

Kapsaisin Endoplazmik Stres Yoluyla Endometrial Kanseri Hücrelerinde Apoptozu İndükler ve Antiproliferatif Etkileri Tetikler

Capsaicin Induces Apoptosis in Endometrial Cancer Cells via Endoplasmic Stress and Triggers Antiproliferative Effects

Betul KEYİF¹  Ceyhan HACIOĞLU^{2,3} 

ÖZ

Amaç: Endometrial kanser, dünya genelinde yaygın görülen bir jinekolojik malignitedir. Hücrel homeostazın bozulmasıyla tanımlanan endoplazmik retikulum (ER) stresi, kanserin ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Antiproliferatif özellikleri bilinen biyo-aktif bir bileşik olan kapsaisin, kanser hücrelerinde ER stresi oluşturarak potansiyel bir tedavi ajanı olabilir. Bu çalışma, kapsaisinin endometrial kanser hücrelerinde ER stresini nasıl tetiklediğini araştırmayı amaçlamaktadır.

Araçlar ve Yöntem: Ishikawa endometrial kanser hücreleri 0–800 µM aralığında kapsaisin ile muamele edildi ve hücre canlılığı MTT testi ile değerlendirildi. Kapsaisin, 24 saatlik uygulamada 285.2 µM IC₅₀ değeri ile doza bağımlı bir şekilde hücre canlılığını azalttı. BrdU testleri de çoğalmanın baskılandığını doğruladı. ER stresi ve apoptozun değerlendirilmesi için GRP78, ATF6, CHOP (ER stres belirteçleri) ile sitokrom c ve kaspaz-3 (apoptoz belirteçleri) düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçüldü.

Bulgular: Kapsaisin, hücre canlılığını ve çoğalmasını konsantrasyon ve zamana bağlı olarak anlamlı biçimde azalttı. GRP78, ATF6 ve CHOP düzeylerindeki artış, ER stresinin indüklediğini gösterdi (p<0.05). Aynı zamanda sitokrom c ve kaspaz-3 düzeylerinin artması, apoptozun da aktive olduğunu ortaya koydu.

Sonuç: Kapsaisin, Ishikawa endometrial kanser hücrelerinde ER stresi aracılı apoptozu tetikleyerek kanserin ilerlemesini engelleme potansiyeline sahiptir. Ancak, etkinliğini ve mekanizmalarını doğrulamak için in vivo çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: apoptoz; endometrial kanser; endoplazmik retikulum stresi; kapsaisin

ABSTRACT

Purpose: Endometrial cancer is a common gynecological malignancy globally. Endoplasmic reticulum (ER) stress, characterized by disrupted cellular homeostasis, is implicated in cancer progression. Capsaicin, a bioactive compound with known antiproliferative properties, may act as a therapeutic agent by inducing ER stress in cancer cells. This study explores the mechanisms by which capsaicin triggers ER stress in endometrial cancer cells.

Materials and Methods: Ishikawa endometrial cancer cells were treated with capsaicin (0–800 µM), and cell viability was assessed using the MTT assay. Capsaicin reduced viability in a dose-dependent manner, with an IC₅₀ of 285.2 µM at 24 hours. BrdU assays further confirmed the suppression of proliferation. To evaluate the involvement of ER stress and apoptosis, levels of GRP78, ATF6, CHOP (ER stress markers), and cytochrome c and caspase-3 (apoptotic markers) were measured via ELISA.

Results: Capsaicin treatment significantly reduced cell viability and proliferation in a concentration- and time-dependent manner. Elevated levels of GRP78, ATF6, and CHOP confirmed the induction of ER stress (p<0.05). Concurrently, increased cytochrome c and caspase-3 levels indicated the activation of apoptosis.

Conclusion: Capsaicin induces ER stress-mediated apoptosis in Ishikawa endometrial cancer cells, suggesting its therapeutic potential in targeting cancer progression. Further in vivo investigations are warranted to confirm its efficacy and underlying mechanisms.

Keywords: apoptosis; capsaicin; endometrial cancer; endoplasmic reticulum stress

Gönderilme tarihi: 28.11.2024; Kabul edilme tarihi: 14.02.2025

¹Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Düzce Üniversitesi, Düzce, Türkiye.

²Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Düzce Üniversitesi, Düzce, Türkiye.

³Biyokimya Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Düzce Üniversitesi, Düzce, Türkiye.

Sorumlu Yazar: Ceyhan Hacıoğlu, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Düzce Üniversitesi, Düzce, Türkiye. e-posta: ceyhanhacioğlu@duzce.edu.tr

Makaleye atıf için: Keyif B, Hacıoğlu C. Kapsaisin endoplazmik stres yoluyla endometrial kanser hücrelerinde apoptozu indükler ve antiproliferatif etkileri tetikler. Ahi Evran Med J. 2025;9(2):186-194. DOI: 10.46332/aemj.1592791



GİRİŞ

Jinekolojik kanserlerin en yaygın türü olan endometriyal kanser, son yıllarda hem insidansında hem de mortalite oranlarında artış gösteren endometriumun kanseridir.¹ Endometriyal kanser, gelişmiş ülkelerde yaygın olarak görülen ve gelişmekte olan ülkelerde ikinci en yaygın jinekolojik malignitedir.² Endometriyal kanser için önde gelen tedavi yöntemi abdominal histerektomidir ve her iki taraftaki fallop tüplerinin ve yumurtalıkların çıkarılmasıdır.³ Hastalık erken bir aşamada teşhis edilirse, sonuç olumludur ve genel beş yıllık sağ kalım oranı >%80'dir.⁴ Ancak, endometriyal kanser vakalarının çoğu geç evrede teşhis edilir ve sonuç kötüdür; beş yıllık sağ kalım oranı <%30'dur.⁴ Histerektomi gibi cerrahi müdahaleler erken evre endometriyal kanserinin tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmış olsa da, ileri evre hastalığı olan veya tekrarlayan vakalara sahip hastalar genellikle kapsamlı tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyar, ancak prognozları kötüdür.⁵ Bu nedenle, geç evre endometriyal kanser için uygun kemoterapi rejimleri geliştirmek kritik öneme sahiptir. Ayrıca, potansiyel yeni kemoterapötik ajanların endometriyal kanser tedavisindeki etkilerini açıklayan moleküler mekanizmaların ortaya konması da büyük önem taşımaktadır.

