



Gossypin'in Kato-III Hücrelerindeki Anti-Proliferatif ve Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi

Harun ÜN^{1a✉}, Rüstem Anıl UĞAN^{2b}, İrfan ÇINAR^{3c}

1. Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ağrı, TÜRKİYE.
2. Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
3. Kastamonu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Kastamonu, TÜRKİYE.
ORCID: 0000-0003-1772-282X^a, 0000-0002-4837-2343^b, 0000-0002-9826-2556^c

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
17.12.2020	19.03.2021	26.04.2021

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

ÜN H, Uğan RA, Çınar İ: Gossypin'in Kato-III Hücrelerindeki Anti-Proliferatif ve Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 16(1): 80-87, 2021. DOI: 10.17094/ataunivbd.842527

Öz: Gastrik karsinoma yüksek morbidite ve mortalite ile insanlarda ve hayvanlarda görülen bir kanser türüdür. Gossypin Hibiscus vitifolius'tan izole edilen doğal bir flavonoid grubunda doğal bir maddedir. Bu çalışmada gossypin'in Kato-III gastrik karsinoma hücrelerinde anti-proliferatif ve apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Kato-III hücreleri uygun ortamlarda kültüre edildi ve gossypin'in etkin doz aralığı (5-100 µg/ml) ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT testi ile 24, 48 ve 72. saatlerde tespit edildi. RT-PCR yöntemi ile kaspaz-3, 9 ve NF-kB gen ekspresyonları belirlendi. Floresan boyama tekniği ile apoptoz seviyeleri tespit edildi. Sisplatin pozitif kontrol grubu olarak deney eklendi. Gossypin'in Kato-III hücre proliferasyonunu doza ve zamana bağlı olarak azalttığı tespit edildi. Gossypin kaspaz-3 ve kaspaz-9 seviyelerini artırırken NF-kB seviyelerini inhibe ettiği ve sonuçların sisplatin ile benzerlik gösterdiği tespit edildi. Hücre morfolojik analiz ve floresan boyama sonuçlarına göre gossypin 100 µg/ml dozunda apoptozu en fazla artıran grup olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak gossypin'in gastrik karsinoma hücrelerinde apoptozu aktive ettiği ve tedavide potansiyel bir aday olabileceği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Gossypin, Kaspaz, Kato-III.

Investigation of Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of Gossypin in Kato-III Cells

Abstract: Gastric carcinoma is a type of cancer in humans and animals with high morbidity and mortality. Gossypin is a natural flavonoid group isolated from Hibiscus vitifolius. In this study, it was aimed to investigate the anti-proliferative and apoptotic effects of gossypin in Kato-III cells. Cells were cultured in standard culture conditions. Cell viability and the effective dose range (5-100 µg/ml) of gossypin were determined at 24, 48 and 72nd hours by MTT. Caspase-3, 9, and NF-kB gene expressions were determined by Real Time-PCR method. Apoptosis levels were determined by fluorescent staining method. Cisplatin was used as positive control group. It was determined that Gossypin decreased Kato-III cell proliferation depending on the dose and time. Gossypin was found to increase caspase-3 and caspase-9 levels while inhibiting NF-kB levels, and the results were similar to cisplatin. Fluorescent staining results showed that gossypin increased apoptosis. As a result, it has been revealed that gossypin activates apoptosis in gastric carcinoma cells and may be a potential candidate for treatment.

Keywords: Apoptosis, Caspase, Gossypin, Kato-III.

✉ Harun Ün

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ağrı, TÜRKİYE.
e-posta: hun@agri.edu.tr

GİRİŞ

Mide kanseri, dünya çapında en yaygın kanserlerden biridir. Hayvanlarda görülen mide kanseri köpeklerde daha sık görülmektedir (1). Köpek mide karsinomu, insan difüze histolojik tipine en yakın histolojik formdur. İnsanda olduğu gibi, köpek mide karsinomu, daha küçük eğrilik boyunca daha sık antral segmentten kaynaklanır ve intragastrik infiltrasyon ve metastaz paternleri aynıdır (2). Hem insan hem de köpek mide karsinomları erkeklerde daha sık görülür ve insidansı yaşla birlikte artar (3). Diyet ve çevresel faktörlerin kanser oluşumuna en fazla sebep olan etmenler olduğu belirtilmiştir. Mide kanseri oluşum mekanizmaları, sağlıklı hücrelerin önce bakteriyel etkilerle ya da yüksek tuzlu beslenme ve vitamin eksikliği gibi diyetle bağlı faktörlerle bozulup, daha sonra kronik gastritit, metaplazi ve displazi oluşturarak sonuçlanması ile açıklanmıştır (4). Mide kanseri olan çoğu hasta, erken semptomların olmaması ve tarama programlarındaki sınırlamalar nedeniyle ileri aşamalarda teşhis edilebilmektedirler (5). Bununla birlikte, mide kanseri için etkili tedavilerin eksikliği ve kemoterapi direncinin varlığı, mide kanseri tedavisinde hala büyük problemlerdir. Bu nedenle mide kanserinin arkasındaki moleküler mekanizmaları anlamak ve yeni tedavi edici ilaçları keşfetmek önemlidir.

