



Nor-wogonin'in İnsan Rahim Ağzı Kanseri Hücrelerinde Antikanser ve Apoptotik Etkileri (Tr)

Ahmet Karakuş^{1*}, Sevgi Ünal Karakuş²

^{1*} Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Bartın, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-1458-808X), akarakus@bartin.edu.tr

² Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bartın, Türkiye (ORCID: 0000-0002-6409-7783), sunal@bartin.edu.tr

(2nd International Conference on Applied Engineering and Natural Sciences ICAENS 2022, March 10-13, 2022)

(DOI: 10.31590/ejosat.1083755)

ATIF/REFERENCE: Karakuş, A., Ünal Karakuş, S. (2022). Nor-wogonin'in İnsan Rahim Ağzı Kanseri Hücrelerindeki Antikanser ve Apoptotik Etkileri. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (34), 617-622.

Öz

Tüm dünyada büyüyen bir sağlık sorunu olan kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci en önemli ölüm nedenidir. Kanser tedavisinde kullanılan klasik yöntemlerin (cerrahi, radyoterapi, kemoterapi vb.) tedavide istenilen düzeyde etkili olamaması araştırmacıları kanser tedavisinde yeni terapötiklerin keşfine ve geliştirilmesine yönlendirmiştir. Flavonoidlerin bir alt grubu olan flavonların biyokimyasal ve farmakolojik etkilerine ek olarak antikanser, antiinflamatuvar, antiproliferatif, antiangiyojenik etkileri olduğu bilinmektedir. Çeşitli biyolojik aktivitelere sahip bir polihidroksi flavon türevidir olan Nor-wogonin'in (5, 7, 8-trihydroxyflavone) insan rahim ağzı kanseri hücre hattı üzerine sitotoksik etkisini ve apoptoza dahil olan bazı genlerin ekspresyon düzeyine etkisini belirlemeyi amaçladık. Çalışmada, rahim ağzı (HeLa) kanser hücre hattına farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 40, 80 µM) Nor-wogonin uygulandı. Bileşiğin hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolyum bromür) yöntemi ile belirlendi ve HeLa hücreleri için Nor-wogonin IC50 değeri hesaplandı. Ek olarak, Nor-wogonin'in HeLa hücrelerindeki anti-apoptotik ve pro-apoptotik gen ekspresyon (bax, p53, caspase-3 ve bcl-2 genleri) seviyeleri üzerindeki etkisini gözlemlemek için Q-PCR ile kantitatif gen analizi yapıldı. Nor-wogonin'in artan doza bağlı olarak HeLa hücrelerinde hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı belirlendi (p<0.05). HeLa hücreleri için IC50 değerleri 32.09 µM olarak hesaplandı. Ayrıca HeLa hücrelerinde bax, caspaz-3, p53 gen ekspresyonlarının arttığı ve bcl-2 gen ekspresyonunun azaldığı belirlendi. Sonuç olarak, bir flavon türevidir olan Nor-wogonin, in vitro sitotoksik aktivitesi ile anti-apoptotik ve pro-apoptotik gen ekspresyonu üzerindeki etkileri sayesinde önemli bir terapötik ajan olarak kabul edilebilir.

Anahtar Kelimeler: Nor-wogonin, Rahim ağzı kanseri, Antikanser etki, Apoptotik Etki, Hücre kültürü.

