



Araştırma

2024; 33(2): 271-278

**KAPSAİSİN U87 İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE EPİTELYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞİ REGÜLE EDEREK HÜCRE CANLILIĞINI BASKILAR**  
**CAPSAICIN SUPPRESSES CELL VIABILITY BY REGULATING EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN U87 HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS**

Ceyhan HACIOĞLU<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Düzce Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye<sup>2</sup> Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye**ÖZ**

Glioblastoma, merkezi sinir sistemini etkileyen en yaygın malign tümörlerden biri olarak öne çıkmakta ve etkili tedavi seçeneklerinin bulunmaması nedeniyle mevcut prognozu kötüdür. Homovanilic asidin bir türevi olan kapsaisinin, çeşitli kanser hücre dizileri üzerindeki anti-tümör etkileri belgelenmiştir. Epitelyal-mezenkimal geçiş, normal embriyogenez ve yara iyileşmesinin doğasında bulunan önemli bir moleküler ve hücresele süreçtir. Ayrıca çeşitli karsinom ve glioblastoma tiplerinde yaygın bir rol oynar. Bu çalışma, U87 glioblastoma hücre hatlarında kapsaisin tarafından indüklenen anti-tümör etkilerine epitelyal-mezenkimal geçişin potansiyel katılımını araştırmayı amaçladı. Başlangıçta kapsaisin tedavisinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür analizi yoluyla değerlendirildi. Daha sonra hücresele proliferasyon ve sitotoksitesite, bromodeoksiüridin analizi kullanılarak değerlendirildi. Daha ileri incelemeler, enzim-bağlı immünosorbent deneyi yoluyla N-kaderin, matriks metalloproteinaz-9, vimentin, transforme edici büyüme faktörü  $\beta$ , kaspaz 3, sitokrom c, glutatyon redüktaz, malondialdehit ve katalaz seviyelerinin belirlenmesini içeriyordu. Kapsaisin, U87 hücrelerinde anti-proliferatif etkiler sergileyerek, özellikle 50  $\mu\text{M}$ 'yi aşan konsantrasyonlarda hücre canlılığında konsantrasyona bağlı bir azalma sergiledi. Ek olarak kapsaisin uygulaması, U87 hücrelerinde N-kaderin, matriks metalloproteinaz-9, vimentin, transforme edici büyüme faktörü  $\beta$ , glutatyon redüktaz ve malondialdehit seviyelerinin azalmasına yol açarken, kaspaz 3, sitokrom c ve malondialdehit seviyelerinin artışına neden olmuştur. Sonuçlarımız kapsaisin uygulamasının U87 hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçiş düzenlemesinin yanı sıra apoptotik ve oksidatif süreçleri de tetikleyerek hücre canlılığını baskıladığını göstermiştir. Bu gözlem, epitelyal-mezenkimal geçiş inglioblastoma çoğalmasında ve migrasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Sonuç olarak, kapsaisin aracılı bu sinyal yolunun hedeflenmesi, glioblastoma tedavisinde umut verici bir terapötik yaklaşım olarak düşünülebilir.

**ABSTRACT**

Glioblastoma stands out as one of the most prevalent malignant tumors affecting the central nervous system, and its current prognosis is unfavorable due to the lack of effective treatment options. Capsaicin, a derivative of homovanilic acid, has been documented for its anti-tumor effects across various cancer cell lines. Epithelial-to-mesenchymal transition is a pivotal molecular and cellular process inherent to normal embryogenesis and wound healing. Moreover, it plays a widespread role in diverse carcinoma and glioblastoma types. This study sought to explore the potential involvement of epithelial-to-mesenchymal transition in the anti-tumor effects induced by capsaicin in U87 glioblastoma cell lines. Initially, the impact of capsaicin treatment on cell viability was assessed through 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide analysis. Subsequently, cellular proliferation and cytotoxicity were evaluated using bromodeoxyuridine analysis. Further examinations involved determining the levels of N-cadherin, matrix metalloproteinase-9, vimentin, transforming growth factor  $\beta$ , caspase 3, cytochrome c, glutathione reductase, malondialdehyde and catalase through enzyme-linked immunosorbent assay. Capsaicin exhibited anti-proliferative effects in U87 cells, displaying a concentration-dependent reduction in cell viability, particularly with concentrations exceeding 50  $\mu\text{M}$ . Additionally, capsaicin administration led to decreased levels of N-cadherin, matrix metalloproteinase-9, vimentin, transforming growth factor  $\beta$ , glutathione reductase and catalase levels in U87 cells, while increasing caspase 3, cytochrome c and malondialdehyde levels. Our results showed that capsaicin treatment not only regulates epithelial-to-mesenchymal transition in U87 cells, but also suppresses cell viability by triggering apoptotic and oxidative processes. This observation suggests that epithelial-to-mesenchymal transition plays a pivotal role in the proliferation and migration of glioblastoma. Consequently, targeting this capsaicin-mediated signaling pathway could be considered a promising therapeutic approach in the treatment of glioblastoma.

**Anahtar kelimeler:** Epitelyal-mezenkimal geçiş, glioblastoma, kapsaisin

**Keywords:** Epithelial-mesenchymal transition, glioblastoma, capsaicin

Makale Geliş Tarihi : 15.12.2023  
Makale Kabul Tarihi: 15.05.2024

**Sorumlu Yazar:** Doç. Dr., Ceyhan Hacıoğlu, ceyhanhacioglu@duzce.edu.tr, 0000-0002-0993-6118, Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye  
**Telefon:** 0850 800 8181 / 4261

## GİRİŞ

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), polarize epitel hücrelerinin çok sayıda biyokimyasal değişikliğe uğraması için uyarıldığı biyolojik bir süreçtir.<sup>1</sup> EMT yara iyileşmesi, embriyonik gelişim ve dokunun yeniden yapılanması için gerekli sinyalizasyon mekanizmasıdır. Patolojik bir süreç olarak EMT, canlılıkta bir kayıp olmaksızın epitelyal tümör hücrelerinde göç ve invaziv yetenekleri de indükler.<sup>2</sup> EMT süreci, tümör hücrelerinin bazal membrandan ayrılmasını içerir. Merkezi sinir sistemi (CNS) bu kritik doku bileşeninden yoksun olmasına rağmen, CNS kanserleri ve diğer kanser türleri arasında temel invazif mekanizmalar örtüşmektedir.<sup>3</sup> Diğer kanserlerde EMT'yi tetikleyen faktörler aynı zamanda GBM'lerdeki mezenkimal özellikleri de aktive edebilir. Glioblastoma (GBM) mezenkimal alt tipi tipik olarak nöral kök hücre belirteçlerini ekspres eder ve agresif bir fenotiple ilişkilidir.<sup>4</sup> Kök hücre belirteçlerini ekspres eden GBM hücreleri oldukça invazivdir ve *in vitro* ve klinik ortamda kemoterapi ve radyoterapiye dirençlidir.<sup>5</sup>

