

# İNSAN ENDOMETRİOİD OVER ADENOKARSİNOM HÜCRE HATTI MDAH-2774 HÜCRELERİNDE KARNOSOL VE KARNOSİK ASİTİN SİTOTOKSİK ETKİSİNİN VE OLASI MEKANİZMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

*Evaluation of the Cytotoxic Effect and Possible Mechanisms of Carnosol and Carnosic Acid in Human Endometrioid Ovarian Adenocarcinoma Cell Line MDAH-2774 Cells İngilizce*

*Kısa Başlık: Carnosol and Carnosic Acid in MDAH-2774 Cells*

Hazal DEMİR<sup>1</sup>  Hatice ÖRS<sup>2</sup>  Ebru ALİMOĞULLARI<sup>1</sup>  Ashl Fahriye CEYLAN<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD, ANKARA, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji ABD, ANKARA, TÜRKİYE

## ÖZ

**Amaç:** Over kanseri, kadınlarda en yüksek ölüm oranına sahip olan ve genellikle ileri evrede teşhis edilebilen bir jinekolojik kanser türüdür. Kanser hücrelerini duyarlı hale getirmek için sitotoksik tedaviler araştırılmaktadır. Sitotoksik etkileri olduğu bilinen bitki kaynaklı ürünlerin kullanımı, kanser büyümesini baskılamada ilgi çekici bir yöntem haline gelmiştir. Hem karnosol hem de karnosik asit, antioksidan, anti-inflamatuvar, anti-proliferatif ve antikanser aktivitelere sahip olan bitkisel diterpenoidlerdir. Yaptığımız bu çalışmanın amacı hem karnosol hem de karnosik asidin MDAH-2774 over endometrioid kanseri hücre hattı üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmamızda farklı konsantrasyonlar ve zaman aralıkları kullanılmıştır. Karnosol ve/veya karnosik asidin varlığında ve yokluğunda hücre canlılığı üzerine olan etkiler, MTT analizi ile saptanmıştır. Ajanların hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin ardındaki mekanizmayı anlamak için hücrelerin toplam antioksidan durumu değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Sonuçlarımız, ajanların tek başlarına ve daha çok da kombine halde MDAH-2774 hücre canlılığını başarıyla azalttığını göstermiştir. Toplam antioksidan durum analizi bileşiklerin ayrı ayrı ve kombine halde antioksidan kapasitelerinin yüksekliğini göstermiştir.

**Sonuç:** Çalışmamız, karnosol ve karnosik asidin tek başına ve kombine halde gösterdikleri sitotoksik etkinin onların antioksidan etkileriyle ilişkili olabileceğini ve bu etkinin kombine halde daha güçlü olduğunu saptamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Karnosol, karnosik asit, MDAH-2774, over kanseri, sitotoksik etki, total antioksidan durum

## ABSTRACT

**Objective:** Ovarian cancer is one of the most lethal forms of gynecological malignancies in women and is often detected at an advanced stage. Cytotoxic treatments have been investigated to sensitize cancer cells. Naturally occurring products are becoming an attractive method for suppressing cancer growth because of their cytotoxic properties. Both carnosol and carnosic acid are diterpenoids with antioxidant, anti-inflammatory, anti-proliferative, and anti-cancer activities. The present study aims to investigate the effects of both carnosol and carnosic acid on the MDAH-2774 cell line.

**Material and Methods:** Different concentrations and time intervals were used in the present study. We employed MTT to show cell survival in the presence and absence of carnosol and/or carnosic acid. To understand the mechanisms behind the effects of the agents on cell survival, total antioxidant capacity was evaluated.

**Results:** Our results showed that the agents, alone and more so in combination, successfully reduced the viability of MDAH-2774 cells. Total antioxidant capacity analysis revealed that the compounds had high antioxidant capacities both when used alone and when combined.

**Conclusion:** Our study determined the cytotoxic effects of carnosol and carnosic acid, both when used alone and in combination. These effects may be attributed to their antioxidant properties, with the combined form exhibiting a more pronounced impact.

**Keywords:** Carnosol, carnosic acid, MDAH-2774, ovarian cancer, cytotoxic effect, total antioxidant status



Yazışma Adresi / Correspondence:

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD, ANKARA, TÜRKİYE

Tel / Phone: +905529468942

Geliş Tarihi / Received: 30.07.2024

Dr. Hazal DEMİR

E-posta / E-mail: demirhazald@gmail.com

Kabul Tarihi / Accepted: 20.08.2024

## GİRİŞ

Over kanseri, yorgunluk, kilo değişimi, karın şişliği, ağrı gibi belirgin belirtileri olmadığı için sessiz katil olarak adlandırılmaktadır. Over kanserinin erken evrelerinde semptomların belirsiz olması ve yetersiz tarama yöntemleri nedeniyle, hastaların %60'ından fazlası ileri evrede teşhis edilir. Over kanseri kadınlarda kanserden ölümlerin dördüncü nedenidir ve tüm jinekolojik kanserler arasında en yüksek ölüm oranına sahiptir (1). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) over tümörlerini histolojik farklılaşmalarına göre epitelyal, seks-kord stromal ve germ hücreli tümörler olarak sınıflandırmaktadır. Tüm vakaların %90'nını oluşturan en büyük grup olan epitelyal over tümörleri, seröz, müsinöz, endometrioid, berrak hücreli, geçiş hücreli ve Brenner tümörler olmak üzere alt gruplara ayrılmıştır (2).