Anticancer and Apoptotic Effects of Nor-wogonin on Human Cervical Cancer Cells (Eng)

Abstract

Cancer, a growing health problem all over the world, is the second most important cause of death after cardiovascular diseases. The ineffectiveness of classical methods (surgery, radiotherapy, chemotherapy, etc.) used in cancer treatment has led researchers to discover and develop new therapeutics in cancer treatment. It is known that flavones, a subgroup of flavonoids, have anticancer, anti-inflammatory, antiproliferative, and antiangiogenic effects in addition to their biochemical and pharmacological effects. We aimed to determine the cytotoxic effect of Nor-wogonin (5, 7, 8-trihydroxyflavone), a polyhydroxyflavone derivative with various biological activities, on the human cervical cancer cell line and its effect on the expression level of some genes involved in apoptosis. In the study, different concentrations of Nor-wogonin (10, 20, 40, 80 µM) were applied to the cervical (HeLa) cancer cell line. The cytotoxic effect of the compound on cell lines was determined by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyl tetrazolium bromide) method and the Nor-wogonin IC50 value for HeLa cells was calculated. In addition, quantitative gene analysis by Q-PCR was performed to observe the

* Sorumlu Yazar: akarakus@bartin.edu.tr

effect of Nor-wogonin on the levels of anti-apoptotic and pro-apoptotic gene expression (bax, p53, caspase-3 and bcl-2 genes) in HeLa cells. It was determined that Nor-wogonin significantly decreased cell viability in HeLa cells depending on the increasing dose ($p < 0.05$). IC50 values for HeLa cells were calculated as 32.09 μM . In addition, it was determined that bax, caspase-3, p53 gene expressions increased and bcl-2 gene expression decreased in HeLa cells. In conclusion, Nor-wogonin, a flavone derivative, can be considered as an important therapeutic agent thanks to its in vitro cytotoxic activity and its effects on anti-apoptotic and pro-apoptotic gene expression.

Keywords: Nor-wogonin, Cervical cancer, Antikanser effect, Apoptotic effect, Cell culture.

1. Giriş

Rahim ağzı kanseri her yıl dünya çapında yaklaşık 500.000 kadının hayatını tehdit eden önemli bir sağlık sorunudur (Herzog ve Wright; 2007). Sigara kullanımı, insan papilloma virüsüne mariziyet ve bağışıklık sistemi bozuklukları rahim ağzı kanseri için risk faktörleri arasındadır (Waggoner, 2003). Rahim ağzı kanseri olan kişiler, tümör erken evrelerindeyken tedavi edilebilse de tedaviden kaynaklanan uzun süreli morbidite yaygındır (Waggoner, 2003).

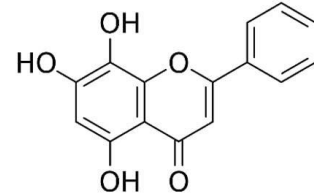
Dünya çapında kanserle mücadelede yıllardır bir savaş verilmesine rağmen morbiditesi ve mortalitesi azalmamaktadır (Banik ve ark, 2020). Her yıl kanser araştırmalarına muazzam miktarlarda para harcanmakta ve tedavisi için çeşitli yöntemlerin geliştirilmekte ancak hastalığın insidasında bir azalış sağlanamamaktadır. Bunun temel nedeni, kanser tedavisinde kullanılan ilaçların çoğunun genellikle iskemik kalp hastalığı, kusma, karaciğer fonksiyon bozukluğu, halsizlik ve hipertansiyon gibi tedavi süreçlerini daha da engelleyen ve sonunda kanserin ilerlemesine neden olan olumsuz yan etkilere sebebiyet vermesidir (Daimary ve ark, 2020; Parama ve ark, 2020). Ayrıca kanser hücrelerinin radyoterapiye ve kemoterapiye direnç geliştirmesinde tedavinin başarısı için istenilen bir durum değildir (Khatoun ve ark, 2020). Bu nedenle, bu ölümcül hastalığın yönetimi için minimum yan etki, kolay erişilebilirlik, düşük maliyet ve daha yüksek verimlilik ile yeni tedavi stratejileri veya kemoterapötiklerin keşfedilmesi önemlidir (Banik ve ark, 2020).