Homovanilik asit türevi olan kapsaisin (8-metil-N-vanilil-nonenamid), acı biberlerin baharatlı bileşenidir ve yaygın olarak bir gıda katkı maddesi olarak kullanılır.⁶ Bazı veriler kapsaisinin analjezik ve antiinflamatuvar aktivitelere sahip olduğunu ve şu anda nörojenik ağrıyı hafifletmek için topikal kremlerde ve jellerde kullanıldığını göstermektedir.⁷ Çalışmalar, kapsaisinin reaktif oksijen türlerinin üretimi, mitokondriyal transmembran potansiyelinin bozulması ve kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktivasyonu dahil olmak üzere farklı mekanizmalarla insan kanser hücrelerinin büyümesini engellediğini ortaya koymaktadır.⁸ Önceki çalışmalarımızda, kapsaisinin insan glioblastoma hücrelerinde epitelyal mezenkimal geçişi inhibe ettiğini, kemosensitivitesi regüle ettiğini ve redoks dengesini düzenleyerek ferroptozis indüklediğini gösterdik.⁹⁻¹¹ Dahası, kapsaisinin hepatoselüler karsinoma hücrelerinde oksidatif stres ve apoptoz arttığını da bulduk.¹² Ancak, kanser hücrelerinde kapsaisin kaynaklı hücre ölüm sinyal yolları altında yatan mekanizmalar henüz tam olarak belirlenmemiştir.

Endoplazmik retikulum (ER), salgı ve zar proteinlerinin sentezi ve katlanması için gerekli bir organelidir. Protein yükü ER'nin katlanma kapasitesini aştığında, hücreler koruyucu önlemler olarak protein kinaz R benzeri ER kinaz (PERK), IRE1/X-box bağlayıcı protein-1 (XBP-1) ve transkripsiyon faktörü-6 (ATF6) sinyal yollarını aktive eden katlanmamış protein tepkisini (UPR) tetikler ve bu da genel translasyonel zayıflama, şaperonların ve katlanma enzimlerin ekspresyonlarının artmasına yani ER stresi olarak bilenen sinyal kaskadının başlamasına neden olur.¹³ ER stresinin şiddetine bağlı olarak, UPR, özellikle ER tarafından aracılık edilen apoptotik yolların aktivasyonu ile hücre ölümüne neden olabilir.¹⁴ Önemli bir UPR hedefi, protein katlanması ve birleştirilmesinde, ER-kalsiyum regülasyonunda ve transmembran ER stres sensörlerinin aktivasyonunu kontrol etmede önemli rolleri olan glikozla düzenlenen protein 78'in (GRP78/BiP) indüksiyonudur.¹⁵ Bu nedenle, GRP78, UPR'nin pro-survival kolunu temsil eder. Son çalışmalar, UPR aktivasyonu ve değişen GRP78/BiP ekspresyonu ve fonksiyonunun kanser gelişimi ve ilerlemesinde potansiyel bir rol oynadığını göstermiştir.¹⁶ Genellikle kanser hücreleri, kapsamlı anjiyogenezle bile oksijen yoksunluğu ve besin stresine karşı karşıya kalır.¹⁷ Bu tür stresler, uygunsuz şekilde işlenmiş proteinlerin birikmesine yol açar ve yüksek GRP78 ekspresyonuna sahip kanser hücrelerini daha kolay apoptoza duyarlı hale getirir.¹⁸ Kanser hücrelerinde GRP78 ekspresyonunun indüklenmesinin apoptotik sinyal kaskadını da regüle ettiği gösterilmiştir.¹⁹ Öte yandan, akciğer, mesane, mide, meme, gastrik ve epidermoid karsinom dahil olmak üzere birden fazla tümör bölgesinde, GRP78 aşırı ekspresyonu çok çeşitli kemoterapötik ajanlara direnç kazandırır ve GRP78'in baskılanması tümör hücrelerini ilaç tedavisine duyarlı hale getirir.¹⁹ Bu nedenle, ER stresinin regülasyonu kanser hücrelerinin hayatta kalma mekanizmaları üzerindeki etkilerinin daha fazla araştırılmasına ve anti-kanser ajanların bu sinyal yolağı üzerindeki etkilerini ortaya konmasına ihtiyaç vardır.

Bu çalışmanın temel amacı, endometriyal kanserde ER stresini araştırmaktır. Daha önce kapsaisinin ER stres sinyalizasyonundaki rolü ve endometriyal kanser hücrelerindeki etkinliği araştırılmamıştır. Mevcut çalışmada insan endometriyal kanser hücreleri olan Ishikawa hücrelerinde kapsaisinin ER stres biyobelirteçleri GRP78, ATF6 ve

C/EBP homolog protein (CHOP) ve apoptotik biyobelirteçler olan kapsaz 3 ve sitokrom c seviyeleri üzerindeki etkileri analiz edildi.

ARAÇLAR ve YÖNTEM

Hücre Kültürü ve Kapsaisin Uygulaması

İnsan endometriyal adenokarsinomu Ishikawa hücreleri American Type Culture Collection'dan (ATTC) elde edildi. Deneysel çalışmalar Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Ishikawa hücreleri RPMI-1640'ta kültürlendi. Hücre kültür ortamına %10 fetal bovin serum (FBS), 100 U/mL penisilin ve 100 µm/mL streptomisin takviye olarak eklendi. Hücreler %5 CO₂ ve nemli atmosfere sahip 37°C'lik bir inkübatörde inkübe edildi.

Hücreler (5×10^3) 96-kuyulu plakalara ekildi ve 0-800 µM kapsaisin (M2028 Sigma-Aldrich) konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat boyunca inkübe edildi. Kapsaisin tedavisinden sonra IC50'yi (hücre canlılığının %50'sini engelleyen madde konsantrasyonu) hesaplamak için hücreler 37°C'de 3 saat boyunca 100 µL 0.5 mg/mL 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür (MTT) (M5655 Sigma-Aldrich) çözeltisi ile inkübe edildi. Daha sonra, üstteki sıvı atıldı ve oluşan formazan kristalleri 100 µL %100 dimetil sülfoksit (DMSO, 673439 Sigma-Aldrich) içerisinde çözüldü. Her bir kuyunun absorbans değerleri daha sonra bir mikro plaka okuyucu (800TS, BioTek) kullanılarak 570 nm'de ölçüldü. Canlı hücrelerin yüzdesi şu şekilde hesaplandı: Hücre canlılığı (%) = $\frac{A570_{\text{(kapsaisine maruz kalan)}}}{A570_{\text{(kontrol)}} - A570_{\text{(blank)}}} \times 100$.