Over karsinogenezi karmaşık ve çok faktörlü bir süreçtir. Over kanserinin histolojik görünümündeki önemli çeşitlilik, gelişim mekanizmasının anlaşılmasını zorlaştırmaktadır. Genellikle menopoza kısa bir süre önce veya sonra ortaya çıkar. Yeni teşhis edilen over kanseri hastaları, cerrahi ve kemoterapi kombinasyonu ile tedavi edilir (3). Geç saptanması ve net tarama kılavuzlarının bulunmaması nedeniyle over karsinomları en ölümcül malignitelerdendir. Tedaviden sonra tüm over kanserlerinin 5 yıllık hayatta kalma oranının %30 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca herhangi bir over kanserine karşı uygulanan kemoterapi, kemo-direnç nedeniyle kötü klinik sonucu ortaya koymaktadır (4).

MDAH-2774, endometrioid over kanseri olan bir kadın hastadan alınan asit hücrelerinden geliştirilen bir endometrioid over adenokarsinomu hücre dizisidir (5). Bu hücre hattının büyüme karakteristikleri ve tümörojenik potansiyeli, endometrioid over adenokarsinomunun klinik özellikleri ile paralellik göstermekle birlikte tümörün derecesi ve evresi ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır (6).

Antiproliferatif özelliklere sahip fitokimyasal bileşikler, yeni ilaçların geliştirilmesine yönelik birçok çalışmanın odak noktası olmuştur. Bazı fitokimyasallar kanser hücrelerine karşı etkili ve normal hücrelere karşı daha az toksik olduğundan ümit vericidir (7). Kanser gelişiminin başlangıç ve ilerleme aşamaları sırasında karnosolün antikanser aktivitesine artan ilgiye rağmen, az sayıda çalışma diterpenoidlerin monoterapide veya diğer fitokimyasallar veya kemoterapötiklerle eşleştirildiğinde etkinliğini kanıtlamıştır (8). Kanser tedavisinde kullanılmayan ancak yapılan çalışmalarda kanser hücreleri üzerinde sitotoksik veya anti-proliferatif etkileri gösterilmiş ilaçlar klasik kemoterapi ajanlarıyla birlikte kullanıldığında umut verici sonuçlar doğurabilmektedir (1). Birçok kemopreventif fitokimyasalın, kemorezistansı ve radyorezistansı hafiflettiği, böylece kemoterapi veya radyasyon tedavisi

ile birleştirildiğinde tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (9).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS), çeşitli insan hastalıklarının etiolojisinde rol oynayan başlıca moleküller olduğu ve karsinogenezin başlatılması ve ilerlemedeki rolleri birçok çalışmada gösterilmiştir. ROS üretimi, ROS'a karşı koruma görevi gören çok sayıda antioksidan sistem tarafından kontrol edilir. Bu sistemler antioksidan enzimlerin yanı sıra askorbik asit ve alfa-tokoferol gibi enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşur. Oksidatif stres, ROS ve detoksifiye edici antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanır; ROS fazlalığı, lipid, protein ve DNA gibi hücresel bileşenlerde oksidatif hasara yol açar (10).

Yapılan birçok çalışma, meme ve kolorektal kanserde artmış oksidatif stresi ve yüksek toplam antioksidan durumu (TAD) düzeylerini ortaya koymuştur (11,12). TAD'nin yüksek olması, kolorektal kanser riskinin %21, endometrial kanser riskinin %27, mide kanseri riskinin %42, pankreas kanseri riskinin %32, Hodgkin dışı lenfoma riskinin %39 ve meme kanseri riskinin %57 oranında azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (13).

Biberiyeden (*Rosmarinus officinalis*) veya adaçayıdan (*Salvia officinalis*) izole edilen bir polifenolik diterpen olan karnosik asit antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-kanser özellikleri dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik etkilere sahiptir (14). Bazı çalışmalar karnosik asidin kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu inhibe ettiğini ve ayrıca vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunu azalttığını göstermiştir. Önceki birkaç çalışma, karnosik asidin insan nöroblastomunda ve insan prostat karsinomu hücrelerinde apoptozu indüklediğini bildirmiştir (15). Karnosik asit, tümörün ilerlemesini doğrudan engelleme kapasitesine ek olarak, bazı kemoterapötik ajanların farklı kanser türlerindeki aktivitesini sinerjik olarak artırabilir (14). Akut miyeloid lösemi hücrelerinin kurkumin ve karnosik asit ile her bileşimin sitotoksik olmayan konsantrasyonlarında birlikte işlenmesiyle, büyük bir sitotoksik etki gözlenmiştir (16).

Karnosol, karnosik asidin oksidatif bozunması ile oluşan ve biberiye ve adaçayı dahil olmak üzere birçok bitkide bulunan, doğal olarak oluşan bir polifenolik diterpendir (17). Karnosol ve karnosik asidin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinin canlılığını azalttığı bulunmuştur (18). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, karnosolün, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin büyümesini zamana ve konsantrasyona bağlı bir şekilde, 24 ve 48 saat sonra sırasıyla 83 µM ve 25 µM IC<sub>50</sub> değerleriyle azalttığı gösterilmiştir (19).

