



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Gossypinin insan hepatom (Hep-3B) hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisi

Antiproliferative effect of gossypin on human hepatoma (Hep-3B) cells

İrfan Çınar¹, Muhammed Yayla¹, Damla Binnetoğlu¹

¹Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Kars, Turkey

Cukurova Medical Journal 2020;45(3):1165-1172

Abstract

Purpose: The aim of this study was to demonstrate the antiproliferative effects of Gossypin which has antioxidant, anti-inflammatory, analgesic and anti-cancer properties on human hepatoma (Hep-3B) cells isolated from *Hibiscus vitifolius*.

Materials and Methods: Hep-3B Cell Lines American Type Culture Collection (ATCC, USA) was provided in our study. The cells were exposed to different concentrations (5-100 µg/ml) of gossypin and cisplatin (50µM) as positive control. Afterwards, viability analysis was performed with MTT method on the cells at 24, 48 and 72 hours. Hoechst fluorescent staining was performed for indication of apoptosis in cells. At the same time, RT-PCR and NFκB, caspase 3 and 9 mRNA expression levels were examined.

Results: Gossypin administration prevented cell proliferation due to dose and time. In the first 24 hours, only 100µg/ml dose was effective, while in 48 and 72 hours it was effective depending on the dose. With Hoechst fluorescent staining, gossypin showed nearly the same effect as the cisplatin group, with doses of 50 and 100 µg/ml seen to lead the cells to more apoptosis. Gossypin, which inhibits dose dependent NFκB mRNA expression, has also up regulated dose dependent the apoptotic proteins mRNA expression of caspase 3 and 9.

Conclusion: Gossypin showed a close effect with cisplatin on Hep-3B cells depending on the dose. These effects were demonstrated by activating apoptosis and inhibiting NFκB. Based on this, gossypin may be a potential anticancer agent in the future for the treatment of liver cancer.

Keywords: Gossypin, cancer, hepatom, apoptosis

Öz

Amaç: Çalışmamızda *Hibiscus vitifolius*'dan izole edilen ve antioksidan, antienflamatuar, analjezik ve anti kanser özelliklere sahip olan gossypinin Hep-3B hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkilerini göstermeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda Hep-3B hücre hatları American Type Culture Collection (ATCC, USA) temin edilmiştir. Hücreler farklı konsantrasyonlarda (5-100 µg/ml) gossypin ve pozitif kontrol olarak da sisplatin (50µM) maruz bırakılmışlardır. Sonrasında 24, 48 ve 72 saatlerde hücrelere (MTT) yöntemi ile canlılık analizi yapılmıştır. Hücrelerdeki apoptozun göstergesi için Hoechst floresan boyama yapıldı. Aynı zamanda RT-PCR ile Nükleer kappa B (NFκB), kaspaz 3 ve 9 mRNA ekspresyon düzeyleri incelendi.

Bulgular: Çalışmamızda gossypin uygulaması doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu önlemiştir. İlk 24 saatte sadece 100µg/ml dozunda etki gösterirken 48 ve 72. saatlerde ise doza bağlı olarak etkisini göstermiştir. Hoechst floresan boyama ile gossypin 50 ve 100 µg/ml dozunda hücreleri daha belirgin apoptoza götürdüğü görüldükçe sisplatin grubu ile neredeyse aynı etkiyi ortaya koymuştur. NFκB mRNA ekspresyonunu doza bağlı inhibe eden gossypin, aynı zamanda apoptotik protein olan kaspaz 3 ve 9'un mRNA ekspresyonlarını doza bağlı olarak indüklemiştir.

Sonuç: Gossypin doza bağlı olarak Hep-3B hücreleri üzerinde sisplatin ile yakın bir etki ortaya koymuştur. Bu etkilerini ise apoptozu aktive ederek ve NFκB inhibisyonu yaparak ortaya koymuştur. Buradan yola çıkarak karaciğer kanserinin tedavisinde gossypinin gelecekte potansiyel bir antikanser ajan olabilir.

Anahtar kelimeler: Gossypin, kanser, hepatom, apoptoz

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. İrfan Çınar, Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Kars E-mail: atairfan.nar@gmail.com

Geliş tarihi/Received: 06.05.2020 Kabul tarihi/Accepted: 01.07.2020 Çevrimiçi yayın/Published online: 31.08.2020

GİRİŞ

Hepatosellüler karsinom (HCC) karaciğerin en yaygın görülen primer maling kanser türüdür^{1,2}. Dünya genelinde karaciğer kanserinin görülme sıklığı % 4,7 iken kansere bağlı ölümler arasında 2. sırada yer almaktadır^{1,2}. Hepatit B virüsü (HBV) veya hepatit C virüsü (HCV), aflatoksinle kontamine olmuş gıda maddeleri, yüksek alkol tüketimi, obezite, sigara tüketimi ve tip 2 diyabet ile HCC'nin ilişkisine yönelik pek çok çalışmada kanserin görülme sıklığını artabileceği ifade edilmiştir³. HCC özellikle damarlanma bakımından zengin bir ağa sahip olması, agresif büyüme potansiyeli, metastaz sıklığının fazla olması ve aynı zamanda heterojen olmasından dolayı hastalardaki sağ kalım oranları oldukça düşüktür.

