirilmiştir. 72 saat süren muamelede hücrelerin 0 saat, 24 saat, 48 saat ve 72 saat sonraki fotoğrafları kameralı mikroskop (JuliBr, Güney Kore) yardımıyla çekilmiştir. Fotoğraflardaki hücre yoğunluğu mikroskobun yazılımı ile belirlenmiştir. Her bir klon için, başlangıç anında (0 saat) alınan ortalama değer %100 kabul edilerek, diğer tüm ölçümler buna göre hesaplanmıştır. Hesaplama sonunda elde edilen değerler GraphPad Prism programı aracılığıyla grafiğe dönüştürülmüştür. Canlı hücre yüzdelerinin her bir klon ve karma popülasyon için her bir zaman noktasındaki değerleri birbirleriyle student t test kullanılarak karşılaştırılmıştır.

### **Western Blotlama**

Kaspaz-3 protein miktarındaki değişim, Comertpay ve Ceylan (2019)'in anlattığı şekilde tespit edilmiştir. Kısaca; üç ayrı T25 flaska yaklaşık 391000 hücre ekimi yapılmış, ertesi gün flasklardaki besiyerleri sırasıyla ortak IC<sub>50</sub> değerinde kapsaisin (KAP) içeren, bu kapsaisini çözen miktar kadar etanol (EtOH) içeren, ve herhangi bir eklenti içermeyen (Kontrol) besiyerleri ile değiştirilmiştir. 24 saatin sonunda hücre proteinleri, proteaz inhibitör kokteyli (Roche; Almanya) ile karıştırılmış MPER (Mammalian Protein Extraction Reagent) (Thermo Scientific; ABD) tamponu ile izole edilmiştir. İzolasyondan sonra gerçekleştirilen SDS-PAGE ve transfer işlemleriyle proteinleri tutuklayan PVDF zarı, kaspaz-3 (abcam; ab32351, Birleşik Krallık) ve GAPDH (Thermo Fisher; ABD) birincil antikoları, sonrasında anti-tavşan (abcam; Birleşik Krallık) ve anti-keçi (Boster; Kanada) ikincil antikolarıyla muamele edilmiştir. İşlemler sonunda PVDF zara ECL substratı (BioRad; CA, ABD) verilmiş ve görüntüleme cihazı (UVP Camera Systems; Cambridge, Birleşik Krallık) ile ışıksız ortamda fotoğrafları çekilmiştir. Gözlenen bantların şiddeti Image J (MD, ABD) programıyla analiz edilmiştir.

## qRT-PCR

Kaspaz-3 mRNA'sı için gerekli RNA'ların izolasyonu ve bu RNA'ların cDNA'ya dönüştürülmesi işlemi Helvacı ve Cömertpay (2018) tarafından anlatıldığı gibi yapılmıştır. Primerler, NCBI (National Center for Biotechnology Information, ABD) 'dan alınan kaspaz-3 transkript varyantları üzerinden dizayn edilmiştir (Çizelge 1). Referans primeri olarak aynı yöntemle oluşturulan beta aktin primeri kullanılmıştır (Çizelge

1). SYBR Green içeren Bright Green 2X qPCR Master Mix-No Dye (master mix-S, abm) kullanılarak RT-PCR kurulmuştur. RT-PCR döngü parametreleri 95 °C 5 dk, 94 °C 1 dk, 53 °C 1dk, 72 °C 2 dk, 72 °C 5 dk olarak ayarlanmıştır. Oluşan ürünlerin primer dimerlerden ayırt edilmesi maksadıyla oluşturulacak erime eğrisi için sıcaklık aralığı 40 °C- 95 °C olarak girilmiştir. Elde edilen Ct değerleri kullanılarak molekülün ifadesindeki bağıl değişiklik Schmittgen ve Livak (2008)'ın önerdiği hesaplama ile belirlenmiştir.

Çizelge 1. RT-PCR analizinde kullanılan primerler ve sekansları

Table 1. Primers used in RT-PCR and their sequences

Primerler <i>Primers</i>	Sekans (5'-3') <i>Sequences (5'-3')</i>	Ürün için beklenen baz çifti sayısı <i>Estimated base pair length for the product</i>
Beta-aktin(ileri) <i>Beta-Actin (Forward)</i>	CCCTGGACTTCGAGCAAGAG	323
Beta-aktin(geri) <i>Beta-Actin (Reverse)</i>	GATCTTCATTGTGCTGGGTGC	
Kaspaz-3 (ileri) <i>Caspase-3 (Forward)</i>	ATCACAGCAAAGGAGCAGT	304
Kaspaz-3 (geri) <i>Caspase-3 (Reverse)</i>	AACCCCTGCTTAATCGTCAAT	

## İstatistiksel Analiz

Çalışmada, tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism (CA, ABD) programı kullanılarak yapılmıştır. IC<sub>50</sub> değeri tespiti için, GraphPad Prism programının "Analyze" seçeneğinde, "Non-linear Regression" başlığı altındaki "EC50 shift" fonksiyonu kullanılmıştır. Klonlardaki IC<sub>50</sub> karşılaştırmalarında iki yönlü ANOVA testi kullanılmış, 'interaction' için verilen p değerleri 0.05'ten küçük olduğunda Klon tipinin sonuçlara anlamlı ölçüde etki ettiği sonucuna varılmıştır. mRNA ölçümlerine ait verilerin analizinde unpaired ttest kullanılmış ve 0.05'ten küçük p değerleri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. \*, \*\*, \*\*\* ve \*\*\*\* sırasıyla 0.05, 0.01, 0.001 ve 0.0001'den küçük p değerlerini temsil etmektedir.