Bu çalışmada MDAH-2774 endometrioid over kanseri hücre hattında karnosol ve karnosik asidin hem tek başına hem de kombinasyon halinde hücre çoğalması üzerine etkilerinin incelenmesi, bu etkilerin olası

mekanizmalarını değerlendirmek amaçlı hücrelerin TAD düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Kimyasallar

Çalışmamızda, karnosol ve karnosik asit (Cayman, ABD), yüksek glukozlu ve L-glutaminli Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Capricorn, Almanya), fetal sığır serumu (FBS) (Capricorn, Almanya), tripsin (Cegrogen, Almanya), penisilin-streptomisin (Cegrogen, Almanya), fosfat tamponlu salin (Dulbecco's PBS 1x) (Cegrogen, Almanya), dimetil sülfoksit (DMSO) (Bioshop, Kanada), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma Aldrich, ABD), TAD değerlendirme kiti (Rel Assay, Türkiye) kullanılmıştır.

### Hücre Kültürü

Çalışmamızda Amerikan Hayvan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC) hücre bankasından sağlanan insan endometrioid over kanser hücre hattı (MDAH-2774, CRL No: 10303) kullanılmıştır. Çalışmamızda ticari olarak satın aldığımız MDAH-2774 hücre hattı kullanılmıştır. Bu nedenle etik kurul onayına gereksinim yoktur. Hücreler %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 glutamin ile desteklenmiş DMEM besiyerinde 37°C, %5 CO<sub>2</sub> etüvde kültüre edilmiştir. Besiyeri her 2-3 günde bir değiştirilerek hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştığında pasajlama veya ekim yapılmıştır (Şekil 1).

### Hücre Canlılığı Deneyi

Hücre canlılığı analizi için konvansiyonel MTT testi kullanılmıştır. MTT testi, hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksitenin bir göstergesi olarak hücre metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılır. Bu kolorimetrik test yöntemi, metabolik olarak canlı hücreler tarafından sarı bir tetrazolyum tuzunun (MTT) mor renkli formazan kristallerine indirgenmesine dayanmaktadır. Canlı hücreler, MTT'yi formazana indirgeyen oksidoredüktaz enzimleri içerir. Çalışmada hücreler, hücre kültürü plakasında %80-90 yoğunluğa ulaştıktan sonra tripsin/EDTA çözeltisi ile yüzeyden kaldırılmış ve 3000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi ile toplanmıştır. Hücreler her bir kuyucuğa 1x10<sup>4</sup> hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaya ekilmiş ve bir gece CO<sub>2</sub> inkübatöründe (Panasonic, MC0-18AC, Japan) inkübe edilmiştir. Hücrelerdeki besiyeri farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 75, 100 ve 150 µg/ml) karnosol, karnosik asit ve kombinasyonlarını içeren besiyeri ile değiştirilmiştir. 24 ve 48 saat inkübasyonun ardından hücrelerdeki besi yeri MTT solüsyonu (1 mg/ml) ile değiştirilmiştir. 4 saat inkübasyonun ardından canlı hücrelerdeki formazan kristalleri 0.04 M HCl izopropanol kullanılarak çözülmüş ve 570 nm'de mikropilaka okuyucuda (CLARIOstar Plus, Germany) absorbans değerleri belirlenmiştir. Kontrol grubundan (sadece besiyeri ile inkübe edildi) alınan absorbans

değeri %100 olarak kabul edilmiş ve diğer kuyucuklardaki absorbans değerleri buna oranlanarak hücre canlılığı belirlenmiştir (n=3).

*Toplam Antioksidan Durumun (TAD) Değerlendirilmesi*  
Hücrelerdeki antioksidan durum, oksidatif stresin bir göstergesi olarak kabul edilir ve TAD ölçümü, oksidatif durumu tahmin etmek için en yaygın kullanılan ve yararlı prosedürlerden biridir. TAD seviyesinin belirlenmesi için MDAH hücreleri 24 kuyucuklu plakaya her bir kuyucuğa 1x10<sup>5</sup> konsantrasyonda eklenmiş ve bir gece CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edilmiştir. Hücreler 48 saat farklı konsantrasyonda karnosol, karnosik asit ve kombinasyonlarına maruz bırakılmıştır (n=3). 48 saat sonunda hücrelerdeki besiyeri uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkanmıştır. Tripsinize edilen hücreler 9000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek parçalanmıştır. TAD değerlendirilmesi üreticinin talimatlarına uygun olarak Erel metodu ile belirlenmiştir (20). Ölçüm yapılan numunede bulunan antioksidan moleküller, koyu mavi-yeşil renkli ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) çözeltisini, renksiz ABTS<sup>•+</sup> formuna değiştirir. Numunenin TAD'ı, ABTS<sup>•+</sup>'nin 660 nm'de absorbansını ölçerek belirlenmiştir. Trolox, E Vitamininin bir analogudur ve E Vitaminine benzer bir antioksidan duruma sahiptir. Trolox, TAD düzeyinin belirlenmesi için bir referans madde olarak kullanılır. TAD aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Sonuç} = \frac{[\Delta\text{Abs H}_2\text{O} - \Delta\text{Abs Numune}]}{[\Delta\text{Abs H}_2\text{O} - \Delta\text{Abs Standard}]} \begin{matrix} \text{Elde edilen} \\ \text{sonuç birimi:} \\ \text{mmol/L} \end{matrix}$$

Toplam protein miktarının belirlenmesi için Thermo BCA kiti kullanılmıştır. TAD sonuçları toplam proteine oranlanarak normalize edilmiştir. Test üç kez tekrarlanmıştır.