Hücre Proliferasyon Analizi

Timidin analogu olan Bromodeoksiuridin (BrdU), hücre döngüsü sırasında yeni sentezlenen DNA'ya dahil edilerek hücre çoğalmasının analizini sağlar. 96-kuyulu plakalarda kültüre edilen Ishikawa hücreleri, 24 saat boyunca kapsaisin konsantrasyonlarıyla inkübe edildi. Daha sonra, hücre çoğalması üreticinin talimatlarına göre ticari olarak temin edilebilen bir BrdU dahil etme kiti (2750; Sigma-Aldrich) kullanılarak 450 nm'de bir mikro plaka okuyucuda (Epoch, BioTek) kolorimetrik olarak analiz edildi.

Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Biyokimyasal Analizler

GRP78, ATF6, CHOP, kapsaz 3 ve sitokrom c düzeylerinin analizi için kapsaisinle muamele edilmiş Ishikawa hücre lizatları önceki çalışmamıza göre hazırlandı.¹¹ Kısaca, 24 saat boyunca kapsaisin konsantrasyonları ile muamele edilen hücreler, tripsin eklenerek kültür ortamından ayrıldı ve ardından 4 °C'de 10 dakika boyunca 1000xg'de santrifüj edildi. Daha sonra, hücreler pH 7,0'da soğuk fosfat tamponu ile üç kez yıkandı. Daha sonra, yeniden süspansiyon edilen hücreler 4 °C'de 20 dakika boyunca lizis tamponu (RIPA) ile inkübe edildi. Son olarak, hücre artıkları 4 °C'de 20 dakika boyunca 10000x g'de santrifüj edilerek uzaklaştırıldı.

GRP78, ATF6, CHOP, kapsaz 3 ve sitokrom c düzeyleri, üreticinin talimatları izlenerek enzim bağlı immüno sorbent deney (ELISA) kitleri (sırasıyla LS-F6280, LS-F36737, LS-F8872, SEA626Hu ve SEA594Mi) kullanılarak değerlendirildi. Bu analizleri gerçekleştirmek için, U251-R ve U87-R hücreleri 96-kuyulu plakalara 1×10^5 hücre yoğunluğunda ekildi ve ardından 48 saat boyunca %120 M kapsaisin ile muamele edildi. Üreticinin talimatları doğrultusunda, her bir numunenin absorbans değeri bir mikropilaka okuyucusu ile analiz edildi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz sırasında GraphPad Prism 8 programı kullanıldı. Deneysel veriler, yedi bağımsız deneyin (n=7) ortalaması ± standart sapması olarak sunuldu. Verilerin varyans homojenliğini değerlendirmek için Levene istatistiği kullanıldı. Tüm veri setlerinin normallik analizi Shapiro-Wilk normallik testi yardımıyla yapıldı. Verilerin normal dağıldığı belirlendikten sonra, veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirildi ve çoklu karşılaştırmalarda Tukey post-hoc testi ile analiz edildi. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Kapsaisinin Ishikawa Hücrelerindeki Canlılık ve Proliferasyon Üzerindeki Etkileri

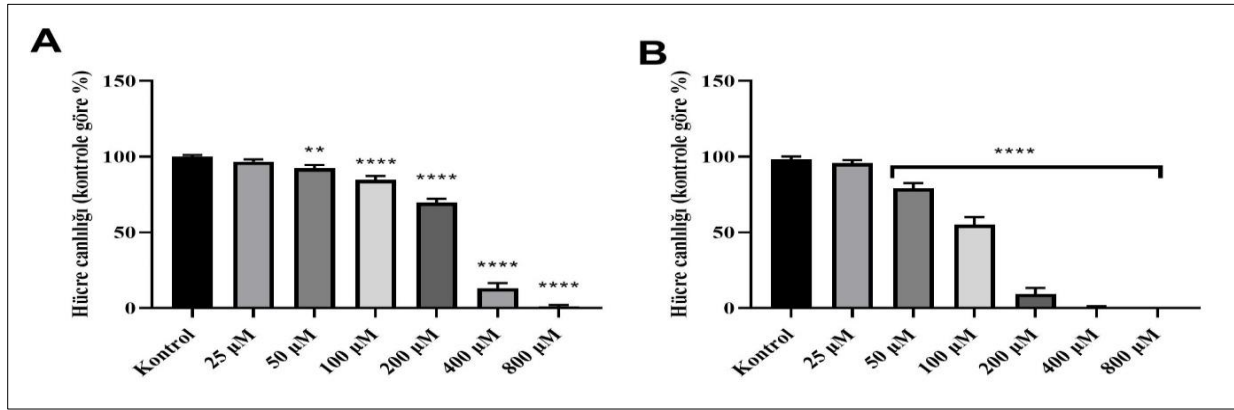
Kapsaisinin Ishikawa hücrelerin canlılığını inhibe edemediğini belirlemek amacıyla hücreler 25, 50, 100,

200, 400 ve 800 μM kapsaisin konsantrasyonları ile 48 saate kadar muamele edildi (Tablo 1) ve hücre canlılığı analizleri MTT yöntemine göre yapıldı (Şekil 1A). MTT sonuçlarına göre, 24 saat boyunca 25 μM kapsaisine maruz kalan Ishikawa hücre canlılığında kontrol gruplarına kıyasla önemli bir azalma göstermedi ($p = 0.31$). Ancak, 50 μM kapsaisin ile inkübe edilen Ishikawa hücrelerinde kontrol grubuna göre sırasıyla %7.1 ($p = 0.0041$) oranında

azalma görüldü. Ayrıca, 24 saatlik 100 μM ve 200 μM kapsaisin konsantrasyonunda kontrol gruplarına göre Ishikawa hücre canlılığının sırasıyla %14.7 ve %30.8 oranında anlamlı bir azalma görüldü ($p < 0.001$). Dahası, 400 μM kapsaisin konsantrasyonuyla inkübe edilen Ishikawa hücrelerinin canlılığı kontrol gruplarına kıyasla sırasıyla %85.8 oranında azaldı ($p < 0.0001$). Ek olarak, 800 μM kapsaisin konsantrasyonunda neredeyse hiç hücre canlılığı tespit edilmedi.

