

Öncül Afidikolin ve Nokodazol Muamelesinin Kanserli ve Ölümsüzleştirilmiş Mezotelyum Hücrelerinde Kapsaisin Sitotoksitesine Etkisi

Sabahattin CÖMERTPAY¹, Gizem CEYLAN²

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

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

✉: sacomertpay@gmail.com

ÖZET

Malignant mezoteliyoma akciğer, kalp ve karın zarında gelişen bir kanser türüdür. Kapsaisin, Capsicum spp.cinsi bitkilerde üretilen ikincil bir metabolittir ve bazı kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olduğu gösterilmiştir. Afidikolin ve nokodazol, hücreleri sırasıyla G1/S ve G2/M fazında tutar. Bu çalışmada, kanserli (H2452) ve ölümsüzleştirilmiş (AG07086) mezotelyum hücrelerinin kapsaisin sitotoksitesini, afidikolin ve nokodazol ön muamelesi ile, ya da bu muameleler olmaksızın, MTS tekniğiyle belirlenmiş ve kaspaz-3 mRNA seviyesindeki değişiklikler qRT-PCR metoduyla incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre; **i**) normal koşullarda, kanserli ve ölümsüzleştirilmiş mezotelyum hücrelerinde kapsaisin sitotoksitesini benzerdir ($p>0.05$), **ii**) afidikolin muamelesiyle kapsaisinin etkenliği azalmış ($p<0.05$) ancak kanser hücrelerinin kapsaisin duyarlılığı ölümsüz hücrelere kıyasla yükselmiştir ($p<0.05$), **iii**) nokodazol ön muamelesi ile, kanser hücrelerinde kapsaisinin sitotoksik etkisi düşüş göstermiş ($p<0.05$), ancak ölümsüzleştirilmiş hücreler için bu değişim istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$), **iv**) yapılan tüm uygulamalarda kaspaz-3 mRNA miktarı kontrol grubuna denk çıkmıştır ($p>0.05$).

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 12.12.2018

Kabul Tarihi : 15.02.2019

Anahtar Kelimeler

Mezotelyoma
Kapsaisin
Afidikolin
Nokodazol
Sitotoksitesite

Effect of Nocodazole and Aphidicolin Pre-treatment on Capsaicin Cytotoxicity in Malignant and Immortalized Cells of Mesothelium

ABSTRACT

Malignant mesothelioma is a type of cancer, developing from the lung membrane, heart and stomach. Capsaicin is a secondary metabolite produced in Capsicum spp., which has been demonstrated to have cytotoxic effect on various cancer types. Aphidicolin and nocodazole are known to arrest cells in G1/S and G2/M, respectively. In this study, the cytotoxicity of capsaicin on cancerous (H2452) and immortalized (AG07086) cells of mesothelium, with or without primary exposure to aphidicolin or nocodazole, was determined through MTS method and the fluctuations in caspase-3 mRNA levels were investigated by qRT-PCR. Accordingly **i**) under regular conditions, capsaicin cytotoxicity on cancerous and immortalized cells of mesothelium was similar ($p>0.05$), **ii**) aphidicolin pre-exposure decreased the cytotoxicity of capsaicin on cancerous cells ($p<0.05$), yet it increased their sensitivity to capsaicin ($p<0.05$), **iii**) pre-exposure to nocodazole decreased the cytotoxicity on cancerous cells ($p<0.05$) whereas it did not affect it for the immortalized cells ($p>0.05$), **iv**) in all conditions studied, caspase-3 mRNA levels were analogous to the control ($p>0.05$).

Research Article

Article History

Received : 12.12.2018

Accepted : 15.02.2019

Keywords

Mesothelioma
Capsaicin
Aphidicolin
Nocodazole
Cytotoxicity

To Cite: Cömertpay 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. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.496108

GİRİŞ

Mezoteliyoma; akciğer, kalp ve karın zarında gelişen, nadir görülen ancak oldukça öldürücü bir kanser

türüdür (Robinson ve ark., 2005). 2015'te yayınlanan 'Consensus Report of the 2015 Weinman International Conference on Mesothelioma'ya göre, bu kanser tipi

dünya genelinde her yıl tahmini 34000 ölüme neden olmaktadır (Carbone ve ark., 2016). Bu kanserin en önemli sebeplerinden biri eriyonite maruz kalmaktır. Eriyonit, asbeste benzeyen, volkanik küllerden oluşan tüflerin içerisinde bulunan lifli yapıdaki bir mineraldir (Emri ve ark., 2002). Bu kaya tüflerinin ülkemizde Kapadokya Bölgesi'nde ev yapımında kullanıldığı bilinmektedir. Öyle ki, bu yörelerde yapılan incelemeler, bazı iç mekanlarda, havada bulunan eriyonitin malignant mezoteliyomaya neden olacak denli yüksek derişimde olduğunu ortaya koymuştur (Carbone ve ark., 2011). Bu bölgede yer alan bazı köylerde mezoteliyomaya bağlı ölüm oranı %50 seviyelerine çıkmaktadır (Carbone ve ark., 2007). Bu kanser, günümüzde uygulanan klasik kanser tedavi yöntemleri kullanılarak henüz etkin bir şekilde tedavi edilememektedir (Hiddinga ve ark., 2015). Bu nedenle hem koruyucu hem de tedavi edici yeni yöntemlerin keşfedilmesi önem arz etmektedir.

Besinlerin içerdiği etken maddeler, kanseri önlemek ve/veya tedavi etmek için halihazırda var olan ilaçlara alternatif olarak kullanılabilir (Zhang ve ark., 2008). Capsicum spp. (biber) bitkilerinin özgün olarak ürettiği ikincil bir metabolit olan kapsaisin, böyle bir etken maddedir ve farklı kanser türleri üzerinde iyileştirici etkisi olduğu kanıtlanmıştır (Chow ve ark., 2007). Mori ve ark.'nın 2006'da yaptığı bir çalışmada kapsaisinin prostat kanser hücrelerini apoptoza yönlendirdiği gösterilmiştir (Mori ve ark., 2006). Bu çalışmaya göre; kapsaisin ile muamele edilen kanser hücreleri, hücre döngüsünün G1/S ya da G0 evresinde tutulmaktadır. Bu özel bir kontrol noktasıdır ve genetik anormallikler taşıyan hücreler burada tutularak bölünmenin gerçekleşmesi önlenir. Döngünün bu basamağında uzun süre hapsedilen hücre, sonrasında programlanmış hücre ölümü olan apoptoza yönlendirilir. Kapsaisinin bu tutulma sayesinde birçok kanser hücrelerinin bölünmesini engellediği ve hücreleri apoptoza yönlendirdiği gösterilmiştir (Vermeulen ve ark., 2003).