Bitkilerden ekstrakte edilen flavonoidler, kumarinler, alkaloidler ve polisakkaritlerin düşük toksisiteye ve tümör büyümesine karşı iyi terapötik etkilere sahip olduğunu gösterilmiştir (6). *Hibiscus vitifolius*'tan izole edilen doğal bir flavonoid olan gossypin (3,5,8,3',4'-pentahidroksi-7-O-glukozil flavon) kolon kanseri ve lösemi hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (7). Ayrıca gossypin'in, apoptozun indüksiyonu ve hücre göçünün azaltılması dahil olmak üzere diğer antikanser aktiviteleri olduğu da tespit edilmiştir (7). Gossypin kanser hücrelerinde aktive olan bazı sinyal yolları üzerinden hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptozu gibi mekanizmalar üzerinde doğrudan etki gösterdiği önceki çalışmalarla tespit edilmiştir (8).

Apoptoz hücrelerin kontrollü ölüm mekanizmasıdır. Kanser hücrelerinde apoptozu tetikleyen mekanizmalar baskılanır ve hücrenin ölümsüzleşmesi sağlanır (9). Bu durumda tedavide apoptozu aktive eden hücre içi sinyal yolları ve sekonder haberciler hedef mekanizmalar olarak karşımıza çıkmaktadır (10). Kaspazlar bu habercilerden biri olup, immünolojik işlevlere, proliferasyona, hücre göçüne ve diğer hücrel organizasyonlara katılırlar (11). Kaspazlar ayrıca çeşitli düzenleyici faktörlerin salgılanmasını da etkiler. Dahası, hücrel olgunlaşma ve yeniden yapılanma ile eski hücrelerin apoptozunu başlatan veya anormallikler nedeniyle normal rollerini oynayamayan hücrelerin sayısını ve kalitesini düzenlemekten sorumludurlar (12). Mide kanserinde kaspazların ekspresyonundaki değişiklikler gözlemlenmiştir. Bazı kaspazların ekspresyonu, belirli histolojik özellikler ve metastazların sıklığı ile de ilişkilidir, dolayısıyla bu da kaspazların prognostik bir faktör olarak kullanımlarını yaygınlaştırmıştır. Programlanmış hücrel ölüm sürecinde merkezi bir rol oynayan enzimler olan kaspazlar, muhtemelen daha etkili bir anti-kanser tedavisinin geliştirilmesinde anahtar olabilir (13, 14).

Bu çalışmada amacımız doğal bir flavonoid olan gossypin'in mide kanseri hücre hattı olan Kato-III hücreleri üzerindeki hücre proliferasyonu ve apoptoz mekanizmaları üzerindeki etkilerinin in vitro araştırılmasıdır.

MATERYAL ve METOT

Hücre Hatlarında Proliferasyon ve Canlılık Analizi

Kato-III hücre hattı Amerika hücre bankasından (ATCC, USA) temin edilmiştir. Sıvı azot tankında bulunan hücre hatları tanktan çıkartılarak su banyosunda 37° C de kısa bir süre çözünmesi için bekletildi. Çözünen hücreleri T75 cm² olan flasklara ekildi. 48 saat sonra Kato-III hücreleri %10 FBS içeren DMEM'de 5x10³ hücre/kuyucuk olacak şekilde sayım yapıp 96 kuyucuklu plakalara ekilerek %5 CO₂ içeren

etüvde, 37°C'de inkübe edildi. 24 saat sonra, hücreler, literatürde daha önce çalışılmış olan farklı konsantrasyonlarda (5-100 µg/ml (%1 DMSO ile çözüldü)) (15) gossypin'e (Sigma, Almanya) ve pozitif kontrol olarak da 50µM sisplatine (15) (Koçak Farma, Türkiye) maruz bırakıldı. Sonrasında 24, 48 ve 72. saatlerde hücrelere MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi uygulanarak mikropłaka okuyucu spektrofotometre (Epoch, BioTek, ABD) ile 570 nm absorbands değerinde ölçümleri 3 tekrarlı olarak yapıldı. Canlılık oranları kontrol kuyucukları ile karşılaştırılarak analiz edildi (16). Tüm hücre kültürü uygulamaları daha önce belirtilen standartlara ve literatüre uygun olarak yapılmıştır (17). (Hücre kültüründe kullanılan medyum ve diğer solüsyonların tamamı Thermo Fisher'den temin edilmiştir).