Hepatosellüler karsinom tedavisinde Doksorubisin, Sisplatin ve 5-Flourourasil gibi sitotoksik ajanlar ve Sorafenib, Lenvatinib ve Regorafanib gibi molekül spesifik antikorlar da kullanılmaktadır^{4,5}. Ancak gerek klinik gerekse de prelinik olarak görülmektedir ki Hepatosellüler karsinom tedavisinde kullanılan kemoterapötikler oldukça fazla yan etkileri ve aynı zamanda sağlıklı hücrelere olan sitotoksik etkilerine bağlı gelişen organ hasarlarına yol açmaları nedeni ile tedaviye yanıtı zorlaştırmaktadır⁶. Bu yüzden her sene 600,000'den fazla yeni vaka teşhis edilen ve henüz tam olarak tedavi edilemeyen karaciğer kanserine yönelik yapılan bilimsel çalışmalar oldukça önem arz etmektedir.

Gossypin *Hibiscus vitifolius*'den elde edilen doğal bir flavonoiddir (3,5,8,3',4'-pentahydroxy-7-O-glucosyl flavone). Geleneksel olarak diyabet tedavisinde, inflamasyonun ve ağrının giderilmesinde faydalı etkileri olduğu bilinmektedir⁷⁻¹⁰. Gossypin hakkında literatürde çok az çalışma bulunmaktadır. Önceki yapılan çalışmalarda gossypinin güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin olduğu gösterilmiştir^{11,12,13,14}. Konumuzla ilgili olarak yapılan çalışmalarda gossypinin gastrik kanser, melanoma ve gliom gibi kanser türleri üzerindeki antiproliferatif etkinliğinin gösterilmesi çalışmamıza ışık tutmuştur. Bizde çalışmamızda gossypinin insan hepatosellüler karsinom hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkisini ortaya koyarak, bu etkisini muhtemel mekanizmalar üzerinden açıklamaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hep 3B hücre hatları AmericanType Culture Collection (ATCC, USA) temin edilmiştir. Hücre

kültüründe yapmış olduğumuz çalışmamızda hücre hattı kullanıldığı için Etik Kurul başvurusu gerekmemektedir.

Sıvı nitrojen tankında Cryotube de bulunan hücre hatları tanktan çıkartılarak su banyosunda 37° C de kısa bir süre çözünmesi için bekletildiler. Çözünen hücreleri T75 cm² olan flasklara alındı. 48 saat sonra Hep 3B hücreleri % 10 FBS içeren DMEM'de 2x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde sayım yapıldı (Cedex hücre sayım cihazında miktarı belirlendikten sonra) 96 kuyucuklu plakalara ekilerek % 5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde 37°C'de inkübe edilmişlerdir. 24 saat sonra, hücreler farklı konsantrasyonlarda (5-100 µg/ml) gossypine (Sigma Aldrich'ten saf olarak temin edilmiştir.) ve pozitif kontrol olarak da sispilatine (50µM) maruz bırakılmışlardır. Sonrasında 24, 48 ve 72 saatlerde hücrelere 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole MTT yöntemi uygulandıktan sonra mikropalak okuyucu spektrofotometre (Epoch Micro plate Spectrophotometer, BioTek, USA) ile 570 nm absorpsiyon değerinde ölçümleri 3 tekrarlı olarak yapıldı. Canlılık oranları kontrol kuyucukları ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir.

İşlem

Gen ekspresyonlarının belirlenmesi

Hücreler 6-kuyucuklu plaklara 2x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve 37°C de % 5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübe edildi. İlaç uygulaması yapıldıktan 6 saat sonra hücreler tripsinizasyon yöntemi ile 6'lı kuyucuklu plaklardan kaldırılarak TissueLyser II (Qiagen) cihazında ((1*10⁵ hücreye 350 µl RLT buffer koyularak) homojenize edildi ve QIACube RNA izolasyon cihazında RNA ekstraksiyonu üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde sürdürüldü.

Revers transkriptaz reaksiyonu ve cDNA sentezi

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit enzimi kullanımı ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. Her reaksiyon 10 µl RNA ile gerçekleştirilerek cDNA sentezi aşağıdaki sıcaklık değerlerine göre Veriti 96 WellThermalCycler (AppliedBiosystem) ile sağlandı. cDNA miktarı nanodropspektrofotometri (EPOCH Take3 Plate, Biotek) ile ölçüm belirlendi ve -20°C'de saklandı.

cDNA sentez reaksiyonu:

total RNA	10 µl
10 X RT Buffer	2 µl

25 X dNTPs mix	0.8µl
10 X RT RandomPrimers	2 µl
MultiScribeReverseTranscriptase	1 µl
DEPC-H2O	4.2µl

Real time PCR ile mRNA ekspresyonlarının kantitatif olarak belirlenmesi

Caspas-3 (Hs00234387_m1) (F: TGTA GAAA TGAT GATG TGGG AGAAC R: GCAG TTAA GTCA TCCG TGTA TATC), Caspase-9 (Hs00962278_m1) (F: CCAG TGAC AGAC AGGC TCTTA R: GCAA TCCA CGGC ATTC ATCT) ve NF-kB (Hs01042014_m1) (F: GTAA CTGC TGGG CCCA AGGA R: CCTC TGTC ATTC GTGC TTCC) mRNA ekspresyonu, Taq Man Gene Expression Master Mix kiti kullanılarak kantifiye edildi. Amplifikasyon ve kantifikasyon işlemi StepOne Plus Real Time PCR System (AppliedBiosystems) cihazında yapıldı. Referans gen olarak β -actin (Hs01060665_g1) kullanıldı. 200 ng cDNA için tablo halinde aşağıda verilen TaqMan® Gene Expression Assays'ler yine aşağıda gösterildiği gibi pipetlendi ve 40 siklus yürütüldü. Ct değerleri cihazda otomatik olarak delta-delta Ct'ye çevrildi ve çalışmalarımız sonucunda elde edilen bulgular istatistiksel olarak IBM SPSS 20.0 paket programında değerlendirildi.