Çalışmada kullanılan hücre kültürleri ticari firmadan sağlandığı için ayrıca bir etik kurul belgesine ihtiyaç duyulmamıştır.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### H2452 Hücrelerinden Seçilen Klon lar

H2452 hücre popülasyonunda 4 adet Klon seçilmiştir. Seçilen bu Klon ların her birinin fotoğrafı Şekil 1'de gösterilmektedir. Fotoğraflar incelendiğinde her bir Klon un morfolojik farklılıkları dikkat çekmektedir.

### H2452 Hücrelerinden Seçilen Klon lar İçin Çizilen IC<sub>50</sub> Grafikleri

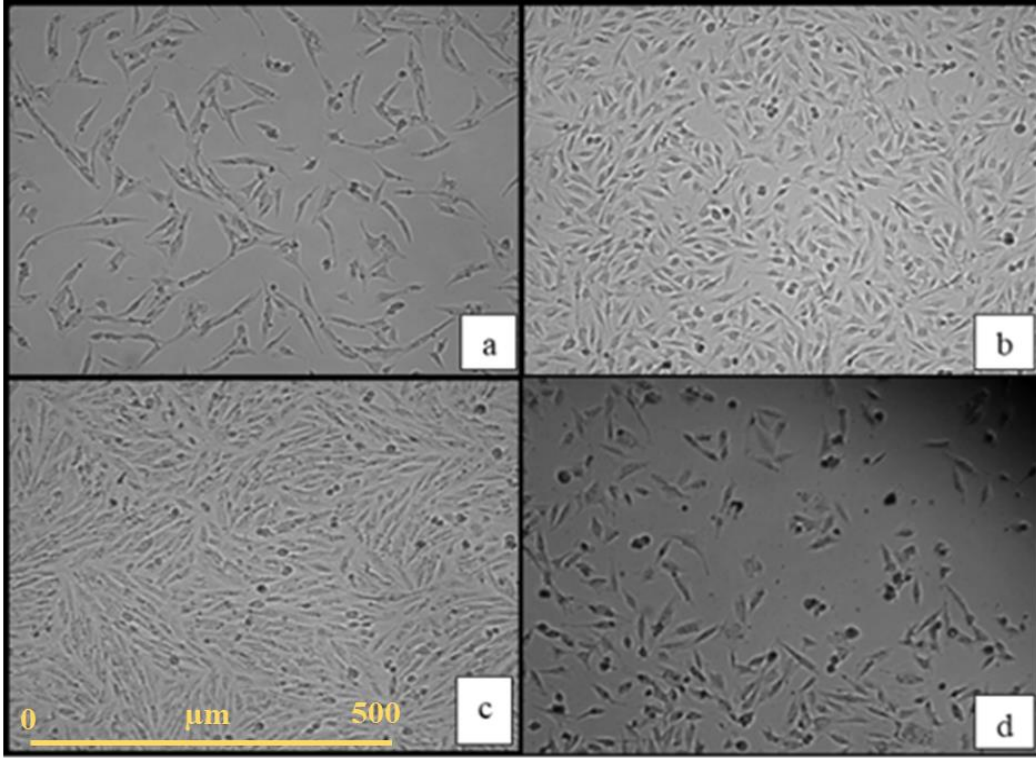
I, II, III ve IV numaralı dört Klon için yapılan MTS deneylerinin IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 282.1 µM, 246.8 µM, 259.7 µM ve 217.8 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 2). Elde edilen Kapsaisin Derişimi'ne karşı % Hücre Canlılığı verileri, İki Yönlü ANOVA ile karşılaştırıldığında Klon tipinin kapsaisin

sitotoksitesine anlamlı bir etkide bulunduğu bulunmuştur (p<0.0001).

Bu değerlerin ortalamasının alınmasıyla, diğer deneylerde kullanılacak ortak IC<sub>50</sub> değeri 251.6 µM olarak bulunmuştur. Ortalama IC<sub>50</sub> değerimiz literatürdeki diğer çalışmalarda bulunan değerlerle karşılaştırılmıştır. Ancak, literatürde kapsaisin mezotelyoma üzerine etkisi yeterince değerlendirilmediğinden, bu karşılaştırmalar diğer kanser tiplerine ait hücre hatlarıyla kısıtlı kalmıştır. Örneğin; kolon kanserinin iki farklı hücre hattı olan HCT-116 ve CaCo-2 üzerinde yapılan çalışmalarda, IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 66.77 ± 10.78 µM ve 163.70 ± 9.32 µM olarak verilmiştir (Li ve ark., 2018). Çocukluk T akut lenfoblastik lösemili iki hücre hattı (CEM/ADR 500 ve CCRF-CEM) ile yapılan MTS testinin IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 125.85 ± 22.05 µM ve 67.55 ± 6.29 µM olarak bulunmuştur (Li ve ark., 2018). Bir başka çalışmada ise, bir osteosarkom hücre hattında kapsaisin IC<sub>50</sub> değeri 165.7 µM (Jin ve ark., 2016) olarak belirlenmiştir. Bizim H2452 hücre Klon ları için bulduğumuz IC<sub>50</sub> değerlerinin aritmetik ortalaması (251.6 ± 24,84 µM), sunulan bu değerlerden belirgin bir şekilde yüksektir. Bu da mezoteliyomanın agresif bir tümör (Scherpereel ve ark., 2018) olduğu düşüncesini desteklemektedir.