Tablo 1. Kapsaisinin Ishikawa hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri.

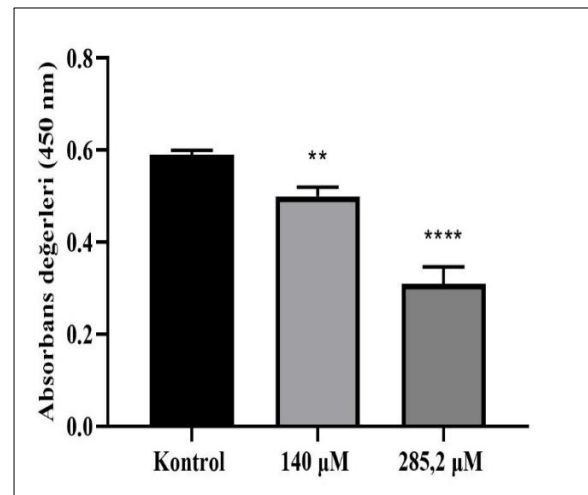
Değişkenler	Kontrol	25 μM	50 μM	100 μM	200 μM	400 μM	800 μM	p
24 saatlik kapsaisin maruziyeti	100.0 $\pm$ 0.5774	96.67 $\pm$ 0.8819	92.33 $\pm$ 1.202**	84.67 $\pm$ 1.453****	69.67 $\pm$ 1.152****	13.00 $\pm$ 2.082****	1.000 $\pm$ 0.524****	**0.0041 **** <0.0001
48 saatlik kapsaisin maruziyeti	98.00 $\pm$ 1.155	95.67 $\pm$ 1.202	79.35 $\pm$ 2.082	55.28 $\pm$ 2.887	9.333 $\pm$ 2.333	0.6667 $\pm$ 0.327	0.000 $\pm$ 0.000	**** <0.0001



Şekil 1. Kapsaisin Ishikawa hücrelerinin canlılığını zaman ve konsantrasyon bağımlı etkileri gösterilmiştir. (A) Ishikawa hücrelerinin 24 saat süreyle kapsaisin maruziyeti, (B) Ishikawa hücrelerinin 48 saat süreyle kapsaisin maruziyeti. ** $p = 0.0041$ ve **** $p < 0.0001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

Ishikawa hücre canlılığı, 48 saat boyunca 50 μM ve üzeri kapsaisin konsantrasyonlarında konsantrasyona bağlı bir şekilde azaldı (Şekil 1B). MTT sonuçlarına göre, 48 saat boyunca 50, 100 ve 200 μM kapsaisin maruziyeti Ishikawa hücre canlılığını sırasıyla %21.8, %45.2 ve %91.4 oranında azalttı ($p < 0.0001$ kontrole grubuna kıyasla). Hücre canlılığı, 48 saat boyunca 400 ve 800 μM kapsaisin konsantrasyonlarında Ishikawa hücrelerinde tespit edilemez düzeydeydi. Sonuç olarak MTT analizine göre, 24 saatlik kapsaisin tedavisinden sonra Ishikawa hücreleri için IC50 kapsaisin konsantrasyonunu 285.2 μM olarak belirledik. Sonraki biyokimyasal analizler sırasında hücreler IC50 ve 140 μM 'lik kapsaisinin ara konsantrasyonu olarak seçilerek analizler gerçekleştirildi. Çünkü biyokimyasal analizler sırasında IC50 üzerindeki konsantrasyonlarda hücre ölümü oranı arttığı için analiz edilen parametrelerde çok

fazla sapma olduğundan belirlenen konsantrasyonlarda diğer analizler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2. Kapsaisin Ishikawa hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri gösterilmiştir. ** $p = 0.0041$ ve **** $p < 0.0001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

BrdU analizi ile kapsaisinın Ishikawa hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkilerini belirledik (Şekil 2 ve Tablo 2). MTT sonuçlarıyla korelasyon halinde, 24 saat boyunca 140 µM ve 285,2 µM kapsaisin konsantrasyonlarıyla tedavi edilen Ishikawa hücrelerinin çoğalması konsantrasyon bağımlı bir şekilde azaldığını belirledik ($p < 0.001$ kontrole kıyasla).

Kapsaisinın Ishikawa Hücrelerindeki ER Stres Biyobelirteçleri Üzerindeki Etkileri

Ishikawa hücrelerinde ER stresine ilişkili ATF6, CHOP ve GRP78 düzeylerinde önemli farklılıklar tespit edildi