Kanserin önlenmesi ve tedavisi için birçok yeni fitokimyasal ve kemoterapötik ajanın ortaya çıkarılması ve etkilerinin araştırılması önem arz etmektedir. Fenolikler ve polifenolikler, terpenoidler, alkaloidler ve kükürt içeren bileşikler gibi fitokimyasallar, esas olarak çok çeşitli meyve, sebze ve bitkisel bitkilerden elde edilir ve muazzam antikanser özelliklere sahiptir (Cragg ve Pezzuto, 2016; Harsha ve ark, 2017). Ayrıca bu doğal ajanlar, büyüme faktörleri, kinazlar, reseptörler, kemokinler, sitokinler, transkripsiyon faktörleri ve enflamatuvar enzimler gibi çok sayıda moleküler onkojenik hedefi modüle edebilir ve böylece kanser hücrelerini kemoterapötiklere karşı duyarlı hale getirebilir, olumsuz yan etkileri önleyebilir, yaşam kalitesini iyileştirebilir ve kanser hastalarında hayatta kalma süresini uzatabilmektedir (Tewari ve ark, 2019; Bose ve ark, 2020).

Flavonlar, sekonder metabolitler grubunda en önemli biyoaktif bileşiklerinden olan flavonoidlerin alt gruplarından birini oluşturmaktadır (Martens ve Mithöfer, 2005). Flavonların antiinflamatuvar, antioksidan, antikanserojenik, antiproliferatif, antiangiyojenik, biyokimyasal ve farmakolojik aktiviteleri vardır ve toksik etkileri bulunmamaktadır (Havsteen, 2002). Flavonların bahsedilen terapötik potansiyeli, bu bileşikler ilaç tasarımı için değerli hedefler haline getirir. Bu kapsamda, flavonların kanser önleme ve tedavisinde kullanımları üzerinde durulması önemlidir (Singh ve ark, 2014).

Wogonin (5,7-dihydroxy-8-methoxyflavone) ve Nor-wogonin (5,7,8-trihydroxyflavone) *Scutellaria baicalensis*'ten

izole edilen antikanser, antiviral ve antioksidan gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip bir polihidroksi flavondur (Hui ve ark, 2002; Miyasaki ve ark, 2013).



Şekil 1. Nor-wogonin flavonunun kimyasal yapısı

Wogonin'in meme, lösemi ve kolorektal kanserler dahil olmak üzere birçok kanser türünde etki mekanizması ve antikanser aktivitesi incelenmiştir (Huynh ve ark, 2017). Ancak Nor-wogonin'in antikanser aktivitesi ve mekanizması hakkında yeterli çalışma yoktur (Abd El-Hafeez ve ark, 2019). Nor-wogonin'in kimyasal yapısı Şekil 1'de verilmiştir. Nor-wogonin, HL-60 lösemi hücrelerinde (Chow ve ark, 2008) apoptozu indükler ve MDA-MB-231 hücrelerinde ise hücre döngüsünü durdurarak, hücre bölünmesini engeller ve hücreleri apoptozu yönlendirerek antiproliferatif bir etki gerçekleştirir (Abd El-Hafeez ve ark, 2019). Ayrıca Nor-wogonin, SW48 kolorektal kanser hücrelerinde, hücre döngüsü tutulmasını, otofajiyi ve apoptozu tetikleyerek hücrelerinin in vitro büyümesini inhibe eder ve olası bir antikanser terapötik olma potansiyeline sahiptir (Wang ve ark, 2020).

Bu çalışma, bir polihidroksi flavon olan Nor-wogonin'in insan rahim ağzı kanser hücreleri (HeLa) üzerindeki antikanser ve apoptotik etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Hücre Kültürü

2.1.1. Nor-wogonin Konsantrasyonlarının Seçimi ve Hazırlanması

İnsan rahim ağzı kanseri hücre hattına uygulanan Nor-wogonin'in 10, 20, 40 ve 80 μM konsantrasyonları (Abd El-Hafeez ve ark, 2019; Chow ve ark, 2008) kullanıldı. Nor-wogonin ticari olarak temin edildi (Cas No: 4443-09-8) ve uygun çözücü içerisinde (serum fizyolojik) belirlenen konsantrasyonları hazırlanarak HeLa hücreleri üzerine uygulaması yapıldı.