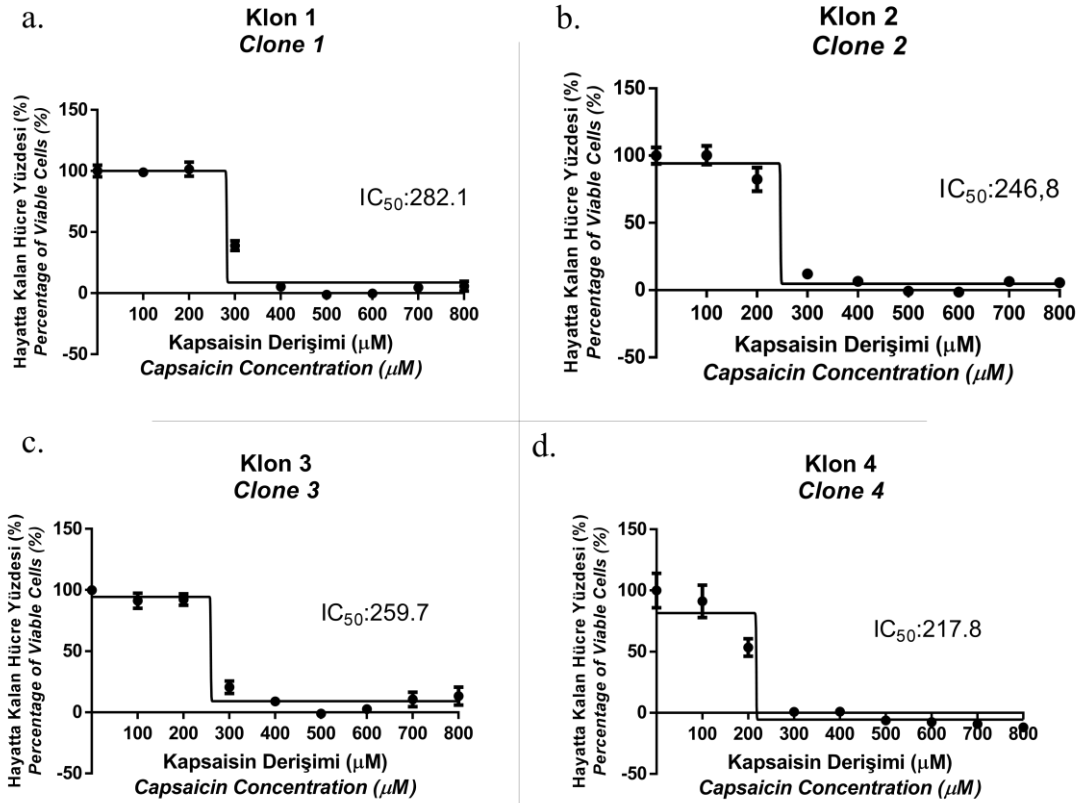
### H2452 Hücrelerinden Seçilen Klon lar İçin Çizilen Büyüme Eğrisi Grafikleri

Ortak IC<sub>50</sub> değerinde kapsaisin içeren besiyeri ortamında tutularak 72 saat boyunca gözlenen hücrelerin büyüme eğrisi grafikleri Şekil 3'te gösterilmektedir.



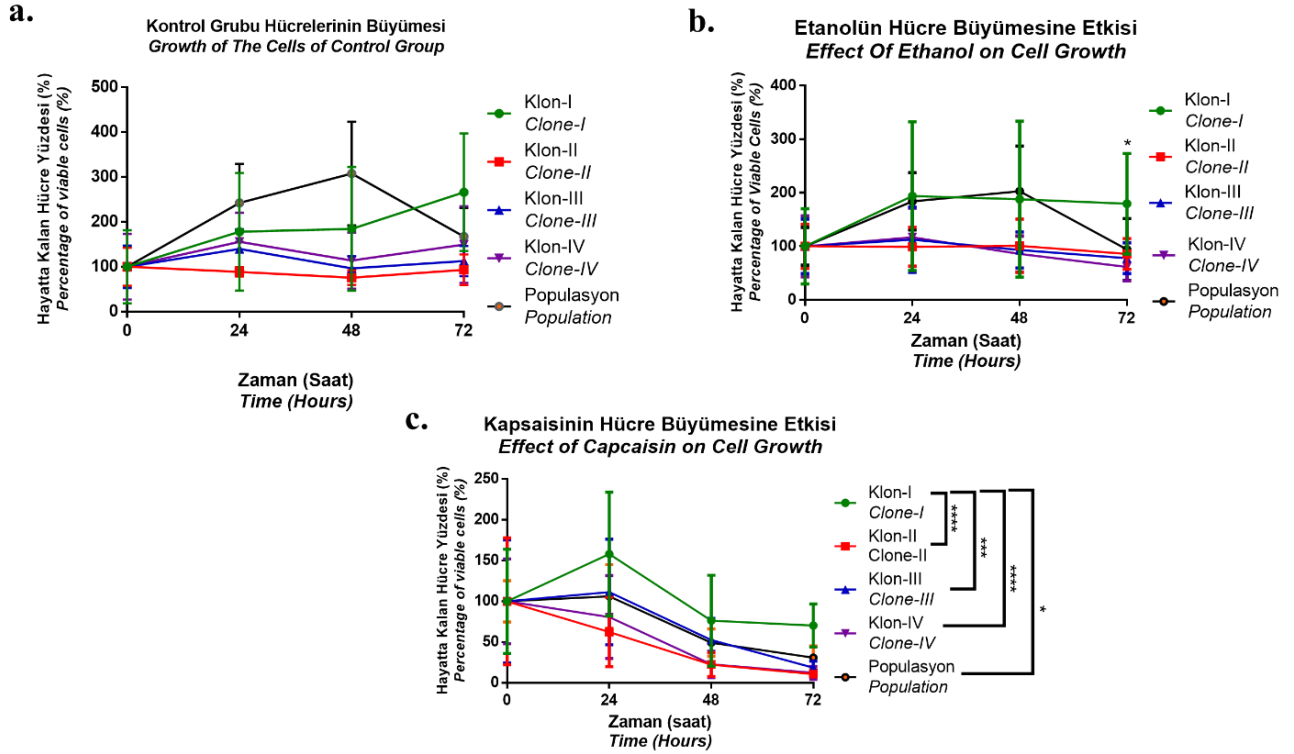
Şekil 1.H2452 hücre populasyonundan seçilen Klon lar:a. Klon I, b. Klon , II,c. Klon III, d. Klon IV. Tüm fotoğraflar için aynı skala kullanılmıştır.