Pipetleme:

cDNA (200 ng)	X µl
TaqMan Master Mix	10 µl
Assay	1 µl

RNasefree H2O ile 20 µl'e tamamlandı.

Florasın boyama (Hoechst 33342)

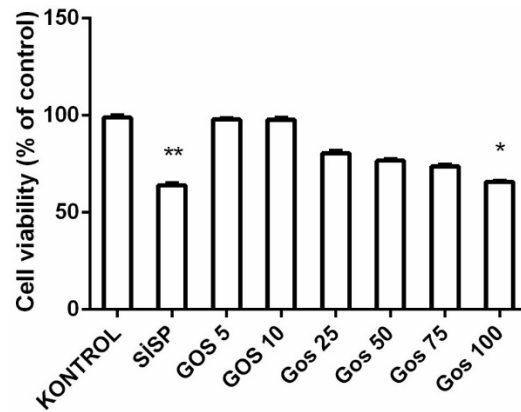
Tripsin yardımı ile 75 cm²lik flastan hücreler kaldırılarak sayımı yapıldı. Her bir kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde hesaplama yapıldı. 96 kuyucuklu pleytlere 24 saat için 3 tekrar olacak şekilde ekimleri yapıldı. 24 saat sonra gossypin ve sisplatin uygulandı. Hoechst boyası hazırlandı. Hoechst ana stoktan 5 µg/ml olacak şekilde hesaplanarak uygulama için hazırlandı. Uygulamadan 48 saat sonra kuyucukların medyumları çekildi ve PBS ile kuyucuklar yıkandı. Hoechst (5 µg/ml) boyası uygulandı.30 dk karanlıkta inkübe edildi. Florasan mikroskobu (Leica, DMIL LED) ile görüntülendi.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz için tüm veriler IBM SPSS 25.00 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ortalama±standart sapma olarak gösterildi. Verilerin normal dağılıma uyduğu kolmogorov-simirnov testi ile gösterilmiştir (p>0,05). Çalışmamızdaki gruplar bağımsız örnekler olduğu için ve normal dağılıma uyduğu için gruplar arasındaki anlamlılığı değerlendirmek için tek yönlü varyans analizi (One Way Anova) testi kullanıldı, post hoc test olarak ise Dunnett testi ile yapıldı. (Bağımsız örnekler; Çalışmanın grupları, Değişkenler; çalışmamızda elde ettiğimiz veriler Kaspaz 3, Kaspaz 9, NFkB, MTT analizleri) P<0.05 önemli olarak kabul edildi. * kontrole göre kıyaslama (*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001)

BULGULAR

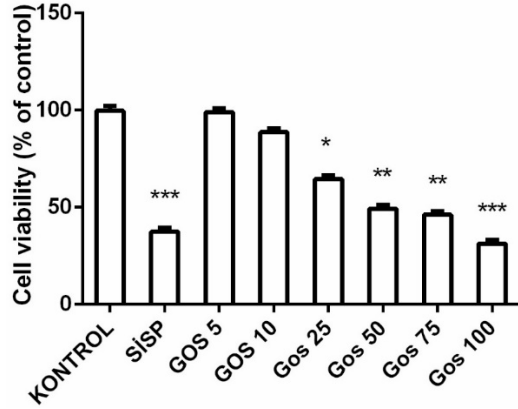
HEP3B hücre hattı üzerinde Gossypinin antiproliferatif etkinliğinin göstermek için 24, 48 ve 72. saatlerde gossypin ve sisplatin uygulanan hücreler MTT hücre canlılığı analizi ile değerlendirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan gossypin ilk 24 saat içerisinde sadece 100 µg/ml dozunda anlamlı bir sitotoksik etki gösterirken sisplatin aynı etki ortaya koymuştur (Şekil 1).



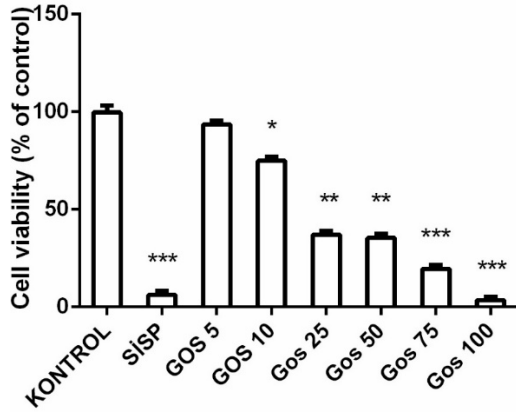
Şekil 1. Gossypin'in hücre canlılığı üzerine etkisi.

