

Araştırma Makalesi | Research Article

ROSMARİNİK ASİTİN İNSAN KOLON KANSERİNDE OTOFAJİK ETKİSİ

AUTOPHAGIC EFFECT OF ROSMARINIC ACID ON HUMAN COLON CANCER

 İlkay Çorumluoğlu^{1*},  Ebru Alimoğulları¹

¹Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi ,Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.



Öz

Amaç: Kolon kanseri en agresif kanser türüdür ve tedavilerin yetersiz olmasından kaynaklı ileri aşamalarda kötü prognoz ile karakterizedir. Rosmarinik asit (RA) kolon, pankreas, prostat, karaciğer ve multipl miyelom dahil olmak üzere çeşitli kanserlerdeki lezyonlara karşı etkili olduğu kanıtlanmıştır. Çalışmamızda lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturulan hücresel hasar ve otofaji üzerine rosmarinik asitin kolon kanseri hücrelerine etkisini araştırmayı amaçladık.

Yöntem: Çalışmamızda insan kolon kanseri Caco-2 (HTB-37) hücre hattı kullanıldı. Kontrol, LPS, RA ve LPS+RA olmak üzere 4 grup dizayn edildi. Caco-2 için 200 µg/mL RA dozu ve LPS dozu 10 µg/mL kullanıldı. Caco-2 hücre hatları kültüre edildikten sonra Beclin-1, p62 ve LC3 proteinlerinin hücresel lokalizasyonlarını belirlemek için immünohistokimyasal analizler gerçekleştirildi. Otofajik yoldaki bu proteinlerin ifadesini belirlemek için western blot analizleri yapıldı.

Bulgular: LPS hasarı oluşturulan grupta kontrol grubuna göre otofajik protein ifadesi yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). LPS+RA verilen grupta diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

Sonuç: Sonuç olarak, Caco-2 kolon kanser hücrelerinde LPS ile hasar oluşturulduğunda otofaji yolağındaki Beclin 1, p62 ve LC3 önemli proteinlerin ifadelerinde azalma ancak rosmarinik asit ile tedavi edilen grupta protein ifadelerinde artış olduğunu tespit ettik. Bu çalışma ile rosmarinik asitin kolon kanseri hücrelerinin otofaji yolağında önemli proteinlerin degradasyonuna karşı klinik etkilerinin tespit edilebilmesi için daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiğini önermekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Caco-2, rosmarinik asit, Beclin 1, p62, LC3, LPS

ABSTRACT

Objective: Colon cancer is the most aggressive type of cancer and is characterized by a inefficient prognosis in advanced stages due to inadequate treatment. Rosmarinic acid (RA) has been shown to be effective against lesions in various cancers, including colon, pancreatic, prostate, liver and multiple myeloma. In our study, we aimed to investigate the effect of rosmarinic acid on lipopolysaccharide (LPS)-induced cell damage and autophagy in colorectal cancer cells.

Method: The human colon cancer cell line Caco-2 (HTB-37) was used in our study. 4 groups were formed: Control, LPS, RA and LPS+RA. For Caco-2, an RA dose of 200 µg/ml and an LPS dose of 10 µg/ml were used. After the Caco-2 cell lines were cultured, immunohistochemical analyzes were performed to determine the cellular localizations of Beclin-1, p62 and LC3 proteins. Western blot analyzes were performed to determine the expression of these proteins in the autophagic pathway.

Results: Autophagic protein expression was found to be higher in the LPS-damaged group compared to the control group ($p<0,05$). It was found to be statistically significant in the LPS+RA group compared to the other groups ($p<0,05$).

Conclusion: As a result, we found that when LPS-induced damage was induced in Caco-2 colon cancer cells, there was a decrease in the expression of important Beclin 1, p62 and LC3 proteins in the autophagy pathway, but an increase in their protein expression in the rosmarinic acid-treated group. In conclusion, with this study we suggest that more comprehensive studies should be conducted to determine the clinical effect of rosmarinic acid against the degradation of key proteins in the autophagy pathway in colorectal cancer cells.

Keywords: Caco-2, rosmarinic acid, Beclin-1, p62, LC3, LPS

* İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: İlkay Çorumluoğlu; Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi ,Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

Telefon/Phone: +90 (542) 513 09 36, e-mail/e-posta: ilkaycorumluoglu@gmail.com

Başvuru/Submitted: 22.11.2024

Kabul/Accepted: 30.04.2025

Online Yayın/Published Online: 30.06.2025

Giriş

Kolorektal kanser (CRC), sindirim sisteminin sık görülen malign tümörlerinden biridir ve görülme sıklığı mide ve özofagus kanserlerinden sonra ikinci sıradadır¹. Rektum kanserlerinin %90'ından fazlası, cerrahi eksizyonla çıkarılabilen adenokarsinomlardır. Ancak cerrahi eksizyonun sonuçları rektum kanserinin evresine bağlıdır. Tek başına cerrahi eksizyonun ve cerrahi eksizyonu takiben radyoterapi (RT) ile karşılaştırıldığında, rektum kanserinin lokal tekrarlama riskinin daha yüksek olduğu bulunmuştur². Kolorektal kanser (CRC), erkeklerde üçüncü, kadınlarda ise ikinci en sık görülen tümördür ve dünya çapındaki tüm tümör çeşitlerinin %10'unu oluşturur. Erkeklerde görülme sıklığı %25 daha yüksektir ve ülkeler arasında büyük farklılıklar gösterir^{3,4}.