Figure 1. Clones selected from the H2452 cell population., A. clone I, b.clone II, c. clone III, d. Clone IV. The same scale was used for all pictures.



Şekil 2.Seçilen Klon ların IC<sub>50</sub> grafikleri. a. Klon I,b. Klon II,c. Klon III,d.Klon IV.

Figure 2.IC<sub>50</sub> graphs of the selected clones. a. clone I, b. clone II, c. CloneIII, d. clone IV.



Şekil 3. H2452 hücrelerinden seçilen Klon ların (a) Kontrol, (b) EtOH ve (c) KAP, gruplarında büyüme eğrileri. \*:p<0.05, \*\*:p<0.01, \*\*\*: p<0.001, \*\*\*\*: p<0.0001. KAP: Ortak IC<sub>50</sub> değerinde kapsaisin muamelesi görmüş hücreler. EtOH: Belirtilen miktarda kapsaisin verilmesi sırasında çözücü olarak kullanılan etanol değerine eşdeğer etanol muamelesi görmüş hücreler. Kontrol: Muamele görmemiş hücreler.

Figure 3. Growth curve the clones selected from H2452 cells in (a) Control, (b) EtOH and (c) KAP groups \*:p<0.05, \*\*:p<0.01, \*\*\*: p<0.001, \*\*\*\*: p<0.0001. CAP: Cells treated with capsaicin at a common IC<sub>50</sub>. EtOH: Cells treated with ethanol equivalent to the ethanol value used as solvent during the administration of the indicated amount of capsaicin. Control: Untreated cells.

Klon lar arasında yapılan karşılaştırma sonunda kapsaisin uygulanmış koşullarda Klon I'in 72 saatteki hücre canlılığı, diğer tüm Klon lardan (p<0.0001 ve p<0.001) ve karma popülasyondan daha yüksek bulunmuştur (p<0.01). Ancak Klon I, -III ve -IV büyüme hızları bakımından bir farklılık göstermemiştir (p>0.05).

Sonuçlarımızın karşılaştırılabileceği bir çalışmada, henüz kemoterapi almamış bireylerin glioblastoma tümörlerinden ilk kültürleme yapılmış ve buralardan seçilen Klon lar kültür ortamında büyütülmeye çalışılmıştır. Buna bağlı olarak Klon lama sonuçları, orijinal birincil kültürlerin, hücrelerin kendi kendini yenileme kapasitesi bakımından dört fark edilebilir kategoriyle ayrılabilir denli heterojen olduğunu göstermiştir: Bu gruplar; (1) genişletilebilir Klon lar, (2) geçici olarak çoğalan hücreler, (3) hareketsiz veya post-mitotik hücreler ve (4) kültür döneminde ölen tek hücreler, şeklinde ifade edilmiştir (Segerman ve ark., 2016). Sonuçlar bu bağlamda değerlendirildiğinde; Klon I'in bir grup, Klon II, -III ve -IV'ünse ayrı bir grup olarak ayrılabilirliği düşüncesi kabul edilebilir görülmektedir.