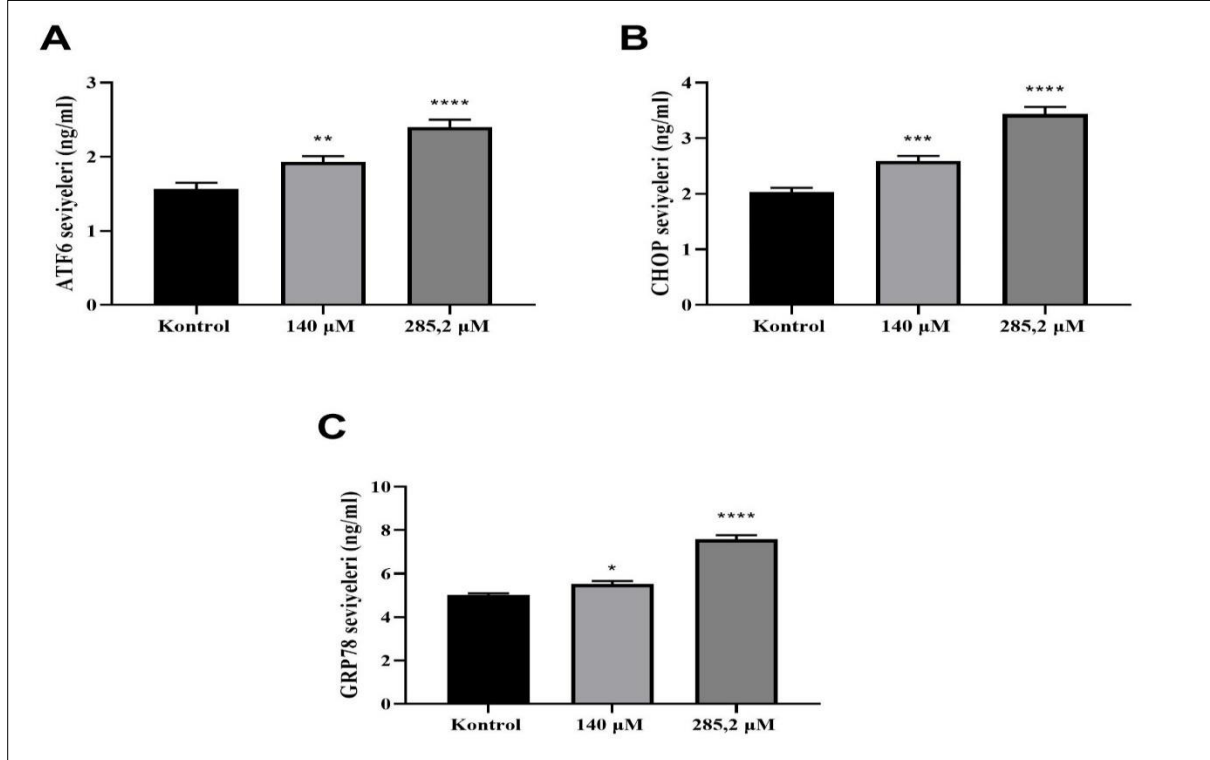
(Şekil 3A-C ve Tablo 3). Ishikawa hücrelerindeki ATF6, CHOP ve GRP78 düzeyleri kontrol grubu hücreleriyle karşılaştırıldığında ATF6, CHOP ve GRP78 seviyelerinde konsantrasyon bağımlı bir düşüş vardı. ELİSA sonuçlarına göre, 24 saat boyunca 140 µM ve 285,2 µM kapsaisin konsantrasyonlarıyla tedavi edilen Ishikawa hücrelerinde kontrol gruplarına kıyasla sırasıyla ATF6 seviyelerinde %25,7 ve %62,4 oranında, CHOP seviyelerinde %34,8 ve %71,5 oranında ve GRP78 seviyelerinde %14,6 ve %53,8 oranında daha yüksekti.

Tablo 2. Kapsaisinın Ishikawa hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri.

Değişkenler	Kontrol	140 µM	285,2 µM	p
24 saatlik kapsaisin maruziyeti	0.59±0.005774	0.50±0.01155	0.31±0.02082	**0.0041 **** <0.0001

Tablo 3. Kapsaisinın Ishikawa hücrelerindeki ATF6, CHOP ve GRP78 seviyeleri üzerinde etkileri.

Değişkenler	Kontrol	140 µM	285,2 µM	p
ATF6 seviyeleri	1.567±0.04807	1.933±0.04410	2.411±0.05774	**0.0038 ****0<0.0001
CHOP seviyeleri	2.033±0.04410	2.593±0.05207	3.433±0.07688	***0.0010 ****0<0.0001
GRp78 seviyeleri	5.023±0.04317	5.527±0.07881	7.567±0.1202	*0.0113 ****0<0.0001



Şekil 3. Kapsaisinın Ishikawa hücrelerindeki ATF6, CHOP ve GRP78 seviyeleri üzerinde etkileri gösterilmiştir. (A) Ishikawa hücrelerinin 24 saat süreyle kapsaisin maruziyetinin ATF6 seviyeleri üzerindeki etkisi, (B) Ishikawa hücrelerinin 24 saat süreyle kapsaisin maruziyetinin CHOP seviyeleri üzerindeki etkisi, (C) Ishikawa hücrelerinin 24 saat süreyle kapsaisin maruziyetinin GRP78 seviyeleri üzerindeki etkisi. * $p = 0.0113$ ** $p = 0.0038$, *** $p = 0.0010$ ve **** $p < 0.0001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

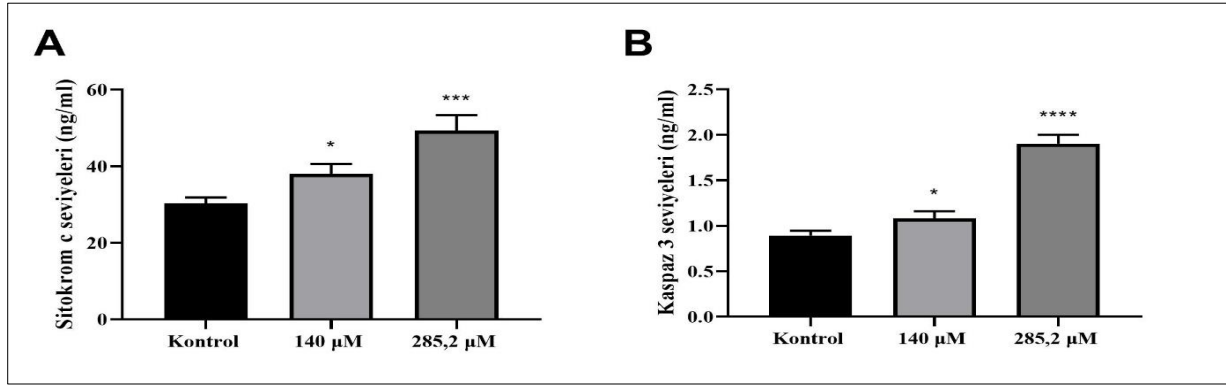
Kapsaisinin Ishikawa Hücrelerindeki Apoptotik Bi-yobelirteçler Üzerindeki Etkileri

Kapsaisin maruziyetinin Ishikawa hücrelerinde apoptozu düzenlediği moleküler mekanizmayı araştırdık (Şekil 4A-4B ve Tablo 4). Kapsaisinin ER stres kaynaklı apoptoz üzerindeki etkisini açıklamak için, hem kapsaisin ile tedavi edilen hem de tedavi edilmeyen Ishikawa hücrelerinde sitokrom c ve kaspaz 3 düzeylerini değerlendirdik. ER stres

biyobelirteçlerinin aksine, 24 saat boyunca 140 μ M ve 285.2 μ M kapsaisin konsantrasyonlarıyla tedavi edilen Ishikawa hücrelerinde kontrol gruplarına kıyasla sırasıyla sitokrom c seviyelerinde %20.8 ve %49.6 oranında ve kaspaz 3 seviyelerinde %27.5 ve %71.2 oranında olmak üzere konsantrasyona bağlı bir artış göstererek apoptotik hücre ölümünü tetiklemiştir.