Kanser hücrelerinde ubikuitin-proteazom sisteminde (UPS) içinde olduğu protein hemostazın (proteostaz) sekteye uğradığı bilinmektedir⁵. Genom sekanslama çalışmaları, kanser hücre genomunun protein kodlama sekanslarında yüzlerce nokta mutasyonlarının olduğunu ortaya çıkarmıştır⁶. Bu durumda, kanser hücrelerindeki bu proteinler, protein kalite kontrol sistemine aşırı yük oluşturacak ve UPS aracılığıyla yıkıma uğratılacaktır⁷. Yapılan çalışmalar, kanserin başlangıcında otofaji aktiviteörlerinin kanser gelişimini engellediği⁸, fakat ileri düzey kanserlerde hem aktive edici hem de inhibe edici ajanların tedaviye yönelik kullanımı önerilmiştir⁹. Yine kolorektal kanserli hastalarda p97/VCP (ATPaz valosin-containing protein)'nin fazlaca ekspre olduğu ve bu ekspresyonun hücre büyümesi ve hücre canlılığı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir¹⁰. Otofaji ve apoptoz, hücre ölümü ve hücre canlılığının düzenlenmesinde yer aldıklarından, bağlantılı ve korunmuş süreçlerdir¹¹. Otofaji proteinleri, membrana bağlı otofagozom oluşumu ve olgunlaşmasında rol oynar. Otofagozomların oluşumu Autophagy-related protein 8 (ATG8) / Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) proteinlerini gerektirir. LC3, otofagozomların en iyi bilinen belirteçidir. Otofajinin aktivasyonu, LC3I'yi katalize ederek otofajik membran ile ilişkili LC3-II'yi oluşturur^{12,13}. Bu reaksiyon, moleküler ağırlığının 18 kDa'dan 16 kDa'ya değişmesine neden olur ve bu, genellikle otofaji tespiti için bir test olarak kullanılır. P62/SOSMT1 (Polyubiquitin-binding protein) proteini ayrıca otofajik akıyı incelemek için kullanılan başka bir belirteçtir ve otofajik bozunmayı kolaylaştırmak için LC3II'ye bağlanır. Daha sonra, otofagozomlar lizozomlarla birleşerek otolizozomlar haline gelirler ve burada içerikleri bozulur¹⁴.

İki ana hücresel temizleme yolu olan UPS ve otofaji, proteinlerin bozulmasını sürdürmek için birbirleriyle işbirliği yapar^{15,16}. UPS, substratların proteazom tarafından bozunması için ubikuitin ile tanındığı ve etiketlendiği bir proteolitik sistemdir. Otofaji aynı zamanda proteinleri ve diğer hücre materyalleri parçalamak için lizozomal hidrolazları kullanan parçalayıcı bir sistemdir. Hem UPS hem de otofajinin farklı, birbirinden bağımsız işlevleri ve mekanizmaları vardır, ancak protein bileşenleri ve her hücrede bulunma gibi birçok açıdan benzerliği paylaşırlar. Ubikuitin (Ub)

proteini, ubikuitin aktive edici (E1), ubikuitin konjuge edici (E2) ve ubikuitin ligaz (E3) enzimlerinin ortak aktivitesi yoluyla proteinlerin lizin kalıntılarına konjuge edilmiş 76 amino asitli bir proteindir¹⁷. BECN1 geni tarafından kodlanan protein olan beclin 1, otofaji için gereklidir. Beclin 1, endositotik yolda ve LC3 (mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3) ilişkili fagositoz dahil olmak üzere diğer yollarda da yer almaktadır¹⁸. Beclin 1, Bcl-2 ile etkileşen yeni bir protein olarak tanımlanan ilk memeli otofaji proteindir¹⁹. Beclin 1 aynı zamanda dönüm noktası niteliğinde bir otofaji proteini olarak da tanımlanmaktadır^{19,20}. BECLIN1, hem otofaji hem de membran trafiği işlevlerini, başlıca vakuolar protein sıralama ilişkili protein 15 (VPS15), VPS34, UV radyasyon direnci ilişkili gen ürünü (UVRAG) ve otofaji ilişkili protein 14 (ATG14) olmak üzere birkaç başka proteinle etkileşime girerek gerçekleştirir. Bunlar birlikte, sırasıyla ATG14 veya UVRAG'ın mevcut olup olmamasına bağlı olarak iki farklı Sınıf III PI3K kompleksi, Kompleks 1 (C1) ve Kompleks 2 (C2) halinde birleşir. Bu kompleksler içinde, katalitik lipid kinaz alt birimi VSP34, PtdIns'in fosforilasyonundan sorumludur ve bu da daha sonra efektör proteinlerin işe alınması yoluyla otofaji ve/veya membran trafiği işlevlerine aracılık eder²¹. Otofajik fonksiyona ek olarak, son çalışmalarda Beclin 1'in tümör proliferasyonunda düşük ekspresyonu ve baskılayıcı fonksiyonu olduğu gösterilmiştir²⁰.

Biberiye (*Rosmarinus officinalis*) labiat ailesine (Lamiaceae) aittir. Bu bitki ailesinin aktif bileşenleri fenolik diterpenler ve triterpenlerdir. Bu bileşiklerin yüksek antioksidan etkileri vardır. Biberiyenin ana aktif bileşikler arasında kafeik asit, rosmarinik asit (RA), ursolik asit (UA), karnosik asit (CA) ve karnosol bulunur. Biberiyenin toplam antioksidan aktivitesinin yaklaşık %90'ı karnosol ve CA'dan türetilmiştir. Rosmarinik asit, fenolik halkalarından birini kafeik asit aracılığıyla fenilalaninden, diğer halkasını ise 3,4-dihidroksifenillaktik asit aracılığıyla tirozinden elde eden kafeik türevlerden biridir. Ursolik asit, antikanser ve anti-inflamatuar özelliklere sahip bir pentasiklik triterpenoiddir²².