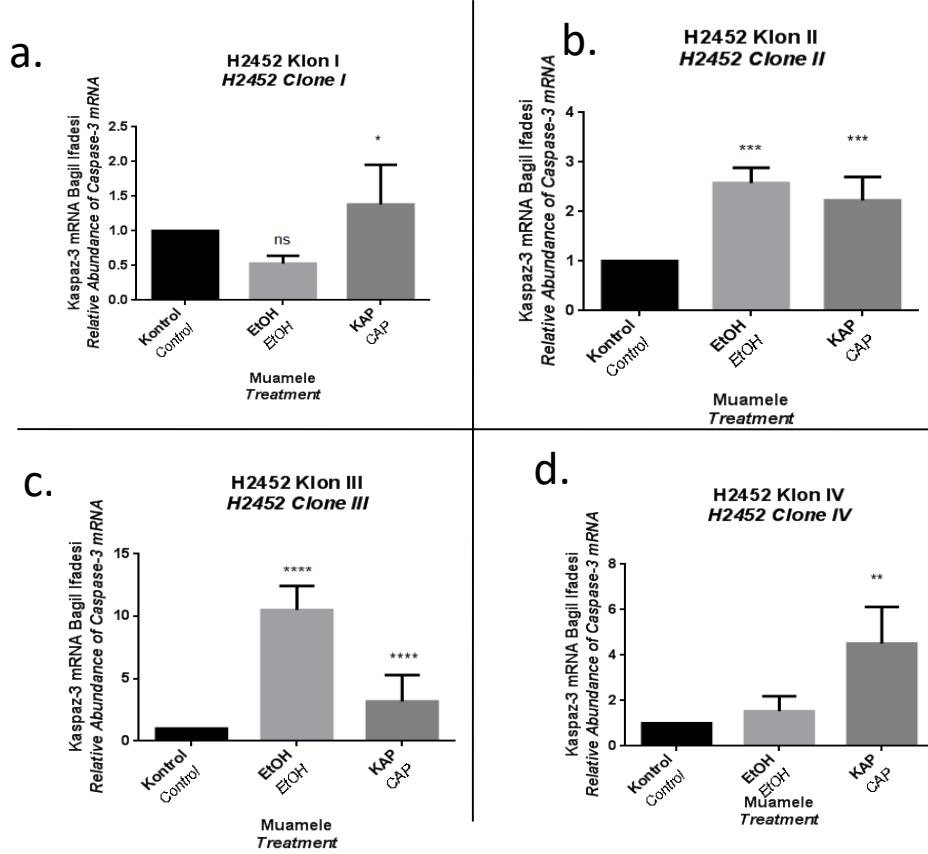
#### qRT-PCR

KAP, EtOH ya da kontrol grubu hücrelerden izole edilen RNA'lar ile kaspaz-3 mRNA seviye tespitinin sonucu olarak; Klon I'de (Şekil 4a) kaspaz-3 mRNA seviyesinin etanolde kontrol grubuna oldukça yakın değerde (~1) olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte kapsaisin uygulaması ile kaspaz-3 mRNA miktarı yaklaşık olarak 2 kat artmıştır. Klon II'ye (Şekil 4b) bakıldığında kapsaisin ve etanolün kaspaz-3 mRNA miktarını neredeyse aynı oranda arttırdığı görülmüştür (p<0.05). Klon III'te (Şekil 4c) bu sonuçlardan farklı olarak, kapsaisinin kaspaz-3 mRNA miktarını arttırmasına ek olarak etanolde bu miktarın istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir (p<0.01). Klon IV'te (Şekil 4d) ise yine kapsaisin kaspaz-3 mRNA miktarı artmış iken etanolde de bir miktar artış görülmüştür.

Kanserli hücre Klon larında kapsaisin uygulaması kaspaz-3 mRNA seviyesini tüm Klon larda arttırmıştır (p<0.05). Ancak burada, artış oranının farklılığının yanında, hücrelerin etanole verdiği tepkiler dikkat çekicidir. Etanol uygulaması Klon I ve Klon IV için kaspaz-3 mRNA seviyesinde hiçbir değişikliğe neden olmazken (p>0.05), Klon II ve III için bu ifadeyi

arttırmıştır ( $p < 0.001$ ). Kapsaisinde klonlar arasında fark olması beklenen bir sonuç olmasıyla birlikte etanolün bu etkisi beklenen bir sonuç değildir. Buna göre bazı klonlarda (II ve III) etanolün hücrelerde stres yarattığı ve bunun da apoptozisi indüklediği düşünülebilir. Literatüre göre etanolün hücrelerin üzerinde böyle bir etkisinin olduğunu belirtilmiştir, dolayısıyla bu çalışma kapsamında yapılan gözlemler, bazı önceki çalışmalarla (Katz ve ark., 2001) uyum

içerisindedir. Bahsi geçen çalışmada, çalışma grubu in vivo koşullarda 100 mM etanolün hücrelerde düşük yüzdelerde (%22) apoptotik etkilere neden olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmada kullanılan etanol derişimi hacimce % 1.2, yani yaklaşık 270 mM'dır. Bu derişimin, üstelik in vitro koşullarda bazı hücrelerde apoptozu tetikleyebiliyor olması, her ne kadar seviye etanolün sitotoksik seviyelerinin çok altındaysa da (Tapani ve ark., 1996), mümkün görünmektedir.



Şekil 4. H2452 hücrelerinden seçilen klonlara kapsaisin uygulamasının qRT-PCR'da kaspaz-3'ün ekspresyon seviyesine etkisinin gözlemlenmesi

a. Klon I, b. Klon II, c. Klon III, d. Klon IV. KAP: Ortak  $IC_{50}$  değerinde kapsaisin muamelesi görmüş hücreler. EtOH: Belirtilen miktarda kapsaisin verilmesi sırasında çözücü olarak kullanılan etanol değerine eşdeğer etanol muamelesi görmüş hücreler. Kontrol: Muamele görmemiş hücreler.

Figure 4. Observation of the effect of capsaicin administration to clones selected from H2452 cells on expression level of caspase-3 by qRT-PCR