### İstatistiksel Analiz

Veriler, en az üçlü tekrarlara dayalı olarak ortalama ± SEM olarak ifade edilmiş ve konsantrasyonlar arasındaki önemli farklılıklar, Varyans Analizi'ne (ANOVA) ve ardından Tukey ve Bonferroni son testine tabi tutulmuştur. %50 inhibisyon konsantrasyonu (IC<sub>50</sub>) değerlerini hesaplanması ve sigmoidal konsantrasyon-cevap eğrilerini oluşturmak amacıyla doğrusal olmayan regresyon analizi GraphPad 8 yazılımı (San Diego, ABD) kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm analizler, p<0.05 olduğunda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

## BULGULAR

### *Karnosol ve Karnosik Asit MDAH-2774 Over Kanseri Hücre Hattı Çoğalmasını Azaltmıştır.*

Karnosol veya karnosik asidin ve kombinasyonlarının insan endometrioid over karsinomu hücrelerinin (MDAH-2774) proliferasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek için MTT testi yapılmıştır. MDAH-

2774 hücreleri 24 ve 48 saat farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 75, 100 ve 150 µM) karnosol, karnosik asit ve ikisinin kombinasyonlarına maruz bırakılmış ve endometrioid over karsinomuna karşı sitotoksik etkileri belirlenmiştir.

Karnosol ya da karnosik asit ile inkübe edilen hücrelerin hücresel canlılığında konsantrasyonun artmasına bağlı olarak azalma görülmüştür. 25 µM karnosol ile 24 saat inkübe edilen hücrelerde %78.12 canlılık belirlenirken 150 µM'da canlılık %61.23'e düşmüştür (p<0.05). 25 µM ve 150 µM karnosik aside maruz bırakılan hücrelerin canlılığı sırasıyla %102.76 ve %74.47 olarak belirlenmiştir (p<0.05). Karnosik asit 48 saatte hücre proliferasyonunu uyarmıştır. Kontrol grubunun canlılığı %100 olarak kabul edilmiş ve 25 µM konsantrasyonda canlılık %132.45'e çıkmıştır (p<0.05). Karnosol ve karnosik asidin kombine uygulanmasında hücre canlılığında önemli ölçüde azalma görülmüştür. 48 saat 75 µM karnosol-karnosik asit'e maruz bırakılan

hücrelerin canlılığı %50,39±2,53 iken 150 µM konsantrasyonda %47,13±1,48'e düşmüştür (p>0.05). MDAH-2774 hücrelerinin 24 ve 48 saatlik inkübasyonunda tüm konsantrasyonlarda karnosol canlılığı azaltmada karnosik asitten daha etkili olmuştur. Karnosol ve karnosik asit hücre canlılığını azaltmada 48 saatlik sonuçlar, 24 saatlik sonuçlara göre daha anlamlı çıkmıştır. Karnosol ve karnosik asidin kombine halde uygulanmasında en etkili sonuç 150+150 µM konsantrasyonla ve 24 saatlik inkübasyonla elde edilmiştir.

Hücre canlılığını azaltmada karnosolün 24 saatlik IC<sub>50</sub> değeri 284.6 µM, 48 saatlik IC<sub>50</sub> değeri 57.75 µM olmuştur. Karnosik asidin 24 saatlik IC<sub>50</sub> değeri 261.9 µM, 48 saatlik IC<sub>50</sub> değeri 113.4 µM olarak bulunmuştur. Aynı konsantrasyonların kombine olarak kullanıldığı analizlerde 24 saatlik IC<sub>50</sub> değeri 92.24 µM, 48 saatlik IC<sub>50</sub> değeri 63.58 µM olarak bulunmuştur (Tablo 1).

**Tablo1:** Karnosol ve karnosik asidin ve ikisinin kombine halde uygulanmasının 24 veya 48 saat inkübasyon sonrası MDAH-2774 hücre hattı canlılığı üzerine olan etkisi.