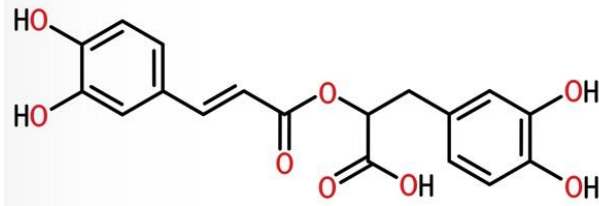
Bakteriyel lipopolisakkarit (LPS), birçok doku ve organda inflamasyona neden olur ve sistemik inflamasyonu uyarak sepsise neden olabilir. LPS, gram negatif bakterilerin hücre duvarının toksik bir bileşenidir. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı; bir iç peptidoglikan tabakası ve bir dış LPS, protein ve fosfolipid tabakasından oluşur. LPS katmanındaki endotoksin molekülü hücre zarında kaldığı sürece etkisizdir. Hızlı hücre proliferasyonu veya hücre yıkımı sırasında salınan endotoksin, sepsis/endotoksemi olaylarını başlatan anahtar moleküldür. LPS, optimal bir bakteriyel enfeksiyon modeli oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır²³.

Caco-2 (HTB-37) hücre hattında rosmarinik asit ve LPS varlığında ilk olarak Beclin-1, p62 ve LC3 ekspresyonları immunohistokimya ve western blot yöntemleriyle belirlenmesi amaçlanmıştır. Literatürde ilk kez kolon kansinomlarında rosmarinik asit ve otofaji arasındaki ilişki ortaya konulup, kanser hastalıklarında otofajik proteinlerin önemine dair ön bilgiler elde edilmesi hedeflenmiştir.

Yöntem

Kimyasallar ve Antikorlar

Bu çalışmada kullanılan rosmarinik asit Sigma Aldrich (St. Louis, Mo., ABD) firmasından satın alınmıştır ve saflığı %95'tir (HPLC) (Şekil 1). Primer antikorlardan rabbit-LC3B (BS-55120R, Bioss, USA), rabbit- p62 (bs-55207R, Bioss, USA), rabbit Beclin-1 (PA5-20171, Invitrogen, USA), rabbit beta-aktin (1:1000, rabbit, bs-0061R, Bioss, USA), sekonder antikor olarak goat anti-rabbit IgG (H+L) konjuge peroksidaz (UK293475, Thermo scientific, USA), ve DAPI(2328994, Invitrogen, USA) kullanılmıştır.



Şekil 1. Rosmarinik asitin moleküler yapısı (C₁₈H₁₆O₈).

Hücre Kültürü Yöntemi

Çalışmamızda ATCC (American Type Culture Collection) tarafından sağlanan Caco-2 (ATCC® Cat. No. HTB-37™) hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler %1 penisilin/streptomisin ve %10 fetal siğir serumu (Hyclone, ABD) ile desteklenen DMEM kültür ortamında (Gibco, ABD) 37°C'de %5'lik CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. Western blot ve immünohistokimyasal analizleri için hücreler, %70 çoğalma kapasitesine ulaştığında %0,25 trypsin kullanılarak kültür kaplarından ayrılmalrı sağlanıp 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekimleri yapılmıştır²⁴. Ön çalışmalar sayesinde Caco-2 hücreleri için belirlenen 200 µg/mL RA dozu²⁵ ve LPS dozu (10 µg/ml)²⁶ kullanılmıştır. Çalışmamız kontrol, LPS, RA ve LPS+RA olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır.

İmmüno Floresan Çalışmaları

Caco-2 hücreleri coverslip (15x15mm, yuvarlak, Nest) eklenen 6 kuyucuklu kültür kaplarında inkübe edilmiştir. Caco-2 hücreleri 3 kez PBS (Phosphate-buffered saline) ile yıkandıktan sonra %4'lük formaldehit ile tespit işlemi gerçekleştirilmiştir. Fiksasyondan sonra 3 kez tekrardan PBS ile yıkandıktan sonra, 1 saat oda sıcaklığında blokama solüsyonunda (%3'lük Bovine serum albümin-%10'lük rabbit serum) bekletilmiştir. Caco-2 hücrelerinin üzerine, blokama sonrasında yıkama işlemi yapılmadan LC3B (1:300, BS55120R, Bioss, USA), p62 (1:200 bs-55207R, Bioss, USA), Beclin 1 (1:200, PA5-20171, Invitrogen, USA) primer antikorları damlatılıp 4°C'de gece boyunca buzdolabında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra primer antikorlara uygun sekonder antikorlar (Goat-anti-rabbit IgG (H+L) FITC konjuge peroksidaz, (UK293475, Thermo scientific, USA) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süre bitiminde 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Hücreler inkübasyon sonrasında immüno floresan kapatma medyumunu DAPI (2328994, Invitrogen, USA) ile kapatılmıştır. Olympus

CKX41 marka floresan mikroskobu ile görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir.

Western Blot Analizi

Western blotlama için Caco-2 hücreleri 6 kuyucuklu kültür kaplarına kültüre edilmiştir. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Hücreler 20 µg protein, gradyan jeline (Invitrogen) yüklenmiş ve bir nitroselüloz membran üzerine yarı kuru transfer gerçekleştirilmiştir. Membran blokajı için PBS içindeki %5 süt kullanılmıştır ve ardından LC3B (1:300, BS-55120R, rabbit, Bioss, USA), p62 (1:200, bs-55207R, rabbit, Bioss, USA), Beclin-1 (1:200, PA5-20171, Rabbit, Invitrogen, USA), beta-aktin (1:1000, rabbit, bs-0061R, Bioss, USA) primer antikorları ile gece boyunca 4 °C'de membranlar inkübe edilmiştir. Yıkamanın ardından 1 saat oda sıcaklığında HRP-konjuge-sekonder antikorlar (anti-rabbit 1:2000 oranında) ile inkübe edilmiştir. HRP Luminol/Enhancer ve Peroxide buffer (Abcam) blotlanan membranlara 5 dakika boyunca kemilüminesans (ab133406, Abcam) uygulanmıştır²⁷. Western blot bantları jel belgeleme sistemi (UVP) ile görselleştirilmiş ve bant yoğunlukları IMAGE J Versiyon 1.46 (NIH) ile değerlendirilmiştir.