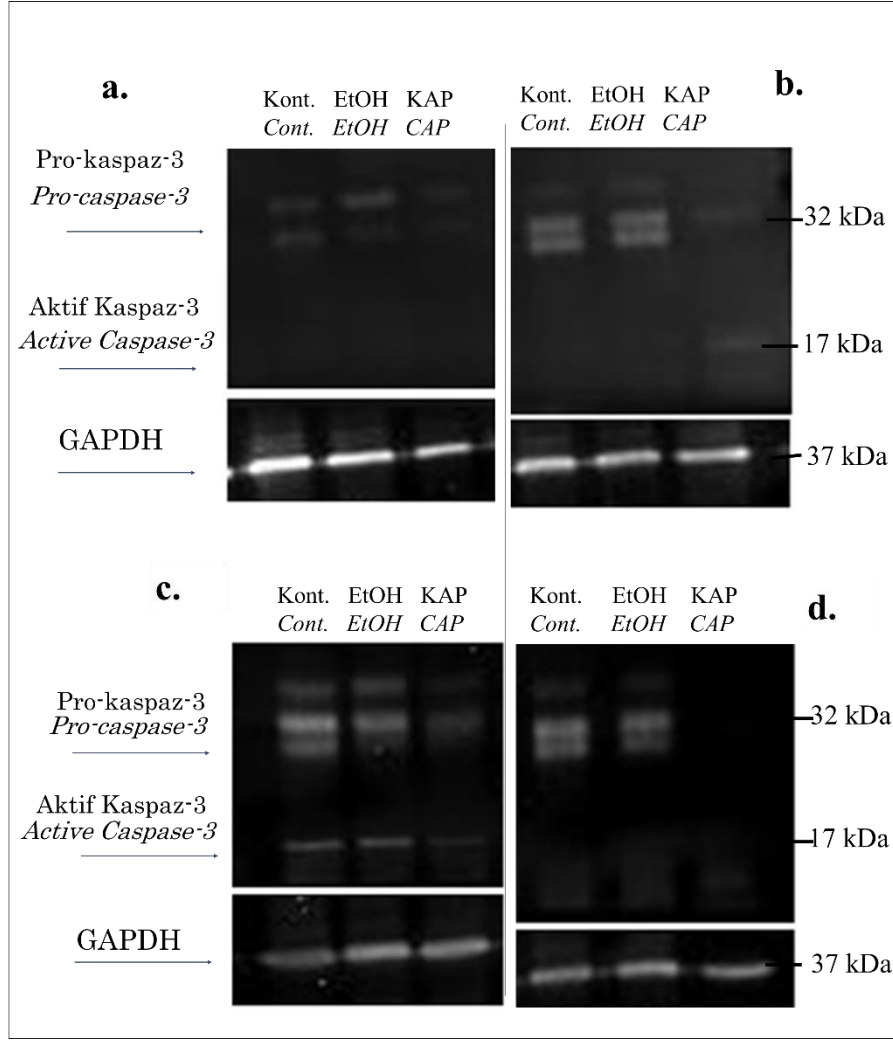
a. clone I, b. clone II, c. clone III, d. clone IV. CAP: Cells treated with capsaicin at a common  $IC_{50}$ . EtOH: Cells treated with ethanol equivalent to the ethanol value used as solvent during the administration of the indicated amount of capsaicin. Control: Untreated cells.

Klonlar ile yapılan RT-PCR analizlerinde yalnızca kaspaz-3 miktarının incelenmesi, apoptotik eğilimi anlamak için yeterli görülmebilir. Ancak, Elmore (2007) kaspaz-3'ün görülmesinin apoptotik sinyal yolağının aktive edildiğine dair önemli bir işaret olduğunu belirtmiştir. Bunun sebebi; apoptozda görülen üç ana yolağın her birinin apoptotik cevabın ana bileşenleri olan kendi başlatıcı kaspazlarını (kaspaz 8, 9, 10) aktive etmesi (Riedl ve Shi, 2004) ve bu üç yolağın, yürütücü kaspaz yani kaspaz 3'ün

aktivasyonunda birleşmesidir (Elmore, 2007). Çalışmada, hangi apoptotik yolağın aktivie edildiğinin bilinmesinden ziyade apoptozun tetiklenip tetiklemediği gözlemlenmek istendiği için kaspaz-3 kullanılması uygun bulunmuştur.

#### Western Blot

Çalışılan her bir klon için KAP, EtOH ve Kontrol gruplarında kaspaz-3 ve GAPDH protein miktarları Şekil 5'te verilmektedir.



Şekil 5. H2452 hücrelerinden seçilen Klonlara kapsaisin muamelesinin kaspaz-3 protein seviyesinde neden olduğu değişikliklerin Western Blot yöntemiyle tespit edilmesi a. Klon I, b. Klon II, c. Klon III, d. Klon IV. KAP: Ortak IC<sub>50</sub> değerinde kapsaisin muamelesi görmüş hücreler. EtOH: Belirtilen miktarda kapsaisin verilmesi sırasında çözücü olarak kullanılan etanol değerine eşdeğer etanol muamelesi görmüş hücreler. Kontrol: Muamele görmemiş hücreler.

Figure 5. Detection of changes in caspase-3 protein levels caused by capsaicin treatment to the clones selected from H2452 by Western Blot method a. clone I, b. clone II, c. clone III, d. clone IV. KAP: Cells treated with capsaicin at the common IC<sub>50</sub>. EtOH: Cells treated with ethanol equivalent to the ethanol value used as solvent during the administration of the indicated amount of capsaicin. Control: Untreated cells.

mRNA sonuçları da dikkate alınarak, burada EtOH ile KAP arasındaki farklara yoğunlaşılmıştır. Buna göre, Klon II ve Klon IV'te aktif kaspaz-3 miktarı kapsaisin muamelesiyle belirgin bir şekilde artmıştır. Dahası, bu Klonlarda kaspaz-3 mRNA miktarı da artmıştır. Dolayısıyla, burada apoptotik bir sürecin tetiklendiği düşünülebilir. Ancak, Klon I'de prokaspaz-3 azalması, aktif kaspaz-3'ün görünmemesi dolayısıyla apoptotik bir süreç olarak değerlendirilemeyecek iken, Klon III'de hem pro- hem de aktif kaspaz-3 protein miktarlarının azalması yorum yapmayı güçleştirmektedir.