Hep-3B hücreleri 24,saat boyunca farklı konsantrasyonlarda gossypin (5-100 µg/ml) ile muamele edildi ve hücre canlılığı MTT analizleriyle tespit edilerek sonuçlar, nispi hücre canlılığı (%) olarak rapor edildi. Tüm veriler % 100 olarak kabul edilen kontrol grubuna göre normalleştirildi. * kontrole göre kıyaslama (*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001)

48.saat ölçümlerinde ise gossypin 25, 50, 75 ve 100 µg/ml dozlarında kontrol grubuna göre kıyasla anlamlı bir antiproliferatif etki ortaya koymuştur. Bu etki doza bağlı olarak artmaktadır (Şekil 2). 72.saat ölçümlerinde ise 100 µg/ml gossypin ve sisplatin % 90 üzerinde bir sitotoksik etki gösterirken, 10, 25, 50 ve 75 µg/ml dozlarında da artan bir antiproliferatif etki görülmektedir (Şekil 3).



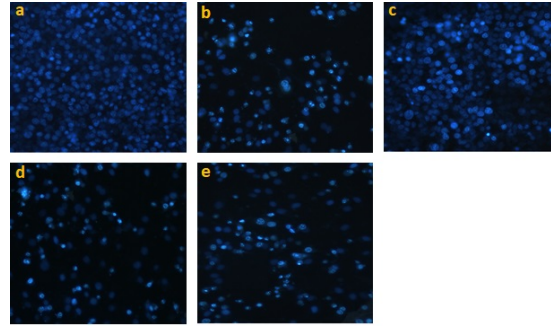
Şekil 2. Gossypin'in hücre canlılığı üzerine etkisi. Hep-3B hücreleri 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda gossypin (5-100 µg/ml) ile muamele edildi ve hücre canlılığı MTT analizleriyle tespit edilerek sonuçlar, nispi hücre canlılığı (%) olarak rapor edildi. Tüm veriler % 100 olarak kabul edilen kontrol grubuna göre normalleştirildi. * kontrole göre kıyaslama (*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001).



Şekil 3. Gossypin'in hücre canlılığı üzerine etkisi. Hep-3B hücreleri 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda gossypin (5-100 µg/ml) ile muamele edildi ve hücre canlılığı MTT analizleriyle tespit edilerek sonuçlar, nispi hücre canlılığı (%) olarak rapor edildi. Tüm veriler % 100 olarak kabul edilen kontrol grubuna göre normalleştirildi. * kontrole göre kıyaslama (*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001)

Gossypin 5 µg/ml dozunda herhangi bir sitotoksik etki göstermemiştir. Gossypin doz ve zamana bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sitotoksik etki göstermiştir. Bu durumda çalışmamızın floresan ve moleküler analizleri için gossypinin 25, 50 ve 100 µg/ml dozları kullanılmıştır.

Çalışmamızda gossypinin ortaya koyduğu antiproliferatif etkinin mekanizmasını göstermeye yönelik gerçekleştirdiğimiz Hoechst floresan boyama ile apoptotik hücrelerin varlığı gösterilmiştir (Şekil 4). Kontrol grubunda apoptotik hücrelere rastlanmazken sisplatin uygulanan gruplarda apoptotik hücre yoğunluğu görülmektedir (Şekil 4 a,b). Gossypin uygulanan gruplarda ise doza bağlı olarak apoptotik hücre yoğunluğunun arttığı görülmektedir (Şekil 4 c,d,e).

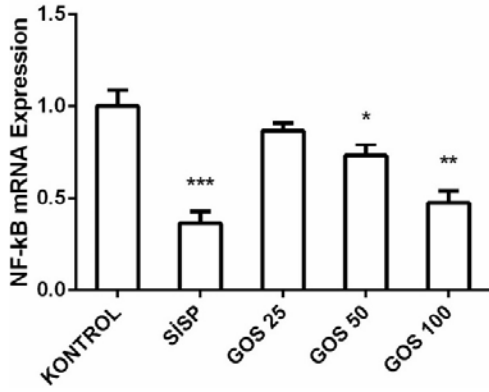


Şekil 4. Hücre ölümünü / apoptozu doğrulamak için floresan görüntüleme.

Hücreler, 48 saat boyunca 25, 50 ve 100 µg/ml gossypin ve 50µM sisplatin ile muamele edildi ve daha sonra Hoechst 33342 boyası ile boyandı, ardından floresan mikroskobu kullanılarak görselleştirildi. Resimler Hoechst 33342 boya lekelemesini göstermektedir. Büyütme 100 ×.