GBM'ler histopatolojik özelliklerine göre sınıflandırılır; bu özellikler klinisyenlerin iki hücre soy (astrostitik ve oligodendrositik) ile dört malignite derecesi (derece I ila IV) arasında ayırım yapmasına olanak tanır.<sup>6</sup> Derece IV'ün en kötü huylu formu, astrostitik soydaki progenitör veya kök hücrelerden kaynaklanan GBM'dir. Pronöral alt tip pozitif prognoz ile ilişkilidir, mezenkimal alt tip ise yüksek oranda invazif bir doğaya ve kötü prognoza sahip, daha yüksek oranda dögüsel hücre ve neoanjiyogenez ile karakterize edilir.<sup>7</sup> Ayrıca tümörlerin mezenkimal olmayan alt tipleri tipik olarak nüks sırasında mezenkimal özellikler kazanır.<sup>8</sup> Mezenkimal alt tipe doğru bir kayma, daha agresif bir doğa kazanmak için EMT uygulanan kanser hücrelerine benzer şekilde, hastalığın ilerlemesinde yaygın bir model gibi görünmektedir.<sup>9</sup>

Kapsaisin, farmakolojik önemi olan biyolojik etkileri açısından kapsamlı bir şekilde araştırılan kırmızı biberin (*Capsicum annuum*) keskin bir alkaloididir.<sup>10</sup> Kapsaisin anti-inflamatuar ve anti-oksidatif stres aktiviteleri gibi faydalı etkilere sahip olduğu bilinmektedir<sup>11</sup>, ancak kanser hücrelerinin (EMT) yoluyla aktivasyonu gibi olumsuz etkileri de vardır.<sup>12</sup> Kapsaisin, Hedgehog sinyal yolunu düzenleyerek ve *in vivo* EMT'yi önleyerek kolanjiyo karsinom karsinogenezini zayıflattığı bildirildi.<sup>13</sup> Bu raporlar kapsaisin EMT üzerinde hücreye özgü etkileri indüklediğini göstermektedir.

Bu nedenle, bu çalışmada U87 insan GBM hücrelerindeki N-kaderin, matriks metaloproteinaz-9 (MMP-9), vimentin ve dönüştürücü büyüme faktörü  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) gibi EMT biyobelirteçleri üzerinde kapsaisin rolünü araştırmayı amaçladık. Aynı zamanda, kaspaz 3 ve sitokrom c gibi apoptotik belirteçlerin yanında prooksidan-oksidan dengenin durumuna bakabilmek için glutatyon redüktaz, malondialdehit katalaz seviyelerinin ölçümünü gerçekleştirdik. Böylece kapsaisin kaynaklı anti-proliferatif etkilerin altında yatan olası moleküler mekanizmaları açıkladık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Hücre Kültürü

U87 GBM hücre hattı Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan temin edildi. Bu hücre hatları, 2 mM glutamin,

%10 fetal dana serumu (FBS), 100 U/ml penisilin ve 100 ug/ml streptomisin ile desteklenmiş Dulbecco'nun değiştirilmiş Eagle ortamında (DMEM) yetiştirildi. Hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren bir inkübatör içerisinde 37°C sıcaklıkta tutuldu.

### Hücre Canlılık ve Proliferasyon Analizleri

Hücre canlılığını değerlendirmek için kolorimetrik 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) tahlili kullanıldı. Kısaca, U87 hücreleri ( $3 \times 10^4$ ) 96 kuyucuklu plakalara ekildi ve 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'de 24 ve 48 saat boyunca farklı kapsaisin konsantrasyonları ile (0 ila 800  $\mu$ M) ile kültürlendi. İşlemin sonunda numunelere 0.8 mg/ml MTT ilave edildi ve 3 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra süpernatantlar atıldı ve 100  $\mu$ l/kuyucuk DMSO ile çözünen renkli formazan kristalleri, mikro plaka okuyucusu (BioTek) tarafından 570 nm'de okundu. Tedavi edilmeyen kontrol grubundaki hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi ve kapsaisin ile tedavi edilen hücrelerin canlılığı kontrol grubuna göre hesaplandı.

Kapsaisin, ticari olarak temin edilebilen 5-bromo-2'-deoksüridin (BrdU) kitini (2750; Sigma-Aldrich) kullanarak 24 kuyucuklu plakalarda kültürlenmiş U87 hücrelerinin ( $3 \times 10^5$ ) proliferasyonu üzerindeki etkisini analiz ettik. Hücreler, MTT analizi sonuçlarına göre belirlenen kapsaisin konsantrasyonları (93.7  $\mu$ M, 115.8  $\mu$ M ve 142.6  $\mu$ M) ile 24 saat boyunca inkübe edildi ve hücre çoğalması, hücre replikasyon sırasında BrdU birleştirme tahliline dayalı olarak üreticinin talimatlarına göre kolorimetrik olarak ölçüldü. Absorbans değerlerinin analizi, bir Epoch mikroploka okuyucu (BioTek) ile 450 nm'de gerçekleştirildi.

### EMT Biyobelirteçlerinin Analizi

N-kaderin (SEB481Hu), MMP-9 (SEA553Hu), vimentin (SEB040Hu) ve TGF- $\beta$  (SEA124Hu) seviyeleri enzim bağımlı immünosorbent tahlili (ELISA) kitleri kullanılarak değerlendirildi. Üretici tarafından sağlanan talimatlara uygun olarak. Bu analizleri gerçekleştirmek için U87 hücreleri,  $1 \times 10^4$  hücre yoğunluğunda 96 kuyucuklu plakalara ekildi ve ardından 24 saat boyunca kapsaisin ile inkübe edildi. İnkübasyon periyodunun ardından her numunenin absorbansı, önerilen dalga boyunda bir mikroploka okuyucuda ölçüldü.

