

İnsan T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi Hücrelerinin Kapsaisin ile İndüklenmiş Apoptozunda Rolü Olabilecek JAK/STAT Sinyal İletim Yolağı Elemanlarının Gen Ekspresyon Profillerinin Belirlemesi

Determination of the Gene Expression Profiles of JAK/STAT Cascade Components for the Potential Role of Capsaicin Induced Apoptosis of Acute T-Cell Lymphoblastic Leukemia Cells

Burçin Tezcanlı Kaymaz, Vildan Bozok Çetintaş, Buket Kosova

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir

ABSTRACT

AIM: Capsaicin, an ingredient of red chili pepper consumed as spice throughout the world is defined as “double-edged sword” agent for having possible tumorigenicity/genotoxicity properties, for being antagonist to carcinogens/mutagens for inducing tumor cell apoptosis. However, reasons of capsaicin induced leukemic cell apoptosis are investigated. In this study, following capsaicin treatment to acute lymphoblastic leukemia cell line CCRF-CEM, detecting apoptosis; determining gene expression profiles of JAK/STAT signaling pathway members STAT3, STAT5A, -5B, JAK2, IL-6 mRNA levels and clarifying possible molecular effect mechanism of capsaicin were aimed.

METHODS: After 72h capsaicin treatment with IC50 dose that caused cytotoxic effect upon CCRF-CEM; an apoptosis assay was carried out; from another group of cells', following total RNA isolation, cDNA synthesis was revealed, target genes' expression levels were determined by real time qRT-PCR. Expressional changes were evaluated by comparing with untreated control group cells' as fold or % change by performing statistical analyses.

RESULTS: When apoptotic case of capsaicin treated and untreated control group cells was compared, significant apoptosis induction was detected in treated group by 37.1% increase. When mRNA expression levels of capsaicin treated leukemic cells/ control group cells for target genes were compared; significant down-regulations were detected in STAT3, STAT5A, -5B, JAK2 and IL-6 expressions with -6.02, -49.6, -2.23, -5.53, -2.51 fold respectively.

CONCLUSION: One possible reason of capsaicin induced leukemic cell apoptosis might be due to the significant decrease in STAT3, STAT5A and -5B expression levels that function as transcription factors and exhibit an upregulated expression in leukemia. In addition, the down-regulation in signaling accelerators JAK2 and IL-6 expressions could be resulted in deceleration in leukemic cell proliferation and induced apoptosis due to signaling suppression. Therefore, the possibility of capsaicin to take place in the treatment of acute lymphoblastic leukemia as well might create new initiative in therapeutic application area.

Key words: capsaicin; investigational; organic chemicals; precursor T-Cell lymphoblastic leukemia-lymphoma; therapies; tissues

ÖZET

AMAÇ: Dünya genelinde baharat olarak tüketilen kırmızı acı biberin içerdiği kapsaisin (trans-8-metil-N-vanilil-6-nonenamid), olası tümörögenез ve genotoksisite özelliğinin yanı sıra; çeşitli karsinojen ile mutajenlere antagonist olması ve tümöral hücre apoptozunun indüklemesi sebebiyle “iki yüzü keskin bıçak” bir ajan olarak tanımlanmaktadır. Ancak kapsaisin ile indüklenmiş lösemi hücre apoptozunun nedenleri halen araştırma konusudur. Bu çalışmada, akut lenfoblastik lösemi hücre dizisi olan CCRF-CEM' e kapsaisin uygulandıktan sonra apoptoz analizinin gerçekleştirilmesinin yanı sıra; JAK/STAT (Janus Kinaz/ Sinyal İleticisi Transkripsiyon Aktivatörü) sinyal iletim yolağı elemanlarından STAT3, STAT5A, -5B, JAK2 ve IL-6'nın mRNA seviyesindeki gen ekspresyon profillerinin çıkartılarak, kapsaisinin olası moleküler etki mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmıştır.

YÖNTEM: Kapsaisinin CCRF-CEM hücreleri üzerinde sitotoksik etki oluşturduğu IC50 dozu 80 µM uygulandıktan 72 saat sonra hücrelerin apoptotik durumu değerlendirilmiş; diğer bir hücre grubundan total RNA izole edilip cDNA sentezi gerçekleştirilmiş ve hedef genlerin ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı qRT-PCR ile belirlenmiştir. Ekspresyon değişimi, madde verilmemiş kontrol grubu hücrelerle kıyaslanarak, kat değişimi ve % değişim olarak istatistiksel analiz yapılarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR: Kapsaisin ile muamele edilmiş lösemi hücreleriyle kontrol grubu hücrelerin apoptotik durumu kıyaslandığında, muamele grubu hücrelerde %37.1 oranında anlamlı bir apoptoz indüksiyonu saptanmıştır. Hedef genlere ait mRNA ekspresyon seviyeleri kıyaslandığında, STAT3, STAT5A, -5B, JAK2 ve IL-6 ekspresyonlarında sırasıyla -6.02, -49.6, -2.23, -5.53, -2.51 katlık anlamlı azalmalar saptanmıştır.