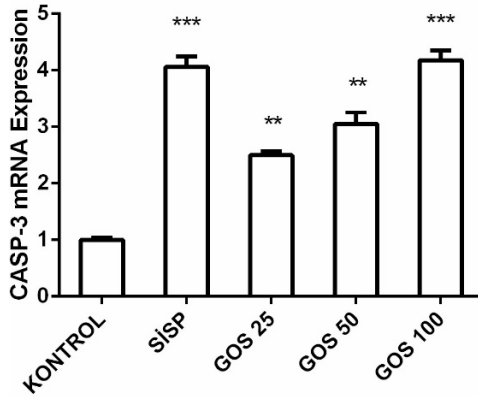
Çalışmamızda gossypinin HEP3B hepatosellüler karsinom hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini hangi mekanizmalar ile ortaya koyduğunu göstermek için kanser hücrelerinin proliferasyonunda önemli rolleri olan genleri ekspresyon düzeyinde inceledik. NFκB mRNA ekspresyonu sisplatin uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma göstermiştir (Şekil 5). Farklı dozlarda uyguladığımız Gossypinin NFκB mRNA üzerindeki etkisi ise doza bağlı olarak inhibe etmektedir (Şekil 5). Hücre canlılığını artıran önemli genlerden NFκB ekspresyonunun gossypin uygulamasına bağlı azalması gossypinin sitotoksik etkisini açıklamaktadır. Apoptik genler olan kaspaz 3 ve 9 mRNA ekspresyonları incelendiğinde gossypin doza bağlı

olarak hem kaspaz 3 hem de kaspaz 9 mRNA ekspresyonlarında artışa yol açarak antiproliferatif etki ortaya koymaktadır (Şekil 6,7). Aynı zamanda 100 µg/ml dozundaki artış ile sisplatin aynı etkiye sahiptir (Şekil 6,7).



Şekil 5. Tüm deney gruplarının 6 saatlik NFκB mRNA ekspresyon seviyeleri.

Hep 3B hücreleri 6 saat boyunca gossypin (0, 25, 50 ve 100 µg/ml) ve sisplatin 50 µM ile muamele edildi. * kontrole göre kıyaslama (*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001).



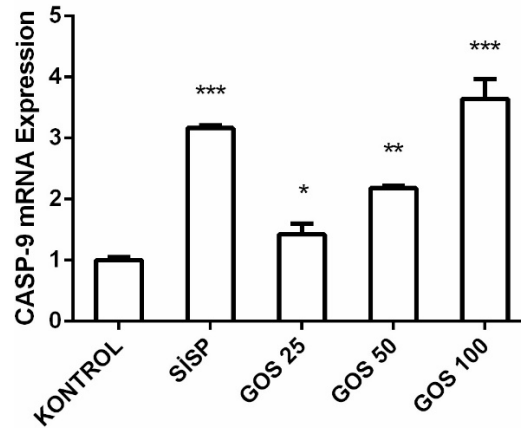
Şekil 6. Tüm deney gruplarının 6 saatlik kaspaz 3 mRNA ekspresyon seviyeleri.

Hep 3B hücreleri 6 saat boyunca gossypin (0, 25, 50 ve 100 µg/ml) ve sisplatin 50 µM ile muamele edildi. * kontrole göre kıyaslama (*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001).

TARTIŞMA

Çalışmamızda gossypinin doza ve zamana bağlı olarak insan hepatosellüler karsinom hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisini gösterdik. Aynı zamanda gossypinin Hep3B hücrelerinde apoptozisi

indükleyerek bu etkisini ortaya koyduğunu gösterdik. Dünya Sağlık Örgütü kanseri ölüme neden olan hastalıklar arasında birinci sırada göstermiştir. Aşırı hızlı bir şekilde yayılan kanserin tedavisi de oldukça zordur. Agresif bir yayılım gösteren HCC, 2019 yılında yapılan çalışmalar sonucunda dünyada ki kanser türleri arasında en sık tanı konan altıncı kanser türü olup kanserlere bağlı gelişen ölümlerde ise ikinci sırada yer almaktadır^{1,2}.



Şekil 7. Tüm deney gruplarının 6 saatlik kaspaz 9 mRNA ekspresyon seviyeleri.

Hep 3B hücreleri 6 saat boyunca gossypin (0, 25, 50 ve 100 µg/ml) ve sisplatin 50 µM ile muamele edildi. * kontrole göre kıyaslama (*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001).

Kemoterapi kanserin standart tedavisi olup bunula birlikte radyoterapi ve cerrahi olarak kanserli dokunun alınması ve ayrıca keser aşırı, ve gen terapileri de giderek yaygınlaşmaya başlamıştır. Kanser tedavi stratejilerindeki ortak amaç tümörün büyümesini kontrol altına alarak yok edilmesini sağlamaktır. Ancak bu süreçte uygulanan tedavi stratejileri aynı zamanda yan etkileri ve diğer organ hasarlarını da beraberinde getirmektedir^{15,16}. Bu yüzden günümüzde kanserin tedavisinde alternatif olarak bitkisel kaynaklı bileşiklerin tedavi yaklaşımları araştırılmaktadır.

Henüz yeni bir flavoid olmasına rağmen potensi oldukça güçlü olan gossypin, yapılan çalışmalar ile bazı kanserli hücreler üzerinde antiproliferatif etkinlik göstermiştir¹⁷⁻¹⁹. Çalışmamızda gossypinin ilk kez Hep3B hepatosellüler karsinom hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisini, hücre proliferasyonu ve sitotoksite çalışmalarının en yaygın göstergesi olan MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) analizi ile gerçekleştirdik^{15,16}.

MTT ölçümünde tetrazolium kristalleri canlı hücrelerin mitokondrial redüktaz enzimi ile indirgenerek formazan kristallerine dönüşmektedir²⁰⁻²².