2.1.2. Hücrelerin çoğaltılması, Nor-wogonin'in hücreler ile muamelesi ve antikanser etkinin belirlenmesi (MTT testi)

HeLa hücrelerini beslemek ve çoğaltmak için DMEM besi ortamı (Sigma-Aldrich, ABD; %10 FBS, 0.1 mg/mL streptomisin 100 U/mL penisilin) kullanıldı. Hücreler 75 cm² hücre kültürü flaskı (TPP; İsviçre) içerisinde büyütüldü ve bir inkübatöre (37°C, %5 CO₂; N-Biotek, Güney Kore) inkübe edildi. Hücre besi ortamı 3-4 günde bir değiştirildi ve hücreler %80-90 yoğunluğa

ulaştığında pasajlandı. HeLa hücreleri DMEM ortamında 10, 20, 40, 80 μ M Nor-wogonin konsantrasyonları ile muamele edildi.

Nor-wogonin'in antikanser etkisi, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolium bromid (MTT) testi ile belirlendi (Mosmann, 1983). Bu kapsamda %80-90 yoğunluğa ulaşan HeLa hücreleri Tripsin-EDTA ile kullanılarak 75 cm²'lik flaskların tabanlarından kaldırıldı ve invert mikroskop altında sayıldı. Daha sonra hücreler 96 kuyucuklu mikropklakların her bir kuyucuğuna 15x10⁴ hücre gelecek şekilde ekildi. Ekilen hücreler 37°C'lik sıcaklıkta, %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından hücre besisi ortamı değiştirildi ve Nor-wogonin'in farklı konsantrasyonları hücrelerin içinde bulunduğu kuyucuklara eklenerek 24 saat inkübe edildi (Koran ve ark, 2017).

İnkübasyonun akabinde kuyucuklardaki besisi ortamı uzaklaştırıldı ve steril PBS içerisinde hazırlanan MTT solüsyonu (0.5 mg/mL) herbir kuyucuğa eklendikten sonra mikropklakalar 3 saat 37°C'lik sıcaklıkta, %5CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Sonrasında kuyucuklarda bulunan sıvı kısım çekildi ve her bir kuyucuğa 100 μ L dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek inkübasyon durduruldu. Mikropklakalardaki hücrelerin optik yoğunlukları spektrofotometre ile (Thermo MultiscanGo, ABD) 570 nm dalga boyunda belirlendi (Mosmann, 1983).

Kontrol kuyucuklarından elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınarak bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edildi. Nor-wogonin'in farklı konsantrasyonlarının uygulandığı mikropklaka kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri, kontrol absorbans değerine oranlandı ve yüzde (%) canlılık değerleri belirlendi.

2.2. Etkin Dozun (IC₅₀) Belirlenmesi

MTT analizi sonuçlarına göre Nor-wogonin'in farklı konsantrasyonlardaki etkileri GraphPad Prism 6 programı aracılığıyla değerlendirildi ve test bileşiğinin hücreler üzerine inhibe edici konsantrasyon (IC₅₀) değeri hesaplandı. Bu basamaktan sonra gerçekleştirilen Q-PCR çalışmalarında belirlenen bu doz uygulaması yapıldı.

2.3. Gen Ekspresyonunun Q-PCR ile Belirlenmesi

HeLa hücrelerine uygulanan Nor-wogonin'in anti-apoptotik ve pro-apoptotik gen ekspresyon gen ekspresyon seviyesine yaptığı etkinin gözlenmesi için kantitatif gen analizi yapıldı. Bu amaçla hedef dizilere spesifik primer setleri dizayn edildi. Nispi ekspresyon değişiminin değerlendirilebilmesi için β -actin geni referans olarak alındı. Ekspresyondaki değişim düzeyi C_T değerleri arasındaki karşılaştırma ile hesaplandı.