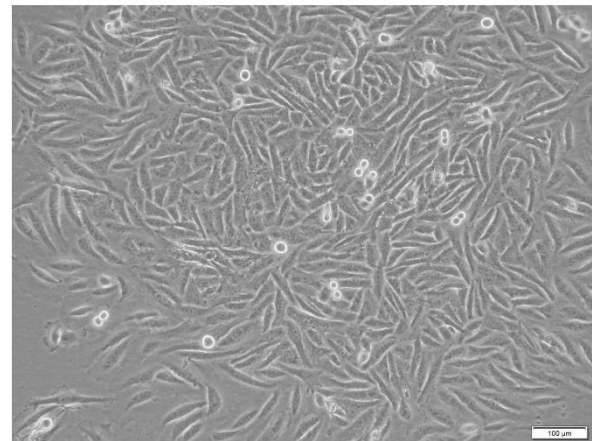
DOZ	Karnosol 24 Saat % (±SEM)	Karnosik Asit 24 Saat % (±SEM)	Karnosol 48 Saat % (±SEM)	Karnosik Asit 48 Saat % (±SEM)	Karnosol- Karnosik Asit 24 Saat % (±SEM)	Karnosol- Karnosik Asit 48 Saat % (±SEM)
0	100 ±2.4	100±2.4	100±6.1	100±5.4	100±2.4	100±6.1
25µM	78.12±0.5	102.76±2.2	52.82±9.0	132.45±14.3	77.46±4.6	47.56±2.92
50µM	70.88±3.5	99.63±4.2	49.77±9.5	108.48±7.3	57.57±3.3	42.07±5.86
75µM	66.30±0.6	88.05±2.5	47.57±5.5	95.69±1.9	51.02±14.1	50.39±2.53
100µM	65.46±0.7	87.39±7.1	47.70±1.1	51.86±12.2	81.92±4.1	51.16±4.82
150µM	61.23±5.9	74.47±0.9	57.94±7.6	36.95±9.2	19.14±0.9	47.13±1.48

SEM: Standart error of mean

#### *Karnosol ve Karnosik Asit MDAH-2774 Over Kanseri Hücre Hattı Toplam Antioksidan Durumu Düzeylerini Arttırmıştır*

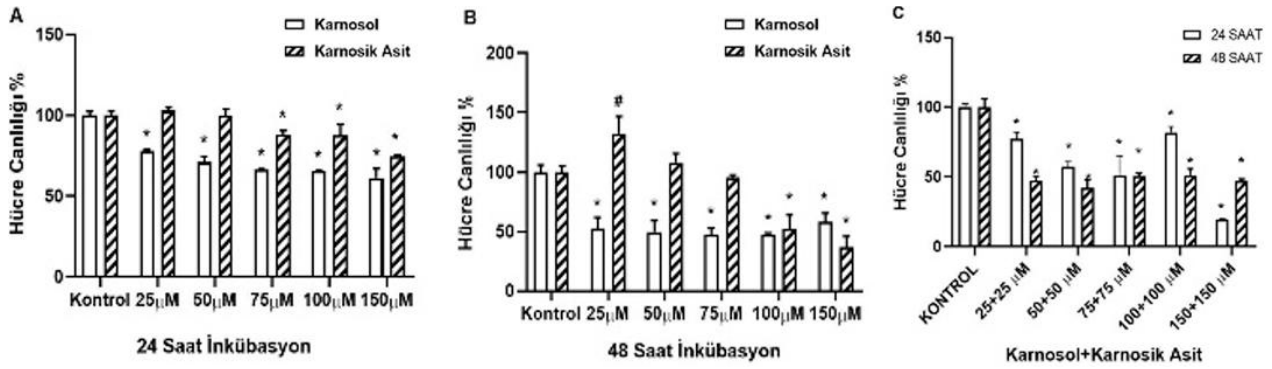
TAD düzeylerinde karnosol ile 100 µM ve 150 µM konsantrasyonlarda anlamlı biçimde artış olmuştur (Şekil 3A). TAD düzeyini en fazla yükselten karnosol dozu 100 µM olmuştur (0.9067 mmol/L, ± 0.1845 SEM). Karnosik asit ile muamele edilen MDAH hücrelerinde konsantrasyonun artmasına bağlı olarak TAD düzeyleri artmıştır (Şekil 3B). En yüksek TAD sonucu en yüksek karnosik asit dozu olan 150 µM ile alınmıştır (0.856 mmol/L,±0.008 SEM). Sonuçlar MTT sonuçları ile uyum göstermektedir. MTT sonuçlarına göre hücreler üzerinde toksik etki gösteren konsantrasyonlarda TAS seviyesi artmış ve kontrol ile kıyaslandığında anlamlı bir artış belirlenmiştir. Karnosol ve karnosik asidin kombine halde uygulanmasıyla en yüksek TAD düzeyleri elde edilmiştir (sırasıyla 0.6943, 0.516, 0.795, 1.356 ve 1.465

mmol/L). Özellikle 100+100 µM ve 150+150 µM kombine konsantrasyonlarda, tek uygulamaya kıyaslayüksek TAD düzeyleri bulunmuştur.