### Hücre apoptoz tespiti

ELISA için, 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler (kuyucuk başına  $1 \times 10^4$ ), 24 saat boyunca kapsaisine maruz bırakıldı. Üreticinin talimatlarına göre sitokrom c (SEA594Mi) ve kaspaz 3 (SEA626Hu) kitleri kullanılarak hücre apoptozu tespit edildi. Hücreler, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 200  $\mu$ l lizis tamponu ile parçalandı. Daha sonra hücre lizatları 200  $\mu$ g'de 10 dakika boyunca 4 °C'de santrifüjlendi. Yirmi mikrolitre süpernatant, streptavidin kaplı bir mikro kuyucuklu plakaya aktarıldı, her bir çalışma reaktifleri eklendi ve plaka, oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. Kuyucuklar üç kez yıkandı ve subtrat ve dururma çözeltileri eklenerek absorbans değerleri 450 nm'de ölçüldü.

### Oksidatif ve Anti-oksidan Durumun Analizi

Hücreler 96 kuyucuklu bir plakaya  $1 \times 10^4$ /kuyucuk yoğunlukta ekildi ve 24 saat süreyle inkübe edildi. Hücreler daha sonra 24 saat süreyle kapsaisin konsantrasyonları ile inkübe edildi. Hücrelerdeki oksidatif hasar tespit etmek için glutatyon redüktaz (SEB314Hu), katalaz (SEC418Hu) ve malondialdehit (MBS728071) kitleri

kullanılarak bir ELISA analizi yapıldı. Kısaca hücreler, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 200 µL lizis tampo- nuyla parçalandı. Lizat 10 dakika boyunca santrifüjlendi ve toplanan 20 µL süpernatant, çalışma reaktifleri ile oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon tamponu ile üç kez yıkandıktan sonra, substrat solüsyonu ilave edildi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Ardından, durdurma solüsyonu eklenerek absorbans değerleri bir ELISA okuyucu kullanılarak ölçüldü.

#### İstatistiksel Analiz

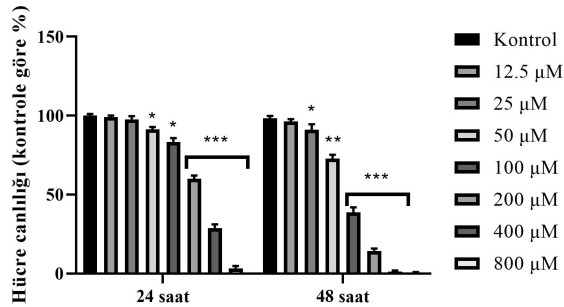
İstatistiksel analiz Graph Pad Prism 8 (Graph Pad Inc., ABD) kullanılarak yapıldı. Deneyler üç kez tekrarlandı. Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak sunuldu. Deney gruplarını karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı ve ardından çoklu grup karşılaştırmaları için Tukey post hoc testi kullanıldı. P değeri 0.05'ten küçük olduğunda istatistiksel anlamlı kabul edildi.

#### BULGULAR

##### Kapsaisinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri

Kapsaisin, kontrol gruplarına kıyasla U87 hücrelerinde konsantrasyona ve zamana bağlı bir azalma ile hücre canlılığını inhibe etti. Şekil 1'de gösterildiği gibi, U87 hücrelerinin kapsaisin (0-800 µM) ile 24 ve 48 saat süreyle işlenmesi hücre canlılığını baskıladı. Bununla birlikte, 24 saat boyunca 12.5µM ila 25µM konsantrasyon aralığında kapsaisin tedavisi, U87 hücre canlılığını önemli ölçüde azaltmadı ( $p>0.05$ ). MTT sonuçlarına göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 24 saatlik 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM ve 800 µM kapsaisin tedavisi, U87 hücre canlılığını sırasıyla %9.4, %17.5, %40.2, %71.6 ve %97.1 oranında azalttı ( $p<0.01$  ve  $p<0.001$ ). Ek olarak, 48 saat boyunca 25 µM ve üzeri kapsaisin konsantrasyonlarında U87 hücre canlılığı konsantrasyona bağlı bir şekilde inhibe edildi. Sonuçlarımıza göre de, 48 saatte boyunca 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM ve 400 µM kapsaisin maruziyeti U87 hücre canlılığının inhibisyon oranları sırasıyla %12.5, %26.4, %59.6, %86.1 ve %98.5 ( $p<0.01$  ve  $p<0.001$ ). Dahası, 48 saat boyunca 800 µM kapsaisin maruziyetinde hücre canlılığı yok denecek kadar azdı. MTT sonuçlarına göre U87 hücreleri için IC50 ve IC25 kapsaisin değerleri sırasıyla 93.7 µM ve 142.6 µM olarak hesaplandı. Ayrıca, diğer biyokimyasal analizler sırasında 24 saat boyunca 93.7 µM, 115.8 µM (ara konsantrasyon olarak) ve 142.6µM konsantrasyonları kullanılmıştır.

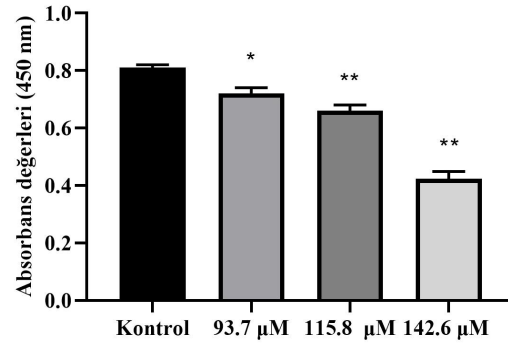
##### Kapsaisinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi



Şekil 1: Kapsaisinin U87 hücrelerindeki hücre canlılığı üzerindeki etkileri. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  ve \*\*\* $p<0.001$ , kontrol grubuyla karşılaştırıldığında

Kapsaisinin U87 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerini BrdU analizi ile belirledik. MTT sonuçlarıyla bağlantılı olarak, 24 saat boyunca 93.7 µM, 115.8 µM ve 142.6 µM kapsaisin konsantrasyonlarıyla tedavi edilen U87 hücrelerinin çoğalması önemli ölçüde azaldı ( $p<0.001$ ; Şekil 2). Ek olarak, U87 hücrelerinde 93.7 µM, 115.8 µM ve 142.6 µM kapsaisin uygulaması, hücre proliferasyonu sırasıyla %21.8, %33.1 ve %56.2 oranında azalttı ( $p<0.001$ ).