Mitoz ile çoğalan tüm ökaryotik hücrelerde olduğu gibi, vücudumuzdaki somatik hücreler de yaşamlarını bir döngü üzerinden tamamlarlar. Bu döngü; G1, S ve G2 isimleriyle adlandırılan interfaz ve bunu takip eden mitotik faz (M) olarak iki ana kısımda incelenebilir. İnterfaz evresindeki basamaklar arasında geçiş, siklin bağımlı kinazlar olarak isimlendirilen özel bir enzim grubunun işlevi ile gerçekleştirilmektedir. İnsan hücrelerinde bu geçişin sağlanabilmesi için sırasıyla Siklin bağımlı Kinaz -4, -2 ve -1 enzimleri elzemdir (Harashima ve ark., 2013). Bu enzimler, aktivasyon göstermek için siklinler adı verilen birtakım moleküllere bağlanmak zorundadırlar. Döngü boyunca siklin bağımlı kinazların seviyesi sabit kalırken, siklinlerin seviyesi değişkenlik gösterir (Swaffer ve ark., 2016). İnsan hücrelerinde G1'den M fazına giderken, kinazlara

sırasıyla D, E, A ve B siklinleri bağlanır (Roskoski Jr., 2018). Hücrede hangi siklin miktarının yüksek hangilerinin düşük olduğuna bakarak hücrenin içinde bulunduğu faz hakkında bilgi edinilebilir (Arooz ve ark., 2000).

Apoptoz, hücrenin kontrollü ölümü olarak tarif edilmekte ve yok edilmek istenen tümör hücrelerinde gerçekleşmesi en çok istenen ölüm türünü oluşturmaktadır (Lowe ve Lin, 2000). Apoptotik ölüm, diğer ölümlerin aksine hücre içi içeriğin korunmasını sağlamakta ve komşu hücrelerde herhangi bir strese neden olmamaktadır (Nikoletopoulou ve ark., 2013). Bu süreç içsel yolak, dışsal yolak ve perforin-granzim yolağı adı verilen üç ana yolak üzerinden işlemektedir (Igney ve Krammer, 2002; Martinvalet, ve ark., 2005). Adı geçen üç yolakta da kaspaz aktivasyonu kritik rol oynamaktadır. Sürecin içsel, dışsal ya da perforin/granzim yolağından başlamasına bağlı olarak aktive edilen ilk kaspazın farklı olabilmesine karşın, tüm yollar sonunda kaspaz-3 isimli merkezi bir molekülü aktifleştirirler (Elmore, 2007).

Bazı kimyasalların hücreleri hücre döngüsünün belirli fazlarında tutukladığı bilinmektedir. Afidikolin, *Cephalosporium aphidicola* mantarından üretilen (Sargent ve ark., 1996) ve DNA replikasyonunu inhibe ederek hücreleri G1/S fazında tuttuğu bilinen bir antibiyotiktir (Borel ve ark., 2002). Nokodazol ise tubuline karşı etki göstererek hücreleri G2/M hücre basamağında hapseden bir ajan olarak bilinir (Ho ve ark., 2001). Bu çalışmada, kapsaisinin hücreyi apoptoza yönlendirmeden önce döngünün belirli bir basamağında tuttuğu gözlemlerine dayanılarak, belirli bir basamakta durdurulmuş hücrelerde kapsaisin etkisinin nasıl olacağı anlaşılmasına çalışılmıştır. Bunun için kanserli ve ölümsüzleştirilmiş mezotelyum hücreleri afidokolin ve nokodazol uygulamalarıyla, sırasıyla G1/S ve G2/M basamaklarında tutulmuşlardır. Ön muamele varlığı ya da yokluğunda kapsaisin etkisinin nasıl değiştiği MTS protokolü ile değerlendirilirken, gözlenen ölümlerin apoptotik olup olmadığına ilişkin yorumda bulunabilmek için kaspaz-3 proteinini kodlayan mRNA'nın miktarı analiz edilmiştir.

MATERYAL ve METOD

Hücre Kültürü

Ticari olarak American Type Cell Culture (ATCC) firmasından satın alınan malignant mezoteliyoma (H2452) hücreleri %10 FBS (Fetal Bovine Serum) içeren DMEM (Dubelco's Modification on Eagle's Medium) medium içinde, Coriell Enstitüsü'nden temin edilen ölümsüzleştirilmiş hücreler (katalog numarası; AG07086) ise %50 M199, %50-F12 içerisinde %10 FBS, %1 Penisilin+Streptomisin, 10 ng/mL EGF, %1 L-Glutamin, 0,4 µg/mL hidrokortizon içeren besiyerinde 37 °C'de %5 CO₂ basıncı altındaki inkübatörde kültür edilmiştir.

IC₅₀ Belirlenmesi

Kapsaisin hücreler üzerindeki IC₅₀ değeri, temeli tetrazolyum bileşiğinin canlı hücreler tarafından formazana dönüştürülmesine dayanan MTS (Metiltiazol Tetrazolyum Assay) kiti (Promega, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Ön muamelesi olan ya da olmayan hücreler 12 saat kapsaisin ile muamele edildikten sonra, IC₅₀ değeri, Helvacı ve Cömertpay (2018)'e göre ve metod üzerinde bazı değişiklikler yapılarak hesaplanmıştır. Hücreler 96 kuyucuklu plaklara her kuyucuğa 5000 hücre gelecek şekilde ekilmişlerdir. Hücrelerin yüzeye tutunması için bir gece beklenmiş, ardından 24 saatlik nokadozol veya afidikolin uygulaması başlatılmıştır. Ön muamelenin olmadığı deneylerde, böyle bir süreç olmadan bir sonraki basamağa geçilmiştir. Bu basamakta, hücre besiyerleri 200-800 µM arasında değişen kapsaisin içeren besiyeri ile değiştirilmiş ve hücreler 12 saat boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda her bir kuyucuğa 10 µL metiltiazol tetrazolyum çözeltisi eklenmiş ve 4 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Deneyler, her bir derişim için dörder kuyucuk içerecek şekilde düzenlenmiş ve üç kez tekrar edilmiştir. Kuyucukların 490 nm'deki absorbanları ölçülerek elde edilen değerler ile GraphPad Prism kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

Nokodazol ve Afidikolin Muamelesi

Hücreler için ön muamele, 2µg/mL Afidikolin veya 400 ng/mL Nokodazol içeren besiyeri içerisinde 24 saat bırakılmayı ifade etmektedir. Bunun için afidikolin (katalog no: A4487; Sigma, Almanya) ve nokodazol (katalog no: M1404; Sigma, Almanya) ürünleri kullanılarak ilgili derişimler hücrelerin normal besiyeri ortamına ilave edilmiştir.