SONUÇ: Kapsaisin ile indüklenmiş lösemi hücre apoptozunun olası nedenlerinden biri de, JAK/STAT sinyal yolağı elemanlarından; transkripsiyon faktörü olan ve lösemide artmış ekspresyon sergileyen STAT3, STAT5A ve -5B ekspresyon seviyelerinin anlamlı derecede azalmış olması olabilir. Buna ilave olarak sinyalleşme tetikleyicileri JAK2 ve IL-6 ekspresyonlarındaki düşüş ise; sinyalleşmenin baskılanarak lösemik hücre proliferasyonunun yavaşlaması ve apoptozun indüklenmesiyle sonuçlanmış olabilir. Bu nedenle, akut lenfoblastik lösemi tedavisinde kapsaisinin de yer alabilecek olması, teröpotik uygulama alanında yeni bir açılım yaratabilecektir.

Anahtar kelimeler: kapsaisin; araştırma; organik kimyasallar; akut T hücreli lenfoblastik lösemi; tedaviler; dokular

Giriş

Janus Kinaz / Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü (JAK / STAT) yolağı hücre proliferasyonu, yaşamı ve apoptozunun düzenlenmesinde görevli en önemli sinyal iletim yollarındandır. Reseptörce uyarılarak aktive olan JAK kinazlar, STAT proteinlerini fosforile eder. Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü proteinlerinin -SH2 ucu, diğer bir STAT proteininin fosfotirozin rezidüsüne bağlanma yeteneğine sahiptir. Böylelikle iki STAT proteini birbirine bağlanıp reseptörden ayrılarak, STAT dimerlerini oluştururlar. STAT dimerleri nükleusa göç eder, sitokine cevap veren hedef genin promoter bölgesindeki DNA sekanslarına bağlanarak, gen ekspresyon değişikliklerine ve sinyal iletimi ile malignitede ekspresyon artışı gösteren genlerin aktivasyonuna neden olurlar. Aktif STAT' lar hücre proliferasyonu ve anjiogenezi uyarma, hücreleri immun sistemden koruma gibi önemli görevleri bulunan çeşitli proteinlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinden sorumludurlar. Bu nedenle; anormal aktivasyonları çoğu zaman hücrel transformasyona neden olmaktadır^{1,2}.

Janus Kinaz-2, sitokin reseptör ailesi üyelerinden IL-6 ile de etkileşime girerek sinyalleşmeyi tetikleyerek JAK/STAT yolağının aktive olmasını sağlar ve hematopoetik büyüme faktörlerinin kan hücreleri üzerindeki etkisini düzenler³. STAT3 ve STAT5 ise farklı hücrelerde gen transkripsiyon etkinliğine bağlı olarak hücre döngüsünü, hücre proliferasyonunu ve apoptozu düzenlerler; ayrıca çeşitli hemato-onkolojik hastalıklarda aktifleşip, lösemi oluşumunda da rol oynarlar⁴.

Lösemi tiplerinden T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL), sürekli JAK/STAT ile NOTCH yollarının sinyalleşmelerini de içeren bir dizi onkogenik süreç sonucunda ve transkripsiyon faktörleri, sinyal ileten onkogenlerle, tümör supresörlerde gözlenen genetik değişiklikler sonucu; T hücre gelişimini yönlendiren hematopoetik öncüllerin malign transformasyonundan köken alır⁵.

T hücreli akut lenfoblastik lösemi prognozu modern protokollerle birlikte yoğun kemoterapi uygulanmasıyla çocukların %75'inde; yetişkinlerin %50'sinde kür ile sonuçlanmaktadır⁶. Ancak, primer direnç gelişen ya da relaps olan olgularda tedavi şansı düşüktür^{7,8}. Bu nedenle yüksek etkinlik, düşük toksisite ve maliyet özelliklerine sahip yeni anti-lösemik ajanların arayışı her an için güncel tedavi protokollerinin

gelişmesine yardımcı olmakta ve lösemi gelişimine neden olan moleküler işleyişin aydınlatılmasını sağlamaktadır^{9,10}.