Yine de, her ne kadar sonuçlarımız, özellikle Klon II ve Klon IV için apoptozun tetiklendiğine dair ipuçları

verse de, apoptoz konusunda kesin yorum yapmak konusunda dikkatli olunması gerektiğini düşünmekteyiz. Nitekim, literatür incelendiğinde, pro- ya da aktif kaspaz-3 seviyesinin artış ya da azalışının tek başına böyle bir yorum için kullanılmadığı görülmektedir. Örneğin; sıçan kortikal nöronlarına Amyloid 8 protein (A $\beta$ ) uygulaması yapılan bir çalışmada, prokaspaz-3 azalırken aktif kaspaz-3'ün arttığı gözlenmiş ve bu, ancak diğer verilerle birlikte apoptotik bir işaret olarak değerlendirilmiştir (Harada ve Sugimoto, 1999). Öte yandan, bir başka grup, insan NSCLC hücre hatları H1975, H3255, A549, H1299 ve H460 ile gerçekleştirdikleri deneylerde prokaspaz-3 bantının azaldığını görmüşler, ve yaptıkları diğer denemelerle



birlikte, bu hücrelerde, apoptozun arttığını söylemişlerdir (Kim ve ark., 2016). Ek olarak, Song ve ark. (2017), 59 haftalık erkek wistar fareleri ile yaptıkları deneylerde prokaspaz-3 proteininin arttığını ve diğer deneylerle birlikte bunu apoptozun azaldığı şeklinde yorumladıklarını belirtmişlerdir.

Gözlemlerde RT-PCR, yani mRNA seviyesinde aldığımız kaspaz-3 verileriyle, Western Blotlama sonunda, yani protein seviyesinde aldığımız verilerin tam bir uyum göstermemesi, santral dogmanın translasyon basamağında gerçekleşen bazı düzenlemelere bağlı olabilir. Nitekim, santral dogmada bir genin ifadesinin, çoğunlukla mesajcı RNA'nın (mRNA) aracılık ettiği bir protein sentezi sürecini temsil ettiğini (Edfors ve ark., 2016), ancak çok sayıda çalışmanın bir genin mRNA seviyesinin protein seviyesini mutlaka tahmin etmediğini (Cenik ve ark., 2015) biliyoruz.

Sonuç olarak; bütün bulgular birlikte değerlendirildiğinde, kesin olarak söylenebilecek bir şey vardır ki; kapsaisin tüm Klon ları hem büyüme hızı, hem kaspaz-3 seviyesinin protein ve mRNA seviyeleri bakımından farklı düzeylerde etkilemektedir. Bu durum, mezotelyoma tümörü hücre popülasyonunun poliKlon al kökenli bir popülasyon, farklı bir ifadeyle heterojen bir popülasyon olduğu savını güçlendirmektedir.

## SONUÇ

H2452 hücre popülasyonundan seçilen dört Klon (I, II, III, IV) morfolojik bakımdan birbirinden farklıdır ve bu Klon lar için hesaplanan kapsaisin IC<sub>50</sub> değerleri Klon tipine göre farklılık göstermektedir. Ayrıca, Klon I'de, kapsaisin muamelesine rağmen canlı kalan hücre sayısı diğer Klon lardan yüksek bulunmuştur. Son olarak; EtOH ile KAP hücreleri karşılaştırıldığında, kaspaz-3 mRNA seviyesi Klon I ve -IV'te artmayken, aktif kaspaz-3 protein seviyesi yalnızca Klon II'de belirgin bir şekilde yükselmektedir. Mezotelyoma hücre hatlarının poliKlon al doğası hakkında daha kesin yorum yapılabilmesi için, benzer deneyler farklı yaş, etnik köken ve cinsiyetten bireylerden alınan hücre hatlarıyla tekrar edilmeli ve kapsaisinin apoptotik etkilerinin daha iyi ortaya konulması için farklı apoptotik markörler içeren metotlar uygulanmalıdır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi 2017/2-11 YLS Nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

## Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

## KAYNAKLAR

- Bayıl-Oğuzkan S, Can M, Kılıç Hİ, Uğraş Hİ, Özasan M 2017. Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Yetişen Yeşil Acı Biberlerdeki Kapsaisinin DNA Koruyuculuğu Üzerine Etkisi. KSU Tarım ve Doğa Derg 21(1): 26-31, 2018.
- Bayıl-Oğuzkan S, Uğraş Hİ 2019. Purification of Capsaicin and Molecular Biological Activity Evaluation. KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi 22(6): 922-927.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A 2018. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin 68(6): 394-424.
- Cenik C, Cenik ES, Byeon GW, Grubert F, Candille SI, Spacek D, Alsallakh B, Tilgner H, Araya CL, Tang H, Ricci E, Snyder MP 2015. Integrative Analysis of RNA, Translation, and Protein Levels Reveals Distinct Regulatory Variation Across Humans. Genome Res. 25 (11): 1610-1621.
- Ceylan G 2019. Kanserli ve Ölümsüzleştirilmiş Mezotelyum Hücrelerinden Seçilen Klon lar Üzerine Kapsaisin Etkisinin İncelenmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 62 sy.
- Comertpay S, Pastorino S, Mika T, Mezzapelle R, Strianese O, Napolitano A, Baumann F, Weigel T, Friedberg J, Sugarbaker P, Krausz T, Wang E, Powers A, Gaudino G, Shreya K, Pass HI, Parsons LB, Yang H, Carbone M 2014. Evaluation of Clonal Origin of Malignant Mesothelioma. J Transl Med 12(301).
- Comertpay S, Ceylan G 2019. Öncül Afidikolin ve Nokodazol Muamelesinin Kanserli ve Ölümsüzleştirilmiş Mezotelyum Hücrelerinde Kapsaisin Sitotoksitesine Etkisi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 22(3): 456-465.
- Edfors F, Danielsson F, Hallström BM, Käll L, Lundberg E, Pontén F, Forsström B, Uhlén M 2016. Gene-Specific Correlation of RNA and Protein Levels in Human Cells and Tissues. Mol Syst Biol 12 (10): 883.
- Elmore S 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol 35(4): 495-516.
- Helvacı N, Cömertpay S 2018. In Vitro Evaluation of the Effects of Capsaicin on Normal and Cancerous Cells of Human Cartilage. Turk J Biol 42: 422-434.
- Harada J, Sugimoto M 1999. Activation of Caspase-3 in b-amyloid-induced Apoptosis of Cultured Rat Cortical Neurons. Brain Res 842, 311-323.
- Hiddinga BI, Rolfo C, van Meerbeeck JP 2015. Mesothelioma Treatment: Are We on Target? A