Hücre Hatlarında Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Hücreler 6-kuyucuklu plakalara 2×10^6 /kuyucuk oranında ekildi ve 37°C de %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi. İlaç uygulamalarından 6 saat sonra hücreler kazıyıcı ile kuyucuklardan kaldırılarak Tissue Lyser II (Qiagen, Almanya) cihazında (tüm gruplara 350 µl RLT çözültisi koyularak) homojenize edildi. Homojenize olan hücrelerden RNA saflaştırılması QIAcube cihazında, literatürde belirtildiği gibi yapıldı (18).

Revers Transkriptaz Reaksiyonu ve cDNA Sentezi

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit kullanımı ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. Her reaksiyon 10 µl RNA ile gerçekleştirilerek cDNA sentezi literatürde belirtildiği gibi (19) Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystem) ile yapıldı. cDNA miktarı nano drop spektrofotometre (EPOCH Take3 Plate, Biotek) ile ölçüldü ve -20°C'de saklandı.

Real Time PCR ile mRNA Ekspresyonlarının Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Kaspaz-3 (Hs00234387_m1), Kaspaz-9 (Hs00962278_m1) ve NF-kB (Hs01042014_m1) mRNA ekspresyonu, TaqMan Gen ekspresyonu

Master Mix kiti kullanılarak kantifiye edildi. Amplifikasyon ve kantifikasyon işlemi StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) cihazında yapıldı. Referans gen olarak β-actin (Hs01060665_g1) kullanıldı. 200 ng cDNA için TaqMan® Gene Expression Assays'ler literatürde belirtildiği gibi pipetlendi (20) ve 40 siklus yürütüldü. Ct değerleri cihazda otomatik olarak delta-delta Ct'ye çevrilerek, bulgular istatistiksel olarak değerlendirildi.

Floresan Boyama (Hoechst 33342)

Kato-III hücreleri, 5×10^3 /kuyucuk oranında, 96 kuyucuklu plakaya 3 tekrar olacak şekilde ekildi. 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 ve Hoechst (5 µg/ml) boyası (Thermo Fisher) uygulandı. 30 dk karanlıkta inkübe edildi. Floresan mikroskobu (Leica, DMIL LED) ile görüntüledi.

İstatistiksel Analiz

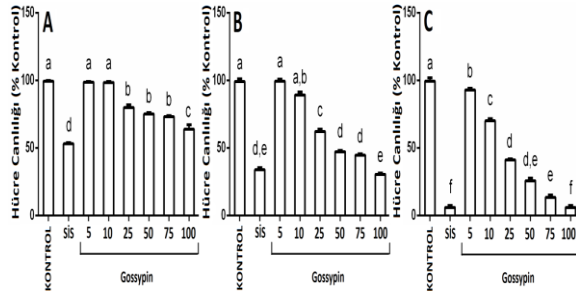
İstatistiksel analiz için tüm veriler SPSS 20.0 software (IBM, ABD) programı kullanılarak hesaplandı ve elde edilen sonuçlar ortalama±standart sapma olarak gösterildi. Veri analizi tek yönlü varyans analizi (ANOVA), ardından Duncan testi ile yapıldı. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Hücre Proliferasyon Sonuçları

Gossypin'in hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT ile tespit edilmiştir (Şekil 1). Proliferasyon sonuçlarına göre; gossypin 25 µg/ml dozunda hücre canlılığını azaltmaya başladığı gözlenmiştir. 24.saat sonuçlarında SİS grubu ile kıyaslandığında her ne kadar 50 ve 100 µg/ml dozları kısmen etki gösterse de, gossypin canlılığı beklendiği kadar azaltmadığı tespit edilmiştir (Şekil 1a). 48.saat sonuçlarına bakıldığında 50, 75 ve 100 µg/ml gossypin dozları hücre canlılığı üzerinde etki göstermiş ve SİS grubu ile

istatistiksel olarak benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 1b). 72.saat proliferasyon sonuçlarına bakıldığında (Şekil 1c), gossypin'in 100 µg/ml dozunun Kato-III hücrelerinin proliferasyonu üzerinde en etkin doz olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Bu sonuçlara göre gen ekspresyon ve floresan boyama testlerinde gossypin'in 25, 50 ve 100 µg/ml dozları çalışılmıştır.