Biyostatistiksel Analiz

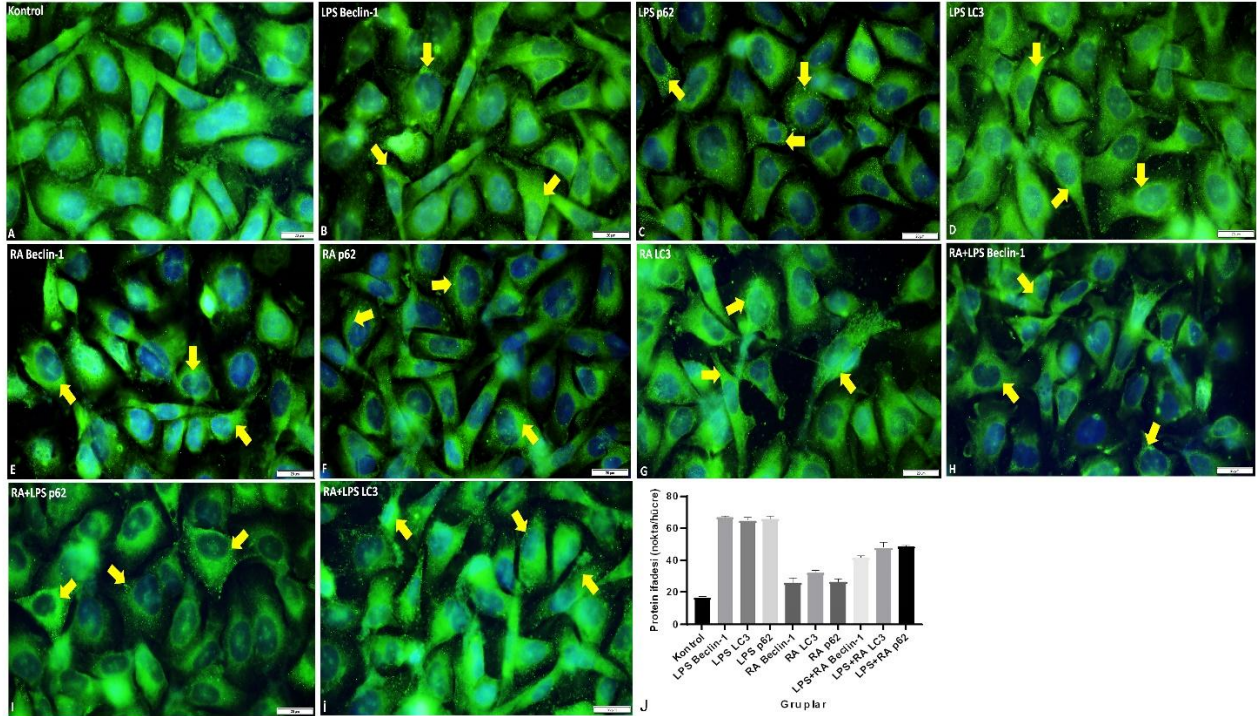
Western blot analiz sonrası band yoğunlukları ve gruplar arası karşılaştırmalar Image J analiz programı kullanılarak analiz edilmiştir. İmmüno floresans sonuçlarının analizi GraphPad Prism version 8.4.2. programında One-way Brown-Forsythe testi uygulanarak belirlendi. Tüm grupların tanımlayıcı istatistiksel ANOVA değerleri yapılmıştır. Western blot analiz sonuçları GraphPad Prism version 8.4.2. programında One-way ANOVA Tukey'nin çoklu karşılaştırma testinde analizi yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi p<0,05 olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

İmmüno floresans analizlerine göre LPS gruplarında otofajik yollardaki önemli belirteçlerden Beclin-1, p62 ve LCB proteinleri sitoplazmada ve perinükleer alanlarda yoğun olarak görülmüştür. Kontrol grubu ile LPS, RA ve LPS+RA grupları arasında Beclin-1, p62 ve LC3 protein ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (p<0,0001). LPS grubunda Beclin-1, p62, LC3 protein ifadelerinde artış tespit edilmiştir. RA grubundaki Beclin-1, p62, LC3 protein ifadelerinde azalma ve her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (p<0,0001). Beclin-1, p62, LC3 proteinleri RA grubunda yüksek düzeyde ifade edilmiştir. RA grubu, LPS+RA grubu ile karşılaştırıldığında proteinlerin ifadesinde azalma görülmüştür ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p<0,0001) (Şekil 2). Hücre hasar oluşturulan LPS grubuna RA verildiğinde otofajik yolak proteinlerinde yıkım normal olarak gerçekleştiği için protein ifade düzeylerinde azalma gözlenmiştir. RA gruplarındaki her üç proteinin kontrol grubuna göre protein ifadelerinde azalma görülmüştür.