Hücre canlılığını takip etmek için 24, 48 ve 72 saat boyunca gossypinin farklı dozlarına maruz kalan Hep3B hücrelerinde zamana ve doza bağlı olarak hücre proliferasyonunda azalma görülmüştür. En güçlü etki 100 µg/ml dozunda görülürken 5µg/ml dozunda herhangi bir etki görülmemiştir. Ancak 100 µg/ml dozunda sisplatin ile aynı etkiye sahip olan gossypin neredeyse tüm hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. Gossypinin 25, 50 ve 75 µg/ml dozlarında da oldukça güçlü antiproliferatif etki ortaya koymuştur. Yeh ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada 17 farklı flavonoidin antiproliferatif etkinliği değerlendirilmiştir²³. Bu çalışmada gossypinin sadece 100 µM dozunda uygulanarak antiproliferatif etkisi gösterilmiş. Ancak bu çalışmada gossypin farklı dozlardaki etkisi ve bu etkisinin mekanizmasına yönelik herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Wang ve arkadaşlarının ortaya koyduğu bir çalışmada gossypinin gastrik kanser hücrelerinde oldukça güçlü antiproliferatif etki koyduğu görülmektedir¹⁹. Yine Shi ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada gossypinin insan malign gliom hücreleri üzerinde antiproliferatif etki gösterdiği kaydedilmiştir¹⁸. Her iki çalışmada da gossypin artan doz ve zamana bağlı olarak daha güçlü antiproliferatif etki göstermiştir.

Gossypinin ortaya koyduğu bu etkinin mekanizmasını anlamak için kanser gelişiminde rol alan apoptotik ve anti-apoptotik yolların iyi anlaşılması gerekmektedir. Çünkü kanserler, kendi kontrol mekanizması bozulmuş, apoptotik yollarını inaktive olmuş kontrolsüzce çoğalan hücrelerdir²⁴. Bu yüzden kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ya doğrudan sitotoksik etki ile ya da hücrenin moleküler olarak aktive olan veya inaktive olan genlerini uyarak etki göstermektedir. Apoptozis hücrenin kendini bakteri, virüs veya kanser gibi hastalıklardan organizmanın devamlılığını sağlamak için ortaya koyduğu programlanmış bir şekilde öldürmesidir^{25,26}. Hem içsel hem de dışsal apoptozisde temel olarak aktive olan son ürün kaspaz 3 proteini nükleaz inhibitörlerinin inaktivasyonuna yol açar bu sayede aktive olan nükleaz DNA'yı degrade ederek hücrenin kontrollü bir şekilde ölümüne yol açar²⁷⁻²⁹.

Çalışmamızda gossypin uygulamasına bağlı olarak Hep3B hücrelerinde kaspaz 3 ve kaspaz 9 genlerinin ekspresyonları incelendiğinde doza bağlı olarak hem

kaspaz 3 hem de kaspaz 9 gen ekspresyonlarının anlamlı şekilde arttığı görülmektedir. İçsel apoptozis mekanizmasında temel olarak p53 aktivasyonu sonucu mitokondri membranında por açılmasına yol açan BAX proteinleri aktive olur. Bu sayede mitokondrilerdeki sitokrom enzimleri sitoplazmaya geçerek kaspaz 9'u aktive eder, kaspaz 9 ise kaspaz 3 aktive ederek hücre ölümü için sinyal verilmiş olur^{30,31}. Çalışmamızda görüldüğü üzere gossypin hem kaspaz 3 hem de kaspaz 9 mRNA ekspresyonlarını anlamlı şekilde artırmıştır. Wang ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, gastrik kanserli hücreler üzerinde gossypin hem kaspaz 9 hem de kaspaz 3 proteinlerini artırarak apoptozisi indüklediği gösterilmiştir¹⁹. Aynı zamanda gossypin bu etkisini doza bağlı olarak artırdığı da gösterilmiştir.

NF-κB, inflamasyon ve kanser arasındaki bağlantıyı sağlayan önemli mediyatörler arasındadır. Kanserli dokularda NF-κB aktivitesi, proinflamatuvar sitokinlerin ortamda birikmesine yol açarak kanser gelişimine katkı sağlamaktadır. Aynı zamanda NF-κB antiapoptotik proteinler olan FLIP, c-IAP1/2, XIAP ve Bcl2'nin gen ekspresyonlarını indükleyerek kanserin apoptozise uğramasını önlemektedir. Aktive olan bu anti-apoptotik proteinler, kaspaz proteinlerini inhibe ederek etki göstermektedir. Çalışmamızda Hep3B hücrelerinde son olarak NF-κB gen ekspresyonlarını incelediğimizde, gossypin 25,50 ve 100 µg/ml dozlarında daha fazla inhibisyona yol açmıştır. Aynı zamanda sisplatin uygulanan grup ile 100 µg/ml dozunda uygulanan gossypin aynı oranda inhibisyona yol açmıştır. Kunnumakkara ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada farklı kanser hücrelerinde (kronik myeloid lökemi, embriyonik böbrek kanseri, akciğer adeno karsinomu, multiple myelom, mesane kanseri, pankreas kanseri) gossypinin antiproliferatif etkinliği araştırılmıştır³². Bu çalışmada özellikle gossypinin NF-κB inhibisyonu yaparak anti apoptotik proteinlerin aktive olmasını önlediği ve tümör proliferasyonunu önlediği gösterilmiştir. Çalışmamızda artan apoptotik ve azalan anti-apoptotik mRNA ekspresyonlarını aynı zamanda apoptozisin gerçekleştiğini gösteren Hoechst floresan boyama ile ortaya koyduk. Hoechst 33342 ile boyama, hücreleri sağlıklı mı, nekrotik mi yoksa apoptotik mi olduğunu anlamak için kullanılan ideal bir yöntemdir³³. Bilindiği üzere nekrozdaki farklı olarak apoptozis sırasında DNA ve nükleus fragmanları oluşmaktadır. İşte Hoechst 33342 bu yoğunlaşmış DNA ve fragmanlaşmış nükleus parçalarına bağlanarak görünür hale getirmektedir^{34,35}. Hui ve arkadaşlarının yapmış