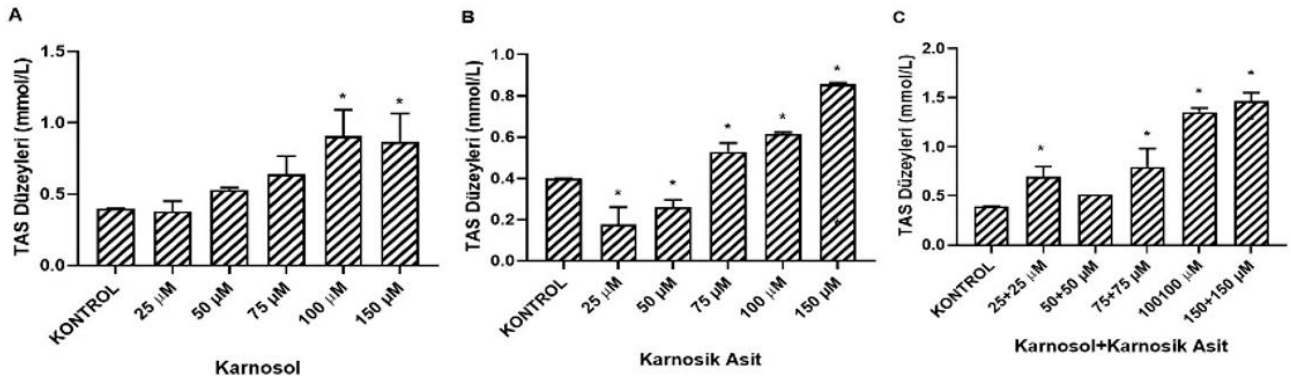


**Şekil 1:** MDAH-2774 insan over endometrioid kanser hücrelerinin görüntüsü. Bar: 100 µm.





**Şekil 2:** Karnosol (A) ve karnosik asidin (B) ve ikisinin kombine halde uygulanmasının (C) 24 veya 48 saat inkübasyon sonrası MDAH-2774 hücre hattı canlılığına etkileri. Tüm veriler (n=3-4) ± SEM (Standart Error of Mean) olarak ifade edilmiştir. p\* < 0.05 olarak alınmış ve sonuçlar 24 ve 48 saatlik kontrolle karşılaştırılmıştır.



**Şekil 3.** Karnosol (A), karnosik asit (B) ve ikisinin kombinasyonunun (C) MDAH-2774 endometrioid over kanseri hücreleri TAS düzeylerine etkileri. Tüm veriler (n=3-4) ± SEM (Standart Error of Mean) olarak ifade edilmiştir. p\* < 0.05 olarak alınmış ve sonuçlar 48 saatlik kontrol değeriyle karşılaştırılmıştır. Sonuçlar litre başına trolox eşdeğeri milimol (eq/L) olarak ifade edilmiştir. TAS: Total Antioksidan Durum.

### TARTIŞMA

Bu çalışmada biberiyede (*R. officinalis*) veya adaçayında (*S. officinalis*) yüksek konsantrasyonda bulunan polifenolik diterpenler olan karnosol ve karnosik asidin insan endometrioid over kanseri MDAH-2774 hücre hattının hücre canlılığına ve hücrelerdeki toplam antioksidan duruma olan etkileri farklı konsantrasyon ve zaman aralıkları kullanılarak ve kombinasyonları ile de karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Daha önceki çalışmalar, farklı akut lösemi hücre hatlarında karnosolün apoptozu indüklediği ve sağlıklı gönüllülerden alınan periferik kan mononükleer hücrelerinde hücre ölümünü etkilemeden lösemi hücre hatlarında apoptozu indüklediği gösterilmiştir (21). Johnson ve arkadaşları yaptığı çalışmada hem karnosol hem de karnosik asidin MCF-7 meme kanseri hücre hattına karşı 82 µM ve 96 µM'lik bir IC<sub>50</sub> değeri ile sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir (22). Literatürde yapılan önceki bir çalışmada karnosolün glioblastoma hücrelerinde temozolamidin anti-proliferatif etkilerini arttırabildiği saptanmıştır. Çalışmada ilk kez, karnosolün kök hücre özelliklerini azaltabilen ve böylece glioblastoma saldırganlığını kontrol edebilen ajanların geliştirilmesi için umut verici bir öncü olabileceği vurgulanmıştır (23). Diğer bir

çalışmada özofagus adenokarsinomu hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonla karnosolün konsantrasyona bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığı ve kaspaz-3 proteinini önemli ölçüde arttırdığı bulunmuştur (24). Yaptığımız hücre canlılığı deneyleri ile hem karnosol ve karnosik asidin hem de ikisinin kombinasyonunun hücre canlılığını konsantrasyon ve zamana bağlı olarak azalttığı saptanmıştır. MTT sonuçlarımız literatürdeki yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Sonuçlarımız karnosolün her iki inkübasyon süresinde (24 ve 48 saat) de karnosik asitten daha etkili olduğunu göstermiştir. Karnosol ve karnosik asit birlikte uygulandığında, ayrı ayrı uygulamayla kıyaslandığında hücre canlılığı üzerine daha etkili olduğu ve hücreler üzerindeki en yüksek sitotoksik etkinin 24 saatte ve 150+150 µM konsantrasyonda kombine uygulamasıyla olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre iki diterpenik maddenin sinerjik etkisinden söz edilebilmektedir.