2.3.1. Hücre Kültüründen Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için, HeLa hücrelerinin Nor-wogonin IC₅₀ değeri ile muamele edilmiş 1x10⁶ hücre içeren 6 kuyucuklu mikropklakaların her bir kuyusuna 1.5 mL soğuk PBS ilave edildi ve ardından hücreler kuyucuklardan kazındı. HeLa hücrelerinden total RNA izolasyonu, üreticinin protokolünün (Thermo Fisher Scientific) önerisi ile yapıldı. RNA'ların saflık derecesi A260/A230 oranı spektrofotometre (Thermo Scientific Multiscan GO, ABD) ile ölçüldü. Oran, her RNA örneği için 1.8 ile 2.0 arasında hesaplandı. cDNA sentezi, üreticinin protokolüne göre (Bio-Rad) uygulandı. cDNA örnekleri -20°C'de ve mRNA örnekleri -86°C'de saklandı (Ceylan ve ark, 2019).

2.3.1. Primer Tasarımı ve Q-PCR

cDNA'lar Q-PCR tekniği ve SYBR Green (2xqPCRBIO SyGreen Mix Lo-ROX Kiti, PCR Biosystems) kullanılarak çoğaltıldı. Ekspresyonu araştırılacak genlere (Bcl-2, Bax, p53, caspase-3 ve β -actin) özgü primer dizileri Primer3 programı (v. 0.4.0) ile tasarlandı ve ticari olarak satın alındı (Metabion). Genlere ait primer dizileri Tablo 1'de verilmiştir. qPCR çalışmalarında housekeeping gen olarak β -Actin referans alınmıştır. Seçilen genlerin ve housekeeping genin ekspresyonu, Q-PCR cihazında (Bio-Rad CFX96) incelendi. Herhangi bir uygulama yapılmayan gruplar ise kontrol olarak kullanıldı.

Tablo 1. Q-PCR reaksiyonunda kullanılan ileri ve geri primer dizileri

Genin Adı	Primer Dizisi (5'-3')
β -actin	İleri CACCCAGCCATGTACGTTGC
	Geri CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
bcl-2	İleri GAGGGGCTACGAGTGGGATGC
	Geri GGAGGAGAAGATGCCCGGTGC
bax	İleri CCGAGAGGTCTTTTCCGAG
	Geri CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
p53	İleri CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG
	Geri GGATGGTGGTACAGTCAGAGC
kaspaz-3	İleri GCGAATCAATGGACTCTGGAA
	Geri GTCAACAGGTCCATTTGTTC

qPCR reaksiyon koşulları; 2 dakika 95°C'de inkübasyondan sonra; 5 saniye 95°C'de, 40 döngü; 45 saniye 66°C'de, 45 döngü; 2 dakika 74°C'de, 45 döngü ve son olarak 72°C'de 5 dakika, 1 döngü olacak şekilde ayarlandı. mRNA ekspresyon seviyeleri 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} yöntemi (Livak ve ark, 2001) ile belirlendi.

Deneylerde tüm cDNA örnekleri ve standart örnekler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde deneysel hataları ve farkları azaltmak amacıyla üçer örnek olarak analiz edildi.

2. 4. İstatistiksel Analiz

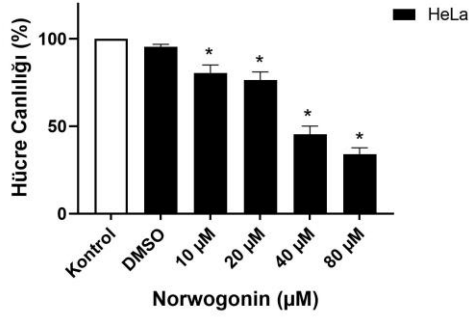
Çalışmada yapılan tüm deneyler birbirinden bağımsız olarak üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve standart sapma değerleri hesaplandı. Bulguların istatistiksel analizi, GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, ABD) programı ile One Way Anova ve testi kullanılarak değerlendirildi.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