Tablo 4. Kapsaisinin Ishikawa hücrelerindeki sitokrom c ve kaspaz 3 seviyeleri üzerinde etkileri.

Değişkenler	Kontrol	140 μ M	285,2 μ M	p
Sitokrom c seviyeleri	30.33 $\pm$ 0.8819	38.00 $\pm$ 1.528	49.33 $\pm$ 2.333	*0.0323 ***0.0004
Kaspaz 3 seviyeleri	0.8933 $\pm$ 0.02963	1.083 $\pm$ 0.04410	1.900 $\pm$ 0.05774	*0.0439 ****0<0.0001



Şekil 4. Kapsaisinin Ishikawa hücrelerindeki sitokrom c ve kaspaz 3 seviyeleri üzerinde etkileri gösterilmiştir. (A) Ishikawa hücrelerinin 24 saat süreyle kapsaisin maruziyetinin sitokrom c seviyeleri üzerindeki etkisi, (B) Ishikawa hücrelerinin 24 saat süreyle kapsaisin maruziyetinin kaspaz 3 seviyeleri üzerindeki etkisi. * p=0.0113 ** p=0.0038, *** p=0.0010 ve **** p<0.0001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

TARTIŞMA

Bu çalışma, kapsaisinin endometriyal kanser hücreleri üzerindeki potansiyel etkilerine yönelik ön bulgular sunmaktadır. Elde edilen veriler, kapsaisinin hücre proliferasyonunu baskıladığını ve bu etkinin konsantrasyona bağlı olarak ER stres belirteçlerinin artışı ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca, apoptozla ilişkili protein düzeylerinde gözlenen artış, kapsaisinin ER stresi aracılığıyla apoptozu indükleyebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, çalışmanın yalnızca ELISA verilerine dayanması, moleküler mekanizmaların tam olarak ortaya konması açısından bir sınırlılık teşkil etmektedir.

Son yıllarda, kapsaisinin çeşitli insan kanseri türlerinde hücre döngüsünü durdurarak, proliferasyonu baskılayarak, apoptozu düzenleyerek ve metastazı önleyerek anti-kanser aktivitesi gösterdiği belgelenmiştir.²⁰ Bu bağlamda, kapsaisinin prostat kanser kök hücrelerinin Wnt/beta-Katenin

yolu aracılığıyla aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir.²¹ Kolon kanseri hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, mitokondriyal zar potansiyelini bozarak apoptozu indüklemiştir.²² Kapsaisinin, epitel, meme, mide, pankreas ve kolon kanserleri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerine karşı önleyici etki gösterme eğiliminde olduğu belirtilmektedir.²³ Bu etkilerin, kapsaisinin p53'ü aktive etmesi ya da NADH oksidaz, MAPK sinyal yolu ve Wnt sinyal yolu aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir.²⁴ Ayrıca, kapsaisinin meme kanseri hücrelerinde hem in vivo hem de in vitro olarak apoptozu belirgin şekilde artırdığı ve proliferasyonu baskıladığı kabul edilmektedir.²⁵ Bunun yanı sıra, genellikle konvansiyonel kemoterapilere dirençli agresif bir lenfoma türü olan primer efüzyon lenfoması (PEL) üzerinde de etkili olduğu gösterilmiştir.²⁶ Kapsaisinin, Kaposi sarkomu ile ilişkili herpes virüsü (KSHV) ile latent olarak enfekte olmuş PEL hücrelerinin büyümesini anlamlı düzeyde inhibe ettiği, bu etkiyi ise PEL hücreleri-

nin hayatta kalması ve büyümesine katkıda bulunduğu bilinen ERK, p38 MAPK ve HIL-6 ekspresyonunu baskılayarak gerçekleştirdiği ortaya konmuştur.²⁶ Önceki bir çalışmada, kapsaisin anti-proliferatif etkisini araştırmak amacıyla insan pankreas kanseri hücre hatları PANC-1 ve SW1990 ile insan pankreas normal epitel hücreleri (HPNE) farklı konsantrasyonlardaki kapsaisin ile muamele edilmiş ve hücre canlılığı CCK-8 testi ile ölçülmüştür. PANC-1 ve SW1990 hücrelerinin canlılığı, 24 saat boyunca kapsaisin ile doz bağımlı bir şekilde baskılanmıştır. Kapsaisin, SW1990 hücrelerinde (IC₅₀: 150 µM) PANC-1 hücrelerine kıyasla (IC₅₀: 200 µM) hücre büyümesini daha etkili bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur. Ayrıca, HPNE hücrelerinin hayatta kalma oranında kapsaisin uygulaması sonrası minimal bir değişiklik gözlemlenmiştir.²⁷ Bu sonuçlar, kapsaisin kanser hücrelerinin proliferasyonunu sağlıklı hücrelere kıyasla daha etkili bir şekilde baskıladığını göstermektedir. Aynı araştırmanın devamı olarak, kapsaisin in vivo antitümöral etkisini araştırmak amacıyla nude-farelerde ortotopik pankreas kanseri ksenograft tümör modeli oluşturulmuştur.²⁷ Beklendiği üzere, kapsaisin pankreas kanseri üzerinde in vivo olarak belirgin bir antitümöral etki göstermiştir. Örneğin, 1 mg/kg kapsaisin uygulanan 42 gün, 2,5 mg/kg kapsaisin uygulanan 53 gün ve 5 mg/kg kapsaisin uygulanan 56 gün hayatta kalma süresi, kontrol grubundaki farelere kıyasla (30 gün) anlamlı derecede daha uzun bulunmuştur.