Yapılan çalışmalar, oksidatif stresin birçok hastalığın patogenezi ile ilişkili olduğunu doğrulamıştır. Kötü huylu tümörler, iyi huylu meme tümörleri ve sağlıklı deneklerde TAS serum düzeylerinin ölçüldüğü bir çalışmada, iyi huylu ve malign tümörleri olan hastalarda TAS düzeyleri sağlıklı kontrollere göre anlamlı

derecede daha düşük bulunmuştur (25). Yapılan bir klinik çalışmada evre III mide kanserli 274 hastanın ortalama TAD değerleri sağlıklı kontrollerden daha düşük bulunmuştur (26). Ching ve arkadaşları,  $\beta$ -karoten, retinol, bilirubin ve TAD serum konsantrasyonlarının artmasını, meme kanseri riskinde önemli azalmalarla ilişkilendirmişlerdir (27). Yapılan başka bir çalışmada elmada bulunan kersetin ve greyturta bulunan naringin gibi flavonoidlerin antioksidan aktivitesinin, mide kanserlerinde kanserojen aktive edici enzimleri inhibe edebildiği gösterilmiştir (28). Askorbik asidin (C vitamini) diyetle takviyesi, ileri meme ve pankreas kanserlerinde hasta sonuçlarının iyileşmesiyle ilişkilendirilmiştir. Üstelik, askorbik asit ve etoposid, sisplatin ve doksorubisin gibi antikanser ajanların etkisini sinerjik olarak arttırdığı da bildirilmiştir (29,30). Gautam ve arkadaşları önemli bir fenolik bileşik olan resveratrolün üç lösemi hücre hattında (32Dp210, L1210, HL-60) apoptotik DNA fragmentasyonuna neden olduğunu, ancak normal kemik iliği hücrelerinde olmadığını, HL-60 hücrelerinde seçici olarak apoptozu indüklediğini göstermiştir (31). Bir diğer fenolik bileşik olan kurkumin antioksidan olarak kabul edilse de kurkuminin belirli koşullar altında prooksidan olarak hareket edebileceğine ve ROS oluşumunu indükleyerek antikanser aktivitesi sergileyebileceğine dair artan sayıda kanıt gösterilmiştir. Chen ve arkadaşları hücre çoğalması, canlılığı ve ROS oluşumunu değerlendirdiği çalışmasında, kurkuminin HL-60 insan lösemi hücrelerindeki antioksidan ve antikanser özelliklerini araştırmıştır. Kurkuminin antikarsinojenik mekanizmalarının konsantrasyona bağlı olarak değiştiğini ve düşük kurkuminin konsantrasyonları (<20  $\mu$ M) ROS üretimini azalttığını, daha yüksek konsantrasyonların ise tam tersi etkiye sahip olduğunu ve ROS oluşumunu desteklediğini bulmuştur (32).

Bizim sonuçlarımızda karnosol, karnosik asit ve ikisinin kombinasyonu özellikle yüksek konsantrasyonlarda (100-150  $\mu$ M) insan endometrioid over kanseri MDAH-2774 hücre hattında TAD düzeylerini arttırmıştır. 100  $\mu$ M karnosol ile en yüksek sitotoksik etki ve en yüksek TAD düzeyi sonucu elde edilmiştir. Benzer şekilde 150  $\mu$ M dozda karnosik asit en iyi sitotoksik etkiyi ve en yüksek TAD düzeyi elde edilmiştir. Bu sonuçlar, karnosol ve karnosik asidin kanser hücrelerine olan sitotoksik etkisi TAD düzeylerinin arttırmasına neden olmuştur.

Hücre canlılığı ve TAD düzeylerine ilişkin tüm sonuçlar ele alındığında çalışmamızla insan endometrioid over kanseri MDAH-2774 hücre hattında karnosol ve karnosik asidin birlikte uygulanmasının sitotoksik etkisi ve buna bağlı olarak TAD düzeylerindeki artış ilk kez gösterilmiştir. Daha ileri çalışmalarla karnosol ve karnosik asidin invivo sonuçlarının değerlendirilmesi

insan endometrioid over kanserinde umut verici bir tedavi seçeneği olarak araştırılmasının gerektiği kanaatine varılmıştır.

**Çatışma Beyanı:** Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

**Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı:** Ana fikir: AFC, HD, EA; Analiz: HD, EA; Veri sağlama: HD, HÖ; Yazım: HD, HÖ; Düzeltme: AFC, EA; Onay: AFC, HD.

**Destek ve Teşekkür Beyanı:** Çalışmaya ilişkin hiçbir kurum ya da kişiden finansal destek alınmamıştır.

**Etik Kurul Onamı:** Çalışmamızda ticari olarak satın aldığımız MDAH-2774 hücre hattı kullanılmıştır. Bu nedenle etik kurul onayına gereksinim yoktur.