Western Blotlama

Bu işlem Helvacı ve Cömertpay (2018)'e göre yapılmıştır. Hücre kültürü ortamından toplanan hücrelerden MPER tamponu (Kat. No: 78503; Thermo Scientific, ABD) ile protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyondan sonra proteinler SDS jel üzerinde elektriksel ortamda göç ettirilerek büyüklüklerine göre ayrılmıştır. Ayrıştırılan proteinler PVDF membran üzerine aktarılmış ve bu membran Siklin E (Kat. No: ab133266; abcam, ABD) ve Siklin B (Kat. No: ab32053; abcam, ABD) birincil antikoru ile bütün gece +4°C'de inkübe edilmiştir. Birincil antikor ile muamele bitiminde membran yıkanmış ve ikincil antikor (Rabbit; Kat. No: ab97051; abcam, ABD) ile oda sıcaklığında 2 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. En son adım ise proteinlerin görüntülenmesi aşamasıdır. ECL Substrat ile muamele sonunda meydana gelen ışımaya UVP EC3 Chemi HR 410 Imaging System görüntüleme cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Ölçülen ışımaya şiddetleri Siklin B ve Siklin E proteinlerin miktarı ile doğru

orantılıdır. Proteinlerin bağıl değişimlerinin doğru değerlendirilebilmesi için çalışılan her bir hücre grubunda yükleme kontrolü olarak GAPDH birincil antikoru (Kat. No: PA1-9046; Thermo Fisher, ABD) kullanılmıştır. Bu antikorla yapılan muamelede ikincil antikor olarak keçi (goat) antikoru kullanılmıştır (Kat. No: BA1060-0.5; BOSTER, ABD)

RT-PCR

Bu deneyler, Helvacı ve Cömertpay (2018)'e göre ve metod üzerinde bazı değişiklikler yaparak gerçekleştirilmiştir. Hücreler sayılıp cm² başına yaklaşık olarak 15000 hücre gelecek şekilde T75 (75 cm²) flaklara ekildikten sonra, uygulama öncesi, bir gece tutunmaları beklenmiştir. Sonrasında, hücrelere daha önceden belirlenmiş IC₅₀ değerinde kapsaisin 12 saat boyunca uygulanmıştır. Toplanan hücrelerden Vivantis Total RNA Kit ile RNA izolasyonu yapılmış, ardından Biolabs cDNA kiti kullanılarak cDNA'lar oluşturulmuştur. NCBI'dan alınan kaspaz-3 gen bölgesi üzerinden primerler dizayn edilmiştir (Çizelge 2.1). Referans olarak aynı yöntemle oluşturulan β-aktin primeri kullanılmıştır. SYBR Green içeren Bright Green Master Mix kullanılarak RT-PCR kurulmuştur. RT-PCR döngü parametreleri 95 °C 10 dk, 95 °C 15s, 55 °C 1dk olarak ayarlanmıştır. Her bir örnek için üç tekrarlı olarak elde edilen C_t değerleri karşılaştırılmalı 2^{-^{CT}} metodu ile hesaplanmıştır.

Çizelge1. RT-PCR analizinde kullanılan primerlerin isimleri ve baz dizilimleri

Primerler	Baz Dizilimi
β-Aktin (ileri)	CCCTGGACTTCGAGCAAGAG
β-Aktin (geri)	GATCTTCATTGTGCTGGGTGC
Kaspaz-3 (ileri)	ATCACAGCAAAGGAGCAGT
Kaspaz-3 (geri)	AACCCCTGCTTAATCGTCAAT

İstatistiksel Analiz

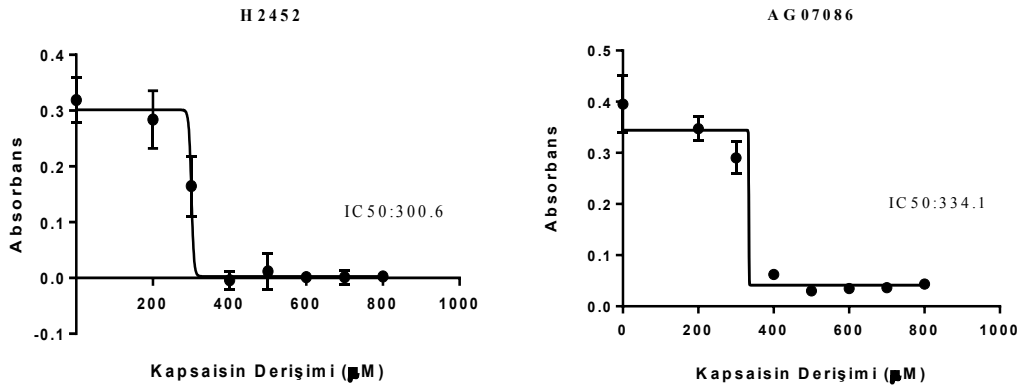
İstatistiksel analizler GraphPad Prism 6.0 (CA, ABD) yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin IC₅₀ değerlerinin birbirlerinden farkının anlaşılması için gruplar arasında iki yönlü ANOVA testi uygulanmış ve interaksiyon parametrelerinde p değeri 0.05'ten küçük çıkan gruplar için aradaki fark anlamlı kabul edilmiştir. Bağıl kaspaz-3 mRNA düzeylerinin belirlenmesinde kontrol grubu için hesaplanan ortalama değer 1.0 kabul edildikten sonra, etanol ve kapsaisin uygulanmış hücrelerin kaspaz-3 mRNA değerleri bulunmuştur. Etanol ve kapsaisin gruplarının, kontrol grubu ile farkı student t testi aracılığıyla değerlendirilmiştir. p değeri 0.05'ten düşük olan gruplar için farkın istatistiksel olarak anlamlı olacağı düşünülmüştür.

BULGULAR**Kapsaisin H2452 kanserli ve AG07086 ölümsüzleştirilmiş mezotelyum hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi**

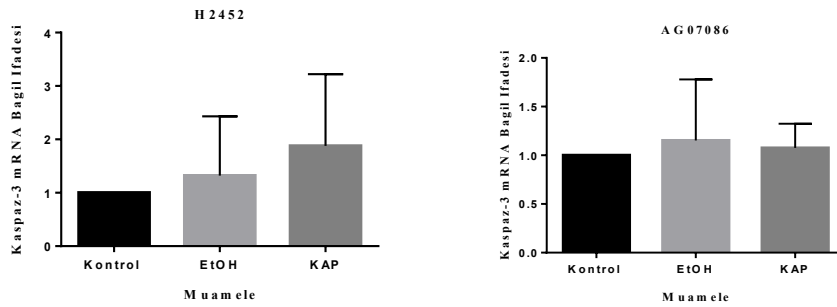
Kanserli ve ölümsüzleştirilmiş hücreler için IC₅₀ değerleri sırasıyla 300.6 ve 334.1 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 1). Hesaplanan değerler iki yönlü ANOVA testiyle analiz edildiğinde, bu iki değerlerin istatistiksel olarak anlamlı bir fark

göstermediği bulunmuştur (p>0.05).

Hücreler daha önceden belirlenen IC₅₀ derişiminde kapsaisin içeren (KAP) veya eşlenik miktarda etanol içeren (EtOH) ya da sade besiyerinde (Kontrol) 12 saat tutulmuş, süre sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar ile kaspaz-3 ve β-Aktin mRNA'ları için RT-PCR gerçekleştirilmiştir. Sonuçların istatistiksel analizlerinde hücre tipi ya da muameleler arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0.05) (Şekil 2).