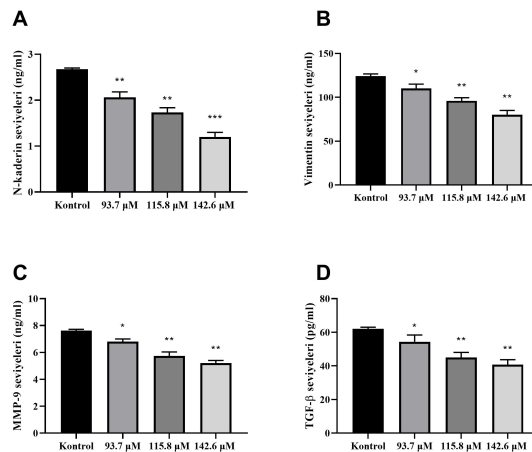
##### Kapsaisinin EMT biyobelirteçleri üzerindeki etkileri



Şekil 2: Kapsaisinin U87 hücrelerindeki proliferasyon üzerine etkileri. \* $p<0.05$  ve \*\* $p<0.01$ , kontrol grubuyla karşılaştırıldığında

Şekil 3A, 3B, 3C ve 3D'de sunulan bulgular, kapsaisin tedavisinin U87 hücrelerinde çeşitli EMT biyobelirteçleri üzerinde önemli regülatif etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Kapsaisin tedavisine yanıt olarak U87 hücrelerindeki N-kaderin, MMP-9, vimentin ve TGF-β düzeylerinde gözlemlenebilir değişiklikler oldu. Kapsaisin tedavisi U87 hücrelerindeki N-kaderin, MMP-9, vimentin ve TGF-β düzeylerinde konsantrasyon bağımlı şekilde düşüşe neden oldu. Dikkat çekici bir şekilde ELISA analiz sonuçları, kapsaisin maruziyeti sonrasında bu biyobelirteçlerin protein seviyelerinde önem yüzdesel değişiklikleri ortaya çıkarmış oldu.

##### Kapsaisinin apoptoz üzerindeki etkileri

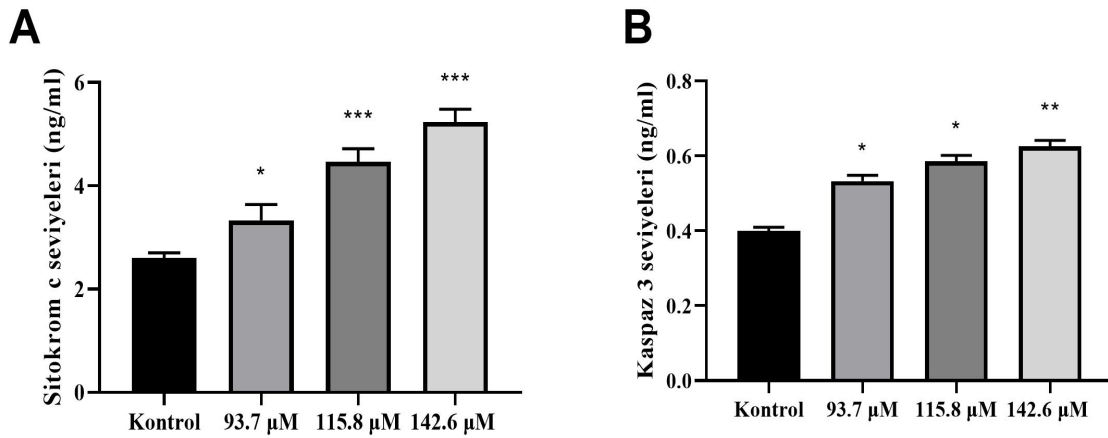


Şekil 3: U87 hücrelerinde kapsaisin maruziyeti EMT biyobelirteçlerinin seviyeleri düşürdü. (A) U87 hücrelerindeki N-kaderin seviyeleri; (B) U87 hücrelerindeki vimentin seviyeleri; (C) U87 hücrelerindeki MMP-9 seviyeleri; (D) U87 hücrelerinde TGF-β seviyeleri. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  ve \*\*\* $p<0.001$ , kontrol grubuyla karşılaştırıldığında

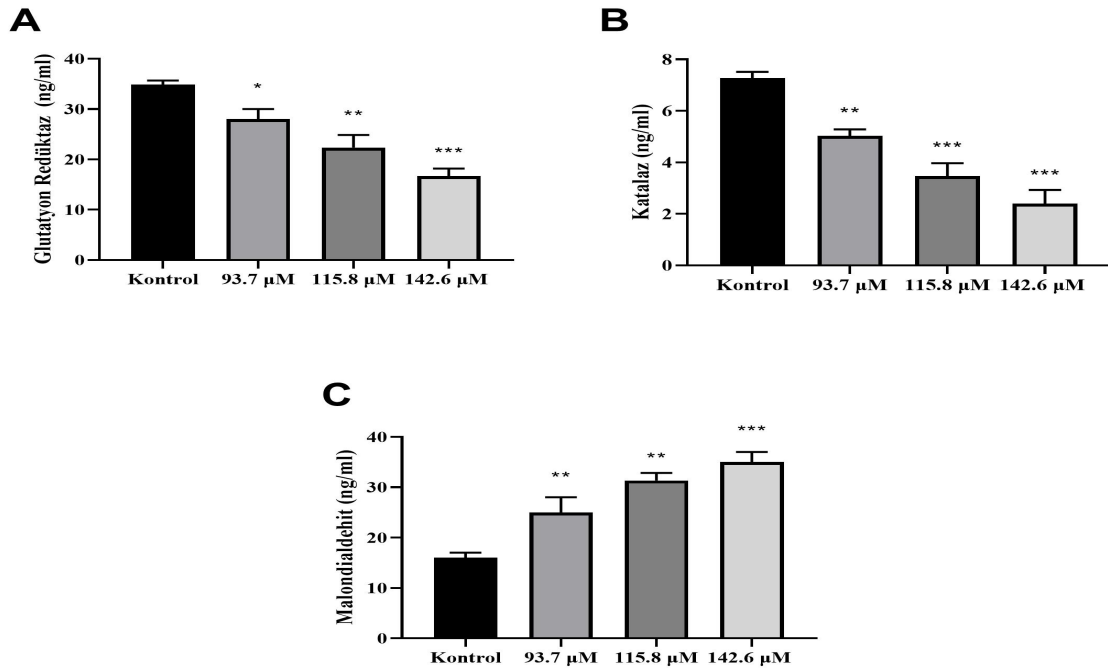
Kapsaisin tedavisinden sonra, U87 hücrelerindeki programlanmış hücre ölümü olan apoptotik süreçlerin artışı neden olmuştur (Şekil 4A ve 4B). U87 hücreleri 24 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda kapsaisin ile tedavi edildikten sonra hücreler toplandı ve sitokrom c ve kaspaz 3 seviyeleri ELISA ile analiz edildi. Veriler, kapsaisin'in sitokrom c ve kaspaz-3 aktivitesini konsantrasyona bağlı bir şekilde indüklediğini gösterdi. Sonuçlarımız, apoptoz indüksiyonunun bir işareti olarak sitokrom c ve kaspaz 3 seviyelerindeki artışının, U87 hücrelerinin 93.7, 115.8 ve 142.6  $\mu\text{M}$  kapsaisin ile tedavi edilmesinden sonra kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli ölçüde arttığını ortaya çıkardı ( $p < 0.05$ ).  
**Kapsaisin oksidatif stres üzerindeki etkileri**