3.1. Norwogonin HeLa Hücrelerinde Antikanser Etkiye Sahiptir

HeLa insan rahim ağzı kanseri hücre hattına uygulanan Nor-wogonin'in hücre canlılığı üzerindeki etkisi Şekil 2'de gösterilmektedir. Bulgularımıza göre Nor-wogonin, HeLa hücrelerinde hücre canlılığını doza bağımlı olarak azalttı. Nor-wogonin'in tüm konsantrasyonları (10, 20, 40 ve 80 μ M) HeLa hücrelerinde hücre canlılığını azalttı.

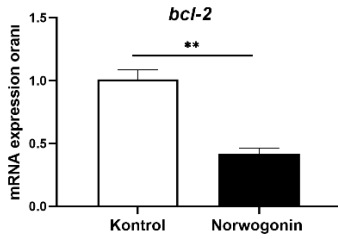
Ayrıca HeLa hücreleri için Nor-wogonin'in IC₅₀ değeri belirlendi. Bu değer 32.09 µM olarak hesaplandı.



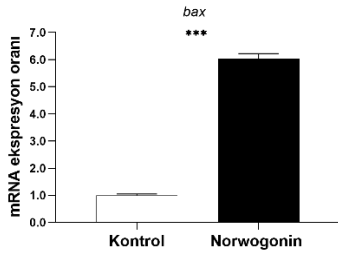
Şekil 2. 24 saat boyunca Nor-wogonin konsantrasyonları ile tedavi edilen insan rahim ağzı kanseri hücrelerinin (HeLa) canlılığındaki % değişim (* $p < 0.05$)

3.1. Norwogonin HeLa Hücrelerinde Apoptotik Etkiye Sahiptir

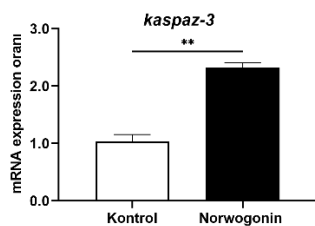
Kontrol grubu için tüm genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri 1.0 olarak değerlendirildi ve sonuçlar kontrol grubuna göre kıyaslandı. Q-PCR sonuçlarına göre Nor-wogonin tedavisi uygulanan HeLa hücrelerinde bcl-2 gen ekspresyonu azalırken (Şekil 3), bax (Şekil 4), kaspaz-3 (Şekil 5) ve p53 (Şekil 6) genlerinin ekspresyonunun arttığı belirlendi. Şekil 3'te verilmiştir.



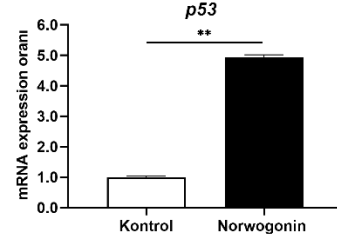
Şekil 3. Nor-wogonin ile tedavi edilen HeLa hücrelerine ve kontrol grubuna ait bcl-2 mRNA ekspresyon oranı ($p < 0,001 = **$)



Şekil 4. Nor-wogonin ile tedavi edilen HeLa hücrelerine ve kontrol grubuna ait bax mRNA ekspresyon oranı ($p < 0,0001 = ***$)



Şekil 5. Nor-wogonin ile tedavi edilen HeLa hücrelerine ve kontrol grubuna ait kaspaz-3 mRNA ekspresyon oranı ($p < 0,001 = **$)



Şekil 6. Nor-wogonin ile tedavi edilen HeLa hücrelerine ve kontrol grubuna ait bcl-2 mRNA ekspresyon oranı ($p < 0,001 = **$)