Şekil 1. H2452ve AG07086 hücrelerinin kapsaisin ile 12 saat muamelesinin hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisinin gözlenmesi



Şekil 2. H2452 ve AG07086 hücrelerine kapsaisin uygulamasının RT-PCR'da kaspaz-3'ün ekspresyon seviyesine etkisinin gözlemlenmesi

Afidikolin Muamelesine Bağlı Olarak Kapsaisinin Etki Gücünün Ve Özgüllüğünün Değerlendirilmesi

Hücreler afidikolin ile 24 saat muamele edildikten sonra hücreler toplanmış ve proteinler izole edilmiştir. Bu proteinlerle gerçekleştirilen Western Blot analizinde Siklin E miktarı, afidikolin muamelesi ile belirgin bir şekilde azalmıştır (Şekil 3).

Bant kuvvet oranlamasında Siklin E'nin GAPDH'e oranı nokodazol uygulaması yapılmamış hücre proteinleri için 1 olarak alınmış, nokodazol muamelesine bağlı değişim buna göre hesaplanmıştır. Bu oranlar kanserli (H2452) ve ölümsüzleştirilmiş (AG07086) hücrelerinde sırasıyla 0.18 ve 0.04 olarak hesaplanmıştır.

24 saatlik afidikolin uygulamasından sonra kanserli ve ölümsüzleştirilmiş hücrelerin IC₅₀ değerleri sırasıyla 420.6 ve 542.9 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4). Bulunan IC₅₀ değerleri arasındaki fark

istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p< 0.05).

Afidikolin ile 24 saat ön muamelele ardından hücreler, daha önceden belirlenen IC₅₀ derişiminde kapsaisin içeren (KAP) veya eşlenik miktarda etanol içeren (EtOH) ya da sade besiyerinde (Kontrol) 12 saat tutulmuş, süre sonunda toplanan peletlerden izole edilen RNA'lar ile kaspaz-3 ve β-Aktin mRNA'ları için RT-PCR gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubuna ait olan değer 1.00 olarak kabul edilmiş, diğer gruptaki değerler buna göre normalize edilmiştir. Sonuçların istatistiksel analizlerinde hücre tipi ya da muameleler arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0.05) (Şekil 5).

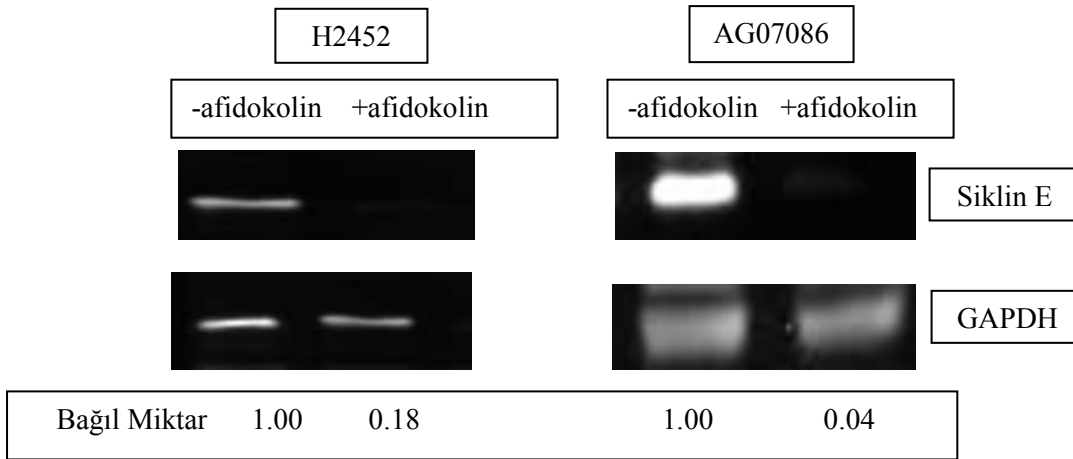
Kapsaisinin Nokodazol İle Muamele Görmüş Kanserli ve Ölümsüzleştirilmiş Mezotelyum Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Hücreler nokodazol ile 24 saat muamele edildikten

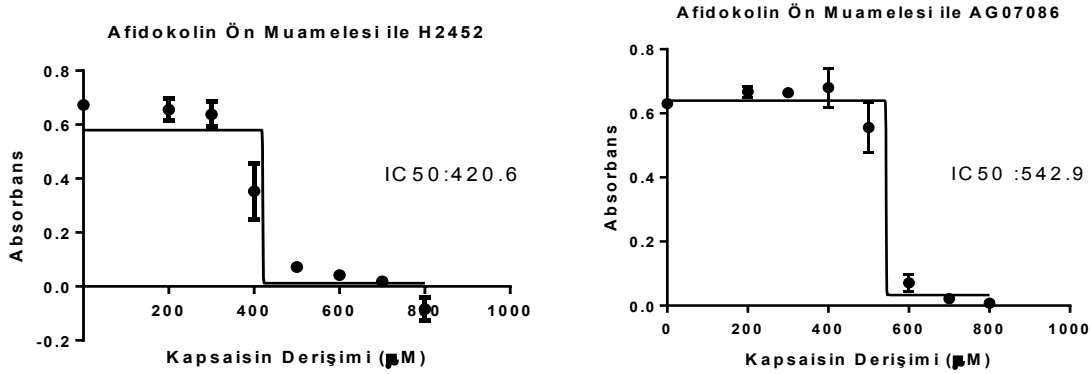
sonra hücreler toplanmış ve proteinler izole edilmiştir. Bu proteinlerle gerçekleştirilen Western Blot analizinde Siklin B miktarı, nokodazol muamelesi ile belirgin bir şekilde azalmıştır (Şekil 6). Bant kuvvet oranlamasında Siklin B'nin GAPDH'e oranı, nokodazol uygulaması yapılmamış hücre proteinleri için 1 olarak alınmış, nokodazol muamelesine bağlı değişim buna göre hesaplanmıştır. Bu oranlar kanserli (H2452) ve ölümsüzleştirilmiş (AG07086) hücrelerinde sırasıyla

0.37 ve 0.06 olarak hesaplanmıştır.

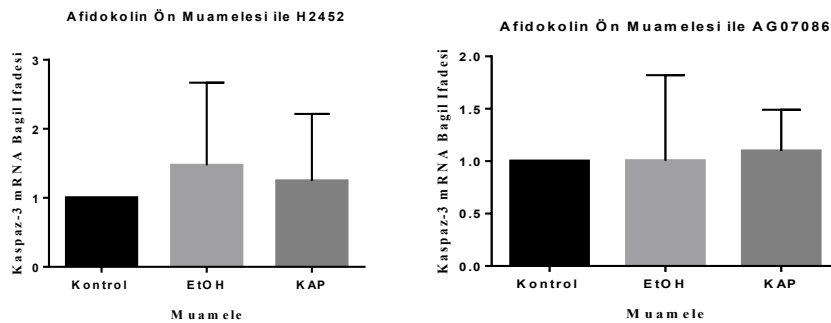
H2452 kanserli mezotelyum hücreleri ve AG07086 ölümsüzleştirilmiş hücreleri 4 tekrarlı biçimde 96'lı kuyucuğa eşit miktarda olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat nokodazol içeren besiyeri ile muameleden ardından kapsaisinin artan derişimleri ile (200-800 μM) muamele edilmiştir. 12 saatlik muameleden sonra MTS ajanı eklenmiş ve 4 saat sonundaki renk derişimleri 490 nm'de okunmuştur..