Fito-kimyasalların kemoterapi ilaçları kadar anti-oksidan ve kanser koruyucu etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bu biyoaktif maddelerin çoğu anti-kanser özelliklerini hücre siklusunun ilerleyişini durdurarak ve tümör hücre apoptozunu uyarak gerçekleştirir¹¹.

Kapsaisin (trans-8-Mmetil-N-vanilil-6-nonenamid), Capsicum cinsi biber çiçeğinden elde edilen ve çeşitli yemeklerde baharat olarak kullanılan kırmızı biberin en temel komponentidir. Saf kapsaisinin Scovil acılık derecesi birimi, 16×10^6 SU (Scoville unitesi) olması itibariyle, kırmızı biber bileşenleri arasındaki en acı komponenttir. İçeriğinde kapsaisin barındıran topikal merhemler, ciltte yanma, batma ve sıcaklık hissine neden olur ve periferik nöropati ağrılarının hafifletilmesinde kullanılır. Kapsaisin, nöronlardaki P maddesini tüketerek lokal ağrı uyarılarının beyine ulaşmasını engeller ve böylece cilt ve eklem dokusunun ağrıya karşı duyarlılığını geriye dönüşümlü olarak azaltır¹².

Kapsaisinin karsinogenik potansiyelinin değerlendirildiği genotoksisite ve karsinogenez analizleri in – vitro ve in – vivo değişken sonuçlar gösterdiğinden bu baharat “iki yüzü keskin bıçak” olarak tanımlanmıştır^{13,14}. Ancak 2000 yılı itibariyle kapsaisinin karsinogenik yönünün çok zayıf olduğu ve saflığının önemli olduğu standardize protokollerle gösterilmeye başlanmıştır. Kapsaisinin önemli bir teröpotik ajan olarak sınıflanması, kanser hücre dizileri ile ksenograft fare modellerinde kanser hücreleri üzerine anti-proliferatif etki göstermesi, hücre siklusunu G_0/G_1 fazlarında durdurması ve özellikle tümör hücre apoptozunu indüklemesi dolayısıdır¹³. Ancak apoptozun hangi moleküler mekanizmalar aracılığıyla uyarıldığı net olarak bilinmemektedir. Günümüze kadar kapsaisin aracılı indüklenmiş apoptozun olası nedenleri arasında, oksidatif strese bağlı geri dönüşümsüz hasar oluşumu, NF-kB aktivitesinin geri-regülasyonu, pro-apoptotik proteinlerin ileri-regülasyonu, intrinsik (mitokondrial) yolağın kaspaz aktivasyonu ve ubiquitin/proteozom yolağının düzensizliği gözlenmiştir¹⁵.

Bu çalışmada, T hücreli akut lenfoblastik lösemi hücre modeli olan CCRF-CEM'e kapsaisin uygulandıktan sonra apoptotik durumun değerlendirilmesi ile JAK/STAT sinyal iletim yolağı elemanlarından STAT3, STAT5A, -5B, JAK2 ve IL-6'nın mRNA seviyesindeki gen ekspresyon profilleri çıkartılarak,

kapsaisinin olası moleküler etki mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmıştır.

Yöntem

Çalışma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda, Kasım 2012 – Mart 2013 sürecinde gerçekleştirilmiştir. Araştırma süresince Helsinki bildirgesine uygun olarak çalışılmıştır.

CCRF-CEM Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

CCRF-CEM insan T hücreli akut lenfoblastik lösemi hücreleri, 37 °C ve %5 CO₂ ile humidifiye edilmiş inkübatörde, %1 L-glutamin, %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serum ve 100 ünite/ml penisilinstreptomisin eklenerek hazırlanan RPMI-1640 besiyerinde çoğaltıldı. Hücrelerin takibi inverted mikroskop ile gerçekleştirildi. Hücre canlılığı, tripan mavisi boyası testi ile ışık mikroskobu altında sayım yapılarak izlendi. Çalışma bitiminde hücreler dondurularak saklandı.

Kapsaisin Muamelesi

Toz haldeki saf kapsaisin [moleküler ağırlık=305.41 g/mol; (Sigma, Missouri, USA)] DMSO' da çözümlenerek ara stok solüsyonlar RPMI 1640 besiyerinde hazırlandı. Kapsaisinin CCRF-CEM hücreleri için belirlenmiş IC₅₀ dozu olan 80 µM ile deney setleri oluşturuldu¹⁶. İnkübasyonundan 72 saat sonra apoptoz analizi ve mRNA seviyesindeki gen ekspresyon analizi için sırasıyla 5x10⁶ ve 1x10⁶ hücre toplandı. Bir deney seti de, kapsaisin ile muamele edilmemiş kontrol grubu hücrelerini oluşturacak şekilde kuruldu ve 72 saat sonunda aynı sayıda hücre toplandı.