oldukları bir çalışmada *Alpinia oxyphylla* bitkisinin HEP3B hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkilerini göstermişlerdir³⁶. Bu çalışmada Hoechst 33342 boyama kullanılarak apoptozisin varlığı gösterilmiştir. Çalışmamızın Hoechst 33342 boyama sonuçları incelendiğinde kontrol grubunda boyama görülmezken gossypin 25,50 ve 100 µg/ml uygulanan dozlarda anlamlı bir artış görülmektedir. Aynı zamanda cisplatin uygulanan grup ve 100 µg/ml dozunda uygulanan gossypinin apoptozise daha fazla yol açtığı görülmektedir.

Çalışmamız herhangi bir proje desteği olmadığı için daha ileri analizler gerçekleştirilememiştir. Çalışmamızın diğer bir kısıtlılığı deney hayvanlarında kanser çalışmalarını için yeterli donanıma sahip olmadığımız için sadece tek bir hücre üzerinde kültür ortamında bir etki ortaya koyduk ancak canlı organ ve sistemler düzeyinde incelemeler yapıldığında daha farklı sonuçlar ortaya çıkabilmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda, güçlü antioksidan ve anti-inflamatuar etkinliği olan ve aynı zamanda antikanser etkinliğe sahip olan gossypinin insan hepatosellüler karsinom hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkisini farklı moleküler mekanizmalar ile ortaya koyduk. Çalışmamız daha detaylı prelinik ve klinik çalışmalar ile desteklendiği takdirde gossypin gelecekte umut vaat edici bir antikanser ajan olarak kullanılabilir.

Yazar Katkıları: Çalışma konsepti/Tasarımı: İÇ; Veri toplama: DB, İÇ; Veri analizi ve yorumlama: İÇ, MY; Yazı taslağı: İÇ; İçeriğin eleştirel incelenmesi: DB; Son onay ve sorumluluk: İÇ, MY, DB; Teknik ve malzeme desteği: İÇ; Süpervizyon: İÇ, MY; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

Etik Onay: Çalışma hücre hattı kullanıldığı için Etik Kurul onayı gerekmektedir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Yazarın Notu: Bu çalışma 04 - 07 Kasım 2019 tarihleri arasında 25. Ulusal Farmakoloji Kongresinde sözlü olarak sunulmuştur.

Author Contributions: Concept/Design : İÇ; Data acquisition: DB, İÇ; Data analysis and interpretation: İÇ, MY; Drafting manuscript: İÇ; Critical revision of manuscript: DB; Final approval and accountability: İÇ, MY, DB; Technical or material support: İÇ; Supervision: İÇ, MY; Securing funding (if available): n/a.

Ethical Approval: Since the cell line was used in our study, the Ethics Committee approval is not required

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support

Acknowledgement: This study is presented as an oral presentation at the XVII. Çukurova Pediatrics Symposium, Çukurova Pediatrics Nursing and Dietitian Symposium. (21-22.02.2019, Adana)