Flavonoidler gibi bitki kökenli doğal ürünler, birçok ilaç ve diyet takviyesinin önde gelen kaynaklarıdır (Liu ve ark, 2005; Huynh ve ark, 2017). Polihidroksiflavonlar sınıfına dahil olan ve yapı olarak nispeten benzer olan Wogonin'in ve Nor-wogonin'in çeşitli biyolojik etkileri bulunmaktadır (Chipuk ve ark; 2004). Wogonin ve Nor-wogonin arasındaki yapısal fark, Wogonin'in C8'inde bir metoksil (OCH₃) grubunun bulunması ve Nor-Wogonin'in C8'inde bir hidroksil (OH) grubunun (Miyashita ve ark, 1994) varlığından kaynaklanmaktadır. Nor-wogonin'in insan lösemi (HL-60) hücrelerinde Wogonin'den daha etkili bir apoptotik indükleyici olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark, 2020). Wogonin ile karşılaştırıldığında, Nor-wogonin'in sitotoksik/antikanser etkisi hakkında literatürde yeteri kadar çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada Nor-wogonin'in insan rahim ağzı kanseri hücrelerinde antikanser ve apoptotik etkilerini araştırarak literatüre katkı sağlamayı amaçladık. Bulgularımıza göre Nor-wogonin, HeLa hücrelerinde hücre canlılığını yapılan çalışmalarda olduğu (Abd El-Hafeez ve ark, 2019; Chow ve ark, 2008) gibi doza bağlı azalttığı belirlendi. Nor-wogonin'in, insan üçlü meme kanseri hücrelerinin hücre canlılığını azalttığı ve MDA-MB-231, BT-549, HCC70 ve HCC1806 hücrelerindeki IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 32.24, 56.2, 39.05 ve 37.3 µM olduğu bildirilmiştir (Abd El-Hafeez ve ark, 2019). Benzer şekilde Nor-wogonin'in HeLa hücrelerindeki hesaplanan IC₅₀ değeri MDA-MB-231 ve HCC1806 hücrelerinde hesaplanan IC₅₀ değerine yakın bir değer (32.09 µM) olduğu tesbit edildi. Ek olarak, yapılan bir başka çalışma ile Nor-wogonin, HL-60 insan lösemi ve SW48 insan kolon kanseri hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı, HL-60 ve SW48 hücrelerinin IC₅₀ değerleri sırasıyla 21.7 µM ve 15.5 µM olduğu belirlenmiştir (Chow ve ark, 2008), bu değerlerin HeLa hücrelerinde hesapladığımız IC₅₀ değerinden düşük olduğu görülmektedir.

Flavonoidler gibi doğal bileşikler, potansiyel terapötik etkileri ve sağlıklı hücrelere sınırlı toksisiteyi nedeniyle kanserin önlenmesi ve tedavisi için önemli ajanlar olarak kabul edilmektedir. Karsinogenezde flavonoidler hücre içi sinyal iletim yollarına müdahale ederek proliferasyonu, anjiyogenezi, metastazi baskılar ve apoptozu artırır (Srivastava ve ark, 2018; Ravishankar ve ark, 2016). Hücrelerdeki genler tarafından kontrol edilen apoptoz, hücrenin aktif ölüm sürecinin bir parçasıdır. Çalışmamızda Nor-wogonin'in HeLa hücrelerinde apoptotik süreçlerinde görev alan antiapoptotik bcl-2, proapoptotik bax, kaspaz-3 ve p53 genlerinin ekspresyon düzeylerini de araştırdık. HeLa hücrelerinde bcl-2 gen ekspresyonunun azaldığını, bax, kaspaz-3 ve p53 genlerinin ekspresyonunun arttığını belirledik.