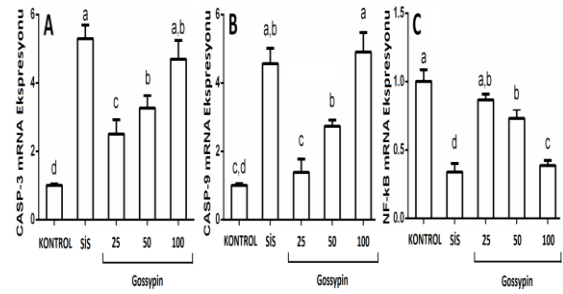
Şekil 1. Gossypin ve Sisplatin'in Kato-III hücre canlılığı üzerindeki etkileri. (A: 24.saat, B: 48.saat, C: 72.saat) Kato-III: Gastrik karsinoma hücre hattı, SİS: Sisplatin 50µM. Gossypin 5-100 µg/ml dozlarında uygulanmıştır. Tüm gruplar kendi aralarında karşılaştırılmıştır ve farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ($p<0.05$).

Figure 1: Effects of Gossypin and Cisplatin on Kato-III cell viability. (A: 24th hour, B: 48th hour, C: 72nd hour) Kato-III: Gastric carcinoma cell line, SİS: Cisplatin 50µM. Gossypin was administered at doses of 5-100 µg/ml. All groups were compared among themselves, and different letters were considered statistically significant ($p < 0.05$).

Real Time-PCR Gen Ekspresyon Sonuçları

Gossypin'in kaspaz-3, kaspaz-9 ve NF-kB gen ekspresyonları üzerindeki etkileri Şekil 2'de gösterilmiştir. Gossypin uygulaması ile kaspaz-3 ekspresyonlarının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı ($P<0.05$) ve bu artışın doza bağlı olarak Gossypin100 grubunda istatistiksel olarak daha fazla anlamlı olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Kaspaz-3 ekspresyon sonuçlarına göre (Şekil 2a), kontrol grubuna göre kıyasla, sisplatin (5,3 kat) ve Gossypin100 (4,7 kat) uygulaması istatistiksel olarak benzer sonuçlar göstermişlerdir. Benzer sonuçların görüldüğü kaspaz-9 ekspresyonlarının (Şekil 2b), kontrol grubuna

kıyasla Gossypin100 grubunda 4,9 kat, Gossypin50 grubunda 2,7 kat ve Gossypin25 grubunda 1,6 kat eksprese oldukları tespit edilmiştir. Şekil 2c'de görüldüğü gibi, NF-kB sonuçları kaspaz sonuçları ile zıt etkiler göstermiştir. SİS grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında sisplatin uygulamasının NF-kB ekspresyonlarını en fazla anlamlı şekilde azalttığı tespit edilmiştir ($P<0.05$). NF-kB ekspresyonları kontrol grubuna kıyasla, Gossypin100 grubunda 0,41 kat ve Gossypin50 grubunda 0.76 kat olarak belirlenmiştir.

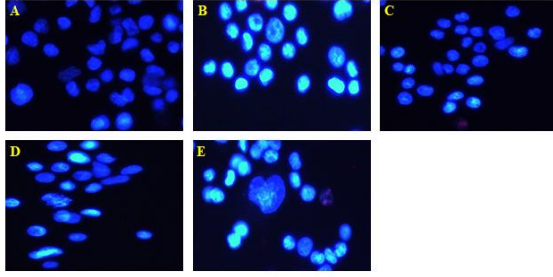


Şekil 2. 24 saatlik Casp-3, Casp-9 ve NF-kB mRNA ekspresyon seviyeleri. (A: Casp-3, B: Casp-9, C: NF-kB) Casp: Kaspaz, SİS: Sisplatin 50µM. Gossypin 25, 50 ve 100 µg/ml dozlarında uygulanmıştır. Tüm gruplar kendi aralarında karşılaştırılmıştır ve farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ($p<0.05$).

Figure 2: 24 hour Casp-3, Casp-9, and NF-kB mRNA expression levels. (A: Casp-3, B: Casp-9, C: NF-kB) Casp: Caspase, SİS: Cisplatin 50µM. Gossypin was administered at doses of 25, 50, and 100 µg/ml. All groups were compared among themselves, and different letters were considered statistically significant ($p < 0.05$).