KAYNAKLAR

1. Cai Z, Liu Q. Understanding the Global Cancer Statistics 2018: implications for cancer control. *Sci*

2. China Life Sci. 2019; doi:10.1007/s11427-019-9816-1.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68:394-424.
4. London WT, Petrick JL, KA. M. Liver cancer. In: *Cancer Epidemiology and Prevention*. 4th ed. (Eds Thun MJ LM, Cerhan JR, Haiman CA, Schottenfeld D):635-60. New York, Oxford University Press; 2018.
5. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:364-78.
6. Ju SM, Kang JG, Bae JS, Pae HO, Lyu YS, Jeon BH. The Flavonoid apigenin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity through reduction of p53 activation and promotion of pi3k/akt pathway in human renal proximal tubular epithelial cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;15:9.
7. Lavery HJ, Cooperberg MR. Clinically localized prostate cancer in 2017: A review of comparative effectiveness. *Urol Oncol.* 2017;35:40-1.
8. Vijayan P, Raghu C, Ashok G, Dhanaraj SA, Suresh B. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. *Indian J Med Res.* 2004;120:24-9.
9. Gautam P, Flora SJ. Oral supplementation of gossypin during lead exposure protects alteration in heme synthesis pathway and brain oxidative stress in rats. *Nutrition.* 2010;26:563-70.
10. Venkatesan T, Sorimuthu Pillai S. Antidiabetic activity of gossypin, a pentahydroxyflavone glucoside, in streptozotocin-induced experimental diabetes in rats. *J Diabetes.* 2012;4:41-6.
11. Viswanathan S, Sambantham PT, Reddy K, Kameswaran L. Gossypin-induced analgesia in mice. *Eur J Pharmacol.* 1984;98:289-91.
12. Yoon I, Lee KH, Cho J. Gossypin protects primary cultured rat cortical cells from oxidative stress- and beta-amyloid-induced toxicity. *Arch Pharm Res.* 2004;27:454-9.
13. Ramaswamy S, Viswanathan S. Influence of gossypin on the development of acute tolerance to morphine induced antinociception. *Indian J Exp Biol.* 1997;35:413-4.
14. Anon MT, Ubeda A, Alcaraz MJ. Protective effects of phenolic compounds on CCl4-induced toxicity in isolated rat hepatocytes. *Z Naturforsch C J Biosci.* 1992;47:275-9.
15. Cinar I, Sirin B, Aydin P, Toktay E, Cadirci E, Halici I et al. Ameliorative effect of gossypin against acute lung injury in experimental sepsis model of rats. *Life Sci.* 2019;221:327-34.
16. Popperl G, Helmberger T, Munzing W, Schmid R, Jacobs TF, Tatsch K. Selective internal radiation therapy with SIR-Spheres in patients with nonresectable liver tumors. *Cancer Biother Radiopharm.* 2005;20:200-8.
17. Shaghayegh K, A Mahdi, K Ali. Larynx preserving

- treatments in the early and advanced laryngeal cancers; a retrospective analysis. *J Cancer Sci Ther.* 2010;1:8-10.
17. Babu BH, Jayram HN, Nair MG, Ajaikumar KB, Padikkala J. Free radical scavenging, antitumor and anticarcinogenic activity of gossypin. *J Exp Clin Cancer Res.* 2003;22:581-9.
 18. Shi L, Chen J, Wang YY, Sun G, Liu JN, Zhang JX et al. Gossypin induces G2/M arrest in human malignant glioma U251 cells by the activation of Chk1/Cdc25C pathway. *Cell Mol Neurobiol.* 2012;32:289-96.
 19. Wang L, Wang X, Chen H, Zu X, Ma F, Liu K et al. Gossypin inhibits gastric cancer growth by direct targeting of AURKA and RSK2. *Phytother Res.* 2019;33:640-50.
 20. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.* 2011;731:237-45.
 21. Plumb JA. Cell sensitivity assays : the MTT assay. *Methods Mol Med.* 1999;28:25-30.
 22. Nikkhah G, Tonn JC, Hoffmann O, Kraemer HP, Darling JL, Schachenmayr W et al. The MTT assay for chemosensitivity testing of human tumors of the central nervous system. Part II: Evaluation of patient- and drug-specific variables. *J Neurooncol.* 1992;13:13-24.
 23. Yeh TC, Chiang PC, Li TK, Hsu JL, Lin CJ, Wang SW et al. Genistein induces apoptosis in human hepatocellular carcinomas via interaction of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial insult. *Biochem Pharmacol.* 2007;73:782-92.
 24. Shi Y, Zhang L, Liu X, Zhou C, Zhang L, Zhang S et al. Icotinib versus gefitinib in previously treated advanced non-small-cell lung cancer (ICOGEN): a randomised, double-blind phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2013;14:953-61.
 25. Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell.* 1994;76:777-9.
 26. Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 1999;59:1701-6.
 27. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30:87.
 28. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007;87:99-163.
 29. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science.* 1984;226:1097-9.
 30. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 2004;305:626-9.
 31. Decaudin D, Marzo I, Brenner C, Kroemer G. Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: a prospective novel target of cancer therapy (review). *Int J Oncol.* 1998;12:141-52.
 32. Kunnumakkara AB, Nair AS, Ahn KS, Pandey MK, Yi Z, Liu M et al. Gossypin, a pentahydroxy glucosyl flavone, inhibits the transforming growth factor beta-activated kinase-1-mediated NF-kappaB activation pathway, leading to potentiation of apoptosis, suppression of invasion, and abrogation of osteoclastogenesis. *Blood.* 2007;109:5112-21.
 33. Zhivotosky B, Orrenius S. Assessment of apoptosis and necrosis by DNA fragmentation and morphological criteria. *Curr Protoc Cell Biol.* 2001;Chapter 18:18 3 1- 3 23.
 34. Errami Y, Naura AS, Kim H, Ju J, Suzuki Y, El-Bahrawy AH et al. Apoptotic DNA fragmentation may be a cooperative activity between caspase-activated deoxyribonuclease and the poly(ADP-ribose) polymerase-regulated DNAS1L3, an endoplasmic reticulum-localized endonuclease that translocates to the nucleus during apoptosis. *J Biol Chem.* 2013;288:3460-8.
 35. Matassov D, Kagan T, Leblanc J, Sikorska M, Zakeri Z. Measurement of apoptosis by DNA fragmentation. *Methods Mol Biol.* 2004;282:1-17
 36. Hui F, Qin X, Zhang Q, Li R, Liu M, Ren T et al. *Alpinia oxyphylla* oil induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via PI3K/Akt pathway in vitro and in vivo. *Biomed Pharmacother.* 2019;109:2365-74.