## KAYNAKLAR

1. Ayla Ş, Bilir A, Ertürkoğlu Ş, et al. Effects of different drug treatments on the proliferation of human ovarian carcinoma cell line MDAH-2774. *Turkish J Med Sci.* 2018;48(2):441-448.
2. Smolle E, Taucher V, Pichler M, et al. Targeting signaling pathways in epithelial ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2013;14(5):9536-9555.
3. Zalewski M, Kulbacka J, Saczko J, et al. Valspodar-modulated chemotherapy in human ovarian cancer cells SK-OV-3 and MDAH-2774. *Bosn J Basic Med Sci.* 2019;19(3):234-241.
4. Gilloteaux J, Lau HL, Gourari I, et al. Apatone® induces endometrioid ovarian carcinoma (MDAH 2774) cells to undergo karyolysis and cell death by autophagy: A potent and safe anticancer treatment. *Transl Res Anat.* 2015;1:25-39.
5. Choi SM, Kim DH, Chun KS, Choi JS. Carnosol induces apoptotic cell death through ROS-dependent inactivation of STAT3 in human melanoma G361 cells. *Appl Biol Chem.* 2019;62:1-11.
6. Dai L, Li C, Shedden KA, et al. Comparative proteomic study of two closely related ovarian endometrioid adenocarcinoma cell lines using cief fractionation and pathway analysis. *Electrophoresis.* 2009;30(7):1119-1131.
7. Corveloni AC, Semperebon SC, Baranoski A, et al. Carnosic acid exhibits antiproliferative and proapoptotic effects in tumoral NCI-H460 and nontumoral IMR-90 lung cells. *J Toxicol Environ Health A.* 2020;83(10):412-421.
8. Vergara D, Simeone P, Bettini S, et al. Antitumor activity of the dietary diterpene carnosol against a panel of human cancer cell lines. *Food Funct.* 2014;5(6):1261-1269.
9. Chun K-S, Kundu J, Chae IG, et al. Carnosol: A phenolic diterpene with cancer chemopreventive potential. *J Cancer Prev.* 2014;19(2):103-110.
10. Mahdavi R, Faramarzi E, Seyedrezazadeh E, et al. Evaluation of oxidative stress, antioxidant status and serum vitamin C levels in cancer patients. *Biol Trace Elem Res.* 2009;130(1):1-6.
11. Erten Şener D, Gönenç A, Akıncı M, et al. Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. *Cell Biochem Funct.* 2007;25(4):377-382.
12. Kocot J, Kielczykowska M, Dąbrowski W, et al. Total antioxidant status value and superoxide dismutase activity in human colorectal cancer tissue depending on the stage of the disease: A pilot study. *Adv Clin Exp Med.* 2013;22(3):431-437.

13. Abbasalizad Farhangi M, Vajdi M. Dietary total antioxidant capacity (TAC) significantly reduces the risk of site-specific cancers: An updated systematic review and meta-analysis. *Nutr Cancer*. 2021;73(5):721-739.
14. Shao N, Mao J, Xue L, et al. Carnosic acid potentiates the anticancer effect of temozolomide by inducing apoptosis and autophagy in glioma. *J Neurooncol*. 2019;141(2):277-288.
15. Lin KI, Lin CC, Kuo SM, et al. Carnosic acid impedes cell growth and enhances anticancer effects of carmustine and lomustine in melanoma. *Biosci Rep*. 2018;38(4):1-11.
16. Ossikbayeva S, Khanin M, Sharoni Y, et al. Curcumin and carnosic acid cooperate to inhibit proliferation and alter mitochondrial function of metastatic prostate cancer cells. *Antioxidants*. 2021;10(10):1591.
17. O'Neill EJ, Den Hartogh DJ, Azizi K, et al. Anticancer properties of carnosol: A summary of *in vitro* and *in vivo* evidence. *Antioxidants*. 2020;9(10):1-22.
18. Duran T, Koçak N, Karaselek M. Carnosol and carnosic acid may be a promising anticancer agent in non-small cell lung cancer treatment. *Cukurova Med J*. 2024;49(1):81-88.
19. Petiwala SM, Johnson JJ. Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anticancer activity. *Cancer Lett*. 2015;367(2):93-102.
20. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004;37(4):277-285.
21. Zunino SJ, Storms DH. Carnosol delays chemotherapy-induced DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis in leukemic cells. *Nutr Cancer*. 2009;61(1):94-102.
22. Johnson JJ. Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Lett*. 2011;305(1):1-7.
23. Giacomelli C, Daniele S, Natali L et al. Carnosol controls the human glioblastoma stemness features through the epithelial-mesenchymal transition modulation and the induction of cancer stem cell apoptosis. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-17.
24. Li A, Cao W. Downregulation of SODD mediates carnosol-induced reduction in cell proliferation in esophageal adenocarcinoma cells. *Sci Rep*. 2023;13(1):1-7.
25. Feng JF, Lu L, Zeng P, et al. Serum total oxidant/antioxidant status and trace element levels in breast cancer patients. *Int J Clin Oncol*. 2012;17(6):575-583.
26. Du XF, Zhang LL, Zhang DZ, et al. Clinical significance of serum total oxidant/antioxidant status in patients with operable and advanced gastric cancer. *Onco Targets Ther*. 2018;11:6767-6775.
27. Ching S, Ingram D, Hahnel R, et al. Serum levels of micronutrients, antioxidants and total antioxidant status predict risk of breast cancer in a case control study. *J Nutr*. 2002;132(2):303-306.
28. Zahra KF, Lefter R, Ali A, et al. The involvement of the oxidative stress status in cancer pathology: A double view on the role of the antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021(1):9965916.
29. Pawlowska E, Szczepanska J, Blasiak J. Pro- and antioxidant effects of Vitamin C in cancer in correspondence to its dietary and pharmacological concentrations. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019(1):7286737.
30. Yun J, Mullarky E, Lu C, et al. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science*. 2015;350(6266):1391-1396.
31. Kelkel M, Jacob C, Dicato M, et al. Potential of the dietary antioxidants resveratrol and curcumin in prevention and treatment of hematologic malignancies. *Molecules*. 2010;15(10):7035-7074.
32. Kong Y, Ma W, Liu X, et al. Cytotoxic activity of curcumin towards CCRF-CEM leukemia cells and its effect on DNA damage. *Molecules*. 2009;14(12):5328-5338.