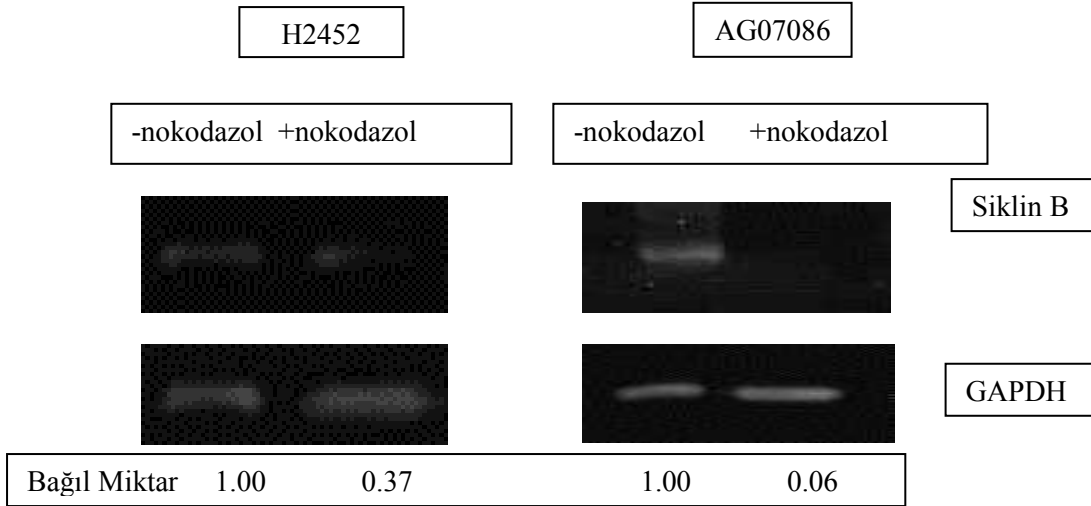
Şekil 3. Afidokolin muamelesinin H2452 ve AG07086 hücrelerinde Siklin E protein seviyesinde neden olduğu derişikliklerin Western Blot yöntemiyle tespit edilmesi (-afidokolin: afidokolin uygulaması yok, +afidokolin: afidokolin uygulaması var)



Şekil 4. H2452 ve AG07086 hücrelerinin 24 saat afidokolin ile muamelesinin ardından kapsaisin ile 12 saat muamele edilen hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisinin gözlenmesi.



Şekil 5. H2452 ve AG07086 hücrelerine afidokolin uygulamasının ardından kapsaisin uygulamasının RT-PCR'da kaspaz-3'ün ekspresyon seviyesine etkisinin gözlemlenmesi.



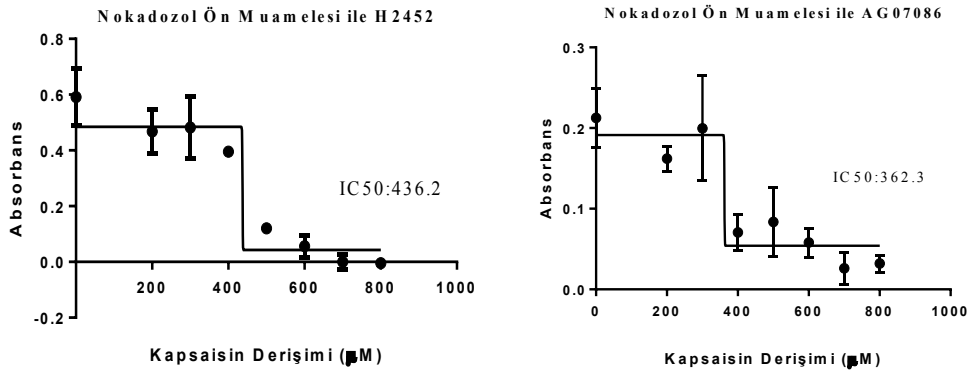
Şekil 6. Nokodazol muamelesinin H2452 ve AG07086 hücrelerinde Siklin B protein seviyesinde neden olduğu değişikliklerin Western Blot yöntemiyle tespit edilmesi (-nokodazol: nokodazol uygulaması yok, +nokodazol: nokodazol uygulaması var).

Bu absorbans değerleri ile GraphPad Prism kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Bulunan IC₅₀ değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p > 0.05$) (Şekil 7). Kansersiz (H2452) ve ölümsüzleştirilmiş (AG07086) hücreler için ortalama IC₅₀ değerleri sırasıyla 436,2 μ M ve 362,3 μ M hesaplanmıştır.

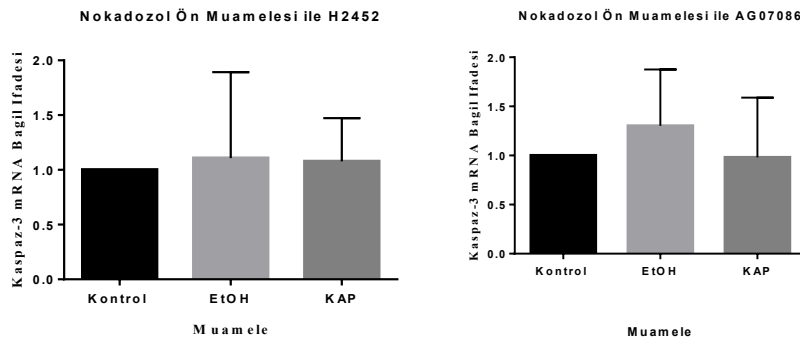
Hücreler nokodazol ile 24 saat muamele edildikten sonra hücreler toplanmış ve proteinler izole edilmiştir. Bu proteinlerle gerçekleştirilen Western Blot analizinde Siklin B miktarı, nokodazol muamelesi ile

belirgin bir şekilde azalmıştır (Şekil 7).

Nokodazol ile 24 saat ön muamelelemeden sonra hücreler, daha önceden belirlenen IC₅₀ derişiminde kapsaisin içeren (KAP) veya eşlenik miktarda etanol içeren (EtOH) ya da sade besiyerinde (Kontrol) 12 saat tutulmuş, süre sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lar ile kaspaz-3 ve B- Aktin mRNA'ları için RT-PCR gerçekleştirilmiştir. Sonuçların istatistiksel analizlerinde hücre tipi ya da muameleler arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$) (Şekil 8).



Şekil 7. AG07086 ve H2452 hücrelerinin 24 saat nokodazol ile muamelesinin ardından kapsaisin ile 12 saat muamelesinin hücrelerin hayatta kalabilirliğine etkisinin gözlenmesi.



Şekil 8. H2452 ve AG07086 hücrelerine nokodazol uygulamasının ardından kapsaisin uygulamasının RT-PCR'da kaspaz-3'ün ekspresyon seviyesine etkisinin gözlenmesi.

Kontrol grubuna ait olan değer 1.00 olarak kabul edilmiş, diğer gruplardaki değerler buna göre normalize edilmiştir. İki hücre tipinde de uygulamalar kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kapsaisinin kanser hücre hatları üzerindeki etkileri son yıllarda çok sayıda araştırma ile incelenmiş (Cao ve ark., 2015), ancak mezotelyum hücrelerine etkisi üzerine çalışmalar sınırlı düzeyde kalmıştır.