ER, salgı proteinlerinin sentez ve katlanmasının hücre organelidir. ER homeostazının bozulması, protein katlanmasını etkiler ve ER stresine neden olur.²⁸ ER stres, organelin homeostazını geri kazandırmayı amaçlayan, UPR olarak adlandırılan hücre içi sinyal iletim yollarını aktive ederek yanıt verir.²⁹ UPR sırasında, GRP78, ER'de yerleşik transmembran proteinlerden ayrılır ve bu da PERK gibi bu transmembran proteinlerin otofosforilasyonuna ve aktivasyonuna yol açar. Aktive edilmiş PERK, eIF2 α'yı fosforile eder ve ardından ATF4 indüklenir.³⁰ ER stresinin bir ayırt edici özelliği olan GRP78, tüm ökaryotik hücrelerin ER'sinde sürekli olarak ifade edilen yerleşik bir proteindir.³¹ Oksidatif stres ve kimyasal toksisite ile indüklenen yükselmiş GRP78 ekspresyonunun PERK/eIF2α/ATF4 sinyal yolunu ve hücre ölümünü tetiklediğini gösteren kanıtlar artmaktadır.³² Ayrıca birkaç raporda erken aşamada

GRP78'in oksiradikal birikimini baskılamak ve mitokondriyal işlevi stabilize etmek gibi bazı mekanizmalarla hücreyi apoptoza karşı koruyabileceği öne sürülmüştür.³³ Endometrioid endometriyal kanserlerin, yani en yaygın endometriyal kanser türünün doku örneklerinde, ATF6, GRP78 ve CHOP gibi ER stres belirteçlerinin hem mRNA hem de protein düzeyinde artış olduğu bildirilmiştir.³⁴ Lin ve ark. yapmış olduğu çalışmada, *in vitro* kapsaisin tedavisinden sonra PANC-1 ve SW1990 iki pankreas kanseri hücresinde önemli ölçüde artan GRP78 mRNA ekspresyonu gözlemlenmiştir.²⁷ Ayrıca, bu araştırmadaki *in vivo* sonuçlar kapsaisin PERK ve eIF2α fosforilasyonunu ve ATF4 ekspresyonunu belirgin şekilde artırdığını göstermektedir. Araştırmacıların sonuçları kapsaisin ER stresini tetikleyebileceğini ve ardından pankreas kanseri hücrelerinde hücre canlılığını baskılayabileceğini öne sürmektedir. Önceki çalışmalar 100 µM kapsaisin konsantrasyonunun KB kanser hücreleri, PC12 feokromositoma hücreleri ve AGC gastrik karsinom hücrelerinde büyüme inhibisyonu ve apoptozu indüklediğini ortaya koymuştur.³⁵⁻³⁷ ER stresinin apoptozu indüklediğinin iyi bilindiği düşünüldüğünde, 100 µM kapsaisin hücre büyümesi üzerindeki sitotoksik etkilerinin ER stresini aracılığıyla gerçekleşmesi muhtemeldir.³⁸ Yukarıda bahsedildiği gibi, kapsaisin maruziyetinin reaktif oksijen türevlerinin üretimine yol açtı ve NPC-TW039 hücrelerinde ER stresini indüklediği bulunmuştur.³³ Ayrıca, kapsaisin kaynaklı ER stresinin GRP78 artışına ve bunun da hücre içi kalsiyum ve ardından mitokondriyal membran depolarizasyonunda artışa bağlı olarak sitokrom c'nin mitokondriyal salınımına ve NPC-TW039 hücrelerinde kaspaz-9 ve -3'ün aktivasyonuna neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma, kapsaisin Ishikawa hücrelerinde ER stresine bağlı yolları nasıl etkilediğini ve bu süreçle ilişkili biyobelirteçlerin düzeylerindeki değişimleri incelemeye odaklanmıştır. Ek olarak, kapsaisin tarafından indüklenen ER stres ve apoptotik mekanizmalar arasındaki bağlantıyı araştırdık. Bulgularımız, kapsaisine maruz kalan Ishikawa hücrelerinde GRP78, CHOP ve ATF6'nın artan seviyeleriyle kanıtlandığı gibi, ER stresinde önemli bir artış olduğunu göstermektedir. Dahası, kapsaisine maruziyetiyle indüklenen yoğunlaşmış ER stres, kaspaz 3 ve sitokrom c seviyelerinde bir artışla korelasyon gösterdi ve bu da apoptozis ile bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgular, Ishikawa hücrele-

rinde ER stresi ve kapsaisin arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmakta ve endometrial kanserinde kapsaisinin antikan-ser etkilerine ışık tutmaktadır.

Sonuç

Sonuç olarak, bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, kapsaisinin endometrial kanserinin ER stres aracılı apoptotik yolu üzerindeki etkisine dair ilk *in vitro* çalışmadır. Bu bulgular, kapsaisinin neden olduğu apoptozda yer alan sinyal-leme olaylarına dair önemli yeni veriler sağlar ve insan en-dometrial kanseri için kapsaisine dayalı kemoterapötik veya kemopreventif stratejilerin geliştirilmesini kolaylaştı-ırabilir. Kapsaisinin anti-kanser hedefleri, gelecekteki po-tansiyel tedavi yöntemleri ve kanser tedavisi ile korunma-daki etkinliği üzerine daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyul-maktadır. Bununla birlikte, klinik çalışmalar yetersiz olsa da, kapsaisin konsantrasyonları, uygulama yolları ve uzun vadeli yan etkiler hakkında yeterli veriye sahip olunması-nın, kapsaisinin klinik kullanımı açısından kritik olduğu düşünölmektedir.

Çıkar Beyannamesi

Herhangi bir çıkar çatışmasının olmadığını yazarlar beyan etmektedirler.

Etik Kurul İzni

Bu çalışma için etik onay gerekmemektedir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı

Ana fikir/Planlama: CH, BK. Veri toplama/İşleme: CH, BK. Veri analizi ve yorumlama: CH, BK. Literatür taraması: CH, BK. Yazım: CH. Gözden geçirme ve düzeltme: CH. Danışmanlık: CH.