Floresan Boyama Sonuçları

Apoptoz seviyelerinin floresan boyama yöntemi ile belirlenebilmesi için Hoechst 33342 floresan boyama metodu ile apoptotik hücrelerin görüntüleri tespit edilmiştir (Şekil 3). Kontrol grubunda herhangi bir parlaklığın olmadığı ancak sisplatin ve yüksek doz gossypin uygulamalarına bağlı olarak renkli ve boyanmış hücrelerin sayısının arttığı belirlenmiştir. 25 ve 50 µg/ml gossypin uygulanan grupta apoptoz seviyeleri oldukça az olarak tespit edilmesine rağmen, Gossypin100 ve SİS gruplarında floresan boyama sonuçlarına göre oldukça fazla sayıda apoptotik hücre olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3. Floresan Hoechst 33342 boyası ile Kato-III hücre morfolojik değişimleri. Floresan mikroskop altında 200 kat küçültme oranında görüntü alınmıştır. A: Kontrol, B: Sisplatin 50µM, C: Gossypin 25 µg/ml, D: Gossypin 50 µg/ml, E: Gossypin 100 µg/ml.

Figure 3: Kato-III cell morphological changes by fluorescent Hoechst 33342 stain. Images were taken under a fluorescent microscope at a rate of 200 times. A: Control, B: Cisplatin 50µM, C: Gossypin 25 µg/ml, D: Gossypin 50 µg/ml, E: Gossypin 100 µg/ml.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Morbidite ve mortalitesi oldukça yüksek olan mide kanseri üzerinde tedavi ve mekanizmaların aydınlatılması konularında oldukça fazla araştırma yapılmaktadır. Son yıllarda özellikle mide kanserine karşı doğal bitkisel kaynaklı etken maddelerin pozitif etkileri olduğu tespit edilmiştir (6). Bu çalışmada doğal bir flavonoid madde olan gossypin'in gastrik karsinoma hücre hattı Kato-III hücrelerinin proliferasyonunu önlediğini ve bu etkisini kaspaz proteinlerini baskılayarak yaptığını gösterdik. Bu sonuçlar ile gossypin'in gastrik karsinoma hücrelerine karşı etkili olduğu belirlenmiş olduk.

Mide kanseri kemoterapiye duyarlı kanser türleri arasında kabul edilir (12). Ancak, mide kanserinin tedavisinde sıkça kullanılan sisplatin türevi ilaçlara karşı direnç gelişimi mide kanserinin tedavisini oldukça zorlaştırmaktadır (21). Literatürde bitkisel kaynaklı moleküllerin hem direkt tedavi edici etkileri hem de kemoterapiye karşı gelişen direnci azaltan etkileri araştırılmaktadır (22). Bitkisel kaynaklı doğal bileşiklerin tümör büyümesine karşı etkili olduğu gösterilmiştir (6). Flavonoidler bu alanda literatürde en fazla çalışılan doğal gruplardan birisidir. Flavonoidlerin kanser hücrelerinde çoklu sinyal iletimini ve hücre bölünme döngüsünü baskılayarak etki gösterdiği tespit edilmiştir (23).

Gossypin flavonoid grubu bir bileşik olup daha önce kolon kanseri ve lösemi hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (7). Bizde çalışmamızda Kato-III hücrelerinin proliferasyonunu hem gossypin hemde tedavide kullanılan sisplatin kullanarak karşılaştırdık. Sonuçlarımız literatürdeki sonuçları destekler nitelikte olup, özellikle yüksek doz (100 µg/ml) gossypin'in hücre proliferasyonunu önemli ölçüde engellediğini gösterdik. Literatürde yapılan bir başka çalışmada gossypin'in gastrik kanseri hücre hattı HGC27 üzerinde Ribozomal protein S6 kinaz proteinini baskıladığı hücre büyümesinin önüne geçildiği bildirilmiştir. Hücre içi sinyal iletim aktivasyonları ve apoptozdan kurtulma kanser hücrelerinde oldukça fazla görülmektedir (24). Dolayısıyla tedavide apoptozu hedefleyen hücre içi proteinlerin ve sinyal iletimlerinin aktive edilmesi önemli bir hedef olarak karşımıza çıkmaktadır.