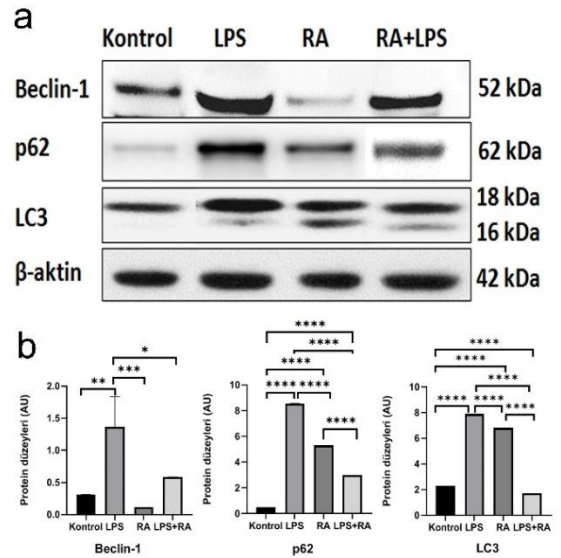
LPS Beclin-1 ile LPS LC3 ($p=0,9375$), LPS Beclin-1 ile LPS p62 ($p=0,9986$), LPS LC3 ile LPS p62 ($p=0,9999$), RA Beclin-1 ile RA p62 ($p=0,9999$), RA LC3 ile RA p62 ($p=0,0573$) ve LPS+RA LC3 ile LPS+RA p62 ($p=0,9999$) grupları arasında protein ifadeleri açısından istatistiksel

olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Analiz sonuçlarımıza göre, hücresel hasar oluşturulan LPS grubuna verilen etken maddenin rejeneratif etkisi olduğu hem gözlemsel hem de istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir (Şekil 2).



Şekil 2. İmmüno Floresans analiz fotomikrografları. A) Kontrol, B) LPS Beclin-1 grubu, C) LPS p62 grubu, D) LPS LC3 grubu, E) RA Beclin-1 grubu, F) RA p62 grubu, G) RA LC3 grubu, H) LPS+RA Beclin-1 grubu, I) LPS+RA p62 grubu, J) LPS+RA LC3 grubu, J) Proteinlerin nokta/hücre oranları histogram grafiğinde verilmiştir. Hücrelerdeki protein ifadesi nokta/hücre şeklinde image j programında hesaplanmıştır. Gruplar arasındaki protein ifade düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Her grup 3 farklı alandan bağımsız şekilde değerlendirilmiştir. Sarı oklar protein ifadesinin yoğun olduğu alanları işaret etmektedir. (Olympus CKX41-büyütme 100x), Bar: 20 μ m.

Western blot analizinde bant yoğunlukları incelendiğinde özellikle LPS gruplarında Beclin-1, p62 ve LC3 proteinlerinin ifadelerinde artış belirlenmiştir. Hücresel hasar oluşturulan LPS grubunda otofaji yolağındaki bozukluklar sebebi ile hücrede Beclin-1, p62 ve LC3 proteinlerinin birikime yol açmıştır. Hücrelerdeki hasarı tamir etmek için rosmarinik asit verilen LPS+RA grubunda Beclin-1, p62 ve LC3 proteinlerinin ifadelerinde RA ve kontrol gruplarına göre artış saptanmıştır ($p<0,0001$). LPS+RA grubunda otofaji yolağındaki protein yıkımının düzelmesi sebebi ile jel bantlarında LPS grubuna göre daha az protein ifadesi gözlemlenmiştir (Şekil 3). Beclin-1 protein ifadesine bakıldığında, kontrol ile LPS ($p=0,0028$), LPS ile RA ($p=0,0009$) ve LPS ile LPS+RA ($p=0,0161$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Kontrol ile RA ($p=0,7327$), kontrol ile LPS+RA ($p=0,5313$) ve RA ile LPS+RA ($p=0,1456$) grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. LC3 ve p62 protein ifadeleri tüm gruplar içerisinde birbirleri ile karşılaştırıldığı istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir ($p<0,0001$) (Şekil 3).



Şekil 3. Western blot analizi. A) Beclin-1 (52 kDa), p62 (62 kDa), LC3 (18 kDa ve 16 kDa) ve beta-aktin (42 kDa) protein ifadeleri western blot analizinde gösterilmiştir. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır, image J programında jel yoğunlukları ölçülmüştür ve istatistiksel olarak GraphPad prism 8.4.2 programında değerlendirilmiştir. B) Protein düzeylerine (AU) ait histogram grafiği verilmiştir. Beclin-1 proteini (*LPS vs. RA, $p=0,0161$; **Kontrol vs. LPS; $p=0,0028$; ***LPS vs. RA, $p=0,0009$), p62 ve LC3 protein ifade düzeyleri gruplar arasında **** $p<0,0001$ olarak gösterilmiştir.

Tartışma

Kolorektal kanserin ilerlemesi inflamasyon ile yakından bağlantılıdır²⁸. Kolorektal kanser genellikle adenomatöz polipler adı verilen kanser öncesi büyümelerden kaynaklanır. Bu büyümeler, kolorektal sistemi kaplayan epitel hücrelerinde aşırı hücre çoğalmasına neden olur. Apoptozis gibi programlanmış hücre ölümünü bozan genetik mutasyonların birikmesi nedeniyle adenokarsinomaya kötü huylu dönüşüm geçirebilir²⁹. Kolorektal kanserin erken teşhisi hastaların klinik sonuçlarını önemli ölçüde iyileştirebilse de, ileri evre III veya evre IV hastalık tanısı konulanlar için 5 yıllık sağkalım oranı endişe verici derecede düşük kalmaya devam etmektedir³⁰.

CRC insidansı giderek artmaktadır ve dünya çapında en yaygın kanserlerden biri haline gelmiştir. Bu nedenle, kolonla ilişkili tümörlerin yıkıcı etkisini bastırmada etkili olacak maliyeti ucuz, doğal olarak oluşan bileşikler keşfetmek önemlidir. Bitkisel kökenli bileşiklerden biri olan RA, kanser önleme ve tedavisi için bir ajan olarak kullanılmak üzere çekici özelliklere sahiptir³¹. RA'nın özellikle fenolik bileşenlerinin, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla kolon kanseri ve diğer kanser türleri üzerinde koruyucu etkiler gösterdiği de bulunmuştur²².