Kapsaisin U87 hücrelerinde anti-proliferatif etkilerinin oksidatif stres ile olan ilişkisini incelemek için glutatyon redüktaz, katalaz ve malondialdehit seviyelerini ölçümünü gerçekleştirdik. U87 hücreleri, 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlardaki kapsaisin ile muamele edildi. Glutatyon redüktaz ve katalaz seviyelerindeki düşüş, kapsaisin U87 hücrelerinde anti-oksidan savunma sistemini baskıladığını gösterdi (Şekil 5A ve 5B). Ek olarak, Şekil 5C'de gösterildiği gibi kapsaisin uygulaması, lipit peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan malondialdehit seviyelerinde artışa neden olarak oksidatif stresin U87 hücrelerinde indüklediğini gösterdi.

#### TARTIŞMA



**Şekil 4:** U87 hücrelerinde kapsaisin maruziyetinin apoptoza olan etkileri.(A) U87 hücrelerindeki sitokrom c seviyeleri; (B) U87 hücrelerindeki kaspaz 3 seviyeleri. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  ve \*\*\* $p < 0.001$ , kontrol grubuyla karşılaştırıldığında



**Şekil 5:** U87 hücrelerinde kapsaisin maruziyetinin oksidatif stres ve anti-oksidan mekanizmalar üzerindeki etkileri.(A) U87 hücrelerindeki glutatyon redüktaz seviyeleri; (B) U87 hücrelerindeki katalaz seviyeleri; (C) U87 hücrelerindeki malondialdehit seviyeleri. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  ve \*\*\* $p < 0.001$ , kontrol grubuyla karşılaştırıldığında

Kanser, Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre dünya çapında hastalık ve ölümlerin önde gelen nedenlerinden birini temsil eden küresel bir sağlık yüküdür. Bitkilerden ekstrakte edilen biyoaktif doğal ürünler, nispeten toksik olmayan ve aktif profilleri nedeniyle kanser tedavisi için yaygın olarak yeni terapötik ve önleyici ilaçlar olarak kabul edilmektedir.<sup>14</sup> Bunlar arasında, acı biberden elde edilen umut verici bir anti-tümör ajanı olan kapsaisinin, *in vitro* ve *in vivo* olarak çeşitli kanserlerde hücre büyümesini ve metastazı inhibe ettiği doğrulanmıştır.<sup>15,16</sup> Ancak kapsaisinin birçok kanser hücreesindeki anti-proliferatif, anti-metastatik ve anti-anjiyojenik etkileri kapsamlı bir şekilde araştırılmış olmasına rağmen kanser metabolizması ile ilgili süreçler henüz tam olarak anlaşılammıştır. Bu çalışmada, kapsaisinin *in vitro* U87 hücre hatlarında EMT'yi inhibe ettiğini ortaya çıkardık. Dahası, çeşitli kapsaisin konsantrasyonları ile tedavi edilen U87 hücrelerinde 48 saate kadar sitotoksitate analizleri gerçekleştirdik ve kapsaisinin EMT biyo belirteçleri üzerindeki etkilerini analiz ettik. EMT, epitelyalden iç şeklindeki mezenkimal benzeri hücrelere doğru morfolojik değişiklikler, artan hücre boyutu, integrin ekspresyonundaki değişikliklerin bir sonucu olarak hücre yapışmasını kaybı, özellikle  $\alpha 5$  ve  $\beta 1$  integrinlerin aşırı ekspresyonu, artan invazivlik ve özellikle vimentin mezenkimal belirteçlerin ekspresyonu ile karakterize edilir.<sup>17</sup> Önceki çalışmada, kapsaisinin kolon kanseri hücrelerinde EMT'yi indüklediği bulunmuştur.<sup>18</sup> Bir başka çalışmada ise, 5637 ve T24 mesane kanseri hücrelerinde kapsaisin maruziyetinin, artan hücre boyutu ve mezenkimal benzeri morfoloji, vimentin,  $\alpha 5$  ve  $\beta 1$  integrin alt birimlerinin ve integrin benzeri kinaz (ILK) ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin gelişmiş ekspresyonunu ve E-kaderinin seviyelerinde düşüş olduğu rapor edilmiştir.<sup>19</sup> EMT, tümör hücrelerinin yeniden programlandığı ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, hücre bağlantılarının kaybı ve ekstraselüler matriksin yeniden modellenmesi yoluyla epitelyal bir fenotipten invazif mezenkimal benzeri bir fenotipe dönüştürüldüğü bir sistemdir.<sup>20</sup> Ek olarak renal hücreli karsinom (RCC) hücre dizileri 786-O ve CAKI-1'de kapsaisinin rolünü araştırılmış ve kapsaisin uygulanan RCC hücrelerinin canlılığının, göçünün ve istilasının regüle ederek EMT sürecini inhibe ettiğini gösterilmiştir.<sup>21</sup> Bu çalışma araştırmacılar, kapsaisinin, E-kaderin (epitelyal belirteç) seviyelerini arttırdığını ve N-kaderin ve vimentin (mezenkimal belirteçler) seviyelerini düşürdüğünü doğrulamıştır; bu da, EMT'nin, kapsaisin ile tedavi edilen RCC hücrelerinde inhibe edildiğini ortaya koydu. Ayrıca, meme kanseri MDA-MB-231 hücrelerinde kapsaisinin, c-Src, FAK ve paxillinin fosforilasyonunu inhibe ederek ve MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarını baskılayarak hücre göçünü ve istilasını baskıladı. Fare prostatının transgenik adenokarsinomunda (TRAMP) kapsaisin tedavisi, karaciğerde ve gastrointestinal sistemde belirgin patolojik toksisitelere yol açmadan metastatik yükte önemli bir azalma gösterdi; bu, p27'deki bir azalmayla ilişkilendirildi.<sup>23</sup> Ling ve ark., GBM hücrelerinde, TGF- $\beta 2$ 'nin EMT'yi kontrol etmek için kritik bir öneme sahip olduğunu rapor etmişlerdir.<sup>24</sup> Yukarıda belirtilen çalışmalarla uyumlu bir şekilde, U87 hücrelerinde kapsaisin uygulamasından sonra N-kaderin, MMP-9, vimentin ve TGF- $\beta$  düzeylerinin azaldığını tespit ettik. Ayrıca MTT