- review. *J Adv Res* 6(3): 319-330.
- Huang SP, Chen JC, Wu CC, Chen CT, Tang NY, Ho YT, Lo C, Lin JP, Chung JG, Lin JG 2009. Capsaicin-Induced Apoptosis in Human Hepatoma HepG2 Cells. *Anticancer Res* 29: 165-174.
- Huh HC, Lee SY, Lee SK, Park NH, Han IS 2011. Capsaicin Induces Apoptosis of Cisplatin-Resistant Stomach Cancer Cells by Causing Degradation of Cisplatin-Inducible Aurora-A Protein. *Nutr Cancer* 63(7): 1095-1103.
- Ito K, Nakazato T, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, Segawa K, Ikeda Y, Kizaki M 2004. Induction of Apoptosis in Leukemic Cells by Homovanillic Acid Derivative, Capsaicin, through Oxidative Stress: Implication of Phosphorylation of p53 at Ser-15 Residue by Reactive Oxygen Species. *Cancer Res* 64: 1071-1078.
- Jin T, Wu H, Wang Y, Peng H 2016. Capsaicin Induces Immunogenic Cell Death in Human Osteosarcoma Cells. *Exp Ther Med* 12(2): 765-770.
- Katz GG, Shear NH, Malkiewicz IM, Valentino K, Neuman MG 2001. Signaling for ethanol-induced apoptosis and repair in vitro. *Clin Biochem* 34: 219-227
- Kim SH, Liu CY, Fan PW, Hsieh CH, Lin HY, Lee MC, Fang K 2016. The Aqueous Extract of Brucea Javanica Suppresses Cell Growth and Alleviates Tumorigenesis of Human Lung Cancer Cells by Targeting Mutated Epidermal Growth Factor Receptor. *Drug Des Devel Ther* 10, 3599-3609.
- Li H, Krstin S, Wang S, Wink M 2018. Capsaicin and Piperine Can Overcome Multidrug Resistance in Cancer Cells to Doxorubicin. *Molecules* 23 (3).
- Martinvalet D, Zhu P ve Lieberman J 2005. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22(3): 355-370.
- Metintas S, Batirel HF, Bayram H, Yilmaz U, Karadag M, Ak G, Metintas M 2017. Turkey National Mesothelioma Surveillance and Environmental Asbestos Exposure Control Program. *Int J Environ Res Public Health* 14(11).
- Mori A, Lehmann S, O'Kelly J, Kumagai T, Desmond JC, Pervan M, McBride WH, Kizaki M, Koeffler HP 2006. Capsaicin, a Component of Red Peppers, Inhibits the Growth of Androgen-Independent, p53 Mutant Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 66(6).
- Riedl SJ, Shi Y 2004. Molecular Mechanisms of Caspase Regulation During Apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(11): 897-907.
- Robinson BWS, Musk AW, Lake RA 2005. Malignant mesothelioma. *The Lancet* 366(9483), 397-408.
- Scherpereel A, Wallyn F, Albelda SM, Munck C 2018. Novel Therapies for Malignant Pleural Mesothelioma. *The Lancet Oncol* 19(3): e161-e172.
- Schmittgen TD, Livak KJ 2008. Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method. *Nat Protoc* 3(6), 1101-1108.
- Segerman A, Niklasson M, Haglund C, Bergström T, Jarvius M, Xie Y, Westermarck A, Sönmez D, Hermansson A, Kastemar M, Naimaie-Ali Z, Nyberg F, Berglund M, Sundström M, Hesselager G, Uhrbom L, Gustafsson M, Larsson R, Westermarck B 2016. Clonal Variation in Drug and Radiation Response among Glioma-Initiating Cells Is Linked to Proneural-Mesenchymal Transition. *Cell Rep* 17, 2994-3009.
- Song Z, Chang H, Han N, Liu Z, Liu Y, Wang H, Shao J, Wang Z, Gao H, Yin J 2017. He-Wei Granules (HWKL) Combat Cisplatin-Induced Nephrotoxicity and Myelosuppression in Rats by Inhibiting Oxidative Stress, Inflammatory Cytokines and Apoptosis. *RSC Adv* 7(32), 19794-19807.
- Tapani M, Taavitsainen M, Lindros K, Vehmas T, Lehtonen E 1996. Toxicity Of Ethanol In Low Concentrations: Experimental Evaluation In Cell Culture. *Acta Radiol* 37: 923-926.
- Zhang R, Humphreys I, Sahu PR, Shi Y, Srivastava SK 2008. In Vitro and In Vivo Induction of Apoptosis by Capsaicin in Pancreatic Cancer Cells is Mediated Through ROS Generation and Mitochondrial Death Pathway. *Apoptosis* 13(12):1465-78.