Apoptoz Analizi

Kapsaisin ile muamele edilmiş hücreler ile kontrol grubu hücreler toplanarak, histon kompleksi oluşturmuş DNA fragmentlerinin rölatif kantitasyonunun spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayalı bir test olan "Cell Death Detection ELISA Kit" (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) ile apoptotik hücre oranı belirlendi. Kapsaisin ile muamele edilmiş/edilmemiş hücreler arasındaki apoptoz oranı farklılığı, ölçülen absorbansların kıyaslanması suretiyle kat değişimi ve yüzde artışı olarak belirlendi. Kitin çalışma prensibi gereğince absorbans artışı, apoptotik nükleozomların artışına; dolayısıyla apoptoz indüksiyonuna neden olmaktadır.

JAK/STAT Sinyal Yolağı Elemanlarının qRT-PCR ile mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

JAK/STAT yolağı üyelerinden hedef genler olarak belirlediğimiz STAT3, STAT5A/-5B, JAK2 ve IL-6 genlerinin ekspresyonunu belirlemek amacıyla, 72 saat süreyle kapsaisin ile muamele edilmiş/edilmemiş eşit sayıda hücre toplandı ve bu hücrelerden MagNAPure LC RNA İzolasyon kiti (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) kullanılarak total RNA izole edildi. Elde edilen RNA'ların miktarları ve saflıkları NanoDrop cihazında spektrofotometrik olarak ölçüldü ve RNA'lar "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit" (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) kullanılarak komplementer DNA'ya çevrildi. Bu aşama da tamamlandıktan sonra, oluşturduğumuz gerçek zamanlı kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) protokolleri ile ekspresyon seviyeleri aşağıda verildiği şekilde belirlendi.

*STAT3, STAT5A, STAT5B, JAK2 ve IL-6 mRNA Kantitasyonu

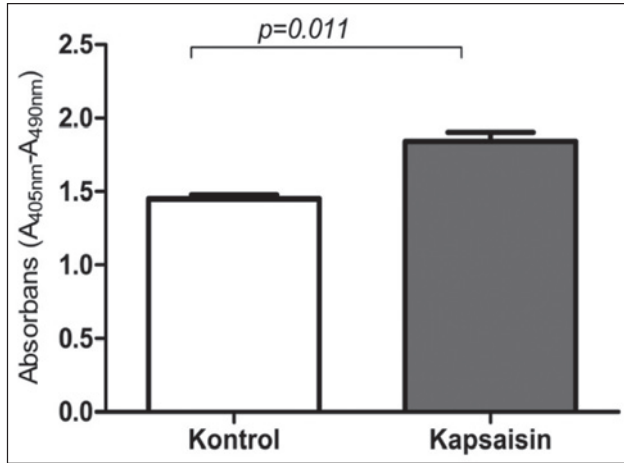
STAT3, STAT5A ve -5B genlerinin mRNA seviyeleri, hedef genlere ait hibridizasyon problemleri kullanılarak qRT-PCR yöntemiyle LightCycler ver: 2.0 (Roche Diagnostics) cihazında belirlendi. Referans gen olarak G6PDH kullanıldı¹⁷. Genlerin mRNA seviyesindeki azalma oranı, rölatif ekspresyon değerlerinin kontrol grubuyla kapsaisin verilmiş grubun kıyaslanması sonrasında yüzde baskılama ve kat değişimi olarak saptandı. JAK2 ve IL-6 genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri, UPL hidroliz problemleri kullanılarak gerçekleştirildi. Bu analizde referans gen olarak β-Aktin kullanıldı. PCR analizi "TaqMan Master Kit" (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) manüeline göre gerçekleştirildi.

İstatistiksel Analiz

qRT-PCR deneyleri triplike olarak kuruldu ve rölatif ekspresyon değerlerinin ortalamasıyla birlikte standart sapmaları da hesaplanırken; apoptoz analizi dublike olarak çalışıldı. Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism (V.5.01) yazılımı kullanılarak, Student's t testi prensibine göre yapıldı ve p<0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

Kapsaisinin lösemi hücrelerinin apoptoz oranında artışa neden olup olmadığının belirlenmesi amacıyla,



Şekil 1. Kapsaisin ile muamele edilmiş ve edilmemiş CCRF-CEM hücrelerinin apoptoz analizi: Histon kompleksi oluşturmuş DNA fragmentlerinin belirlenmesi. Kapsaisin verilmiş lösemi hücrelerinin sitoplazmasında mono- ve oligonukleozom oluşumunun kantitatif olarak ölçülmesiyle saptanan apoptoz artışı.