analizlerine göre, U87 hücreleri için kapsaisinin IC50'sinin 24 saat boyunca 121.6  $\mu\text{M}$  olduğunu bulundu. U87 hücre hattında kapsaisin tedavisi, BrdU birleşme analizine göre hücre proliferasyonunda konsantrasyona bağlı bir azalmaya neden olduğunu da ortaya koydu. Bu sonuçlar, kapsaisinin insan U87 hücrelerinde EMT sinyalizasyonunu regüle ederek hücre proliferasyonunu baskıladığını düşündürülebilir. Apoptoz, kanser gelişimi ve ilerlemesine karşı önemli bir engeldir ve apoptotik sinyal kaybı, malignite ile yüksek oranda ilişkilidir.<sup>25</sup> Birçok kanser türü apoptotik yolları bozar ve kanser hücrelerini apoptoza dirençli hale getiren anti-apoptotik yolları güçlendirir. Kapsaisinin, pankreas, kolon, prostat, karaciğer, özofagus, mesane, deri dahil olmak üzere birçok farklı kanser hücre dizisinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir.<sup>26</sup> İçsel mitokondriyal ölüm yolu ve dışsal ölüm reseptörü yolu, uygulayıcı/efektör kaspazları aktive eden ve programlanmış hücre ölümüne yol açan iki ana sinyal sistemidir. Özellikle mitokondriyal yol, apoptozun tam olarak yürütülmesiyle meşguldür, bu nedenle mitokondri, apoptotik mekanizmanın 'bekçisi' olarak adlandırılmıştır ve mitokondriyal ölüm yolunun proteinleri ve yolları, yeni terapötik tedaviler için umut verici hedefler haline gelmiştir.<sup>27</sup> Kapsaisinin, farklı kanser hücre hatlarında apoptozu başlatmak için mitokondriyal ölüm yolunda yer alan çeşitli proteinleri hedeflediği gösterilmiştir. Örneğin kapsaisin tedavisi, içsel ve dışsal apoptotik yolların aktive ettiği ve kaspaz-9 ve -3 aktivasyonuna yol açan anti-apoptotik protein, B hücreli lenfoma 2'nin ekspresyonunu bastırıcı ve mitokondriyal membran potansiyelinin kaybını takibensitokrom c salınımının arttığı gösterilmiştir.<sup>28</sup> Mitokondri, mitokondriyal solunum sırasında oksijenin eksik indirgenmesi nedeniyle üretilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) ana fizyolojik kaynağıdır.<sup>29</sup> Bazı patolojik durumlarda aşırı ROS üretimi apoptoza neden olur. Normal koşullar altında mitokondri, aşırı ROS oluşumunu ve oksidatif hasarı önleyen yeterli düzeyde anti-oksidan içerir. Bununla birlikte, ROS üretiminin arttığı veya anti-oksidan seviyelerinin tükendiği durumlarda oksidatif stres, protein oksidasyonuna ve lipid peroksidasyonuna neden olur ve bu da mitokondriyal membran, proteinler ve DNA'da hasara yol açar.<sup>30</sup> Kanser hücreleri, tümör büyümesini sürdüren ve bu hücreleri pro-apoptotik sinyallere karşı koruyan, böylece tümörün ilerlemesini teşvik eden gelişmiş bir yapısal oksidatif stres seviyesi geliştirir. İlginçtir ki, Zhang ve meslektaşları kapsaisin tedavisinin, normal asiner hücreleri etkilemeden hem AsPC-1 hem de BxPC-3 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelini önemli ölçüde azalttığını gösterdi.<sup>31</sup> Bir başka çalışmada, kapsaisin U251 hücrelerindeki apoptotik etkileri, ROS üretimi, hücre içi kalsiyum artışı, ekstraselüler matriks bozulması ve sitokrom c'nin sitozole salınması ve kaspazkas kadının aktivasyonu ile ilişkililiydi.<sup>32</sup> Bu çalışma, acı biberde en çok bulunan ikinci kapsaisinoid olan kapsaisinin, U251 insan GBM hücrelerine karşı anti-kanser ajanları olabileceğini gösterdi. Kapsaisinin GBM hücrelerinde oksidatif stres aracılığıyla mitokondriyal bütünlüğü bozarak apoptozu indüklediğini, bunun glutatyon ve katalaz gibi anti-oksidanların seviyelerinin düşmesi ve kaspaz3'ü aktive etmek için sitozole sitokrom c salınımı ile ilişkili olduğunu gösterdi.