KAYNAKÇA

- Brüggmann D, Ouassou K, Klingelhöfer D, Bohlmann MK, Jaque J, Groneberg DA. Endometrial cancer: mapping the global landscape of research. *J Transl Med.* 2020;18(1):386.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
- Dowdy SC, Borah BJ, Bakkum-Gamez JN, et al. Prospective assessment of survival, morbidity, and cost associated with lymphadenectomy in low-risk endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2012;127(1):5-10.

- Braun MM, Overbeek-Wager EA, Grumbo RJ. Diagnosis and Management of Endometrial Cancer. *Am Fam Physician.* 2016;93(6):468-474.
- Heidari F, Rabizadeh S, Mansournia MA, et al. Inflammatory, oxidative stress and anti-oxidative markers in patients with endometrial carcinoma and diabetes. *Cytokine.* 2019;120:186-190.
- Chapa-Oliver AM, Mejía-Teniente L. Capsaicin: From Plants to a Cancer-Suppressing Agent. *Molecules.* 2016;21(8):931.
- Pasierski M, Szulczyk B. Beneficial Effects of Capsaicin in Disorders of the Central Nervous System. *Molecules.* 2022;27(8):2484.
- Radhakrishna GK, Ammunje DN, Kunjiappan S, et al. A Comprehensive Review of Capsaicin and Its Role in Cancer Prevention and Treatment. *Drug Res (Stuttg).* 2024;74(5):195-207.
- Hacıoğlu C, Kar F. Capsaicin induces redox imbalance and ferroptosis through ACSL4/GPx4 signaling pathways in U87-MG and U251 glioblastoma cells. *Metab Brain Dis.* 2023;38(2):393-408.
- Hacıoğlu C. Capsaicin Enhances Temozolomide-Resistant Glioblastoma Cells' Chemosensitivity and Ferroptosis through FHOD1/IRF2 Downregulation. *J Food Biochem.* 2024(1):8464817.
- Hacıoğlu C. Kapsaisin U87 İnsan Glioblastoma Hücrelerinde Epitelyal-Mezenkimial Geçiş Regüle Ederek Hücre Canlılığını Baskılar. *JHS.* 2024;33(2):271-278.
- Hacıoğlu C. Capsaicin inhibits cell proliferation by enhancing oxidative stress and apoptosis through SIRT1/NOX4 signaling pathways in HepG2 and HL-7702 cells. *J Biochem Mol Toxicol.* 2022;36(3):22974.
- Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol.* 2015;10:173-194.
- Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(12):3460-3470.
- Coleman OI, Haller D. ER Stress and the UPR in Shaping Intestinal Tissue Homeostasis and Immunity. *Front Immunol.* 2019;10:2825.
- Chen X, Cubillos-Ruiz JR. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nat Rev Cancer.* 2021;21(2):71-88.
- Urra H, Dufey E, Avril T, Chevet E, Hetz C. Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends Cancer.* 2016;2(5):252-262.
- Gifford JB, Hill R. GRP78 Influences Chemoresistance and Prognosis in Cancer. *Curr Drug Targets.* 2018;19(6):701-708.
- Li J, Lee AS. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med.* 2006;6(1):45-54.
- Clark R, Lee SH. Anticancer properties of capsaicin against human cancer. *Anticancer Res.* 2016;36(3):837-843.
- Zhu M, Yu X, Zheng Z, Huang J, Yang X, Shi H. Capsaicin suppressed activity of prostate cancer stem cells by inhibition of Wnt/ β catenin pathway. *Phytother Res.* 2021;34(4):817-824.
- Yang K, Pyo J, Kim GY, et al. Capsaicin induces apoptosis by generating reactive oxygen species and disrupting mitochondrial transmembrane potential in human colon cancer cell lines. *Cell Mol Biol Lett.* 2009;14(3):497-510.
- Richbart SD, Friedman JR, Brown KC, et al. Nonpungent N-AVAM capsaicin analogues and cancer therapy. *J Med Chem.* 2021;64(3):1346-1361.
- Thoenissen NH, O'Kelly J, Lu D, et al. Capsaicin causes cell-cycle arrest and apoptosis in ER-positive and-negative breast cancer cells by modulating the EGFR/HER-2 pathway. *Oncogene.* 2010;29(2):285-296.
- Chen M, Xiao C, Jiang W, et al. Capsaicin inhibits proliferation and induces apoptosis in breast cancer by

- down-regulating FBI-1-mediated NF- κ B pathway. *Drug Des Devel Ther.* 2021;5:125-140.
26. Moriguchi M, Watanabe T, Kadota A, Fujimuro M. Capsaicin induce apoptosis in KSHV-positive primary effusion lymphoma by suppressing ERK and p38 MAPK signaling and IL-6 expression. *Front Oncol.* 2019;9:83.
 27. Lin S, Zhang J, Chen H, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in capsaicin-induced apoptosis of human pancreatic cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013(1):629750.
 28. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science.* 2011;334(6059):1081-1086.
 29. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(2):89-102.
 30. Marciniak SJ, Chambers JE, Ron D. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress in disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2022;21(2):115-140.
 31. Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elfiky AA. GRP78: A cell's response to stress. *Life Sci.* 2019;226:156-163.
 32. Bánhegyi G, Baumeister P, Benedetti A, et al. Endoplasmic reticulum stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1113(1):58-71.
 33. Ip SW, Lan SH, Lu HF, et al. Capsaicin mediates apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW 039 cells through mitochondrial depolarization and endoplasmic reticulum stress. *Hum Exp Toxicol.* 2012;31(6):539-549.
 34. Bifulco G, Miele C, Di Jeso B, et al. Endoplasmic reticulum stress is activated in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol.* 2012;125(1):220-225.
 35. Lin CH, Lu WC, Wang CW, Chan YC, Chen MK. Capsaicin induces cell cycle arrest and apoptosis in human KB cancer cells. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:1-9.
 36. Krizanova O, Steliarova I, Csaderova L, Pastorek M, Hudecova S. Capsaicin induces apoptosis in PC12 cells through ER stress. *Oncol Rep.* 2014;31(2):581-588.
 37. Park SY, Kim JY, Lee SM, et al. Capsaicin induces apoptosis and modulates MAPK signaling in human gastric cancer cells. *Mol Med Rep.* 2014;9(2):499-502.