Kaspaz proteinleri, sağlıklı hücrelerde normal şartlarda, hücrelerin çoğalmasına, organizasyonuna ve göçüne katılır ve ayrıca çeşitli düzenleyici faktörlerin salgılanmasını etkiler. Proapoptotik rolleri, yaşlanmış veya anormal hücrelerin programlanmış ölümünün aktivasyonu yoluyla hücrelerinin sayısını ve kalitesini kontrol eder (25). Hücre içerisinde aktive olan prokaspazlar mitokondriden apoptoz indükleyici faktörleri ve sitokrom c salınımına neden olur. Daha sonra kaspaz-9 ve kaspaz-3 nükleusta DNA eşleşmesi sağlayan enzimleri baskılar ve apoptoz gerçekleşir (26). Neoplastik hücrelerin apoptozuna yol açan kaspaz proteinlerinin aktivasyonu, mide kanseri tedavisinde gelecekteki hedeflerden biri olabilir. Yapılan deneysel araştırmalarda rekombinant kaspaz-3 proteininin hücre içine transferi denenmektedir. Bir araştırmada, ökaryotik vektör pcDNA/Rev-Caspase-3 oluşturulmuş ve laboratuvar koşullarında mide kanseri SGC7901'in hücresel hatlarının apoptozu üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir (27). Sonuçlar, bu kanser durumunda olası bir gen tedavisi uygulamasını önermekte, ancak bu olasılığın yine de dikkatlice değerlendirilmesi ve gözlemlenmesi gerektiğini göstermektedir.

Kaspaz-3 aktivasyonunun mutlaka moleküler düzeyde gerçekleşmesi gerekmez ve dünyadaki birçok bilim insanı, çeşitli biyolojik ve kimyasal maddeler ile kaspaz proteinlerinin aktivatörlerini ve düzenleyicilerini araştırmaktadır. Bu konuda en önemli adaylardan birinin, kaspaz-3 üzerindeki etkisiyle (hem iç hem de dış yollarla) kanser hücresi büyümesinin inhibisyonuna ve apoptozun aktivasyonuna neden olan arsenik trioksit olduğu belirlenmiştir (28). Arsenik trioksit'in mide kanseri hücrelerinde kaspaz-3'e yüksek düzeyde duyarlılığı göstermesi çalışmanın sonuçlarını daha da fazla desteklemiştir. Ancak, arseniğin bir bütün olarak organizma üzerindeki zararlı etkisi nedeniyle uygulamasında oldukça önemli bir sınırlama oluşturmuştur. Dolayısıyla kaspaz proteinlerini hedefleyen moleküllerin daha az yan etkileri sebebiyle bitkisel kaynaklı olması tercih edilebilir. Bizim sonuçlarımıza göre gossypin kaspaz-3 ve 9 ekspresyonlarını artırarak kanser hücrelerinin apoptoza gitmesini sağladığı belirlenmiştir. Literatürde bizim çalışmamızı destekleyen ve gossypin'in kanser hücrelerinde kaspazları aktive ettiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (8, 17). Yapmış olduğumuz floresan boyama ile apoptoz tayini sonuçları da kaspaz ekspresyon sonuçlarımızı desteklemektedir.

Çalışmamızın bir diğer bulgusu gossypin'in nükleusta enflamasyona bağlı olarak hücre organizasyonlarını doğrudan kontrol eden NF-kB ekspresyonlarının belirlenmesidir. NF-kB'nin aktivasyonu, çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri ve tirozin kinazlar tarafından tetiklenen farklı sinyal yollarından kaynaklanır (29). Bu sinyal yolları genelde epidermal büyüme faktörü reseptörü, insülin büyüme faktörü reseptörü ve tümör nekroz faktörü reseptörlerine bağlı olarak aktive olur ve NF-kB aktivasyonuna sebep olur (30). Ayrıca kanser hücrelerinde aktive olan Ras/MAPK ve PI3K/Akt gibi diğer sinyal yollarının aktivasyonu da NF-kB'nin aktivasyonunda rol oynayarak hücre çekirdeğinde gen ekspresyonu artışı ve sonucunda hücre bölünmesine yol açarlar (31). Apoptoz indüklemesi

NF-kB aktivasyonunu düzenler (32). NF-kB aktive olmadan önce sitoplazmada inhibe halde IKB olarak bulunur. IKB'nin fosforilasyonu, I kappa B kinaz (IKK) gibi çeşitli NF-kB aktivatörü olan kinazlarla düzenlenir ve nükleusa NF-kB girişi sağlanır. Böylece hücreSEL döngü tetiklenir (33). Kaspaz aktivasyonu bu mekanizmayı IKK'yı inhibe ederek engeller ve apoptozun indüklenmesi ile NF-kB baskılanmış olur (34). Yapılan bir çalışmada kaspaz aktivasyonu sağlanan hücrelerde NF-kB ve aktivatörlerinin ekspresyonlarının azalmış olduğu belirtilmiştir (32). Yapılan çalışmalarda flavonoidlerin kanser hücrelerinde NF-kB ekspresyonlarını azalttığı tespit edilmiştir (35-37). Bizde çalışmamızda literatür ile benzer sonuçlar tespit ettik. Gossypin uygulamasının Kato-III hücrelerinde NF-kB seviyelerini baskıladığını belirledik. Daha önce yapılan bir çalışmada gossypin'in prostat kanseri hücrelerinde NF-kB seviyelerini baskıladığı belirtilmiştir (15, 38). Sonuç olarak gossypin'in kaspazları aktive ederek NF-kB üzerinde baskılayıcı etkisinin olması kanser hücrelerindeki etkinliğini daha iyi açıklamaktadır.