Çalışmamız, ülkemizde özellikle Kapadokya Bölgesi'nde alışılmadık yüksek bir oranda görülen mezotelyoma kanserine (Emri, 2017) karşı, kapsaisinin sitotoksik etkilerinin incelemesi açısından önemli bir eksikliği kapatmaktadır. Burada sunulan araştırmada yalnızca kanserli hücre hattının değil, ek olarak aynı doku hücrelerinden geliştirilen ölümsüzleştirilmiş bir hücre hattının kullanılması yaklaşımımızın güçlü yanlarından biridir.

Böylesi bir yaklaşım, etkisi değerlendirilen maddenin yalnızca kanser hücreleri değil, sağlıklı hücreler üzerindeki olası etkisini de ortaya koyarak, maddenin terapötik potansiyelinin daha doğru değerlendirilmesine yardımcı olmaktadır.

Çalışmanın ilk adımı AG07086 ölümsüzleştirilmiş ve H2452 kanserli mezotelyum hücreleri için kapsaisinin sitotoksitesinin belirlenmesi olmuştur. Bunun için yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan enzim aracılığıyla indirgenen ve formazan bileşiğini oluşturan, böylece değişen rengin 490 nm'deki absorbansına dayanan MTS protokolü kullanılmıştır (Helvacı ve Cömertpay, 2018). Bu metodla belirlenen IC_{50} değerimiz literatürdeki birçok çalışmadan farklıdır. Örneğin, kolon kanserinin iki ayrı hücre hattı olan HCT-116 ve Caco-2 için sırasıyla $66.77 \pm 10.78 \mu M$ and $163.70 \pm 9.32 \mu M$ değerleri ölçülmüşken, çocukluk lösemisinden iki ayrı hücre hattı için bu değerler (CEM / ADR 500 ile CCRF-CEM) $125.85 \pm 22.05 \mu M$ ve $67.55 \pm 6.29 \mu M$ olarak tespit edilmiştir (Li ve ark., 2018). Bir başka çalışmada osteosarkoma hücre hattı için IC_{50} değeri $165.7 \mu M$ (Jin ve ark., 2016) olarak belirlenmiştir. Laboratuvarında gerçekleştirilen ve sonuçları yakın zamanda yayımlanan bir çalışmada kondrosarkoma hücre hattı için bu değer $254 \mu M$ olarak bildirilmiştir (Helvacı ve Cömertpay, 2018). Literatürde verilen bu IC_{50} bilgileri kapsaisinin farklı hücre hatları üzerindeki etkilerini göstermektedir. Her ne kadar bizim çalışmış olduğumuz hücre hattı H2452'ye ait böylesi bir değer bulunmamışsa da, değerlerimizin hangi hücre hattı ya da hatlarına yakın durduğunu görmek için bu karşılaştırma önem arz etmektedir. Buna göre; H2452 hücrelerinin IC_{50} değeri diğer birçok kanser hücre hattından belirgin şekilde yüksek ancak kondrosarkoma hücrelerine yakındır. Mezotelyomanın da kondrosarkoma kadar agresif ve

terapiye karşı dirençli (Holmes ve Leddy, 2014) olduğu değerlendirildiğinde kanserli mezotelyum hücreleri için hesaplanan $300 \mu M$ IC_{50} değerleri şaşırtıcı bulunmamıştır. Öte yandan, ölümsüzleştirilmiş mezotelyum hücreleri için bu değer $334 \mu M$ olarak belirlenmiştir ki iki hücre tipi arasında yaklaşık %11'lik bir farka tekabül eder. Bu fark yapılan iki yönlü ANOVA sonucunda anlamsız bulunmuştur.

Kapsaisinin bazı kanser hücrelerini önce hücre döngüsünün belirli bir basamağında tuttuğu bunu takiben de apoptoza yönlendirdiği bazı çalışmalarla gösterilmiştir (Huang ve ark., 2009). Ancak, hücreleri yaşam döngüsünün belirli basamağında sabitlediği bilinen kimyasalların öncül uygulamasına bağlı olarak kapsaisin etki gücünün ve özgüllüğünün nasıl değiştiğine ilişkin araştırmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Bu bakımdan çalışmamız özgün bir yaklaşım sunmaktadır. Sonuçlarımıza göre, kapsaisinin normal besiyeri koşullarında ölümsüzleştirilmiş ve kanserli mezotelyum hücreleri üzerine etkisi belirgin bir farklılık göstermemektedir. Bu bulgular, kapsaisin uygulamasının seçim kabiliyetinin olmadığını, aynı dokunun yavaş ve hızlı bölünen hücrelerine benzer kuvvetlerde etki ettiğini ortaya koymaktadır. Öte yandan, hücreleri G1/S basamağında tuttuğu bilinen afidikolin uygulaması, ölümsüzleştirilmiş ve kanserli hücreler arasında kapsaisin sitotoksitesini istatistiksel olarak anlamlı bir noktaya taşımıştır. Öyle ki, afidikolin ön muamelesi sonunda bulunan kapsaisin IC_{50} değerlerinin böyle bir ön muamele yapılmaksızın bulunan değerlerden yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Bu sonuç afidikolin muamelesinin kapsaisinin etki gücünü azaltmasına neden olurken özgüllüğünü arttırdığı şeklinde yorumlanmıştır. Buna göre; afidikolin muamelesi görmüş hücreler üzerine uygun derişimde kapsaisin uygulandığında yalnızca kanserli hücrelerin ölmesi sağlanacak, ancak transformasyona uğramamış hücreler aynı derişimde kapsaisinden bu denli etkileyenmeyeceklerdir. Böylesi bir ayırım, dolaşım sistemine verilecek ilacın tümör hücrelerini seçimli olarak öldürebileceği ihtimalini ortaya çıkardığı için kapsaisinin terapötik potansiyelini yükseltebilir.

Literatürde afidikolin uygulamasının mezotelyoma hücrelerine olan etkisi yahut bu kimyasalın kapsaisinle etkileşimine ilişkin verilere ulaşılamamıştır. Buna rağmen, yapılan gözlemler ile paralellik kurulabilecek yayınlar mevcuttur. Örneğin, Sargent ve ark. (1996), araştırmaları sonunda over tümör hücrelerinde afidikolin uygulamasının platinyuma karşı duyarlılığı arttırdığı sonucunu ortaya koyarken, Starczewska ve ark. (2016) afidikolinin lösemi hücrelerinde purin analoglarına karşı duyarlılığı arttığını duyurmuştur. Bu açıdan bakıldığında bizim gözlemlerimiz bu bulgulara zıtlık göstermektedir. Çünkü, bizim deneylerimizde

afidikolin uygulamasına bağlı olarak hem kanserli hem de ölümsüzleştirilmiş hücrelerin IC₅₀ seviyelerinin anlamlı bir şekilde yükseldiği gözlenmiştir. Yine de bu gözlem, belirli bir kimyasalın kanserli dokunun türü yanında hücre hattının elde edildiği bireye bağlı olarak farklı tepkiler yaratabileceği bilgisi göz önünde bulundurulduğunda şaşırtıcı bir sonuç değildir (Wilding ve Bodmer, 2014).