Çalışmamızda, çeşitli bitkilerde bol miktarda bulunan polifenolik bir bileşik olan RA'nın, CRC hücrelerine karşı anti-kanser etkilerini güçlendirebileceğini gösterebilmek hedeflenmiştir. RA tedavisinin CRC hücre hattı Caco-2'de otofaji yolağındaki Beclin-1, p62 ve LC3 gibi önemli proteinlerin ifade düzeylerinde düzelme olduğunu tespit ettik. Bir çalışmada, RA'nın tümör oluşumu ve dolaşımdaki oksidan-antioksidan durumu üzerindeki etkisi değerlendirilerek, RA'nın azoksimetan (AOM) kaynaklı sıçan kolon karsinogenezisini önleme yeteneği araştırılmıştır ve çalışmamızla benzer sonuçlara ulaşmışlardır³¹.

Programlanmış hücre ölümü olan apoptozis, doku homeostazının korunmasında önemli bir rol oynar ve düzensizliği kanser gelişimi ve ilerlemesine neden olur. RA'nın diğer kanser tiplerindeki pro-apoptotik etkilerine ilişkin önceki yayınlarla tutarlı olarak^{28,32}, RA'nın sisplatin ile birlikte kolorektal kanser hücrelerinde apoptozu tetiklediğini, bunun da kaspazların ve pro-apoptotik protein Bax'ın aktivasyonu ve anti-apoptotik protein Bcl-2'nin ifadesinin düzenlenmesiyle kanıtlandığını son çalışmalarda gözlemlenildi. Bu bulgular, RA'nın içsel mitokondriyal yol aracılığıyla apoptozu indüklemekte önerilen mekanizma ile uyumlu olduğu bulunmuştur²⁹. RA, doğrudan sitotoksik etkilerinin yanı sıra tümör mikroçevresini düzenleyerek dolaylı antikanser etkileri de gösterebilir. Çok sayıda çalışma, RA'nın anti-inflamatuvar, antioksidan ve antianjiyojenik özelliklerini vurgulamıştır³³⁻³⁵, bu da tümör promoting faktör, oksidatif stres ve neovaskülarizasyonu baskılayarak anti-kanser aktivitesine potansiyel olarak katkıda bulunabilir. LPS, bakteriyel orijinli bir endotoksindir ve vücutta septik şoku etkilediği bilinmektedir. Bağışıklık hücreleri tarafından salgılanan önemli inflamatuvar olan Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α), İnterlökinler (IL-1 β , IL-6 ve IL-

10) ve pro- ve anti-inflamatuvar sitokinlerin LPS hasarında immün cevabın oluşturulmasına neden olduğu gösterilmiştir³⁶. Bir çalışmada, MTT testi kullanarak RA'nın MC38 hücreleri üzerindeki metastazı önleyici konsantrasyonu belirlenmiş ve RA 150 μ M'nin MC38 hücrelerinin göçünü ve invazyonunu önemli ölçüde engellediği ve bunun *in vitro* tümör metastaz inhibitörü olarak potansiyelini göstermişlerdir²⁸.

Karnosol (%1 diyet) kolorektal kanseri, bağırsak tümör çeşitliliğini azalttığı belirlenmiştir³⁷. Ursolik asit (%0,11 diyet) kolorektal adenom gelişiminin en erken öncülerinden biri olan anormal kript odaklarının ve özellikle tümör başlangıç evre insidansını azaltmıştır³⁸. Araştırılan diğer kanser türleri arasında meme, karaciğer ve cilt kanseri yer almaktadır. Biberiye özütü, karnosol ve UA meme tümörünün görülme sıklığını ve/veya çokluğunu azaltmıştır³⁹⁻⁴¹. Osakabe ve ark. tarafından bildirilen %68 RA içeren bir *Perilla frutescens* özütünün, iki aşamalı bir fare deri modelinde tümör oluşumunu belirgin şekilde azalttığını bildirmiştir⁴².

Otofaji, uzun ömürlü proteinlerin, sitozolik bileşenlerin veya hasarlı organellerin yenilenmesinde rol oynayan oldukça düzenli bir süreçtir⁴³. ROS'un ER stresini indüklemekteki rolüne ek olarak, Yang ve ark. tarafından gerçekleştirilen *in vivo* çalışmalar, bozulmuş otofajinin de ER stresine katkıda bulunduğunu ve otofaji restorasyonunun ER homeostazını iyileştirdiğini göstermiştir. Son veriler ayrıca hepatosit lipid birikiminin azalmış otofajik işlevle ilişkili olduğunu ileri sürmüştür; bu da otofaji'nin hepatositlerde lipid homeostazının düzenlenmesindeki rolünü göstermektedir. Mevcut çalışmada HepG2 hücrelerinin oleik asitle muamele edilmesiyle, LC3II, Beclin 1, ATG5 ve ATG7'nin protein ekspresyonunda azalma olduğu tespit edilmiştir⁴⁴. LC3II, otofagozomun karakterize edilmiş bileşenidir ve azalması, hepatositlerde lipid damlacıklarının birikmesine yol açabilecek olan otofagozom dönüşümünün azaldığını göstermektedir. Benzer şekilde, Beclin 1, otofaji sürecindeki anahtar genler ve otofaji aktivitesinin miktarını temsil etmektedir¹.