Kapsaisin, ortalama 60°C erime noktasına ve 305.4 kDa moleküler ağırlığa sahip, yağda çözünen bir kapsaisinoiddir. *In vivo* çalışmalar, oral alımdan sonra kapsaisin emiliminin %50 ile %90 arasında değiştiğini göstermektedir.<sup>33</sup> Dahası kapsaisin *in vivo* çalışmaların da gösterildiği gibi, kan-beyin bariyerini etkili bir şekilde geçer. İntravenöz uygulamadan sonra, bileşiğin beyinde ve omurilikte serumla karşılaştırıldığında 5 kat daha yüksek konsantrasyonları rapor edilmiştir.<sup>34</sup> Ek olarak hayvan çalışmalarında kapsaisin subkutan uygulamadan sonra plazmada, beyinde ve omurilikte tespit edilebildiği gösterilmiştir.<sup>33</sup> Kapsaisin oral yoldan uygulanmasına yönelik farmasötik formülasyonlar, kırmızı biber içeren kapsüller formunda mevcuttur.<sup>35</sup> Kapsaisin oral uygulaması için terapötik doz belirlenmemiştir, ancak ticari olarak temin edilebilen kapsüllerin etiketlerinde belirtilen genel olarak önerilen günlük doz, %0.25 kapsaisin içeren 1350-4000 mg kırmızı biberdir.<sup>36</sup> Bu doz aralığının insanlarda enerji harcamasını, yağ oksidasyonunu, termojenezi artırdığı, iştahı azalttığı ve toksik bir yan etkiye neden olmadığı gösterilmiştir.<sup>37</sup> Farklı bir çalışmada baş ağrısı hastalarında intranazal kapsaisin (10 mM) uygulamasının ağrı ataklarının sıklığını azalttığı bulunmuştur.<sup>38</sup> Yukarıda bahsi geçen çalışmalara göre, hidrofobik ve lipofilik karaktere sahip olan kapsaisin kan beyin bariyerini geçtiği yapılan çalışmalar ile de ortaya konmuştur. Ek olarak, sonuçlarımız literatür ile de tutarlı şekilde, hücre tipine bağlı olarak 100 ila 500 µM aralığındaki kapsaisin, 40'tan fazla farklı tipte kanser hücre hattında hücre proliferasyonunu baskıladığı bildirilmiştir.<sup>39,40</sup> Dahası, *in vitro* analizler sırasında kullandığımız kapsaisin konsantrasyonlarının kabul edilebilir aralıkta olduğunu da doğrulamış olduk. Kuşkusuz kapsaisin sağlık üzerindeki etkileri çoğunlukla olumludur. Ancak, kapsaisin nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki etkilerini aydınlatmayı amaçlayan daha ileri klinik öncesi araştırmalara ihtiyaç vardır.

## SONUÇ

Sonuç olarak, GBM hücrelerinde kapsaisin, N-kaderin, MMP-9, vimentin ve TGF-β düzeylerinin düşürerek EMT'nin inhibisyonu yoluyla hücre canlılığı ve proliferasyonunu baskılamıştır. Ancak, bu çalışmanın en büyük limitasyonlarından biri kapsaisin tümör dışı hücrelerdeki ve *in vivo* modellerdeki etkilerinin analiz edilmemiş olmasıdır. Diğer bir sınırlılık ise çalışmamızın bir ön araştırma olması nedeniyle 24 saatlik kapsaisin tedavisinin etkilerinin araştırılması, uzun vadeli etkilerinin araştırılmamasıdır. Bu nedenle kapsaisin farklı kanser türlerinde diğer EMT biyobelirteçler üzerindeki etkilerini araştırmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Etik Komite Onayı:** Ticari olarak temin edilen hücre hatları *in vitro* deneylerde kullanıldığı için etik onay gerekmemektedir. Deneysel çalışmalarda sırasında herhangi bir hayvan ve insan dokusu kullanılmamıştır.

**Bilgilendirilmiş onam:** Bilgilendirilmiş onam alınmasına gerek yoktur.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir- CH; Tasarım- CH; Denetleme- CH; Kaynaklar- CH; Malzemeler- CH; Veri Toplanması ve/veya işlenmesi- CH; Analiz ve/veya yorum- CH; Lite-

ratür taraması- CH; Yazıyı yazan- CH; Eleştirel inceleme- CH.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

**Finansal Destek:** Bu araştırma herhangi bir finansman kuruluşundan/sektörden destek almamıştır.

**Teşekkür:** Yok.

**Ethics Committee Approval:** Ethical approval is not required because commercially available cell lines are used in *in vitro* experiments. No animal or human tissues were used during experimental studies.

**Informed Consent:** There is no need to obtain informed consent.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept- CH; Design- CH; Supervision- CH; Resources- CH; Materials- CH; Data Collection and/or Processing- CH; Analysis and/or Interpretation- CH; Literature Search- CH; Writing Manuscript- CH; Critical Review- CH.

**Declaration of Interests:** The authors declare that there is no conflict of interest.

**Funding:** This research did not receive support from any funding agency/industry.

**Acknowledgements:** None.

## KAYNAKLAR

1. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(2):69-84. doi:10.1038/s41580-018-0080-4
2. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1429-37. doi: 10.1172/JCI36183
3. Kahlert UD, Nikkhah G, Maciaczyk J. Epithelial-to-mesenchymal(-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas. *Cancer Lett.* 2013;331(2):131-8. doi:10.1016/j.canlet.2012.12.010
4. Wang LM, Englander ZK, Miller ML, Bruce JN. Malignant Glioma. *Adv Exp Med Biol.* 2023;1405:1-30. doi:10.1007/978-3-031-23705-8\_1
5. Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, Colman H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics.* 2017;14(2):284-297. doi:10.1007/s13311-017-0519-x
6. Weller M, Wick W, Aldape K, et al. Glioma. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15017. doi:10.1038/nrdp.2015
7. Gussyatiner O, Hegi ME. Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options. *Semin Cancer Biol.* 2018;51:50-58. doi:10.1016/j.semcancer.2017.11.010
8. Lah TT, Novak M, Breznik B. Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases. *Semin Cancer Biol.* 2020;60:262-273. doi:10.1016/j.semcancer.2019.10.010
9. Iwadata Y. Plasticity in Glioma Stem Cell Phenotype and Its Therapeutic Implication. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2018;58(2):61-70. doi:10.2176/nmc.ra.2017-0089
10. Reilly CA, Taylor JL, Lanza DL, Carr BA, Crouch DJ, Yost GS. Capsaicinoids cause inflammation and epithelial cell death through activation of vanilloid