Nokodazol uygulaması ise kanserli hücrelerde kapsaisin sitotoksitesini belirgin bir şekilde düşürmüş ancak ölümsüzleştirilmiş hücrelerde bir değişikliğe neden olmamıştır. Buna bağlı olarak, kapsaisin transforme olmamış hücreleri olanlara kıyasla daha kolay öldürebilen bir ajan haline gelmiştir ki, ilgili etken maddenin terapötik kullanım maksadına taban tabana zıtlık göstermektedir. Nokodazol ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda, nokodazolun mikrotübül oluşumunu engellediği ve proteinlerin tam olarak işlenmemesine neden olduğu gösterilmiştir (Haltiwanger ve Philipsberg, 1997). Bu veriler, nokodazol uygulanmış kanser hücrelerinde öldürücü etkenlere hassaslığın arttıracağını düşündürmüştür. Bizim gözlemlerimiz, nokodazol uygulanmış kanser hücrelerinde IC₅₀ değerinin ön muameleye maruz kalmamış hücrelere kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı, ölümsüzleştirilmiş hücrelerde ise değişmediği şeklinde olmuştur. Bu gözlemler, ölümsüzleştirilmiş hücrelerin bölünme hızının kanserli hücrelerden çok daha az olduğu ve nokodazolun ana etkisinin hücre bölünmesi üzerinde olduğu düşünüldüğünde çok şaşırtıcı olmamıştır.

Realtime PCR ile yapılan kantitatif mRNA ölçümlerimiz, kaspaz-3 mRNA seviyesinin çalışılan hiçbir koşulda, kapsaisin uygulamasına bağlı olarak değişmediğini ortaya koymuştur. Bu durum kapsaisin uygulamasına bağlı olarak gözlenen ölümün kaspazlardan bağımsız olabileceği ihtimalini kuvvetlendirmektedir. Ancak, bu çalışma sonunda ortaya çıkan sonuçların kesinliğinin arttırılabilmesi için aktif kaspaz protein miktarlarının ölçülmesi ve/veya hücre ölüm tiplerini ayırt etmeye yarayan deneysel metodların uygulanması şarttır. Bu noktada kaspaz-3 ile ilgili sonuçlarımızla, ancak apoptotik olmayan bir ölümün apoptotik ölümden daha olası olduğu bir sitotoksositeyle karşı karşıya olduğumuzu söyleyebiliriz. Kapsaisinin birçok farklı kanser hücre hattı hücrelerini apoptotik yoldan öldürdüğü bildirilmiş olsa da (Clark ve Lee, 2016), elimizdeki gibi bir gözlem de olağandışı değildir; nitekim, apoptoz dışı bir metotla kanser hücrelerini elimine ettiği bilinen birçok doğal ürün bulunmaktadır (Ye ve ark., 2018).

Bu çalışmada iki türlü siklin seviyesi, sırasıyla Siklin E ve Siklin B, uygulanan öncül muamelenin etkinliğini kanıtlamak amacıyla kullanılmıştır. Siklin E G1 den S fazına geçişte rol alan önemli bir protein iken (Teixeira ve Reed, 2017) Siklin B G2 fazından M fazına geçişte düzenleyici rol oynamaktadır (Sanchez ve Dynlacht,

2005). Yaptığımız afidikolin ön uygulamasında Siklin E seviyesi belirgin bir şekilde azalırken nokodazol uygulaması sonrasında ise Siklin B seviyesinde anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Bu gözlemler, hücrelerin sırasıyla G1 ve G2 basamaklarında tutulduğu şeklinde yorumlanmıştır. Halbuki, herhangi bir siklinin seviyesindeki azalma kendi başına hücrenin belirli bir basamakta sabitlendiği bilgisini kesin olarak veremez. Çünkü hücre döngüsü siklinleri, yalnızca ihtiyaç duyuldukları fazlarda üretilir ve bu fazın aşımı sürecinde degrades edilirler (Truman ve ark., 2005). Örneğin siklin E, S fazının sonlarında, G2 fazında ve M fazında bulunmaz. Dolayısıyla siklin E seviyesinin azaldığı bir hücre grubu, G1 fazının başlarında tutulmuş olabileceği gibi G2 fazında ya da M fazında da olabilir (Hochegger ve ark., 2008). Yine de, kullanılan tutuklayıcı moleküllerin hücreleri belirli bir basamakta tuttuğu daha önceki çalışmalarla ortaya konulmuş olduğundan (Poxleitner ve ark., 2008) ilgili siklin seviyelerindeki azalmanın yeterli bir onaylayıcı veri sunduğu düşünülmüştür.

Genel bir bakışla, sonuçlarımızın kapsaisinin yan uygulamalarla birlikte mezotelyoma kanseri üzerinde terapötik potansiyelinin değerlendirilmesi konusunda önemli bir eksiği kapattığı düşünülmektedir. Ancak, yapılan araştırmanın yalnızca bir mezotelyoma hücre hattı ve bir ölümsüzleştirilmiş mezotelyoma hücre hattı üzerinde gerçekleştirilmiş olması, bulunan sonuçların mezotelyoma hücrelerine genellemesini zorlaştırmaktadır. Öte yandan, hiçbir genetik müdahaleye uğramamış insan birincil mezotelyoma hücrelerinin karşılaştırmaya dahil edilmemesi de kanserli/sağlıklı şekilde yapılan yorumların gücünü kısmen azaltmaktadır. Kapsaisinin ve denenen ön uygulamaların mezotelyoma kanseri üzerinde tedavi potansiyellerinin daha doğru bir şekilde değerlendirilebilmesi için farklı etnik köken, cinsiyet ve yaştaki bireylerden alınmış tümör ve sağlıklı doku hücreleriyle gerçekleştirilecek *in vitro* çalışmalar ve bunları takip eden *in vivo* çalışmalar yapılması yüksek önem arz etmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından desteklenen 214 S 183 Nolu Proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Arooz T, Yam CH, Siu WY, Lau A, Li KKW, Poon RYC 2000. On the Concentrations of Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases in Extracts of Cultured Human Cells. *Biochemistry*, 39(31): 9494-9501.
- Borel F, Lacroix FB, Margolis RL 2002. Prolonged Arrest of Mammalian Cells at the G1/S Boundary Results in Permanent S Phase Stasis. *Journal of Cell Science* 115: 2829-2838.
- Cao S, Chen H, Xiang S, Hong J, Weng L, Zhu H, Liu