histon kompleksi oluşturmuş DNA fragmentlerinin spektrofotometrik olarak ölçümü prensibine dayanan analiz yapıldı. Bu amaçla, kapsaisin ile muamele edilmiş lösemi hücreleriyle kontrol grubu hücrelerden 72 saat inkübasyon sonunda, eşit sayıda toplandı. Bu hücre ölümü testinde, kontrol grubu hücrelerden elde edilen absorbans oranları kapsaisin verilen hücrelerle kıyaslandığında, muamele grubunda 1.23 katlık anlamlı bir artış saptandı. Buna göre, kapsaisin lösemik hücre apoptozunda %37.1 oranında ($p=0.011$) anlamlı bir indüksiyon olduğu belirlendi (Şekil 1).

Kapsaisinin lösemi hücre apoptozunu indüklediğini gösterdikten sonra, bu etkinin JAK/STAT yolu elemanlarının transkripsiyonun engellenmesi aracılığıyla olup olmadığının kontrolü qRT-PCR analiziyle gerçekleştirildi. Buna göre hedef genlerimizden mRNA seviyesi en yüksek oranda baskılanan gen STAT5A oldu. Buna göre, kapsaisin verilen grup, kontrol grubuyla kıyaslandığında STAT5A mRNA rölatif ekspresyon seviyesinde %97.6 oranında ve 49.6 katlık anlamlı bir azalma saptandı ($p=0.008$). STAT3 ekspresyonu, %83.4 oranında ve 6.02 katlık anlamlı bir düşüş sergilerken ($p=0.027$); STAT5B ekspresyonunda, kontrol grubuna göre %55.2 oranında ve 2.23 katlık anlamlı bir azalma belirlendi ($p=0.026$). diğer hedef genlerimiz JAK2 ve IL-6 ekspresyonları da yine kapsaisin uygulaması sonrasında sırasıyla %77.7 oranında ve 5.53 katlık ($p=0.002$) ve %60.18

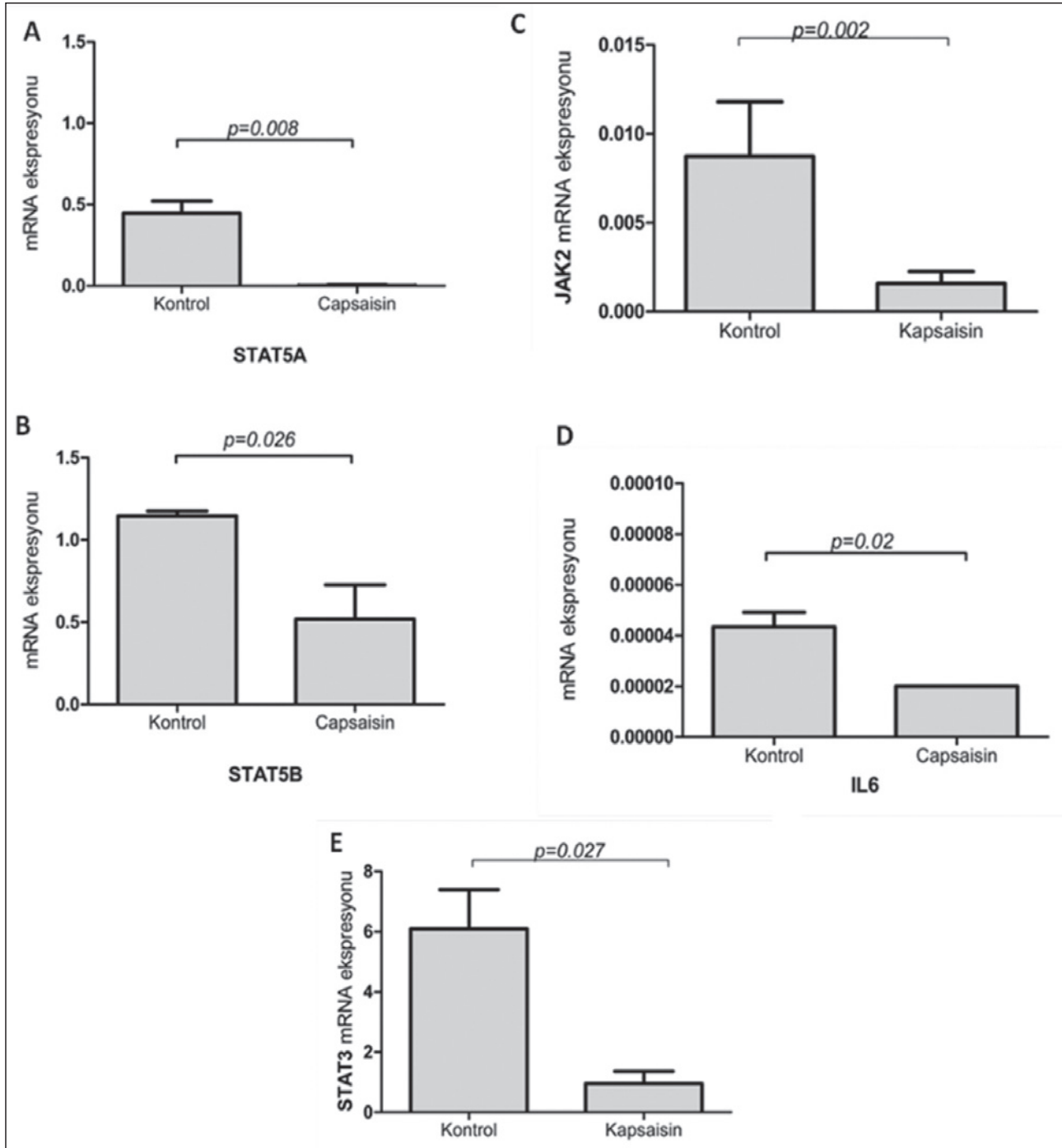
oranında ve 2.51 katlık ($p=0.02$) anlamlı bir azalma sergiledi (Şekil 2).