Sonuç olarak bu çalışmada gossypin farklı doz uygulaması ile Kato-III hücreleri üzerinde doza bağlı olarak etkinlik göstermiştir. Hücre proliferasyonunu baskılanması ve apoptozu aktive etmesi gossypin'i alternatif tedavi için önemli bir aday olarak ortaya çıkarmıştır. Çalışmamızın sonuçlarına göre gossypin kaspaz proteinlerini aktive ederek ve aynı zamanda NF-kB'yi inhibe ederek hücreleri apoptoza götürmüştür. Bu çalışma, gossypin'in kanser hücrelerindeki etki mekanizmaları için önemli bir çalışma olmuştur.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Elliott GS., Stoffregen DA., Richardson DC., Blevins WE., Richardson RC., 1984. Surgical, medical, and nutritional management of gastric adenocarcinoma in a dog. J Am Vet Med Assoc, 185, 98-101.

2. Lingeman CH., Garner F., Taylor DO., 1971. Spontaneous gastric adenocarcinomas of dogs: a review. *J Natl Cancer Inst*, 47, 137-153.
3. Gualtieri M., Monzeglio MG., Scanziani E., 1999. Gastric neoplasia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 29, 415-440.
4. Fox JG., Wang TC., 2007. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest*, 117, 60-69.
5. Hamashima C., 2014. Current issues and future perspectives of gastric cancer screening. *World J Gastroenterol*, 20, 13767.
6. Ishibashi M., Ohtsuki T., 2008. Studies on search for bioactive natural products targeting TRAIL signaling leading to tumor cell apoptosis. *Med Res Rev*, 28, 688-714.
7. Babu B., Jayram H., Nair M., Ajaikumar K., Padikkala J. 2003. Free radical scavenging, antitumor and anticarcinogenic activity of gossypin. *J Exp Clin Cancer Res*, 22, 581-589.
8. Wang L., Wang X., Chen H., Zu X., Ma F., Liu K., Bode AM., Dong Z., Kim DJ. 2019. Gossypin inhibits gastric cancer growth by direct targeting of AURKA and RSK2. *Phytother Res*, 33, 640-650.
9. Portt L., Norman G., Clapp C., Greenwood M., Greenwood MT., 2011. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1813, 238-259.
10. Chen M., Wang J., 2002. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis*, 7, 313-319.
11. Salvesen GS., Dixit VM., 1997. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 91, 443-446.
12. Frejlich E., Rudno-Rudzinska J., Janiszewski K., Salomon L., Kotulski K., Pelzer O., Grzebieniak Z., Tarnawa R., Kielan W., 2013. Caspases and their role in gastric cancer. *Adv Clin Exp Med*, 22, 593-602.
13. Sun Y., Chen XY., Liu J., Cheng XX., Wang XW., Kong QY., Li H., 2006. Differential caspase-3 expression in noncancerous, premalignant and cancer tissues of stomach and its clinical implication. *Cancer Detect Prev*, 30, 168-173.
14. Li YH., Wang C., Meng K., Chen LB., Zhou XJ., 2004. Influence of survivin and caspase-3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*, 10, 1984-1988.
15. Cinar I., 2020. Apoptosis-Inducing Activity and Antiproliferative Effect of Gossypin on PC-3 Prostate Cancer Cells. *Anticancer Agents Med Chem*, 21, 445-450
16. Demirkaya AK., Gündoğdu G., Dodurga Y., Seçme M., Gündoğdu K., 2019. Parietinin HepG2 Hepatoselüler Karsinom Hücrelerinde Sitotoksik ve Genotoksik Etkisinin Belirlenmesi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 14, 29-37.
17. Cinar I., Yayla M., Binnetoglu D., 2020. Antiproliferative effect of gossypin on human hepatoma (Hep-3B) cells. *Cukurova Med J*, 45, 1165-1172.
18. Demir R., Cadirci E., Akpınar E., Cayir Y., Atmaca HT., Un H., Kunak CS., Yayla M., Bayraktutan Z., Demir I., 2015. Does bosentan protect diabetic brain alterations in rats? The role of endothelin-1 in the diabetic brain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 116, 236-243.
19. Duygu K., Halıcı Z., Toktay E., 2020. Prepubertal ve Postpubertal Sıçanların Genital Sistem Organlarında Ürotensin 2 Reseptörünün Karşılaştırılması. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 15, 113-121.
20. Bayir Y., Un H., Cadirci E., Akpınar E., Diyarbakir B., Calik I., Halici Z., 2019. Effects of Aliskiren, an RAAS inhibitor, on a carrageenan-induced pleurisy model of rats. *An Acad Bras Cienc*, 91, e20180106.
21. Spirina LV., Avgustinovich AV., Afanas'ev SG., Cheremisina OV., Volkov MY., Choyzonov EL., Gorbunov AK., Usynin EA., 2020. Molecular mechanism of resistance to chemotherapy in gastric cancers, the role of autophagy. *Curr Drug Targets*, 21, 713-721.
22. Homayoun M., Ghasemnezhad Targhi R., Soleimani M., 2020. Anti-proliferative and anti-apoptotic effects of grape seed extract on chemo-resistant OVCAR-3 ovarian cancer cells.