Çalışmamız RA'nın etkili bir şekilde kolon kanserinde hücrel otofaji yollarındaki defektleri iyileştirebileceğini ve engelleyebileceğini göstermektedir. LPS hasarı oluşturduğumuz Caco-2 hücre hasarında otofajik yıkımdaki etkisine karşı RA'nın rejeneratif etkisini tespit ettik. İmmüno Floresans analizinde LPS gruplarında otofajik yoldaki Beclin 1, p62 ve LC3 proteinlerinin yıkımındaki hasar sonucu, bu proteinlerin hücrenin sitoplazmasında ve perinükleer alanlarda yoğunlaştığını belirledik. LPS+RA verilen gruplarda protein degradasyonunda yıkımın geri dönüşürebilir etkilerini tespit ettik. Ek olarak, western blot analizi, immüno Floresans analizindeki sonuçlarımızı desteklemektedir ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,05$).

Sonuç olarak, bulgularımız RA'nın anti-kanser etkilerini güçlendirirken, kullanılan *in vitro* hücre modeli ile RA'nın otofajik yoldaki önemli proteinlerin degradasyonunda rejeneratif etkilerini olduğunu tespit ettik. *In vivo* ksenograft modelleri ve hasta kaynaklı organoidler

kullanılarak yapılacak gelecekteki çalışmalar, farklı ilaç kombinasyon yaklaşımının terapötik potansiyeli hakkında klinik açıdan daha anlamlı bilgiler sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Etik Standartlara Uygunluk

Etik onay gerekliliği bulunmamaktadır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek

Çalışmamız herhangi bir kurum ya da kuruluş tarafından maddi olarak desteklenmemiştir.

Yazar Katkısı

İÇ, EA: Çalışmanın fikrinin geliştirilmesi, hipotezin oluşturulması ve çalışma tasarımının hazırlanması; İÇ, EA: Materyal hazırlama, veri toplama ve analizinin gerçekleştirilmesi; İÇ: istatistiksel değerlendirme; İÇ: Makalenin ilk taslağının yazılması; İÇ, EA: Makalenin nihai halinin düzenlenmesi ve yayın sürecinin eleştirel değerlendirilmesi.

Kaynaklar

- Wang Y, Wang C, Zhong R, Wang L, Sun L. Research progress of DNA methylation in colorectal cancer (Review). *Mol Med Rep.* 2024;30(3):154. doi:10.3892/mmr.2024.13278
- Jain SM, Nagainallur Ravichandran S, Murali Kumar M, et al. Understanding the molecular mechanism responsible for developing therapeutic radiation-induced radioresistance of rectal cancer and improving the clinical outcomes of radiotherapy - A review. *Cancer Biol Ther.* 2024;25(1):2317999. doi:10.1080/15384047.2024.2317999
- Argilés G, Tabernero J, Labianca R, Hochhauser D, Salazar R, Iveson T, Laurent-Puig P, Quirke P, Yoshino T, Taieb J, Martinelli E, Arnold D; ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2020;31(10):1291-1305. doi:10.1016/j.annonc.2020.06.022
- Fasano M, Pirozzi M, Miceli CC, et al. TGF- β Modulated Pathways in Colorectal Cancer: New Potential Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci.* 2024;25(13):7400. doi:10.3390/ijms25137400
- Deshaias RJ. Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy. *BMC Biol.* 2014;12:94. doi:10.1186/s12915-014-0094-0
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science.* 2013;339(6127):1546-58. doi:10.1126/science.1235122
- Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell.* 2009;136(5):823-37. doi:10.1016/j.cell.2009.02.024
- Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* 2015;34(7):856-80. doi:10.15252/embj.201490784
- Levy JM, Thorburn A. Targeting autophagy during cancer therapy to improve clinical outcomes. *Pharmacol Ther.* 2011;131(1):130-41. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.03.009
- Fu Q, Jiang Y, Zhang D, Liu X, Guo J, Zhao J. Valosin-containing protein (VCP) promotes the growth, invasion, and metastasis of colorectal cancer through activation of STAT3 signaling. *Mol Cell Biochem.* 2016;418(1-2):189-98. doi:10.1007/s11010-016-2746-6
- D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019;43(6):582-592. doi:10.1002/cbin.11137
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000;19(21):5720-8. doi:10.1093/emboj/19.21.5720
- Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(12):2503-18. doi:10.1016/j.biocel.2004.05.009
- Cayli S, Sahin C, Sancı TO, Nakkas H. Inhibition of p97/VCP function leads to defective autophagosome maturation, cell cycle arrest and apoptosis in mouse Sertoli cells. *Theriogenology.* 2020;158:196-206. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.09.017
- Ji CH, Kwon YT. Crosstalk and Interplay between the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Mol Cells.* 2017;40(7):441-449. doi:10.14348/molcells.2017.0115
- Kwon YT, Ciechanover A. The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends Biochem Sci.* 2017;42(11):873-886. doi:10.1016/j.tibs.2017.09.002
- Ciechanover A. The unravelling of the ubiquitin system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(5):322-4. doi:10.1038/nrm3982
- Vega-Rubín-de-Celis S. The Role of Beclin 1-Dependent Autophagy in Cancer. *Biology (Basel).* 2019;9(1):4. doi:10.3390/biology9010004
- Li W, Zhang L. Regulation of ATG and Autophagy Initiation. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1206:41-65. doi:10.1007/978-981-15-0602-4_2
- Nakkas H, Ocal BG, Kipel S, et al. Ubiquitin proteasome system and autophagy associated proteins in human testicular tumors. *Tissue Cell.* 2021;71:101513. doi:10.1016/j.tice.2021.101513
- Tran S, Fairlie WD, Lee EF. BECLIN1: Protein Structure, Function and Regulation. *Cells.* 2021;10(6):1522. doi:10.3390/cells10061522
- Ngo SN, Williams DB, Head RJ. Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011;51(10):946-54. doi:10.1080/10408398.2010.490883. PMID: 21955093
- Öztürk Küp F, Koçak B, Akın AT, et al. Lipopolisakkarit'in neden olduğu bağırsak toksisitesine karşı biyosentetik gümüş nanopartiküllerin etkisi. *Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi.* 2020;77(3):333-342.
- Liu Y, Xu X, Tang H, Pan Y, Hu B, Huang G. Rosmarinic acid inhibits cell proliferation, migration, and invasion and induces apoptosis in human glioma cells. *Int J Mol Med.* 2021;47(5):67. doi:10.3892/ijmm.2021.4900
- Woottisin N, Sukprasert S, Kulsirirat T, Tharavanij T, Sathirakul K. Evaluation of the Intestinal Permeability of Rosmarinic Acid from Thunbergia laurifolia Leaf Water Extract in a Caco-2 Cell Model. *Molecules.* 2022;27(12):3884. doi:10.3390/molecules27123884
- Lin TY, Fan CW, Maa MC, Leu TH. Lipopolysaccharide-promoted proliferation of Caco-2 cells is mediated by c-Src