Tartışma

Bu çalışmada saf kapsaisin ile insan T hücreli akut lenfoblastik lösemi hücre modeli CCRF-CEM kullanılarak lösemi hücrelerinin proliferasyonu inhibe edilmiştir ve apoptoz %37.1'lik anlamlı bir artışla indüklenmiştir. Literatürde lösemi hücreleri kullanılarak apoptoz artışına işaret eden çalışmalar bulunmaktadır. Sonuçlarımıza benzer olarak Zhang ve arkadaşları da 3 adet T hücreli lösemi hücre dizisine kapsaisin verdikten sonra, lösemi hücrelerinin proliferasyonunun inhibe edildiğini, apoptozun indüklediğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, 100 ve 200 μM kapsaisin 24 saat süreyle uygulandığında, CTL-1 hücre dizisinde sırasıyla %5,4 ve % 32,2 oranlarında apoptoz artışı saptanmışken, ATL-T hücrelerinde aynı dozlar için sırasıyla %8,8 ve %19,8 oranlarında artmış apoptoz gözlenmiştir¹⁶. Ito ve arkadaşlarının insan akut myeloid lösemi hücre dizileri NB4 ve Kasumi-1'e kapsaisin verdikleri çalışmalarında, G_0/G_1 fazında hücre döngüsünü durdurması ve apoptozu indüklemesi suretiyle lösemi hücrelerinin proliferasyonu baskılanırken; normal kemik iliği mononükleer hücrelerin etkilendiği görülmüştür¹⁸.

Tsou ve arkadaşlarının insan lösemi HL-60 hücrelerine kapsaisin vererek Ca^{+2} un rolünü inceledikleri çalışmalarında, reaktif oksijen türleri (ROS) ve Ca^{+2} üretimindeki artışa bağlı olarak mitokondri zar potansiyelini ($\Psi\Delta_m$) düşürerek apoptozu indüklediği rapor edilmiştir¹⁹. Dou ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada ise, 10 farklı acı biber ekstraktı meme kanseri ve lösemi hücre dizilerinde denenmiş, apoptozun indüklediği, kanser hücre proliferasyonunun engellendiği bildirilmiştir²⁰. Lösemi hücreleri dışında, saf kapsaisin ile muamele edilmiş melanom, meme, adenokarsinom, hepatosellüler karsinom gibi çeşitli kanser hücrelerinin büyümesinin inhibe edildiği de gösterilmiştir²¹⁻²³.

Yapılan çeşitli çalışmalarda, kapsaisin muamelesi sonrasında kanser hücrelerinin indüklenmiş apoptozunun olası nedenleri arasında oksidatif stres, NF-kB aktivitesinin inhibisyonu, pro-apoptotik proteinlerin ekspresyon artışı, intrinsik apoptoz yolğunun aktivasyonu gösterilmekte, ancak apoptoz mekanizması net olarak açıklanamamaktadır. Maity ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınladıkları fare neuro 2a hücre dizisine kapsaisin uyguladıkları çalışmalarında, ubiquitin/