- Res Pharm Sci, 15, 390-400.
23. Zhang Z., Yang L., Hou J., Tian S., Liu Y., 2020. Molecular mechanisms underlying the anticancer activities of licorice flavonoids. *J Ethnopharmacol*, 267, 113635.
 24. Debatin KM., 2004. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*, 53, 153-159.
 25. Yi CH., Yuan J., 2009. The Jekyll and Hyde functions of caspases. *Dev Cell*, 16, 21-34.
 26. Savva CG., Totokotsopoulos S., Nicolaou KC., Neophytou CM., Constantinou AI., 2016. Selective activation of TNFR1 and NF- κ B inhibition by a novel biyouyanagin analogue promotes apoptosis in acute leukemia cells. *BMC Cancer*, 16, 279.
 27. Fu YG., Qu YJ., Wu KC., Zhai HH., Liu ZG., Fan D-M. 2003. Apoptosis-inducing effect of recombinant Caspase-3 expressed by constructed eukaryotic vector on gastric cancer cell line SGC7901. *World J Gastroenterol*, 9, 1935.
 28. Jiang XH., Chun-Yu Wong B., Yuen ST., Jiang SH., Cho CH., Lai KC., Lin MC., Kung HF., Lam SK., 2001. Arsenic trioxide induces apoptosis in human gastric cancer cells through up-regulation of P53 and activation of caspase-3. *Int J Cancer*, 91, 173-179.
 29. Dolcet X., Llobet D., Pallares J., Matias-Guiu X., 2005. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows archiv*, 446, 475-482.
 30. Wang C-Y., Mayo MW., Baldwin AS., 1996. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science*, 274, 784-787.
 31. De Simone V., Franze E., Ronchetti G., Colantoni A., Fantini M., Di Fusco D., Sica G., Sileri P., MacDonald T., Pallone F., 2015. Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- α synergistically activate STAT3 and NF- κ B to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene*, 34, 3493-3503.
 32. Frelin C., Imbert V., Bottero V., Gonthier N., Samraj AK., Schulze-Osthoff K., Auberger P., Courtois G., Peyron JF., 2008. Inhibition of the NF- κ B survival pathway via caspase-dependent cleavage of the IKK complex scaffold protein and NF- κ B essential modulator NEMO. *Cell Death Differ*, 15, 152-160.
 33. Scheidereit C., 2006. I κ B kinase complexes: gateways to NF- κ B activation and transcription. *Oncogene*, 25, 6685-6705.
 34. Pomerantz JL., Baltimore D., 2002. Two pathways to NF- κ B. *Molecular cell*, 10, 693-695.
 35. Hazafa A., Rehman KU., Jahan N., Jabeen Z., 2020. The role of polyphenol (Flavonoids) compounds in the treatment of cancer cells. *Nutr Cancer*, 72, 386-397.
 36. Priyadarsini RV., Murugan RS., Maitreyi S., Ramalingam K., Karunakaran D., Nagini S., 2010. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- κ B inhibition. *Eur J Pharmacol*, 649, 84-91.
 37. Yoshimizu N., Otani Y., Saikawa Y., Kubota T., Yoshida M., Furukawa T., Kumai K., Kameyama K., Fujii M., Yano M., 2004. Anti-tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric cancer include: antiproliferative effects, induction of apoptosis and cell cycle deregulation. *Aliment Pharmacol Ther*, 20, 95-101.
 38. Chiu CT., Chen JH., Chou FP., Lin HH., 2015. Hibiscus sabdariffa leaf extract inhibits human prostate cancer cell invasion via down-regulation of Akt/NF- κ B/MMP-9 pathway. *Nutrients*, 7, 5065-5087.