- Q 2015. Anti-Cancer Effects and Mechanisms of Capsaicin in Chili Peppers. *American Journal of Plant Sciences*, 06(19): 3075-3081.
- Carbone M, Emri S, Dogan AU, Steele I, Tuncer M, Pass HI, Baris YI 2007. A Mesothelioma Epidemic in Cappadocia: Scientific Developments and Unexpected Social Outcomes. *Nat Rev Cancer*, 7(2): 147-154.
- Carbone M, Kanodia S, Chao A, Miller A, Wali A, Weissman D, Adjei A, Baumann F, Boffetta P, Buck B, de Perrot M, Dogan AU, Gavett S, Gualtieri A, Hassan R, Hesdorffer M, Hirsch FR, Larson D, Mao W, Masten S, Pass HI, Peto J, Pira E, Steele I, Tsao A, Woodard GA, Yang H, Malik S 2016. Consensus Report of the 2015 Weinman International Conference on Mesothelioma. *J Thorac Oncol*, 11(8): 1246-1262.
- Carbone M, Baris YI, Bertino P, Brass B, Comertpay S, Dogan A.U, Gaudino G, Jube S, Kanodia S, Partridge CR, Pass HI, Rivera ZS, Steele I, Tuncer M, Way S, Yang H, Aubrey M 2011. Erionite Exposure in North Dakota and Turkish Villages with Mesothelioma. *PNAS*, 108(33): 13618–13623.
- Chow J, Norng M, Zhang J, Chai J 2007. TRPV6 Mediates Capsaicin-Induced Apoptosis in Gastric Cancer Cells—Mechanisms Behind A Possible New “Hot” Cancer Treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(4): 565-576.
- Clark R, Lee SH 2016. Anticancer Properties of Capsaicin Against Human Cancer. *Anticancer Research*, 36: 837-844.
- Elmore S 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, 35(4): 495-516.
- Emri SA 2017. The Cappadocia Mesothelioma Epidemic: Its Influence in Turkey and Abroad. *Ann Transl Med*, 5(11):239.
- Emri S, Demir A, Dogan M, Akay H, Bozkurt B, Carbone M, Baris I 2002. Lung Diseases Due to Environmental Exposures to Erionite and Asbestos in Turkey. *Toxicology Letters*, 127(1–3): 251-257.
- Haltiwanger RS, Philipsberg GA 1997. Mitotic Arrest with Nocodazole Induces Selective Changes in the Level of O-Linked N-Acetylglucosamine and Accumulation of Incompletely Processed N-Glycans on Proteins from HT29 Cells. *The journal of biological chemistry*, 272(13): 8752–8758.
- Harashima H, Dissmeyer N, Schnittger A 2013. Cell Cycle Control Across the Eukaryotic Kingdom. *Trends Cell Biol*, 23(7): 345-356.
- Helvacı N, Comertpay S 2018. *in vitro* Evaluation of The Effects of Capsaicin on Normal And Cancerous Cells of Human Cartilage. *Turk J Biol*, 42: 422-434.
- Hiddinga BI, Rolfo C, van Meerbeeck JP 2015. Mesothelioma Treatment: Are We on Target? A review. *J Adv Res*, 6(3): 319-330.
- Hochegger H, Takeda S, Hunt T 2008. Cyclin-Dependent Kinases and Cell-Cycle Transitions: Does One Fit All? *Molecular Cell Biology*, 9(11): 910-916.
- Ho YS, Duh JS, Jeng JH, Wang YJ, Liang YC, Lin CH, Tseng CJ, Yu CF, Chen RJ, Lin JK 2001. Griseofulvin Potentiates Antitumorogenesis Effects of Nocodazole Through Induction of Apoptosis and G2/M Cell Cycle Arrest in Human Colorectal Cancer Cells. *Int. J. Cancer* 91: 393–401.
- Holmes RE, Leddy LR 2014. Chondrosarcoma of Bone. *Cancer Treat Res*, 162: 117-130.
- 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 Research*, 29: 165-174.
- Igney FH, Krammer PH 2002. Death And Anti-Death: Tumour Resistance to Apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2(4): 277-288.
- 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.
- Li H, Krstin S, Wang S, Wink M 2018. Capsaicin and Piperine Can Overcome Multidrug Resistance in Cancer Cells to Doxorubicin. *Molecules*, 23(3): 557.
- Lowe SW, Lin AW 2000. Apoptosis in Cancer. *Carcinogenesis*, 21: 485–495.
- Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J 2005. Granzyme A Induces Caspase-Independent Mitochondrial Damage, A Required First Step For Apoptosis. *Immunity*, 22(3): 355-370.
- Mori A, Lehmann S, O’Kelly J, Kumagai T, Desmond JC, Pervan M, McBride WH, Kizaki M, Koeffler H P 2006. Capsaicin, a Component of Red Peppers, Inhibits the Growth of Androgen-Independent, p53 Mutant Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 66(6): 3222-3229
- Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N 2013. Crosstalk Between Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1833(12): 3448-3459.
- Poxleitner MK, Dawson SC, Cande WZ 2008. Cell Cycle Synchrony in *Giardia intestinalis* Cultures Achieved by Using Nocodazole and Aphidicolin. *Eukaryot Cell*, 7(4): 569-574.
- Robinson BWS, Musk AW, Lake RA 2005. Malignant Mesothelioma. *The Lancet*, 366(9483): 397-408.
- Roskoski JrR 2019. Cyclin-Dependent Protein Serine/Threonine Kinase Inhibitors As Anticancer Drugs. *Pharmacological Research*, 139:471-488.
- Sanchez I, Dynlacht BD 2005. New Insights into Cyclins, Cdks, and Cell Cycle Control. *Semin Cell Dev Biol*, 16(3): 311-321.
- Sargent JM, Elgie AW, Williamson CJ, Taylor CG 1996. Aphidicolin Markedly Increases the Platinum Sensitivity of Cells from Primary Ovarian Tumours. *British Journal of Cancer*, 74: 1730-1733.
- Starzecwska E, Beyaert M, Michaux L, Vekemans MC, Saussoy P, Bol V, Echarri AA, Smal C, Neste EVD, Bontemps F 2016. Targeting DNA Repair with

- Aphidicolin Sensitizes Primary Chronic Lymphocytic Leukemia Cells to Purine Analogs. *Oncotarget*, 7(25):38367-38379.
- Swaffer MP, Jones AW, Flynn HR, Snijders AP, Nurse P 2016. CDK Substrate Phosphorylation and Ordering the Cell Cycle. *Cell*, 167(7): 1750-1761.
- Teixeira LK, Reed SI 2017. Cyclin E Deregulation and Genomic Instability. In: Masai H, Foiani M, Editors. *DNA Replication: From Old Principles to New Discoveries*. 1st ed. Singapore: Springer, pp. 527-547.
- Truman AW, Kitazono AA, Fitz Gerald JN, Kron SJ 2012. Cell Cycle: Regulation by Cyclins. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net>. (Erişim tarihi:11.12.18).
- Vermeulen K, Bockstaele DRV, Berneman ZN 2003. The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targets in Cancer. *Cell Prolif.*, 36: 131-149.
- Wilding JL, Bodmer WF 2014. Cancer Cell Lines For Drug Discovery and Development. *Cancer Res*, 74(9): 2377-2384.
- Ye J, Zhang R, Wu F, Zhai L, Wang K, Xiao M, Xie T, Sui X 2018. Non-Apoptotic Cell Death in Malignant Tumor Cells and Natural Compounds. *Cancer Lett*, 420: 210-227.
- 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):1465-1478.