Şekil 2. Kapsaisin ile muamele edilmiş ve edilmemiş CCRF-CEM hücrelerinde STAT5A/-5B, JAK2, IL-6 gen ekspresyonları: Sonuçlar, üç ayrı qRT-PCR analizine dayanmaktadır ve ortalama mRNA ekspresyon miktarları, referans genlere oranlanarak elde edilmiştir. Kapsaisin uygulaması sonrasında **A)** STAT5A, **B)** STAT5B, **C)** JAK2, **D)** IL-6, **E)** STAT3 rölatif ekspresyonlarındaki azalma gösterilmektedir.

proteozom yoluğ üzerinden hücrel proteozom fonksiyonunun bozulmasına bağı olarak apoptozun indüklendiğini göstererek, moleküler mekanizmanın aydınlatılmasında önemli bir iz bırakmışlardır. Hatta NF-kB aktivitesinin azalması, otofajinin indüksiyonu,

hücre siklusu arresti gibi olayların, proteozom degradasyonuna dayandırılabilceğini öne sürmüş, bu etki sayesinde uyarılmış apoptozun en azından bir bölümünde proteozomal düzensizliğin rol oynadığı rapor edilmiştir²⁴.

Çalışmamızın ikinci amacı, net olarak aydınlatılmamış apoptoz indüksiyonunun mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sağlayabilmek amacıyla, JAK/STAT sinyal iletim yolağı üyelerinden STAT3, STAT5A, STAT5B, JAK2 ve IL-6 mRNA ekspresyon seviyelerini inceleyerek, potent bir veriye ulaşmaktır. Çünkü çeşitli solid tümörlerin yanı sıra lösemi ve lenfomada da artmış ekspresyon gösteren JAK/STAT sinyal iletim yolağı üyelerinden STAT3 ve STAT5, iyi birer moleküler hedef olarak bilinmektedir. Ayrıca, besinsel ajanların STAT ailesine mensup proteinleri etkilediği rapor edilmiştir²⁵. Bu ajanlardan zerdeçal, resveratrol, kaju ekstraktı butein, özellikle IL-6 aracılı STAT 3 fosforilasyonunu engelleyerek, sonuçta STAT3 nuklear translokasyonuna ket vururlar¹⁰. Bulgularımıza göre, lösemi hücrelerine kapsaisin uyguladığımızda, tüm hedef genlerimizin mRNA ekspresyon seviyelerinde anlamlı azalmalar olmaktadır. JAK/STAT ailesi üyeleri arasından özellikle JAK2 ve IL-6 ekspresyonlarındaki düşüş, sinyal yolağının daha başlangıcı itibarıyla etkilenmeye başladığına işaret etmektedir. Kapsaisin muamelesiyle, sinyalizasyon tetikleyicisi Janus kinaz ve sitokin ekspresyonlarındaki bu düşüş, yolağın sürekli aktif halde kalmasını sağlayan genlerin baskılanmasına yol açmıştır. Böylelikle yolağın daha ileri basamaklarında bulunan ve malign transformasyondan sorumlu STAT3 ve STAT5 ekspresyonları da azalarak, lösemi hücre apoptozu indüklenmiş olabilir. Lösemi patogeneğinde, özellikle sürekli yüksek ekspresyon miktarlarına bağlı olarak lösemik hücre sağ kalım sürekliliğini sağlayan, immun sistemden kaçınan, apoptozu engelleyen STAT5A ekspresyonundaki 49.6 katlık azalma, bu genin bir kez daha çok iyi bir moleküler hedef olduğunu vurgulamaktadır. Bu bulgu, kapsaisin ile indüklenmiş lösemi hücre apoptozunda STAT5A'nın ekspresyon seviyesinin bakıldığı ilk çalışma olması açısından da değerlidir. Literatürde, kapsaisinin etki mekanizmasının JAK/STAT sinyal yolağı üzerinden de olabileceğini gösteren tek çalışma, Bhutani ve arkadaşlarının 2007 yılında multiple myelom oluşturulan farelerle, U266 ve MM.1 myelom hücre serilerinde gerçekleştirdiği in-vitro/in-vivo ortak araştırmadır. Bu çalışmanın sonucunda, STAT3 aktivasyonunun inhibe edildiği, farelerde multiple myelom oluşumunun engellendiği belirlenmiştir. Tüm bulgular değerlendirildiğinde, kapsaisinin STAT3 aktivasyon yolağının engelleyicisi olduğu, multiple myelomun engellenmesi ve tedavisi için potansiyel rolünün olduğu rapor edilmiştir²⁶.