- induction and ERK activation. *Biomedicine (Taipei)*. 2015;5(1):5. doi:10.7603/s40681-015-0005-x
27. Cayli S, Alimogullari E, Piskin I, Bilginoglu A, Nakkas H. Effect of pioglitazone on the expression of ubiquitin proteasome system and autophagic proteins in rat pancreas with metabolic syndrome. *J Mol Histol*. 2021;52(5):929-942. doi:10.1007/s10735-021-10013-1
 28. Liu H, Deng R, Zhu CW, et al. Rosmarinic acid in combination with ginsenoside Rg1 suppresses colon cancer metastasis via co-inhibition of COX-2 and PD1/PD-L1 signaling axis. *Acta Pharmacol Sin*. 2024;45(1):193-208. doi:10.1038/s41401-023-01158-8
 29. Huang JY, Hsu TW, Chen YR, Kao SH. Rosmarinic Acid Potentiates Cytotoxicity of Cisplatin against Colorectal Cancer Cells by Enhancing Apoptotic and Ferroptosis. *Life (Basel)*. 2024;14(8):1017. doi:10.3390/life14081017
 30. Siegel RL, Miller KD, Sauer AG, Fedewa SA. Colorectal Cancer Statistics, 2020. 2020;70(3):145-164. doi:10.3322/caac.21601
 31. İlhan N, Bektas I, Susam S, Ozercan IH. Protective effects of rosmarinic acid against azoxymethane-induced colorectal cancer in rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2022;36(2):e22961. doi:10.1002/jbt.22961
 32. Messeha SS, Zarmouh NO, Asiri A, Soliman KFA. Rosmarinic acid-induced apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells. *Eur J Pharmacol*. 2020;885:173419. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173419
 33. Jin BR, Chung KS, Hwang S, et al. Rosmarinic acid represses colitis-associated colon cancer: A pivotal involvement of the TLR4-mediated NF-κB-STAT3 axis. *Neoplasia*. 2021;23(6):561-573. doi:10.1016/j.neo.2021.05.002
 34. Pagano K, Tomaselli S, Molinari H, Ragona L. Natural Compounds as Inhibitors of Aβ Peptide Aggregation: Chemical Requirements and Molecular Mechanisms. *Front Neurosci*. 2020;14:619667. doi:10.3389/fnins.2020.619667
 35. Cao W, Mo K, Wei S, Lan X, Zhang W, Jiang W. Effects of rosmarinic acid on immunoregulatory activity and hepatocellular carcinoma cell apoptosis in H22 tumor-bearing mice. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2019;23(6):501-508. doi:10.4196/kjpp.2019.23.6.501
 36. Doğanyığıt Z, Kıp FÖ, Silici S, Deniz K, Yakan B, Atayoglu T. Protective effects of propolis on female rats' histopathological, biochemical and genotoxic changes during LPS induced endotoxemia. *Phytomedicine*. 2013;20(7):632-9. doi:10.1016/j.phymed.2013.01.010
 37. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T. Anti-Carcinogenic Effects of Carnosol-An Updated Review. *Curr Drug Discov Technol*. 2018;15(1):32-40. doi:10.2174/1570163814666170413121732
 38. Andersson D, Cheng Y, Duan RD. Ursolic acid inhibits the formation of aberrant crypt foci and affects colonic sphingomyelin hydrolyzing enzymes in azoxymethane-treated rats. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008;134(1):101-7. doi:10.1007/s00432-007-0255-4
 39. Singletary KW, Nelshopp JM. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced mammary tumorigenesis and of in vivo formation of mammary DMBA-DNA adducts by rosemary extract. *Cancer Lett*. 1991;60(2):169-75. doi:10.1016/0304-3835(91)90224-6
 40. Singletary K, MacDonald C, Wallig M. Inhibition by rosemary and carnosol of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation. *Cancer Lett*. 1996;104(1):43-8. doi:10.1016/0304-3835(96)04227-9
 41. Amagase H, Sakamoto K, Segal ER, Milner JA. Dietary rosemary suppresses 7,12-dimethylbenz(a)anthracene binding to rat mammary cell DNA. *J Nutr*. 1996;126(5):1475-80. doi:10.1093/jn/126.5.1475
 42. Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Yoshikawa T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of Perilla frutescens extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*. 2004;25(4):549-57. doi:10.1093/carcin/bgh034
 43. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*. 2005;12 Suppl 2(Suppl 2):1542-52. doi:10.1038/sj.cdd.4401765
 44. Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab*. 2010;11(6):467-78. doi:10.1016/j.cmet.2010.04.005