- receptors. *Toxicol Sci.* 2003;73(1):170-81. doi:10.1093/toxsci/kfg044
11. Grüter T, Blusch A, Motte J, et al. Immunomodulatory and anti-oxidative effect of the direct TRPV1 receptor agonist capsaicin on Schwann cells. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):145. doi:10.1186/s12974-020-01821-5
  12. Geng S, Zheng Y, Meng M, et al. Gingerol Reverses the Cancer-Promoting Effect of Capsaicin by Increased TRPV1 Level in a Urethane-Induced Lung Carcinogenic Model. *J Agric Food Chem.* 2016;64(31):6203-11. doi:10.1021/acs.jafc.6b02480
  13. Wutka A, Palagani V, Barat S, et al. Capsaicin treatment attenuate scholango carcino macarcino genesis. *PLoS One.* 2014;9(4):e95605. doi:10.1371/journal.pone.0095605
  14. Sauter ER. Cancer prevention and treatment using combination therapy with natural compounds. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2020;13(3):265-285. doi:10.1080/17512433.2020.1738218
  15. Liu T, Wang G, Tao H, et al. Capsaicin mediates caspases activation and induces apoptosis through P38 and JNK MAPK path ways in human renal carcinoma. *BMC Cancer.* 2016;16(1):790. doi:10.1186/s12885-016-2831-y
  16. Hacıoğlu C. Capsaicin inhibits cell proliferation by enhancing oxidative stress and apoptosis through SIRT1/NOX4 signaling path ways in HepG2 and HL-7702 cells. *J Biochem Mol Toxicol.* 2022;36(3):e22974. doi:10.1002/jbt.22974
  17. Nam EH, Lee Y, Moon B, Lee JW, Kim S. Twist1 and AP-1 cooperatively upregulate integrin  $\alpha 5$  expression to induce invasion and the epithelial-mesenchy maltransition. *Carcinogenesis.* 2015;36(3):327-37. doi:10.1093/carcin/bgv005
  18. Yang J, Li TZ, Xu GH, Luo BB, Chen YX, Zhang T. Low-concentration capsaicin promotes colorectal cancer metastasis by triggering ROS production and modulating Akt/m TO Rand STAT-3 path ways. *Neoplasma.* 2013;60(4):364-72. doi: 10.4149/neo\_2013\_048
  19. Amantini C, Morelli MB, Nabissi M, Cardinali C, Santoni M, Gismondi A, Santoni G. Capsaicin trigger sauto phagic cell survival which drives epithelial mesenchy maltransition and chemoresistance in bladder cancer cells in an Hedgehog-dependent manner. *Oncotarget.* 2016;7(31):50180-50194. doi:10.18632/oncotarget.10326
  20. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell.* 2016;166(1):21-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028
  21. Que T, Ren B, Fan Y, et al. Capsaicin inhibits the migration, invasion and EMT of renal cancer cells by inducing AMPK/mTOR-mediated auto phagy. *Chem Biol Interact.* 2022;366:110043. doi: 10.1016/j.cbi.2022.110043
  22. Li BH, Yuan L. Inhibitory effects of capsaicin on migration and invasion of breast cancer MDA-MB-231 cells and its mechanism. *Sheng Li Xue Bao.* 2017;69(2):183-188. doi:10.13294/j.aps.2017.0016
  23. Venier NA, Yamamoto T, Sugar LM, Adomat H, Fleshner NE, Klotz LH, Venkateswaran V. Capsaicin reduces the metastatic burden in the transgenicadenocarcinoma of the Mouse prostate model. *Prostate.* 2015 Sep;75(12):1300-11. doi: 10.1002/pros.23013
  24. Ling G, Ji Q, Ye W, Ma D, Wang Y. Epithelial-mesenchymal transition regulated by p38/MAPK signaling path ways participates in vasculogenicmimicry formation in SHG44 cells transfected with TGF- $\beta$  cDNA loaded lentivirus in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* 2016;49(6):2387-2398. doi:10.3892/ijo.2016.3724
  25. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
  26. Clark R, Lee SH. Anticancer properties of capsaicin against human cancer. *Anticancer Res.* 2016;36(3):837-43.
  27. Chalah A, Khosravi-Far R. The mitochondrial death path way. *Adv Exp Med Biol.* 2008;615:25-45. doi:10.1007/978-1-4020-6554-5\_3
  28. Kim MY, Trudel LJ, Wogan GN. Apoptosis induced by capsaicin and resveratrol in coloncarcinoma cells requires nitric oxide production and caspase activation. *Anticancer Res.* 2009;29(10):3733-40.
  29. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.* 2019;25:101084. doi: 10.1016/j.redox.2018.101084
  30. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU. Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther.* 2021;17(1):22-28. doi:10.4103/jcrt.JCRT\_862\_16
  31. Zhang R, Humphreys I, Sahu RP, Shi Y, Srivastava SK. In vitro and in vivo induction of apoptosis bycapsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death path way. *Apoptosis.* 2008;13(12):1465-78. doi: 10.1007/s10495-008-0278-6
  32. Xie L, Xiang GH, Tang T, et al. Capsaicin and dihydro capsaicin induce apoptosis in human glioma cells via ROS and Ca<sup>2+</sup>-mediated mitochondrial path way. *Mol Med Rep.* 2016;14(5):4198-4208. doi:10.3892/mmr.2016.5784
  33. O'Neill J, Brock C, Olesen AE, Andresen T, Nilsson M, Dickenson AH. Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treatpain. *Pharmacol Rev.* 2012;64(4):939-971. doi:10.1124/pr.112.006163
  34. Saria A, Skofitsch G, Lembeck F. Distribution of capsaicin in rat tissues after systemic administration. *J Pharm Pharmacol.* 1982;34(4):273-275. doi:10.1111/j.2042-7158.1982.tb04245.x
  35. Janssens PL, Hursel R, Westerterp-Plantenga MS. Capsaicin increases sensation of fullness in energy balance, and decreases desire to eat after dinner in negative energy balance. *Appetite.* 2014;77:44-49. doi: 10.1016/j.appet.2014.02.018
  36. Ludy MJ, Moore GE, Mattes RD. The effects of capsaicin and capsiate on energy balance: critical review and meta-analyses of studies in humans. *Chem Senses.* 2012;37(2):103-121. doi:10.1093/chemse/bjr100
  37. Fattori V, Hohmann MS, Rossaneis AC, Pinho-Ribeiro FA, Verri WA. Capsaicin: Current understanding of its mechanisms and therapy of

- pain and other pre-clinical and clinical uses. *Molecules*. 2016;21(7):844. doi:10.3390/molecules21070844
38. Fusco BM, Fiore G, Gallo F, Martelletti P, Giacobuzzo M. "Capsaicin-sensitive" sensory neurons in cluster headache: pathophysiological aspects and therapeutic indication. *Headache*. 1994;34(3):132-137. doi:10.1111/j.1526-4610.1994.hed.3403132.x
39. Clark R, Lee SH. Anti cancer properties of capsaicin against human cancer. *Anticancer Res*. 2016;36(3):837-843.
40. Hacıoğlu C. Capsaicin enhances temozolomide-resistant glioblastoma cells' chemo sensitivity and ferroptosis through FHOD1/IRF2 down regulation. *J Food Biochem*. 2024;8464817:1-11. doi:10.1155/2024/8464817