Çalışmamızda biz de STAT3 ekspresyonunda yine oldukça yüksek oranda, 6.02 katlık anlamlı bir azalma belirledik. STAT3 ekspresyonundaki bu düşüş, myelomun yanı sıra, lösemi için de STAT3'ün oldukça önemli bir hedef gen olduğunu ve lösemi hücre apoptozunun indüksiyonunda rol alabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç

Çeşitli kanser hücrelerinin sağ kalımı üzerinde JAK/STAT sinyal yolağı önemli gibi gözükmektedir ve indüklenmiş lösemi hücre apoptozunun altında yatan moleküler mekanizmalardan biri de JAK/STAT sinyalleşmesinin engellenmesi olabilir. Ayrıca, kapsaisinin insan T hücreli akut lenfoblastik lösemi tedavisinde yer alabilecek önemli bir ajan olabileceğine dair işaretler vardır.

Kaynaklar

1. Williams JG. Serpentine receptors and STAT activation: more than one way to twin a STAT. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 333-4.
2. Yu H, Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 97-05.
3. Kiu H, Nicholson SE. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors* 2012; 2: 88-106.
4. Frank DA. STAT signaling in cancer: insights into pathogenesis and treatment strategies. *Cancer Treat Res* 2003; 115: 267-91.
5. Turkson J, Jove R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 2000; 19(56): 6613-26.
6. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008; 9617: 1030-43.
7. Goldberg JM, Silverman LB, Levy DE, et al. Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience. *J Clin Oncol* 2003; 19: 3616-22.
8. Oudot C, Auclerc MF, Levy V, et al. Prognostic factors for leukemic induction failure in children with acute lymphoblastic leukemia and outcome after salvage therapy: the FRALLE 93 study. *J Clin Oncol* 2008; 9: 1496-503.
9. Aifantis I, Raetz E, Buonamici S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol* 2008; 5: 380-90.
10. Shanmugam MK, Kannaiyan R, Sethi G. Targeting cell signaling and apoptotic pathways by dietary agents: role in the prevention and treatment of cancer. *Nutr Cancer* 2011; 2: 161-73.
11. Smets LA. Programmed cell death (apoptosis) and response to anticancer drugs. *Anticancer Drugs* 1994; 5: 3-9.

12. Holzer P. Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 143–201.
13. Bley K, Boorman G, Mohammad B, et al. A comprehensive review of the carcinogenic and anticarcinogenic potential of capsaicin. *Toxicol Pathol* 2012; 40: 847-73.
14. Bode AM, Dong Z. The two faces of capsaicin. *Cancer Res* 2011; 71: 2809-14.
15. Maity R, Sharma J, Jana NR. Capsaicin induces apoptosis through ubiquitin-proteasome system dysfunction. *J Cell Biochem* 2010; 109: 933-42.
16. Kaymaz BT, Selvi N, Gündüz C, et al. Repression of STAT3, STAT5A, and STAT5B expressions in chronic myelogenous leukemia cell line K-562 with unmodified or chemically modified siRNAs and induction of apoptosis. *Ann Hematol* 2013; 92: 151-62.
17. Zhang J, Nagasaki M, Tanaka Y, et al. Capsaicin inhibits growth of adult T-cell leukemia cells. *Leuk Res* 2003; 27: 275-83.
18. Ito K, Nakazato T, Yamato K, et al. 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* 2004; 64: 1071-8.
19. Tsou MF, Lu HF, Chen SC, et al. Involvement of Bax, Bcl-2, Ca²⁺ and caspase-3 in capsaicin-induced apoptosis of human leukemia HL-60 cells. *Anticancer Res*. 2006; 26: 1965-71.
20. Dou D, Ahmad A, Yang H, et al. Tumor Cell Growth Inhibition Is Correlated With Levels of Capsaicin Present in Hot Peppers. *Nutr Cancer* 2011; 63: 272-81.
21. Morre DJ, Chueh PJ, Morre DM. Capsaicin inhibits preferentially the NADH oxidase and growth of transformed cells in culture. *Proc Natl Acad Sci* 1995 ; 92: 1831–5.
22. Takahata K, Chen X, Monobe K, et al. Growth inhibition of capsaicin on HeLa cells is not mediated by intracellular calcium mobilization. *Life Sci* 1999; 64: 165–71.
23. Jung MY, Kang HJ, Moon A. Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 down-regulation and caspase-3 activation. *Cancer Lett* 2001; 165: 139–45.
24. Maity R, Sharma J, Jana NR. Capsaicin induces apoptosis through ubiquitin-proteasome system dysfunction. *J Cell Biochem* 2010; 109: 933-42.
25. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 798-809.
26. Bhutani M, Pathak AK, Nair AS, et al. Capsaicin is a novel blocker of constitutive and interleukin-6-inducible STAT3 activation. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 3024-32.