Apoptoza giren hücrelerde kaspaz kaskadı aktivasyonu meydana gelir. Bu çalışmada, Nor-wogonin, HeLa hücrelerinde kaspaz-3 gen ekspresyonunun arttığını gözledik. Bax ve bcl-2 gen ekspresyon oranı apoptozun tetiklenmesinde ve hücre ölümünün gerçekleşmesinde önemlidir (Liu ve ark, 2005). Bulgularımıza göre Nor-wogonin uygulanan HeLa hücrelerinde, bcl-2/bax genlerinin ekspresyon oranının apoptozu tetiklediği söylenebilir.

Tümör baskılayıcı protein p53, bax ve bcl-2 gen ekspresyonunu düzenlemekten, DNA onarım mekanizmalarını aktive etmekten, hücre döngüsü kontrol noktalarından ve apoptoz yanıtından sorumludur. DNA'ya zarar veren ajanlar, apoptotik programı aktive etmek için pro-apoptotik bax genini doğrudan aktive etmede öncü bir rol oynayan p53'ü indükler (Chipuk ve ark; 2004; Miyashita ve ark, 1994). Bu çalışmada Nor-wogonin'in, HeLa hücrelerinde p53 ekspresyonunu arttırdığı belirlendi.

4. Sonuç

Sonuçlarımız birlikte değerlendirildiğinde Nor-wogonin insan Rahim ağzı kanseri (HeLa) hücrelerinde antikanser etki göstermiştir. Ayrıca proapoptik genlerden bax, kaspaz-3 ve p53 gen ekspresyonlarını artırma ve antiapoptik bcl-2 gen ekspresyonunu azaltma suretiyle gen düzeyinde hücreleri apoptoza yönlendirdiği söylenebilir. Ancak, Nor-wogonin'in hücre ölümünü hangi moleküler mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirdiğinin detaylı olarak aydınlatılabilmesi ve biyouyumluluk düzeyinin belirlenmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

5. Teşekkür

Bu çalışma Bartın Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2021-FEN-B-001 proje numarası ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Bartın Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz.

Kaynakça

Abd El-Hafeez, A. A., Khalifa, H. O., Mahdy, E. A. M., Sharma, V., Hosoi T., Ghosh, P., et al. (2019). Anticancer effect of nor-wogonin (5, 7, 8-trihydroxyflavone) on human triple-negative breast cancer cells via downregulation of TAK1, NF- κ B, and STAT3. *Pharmacol Rep.* 71(2), 289-298.

Banik, K., Khatoon, E., Harsha, C., Rana, V., Parama, D., Thakur, K. K., Bishayee, A., Kunnumakkara, A. B. (2022). Wogonin and its analogs for the prevention and treatment of cancer: A systematic review. *Phytotherapy Research.*

Bose, S., Banerjee, S., Mondal, A., Chakraborty, U., Pumarol, J., Croley, C. R., & Bishayee, A. (2020). Targeting the JAK/STAT signaling pathway using Phytocompounds for cancer prevention and therapy. *Cell*, 9(6), 1451.

Ceylan, H., Budak, H., Kocpinar, E. F., Baltacı, N. G. & Erdogan, O. (2019). Examining the link between dose-dependent dietary iron intake and Alzheimer's disease through oxidative stress in the rat cortex. *J Trace Elem Med Biol.* 56, 198-206.

Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., et al. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 303, 1010-1014.

Chow, J. M., Huang, G. C., Shen, S. C., Wu, C. Y., Lin, C. W. & Chen, Y. C. (2008). Differential apoptotic effect of wogonin

and nor-wogonin via stimulation of ROS production in human leukemia cells. *J Cell Biochem*, 103, 1394-1404.

Cragg, G. M., & Pezzuto, J. M. (2016). Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and Chemopreventive agents. *Medical Principles and Practice*, 25, 41-59

Daimary, U. D., Dey, P., Rana, V., Banik, K., Kumar, A., Choudhary, H., & Kunnumakkara, A. (2020). Emerging roles of cardamonin, a multitargeted nutraceutical in the prevention and treatment of chronic diseases. *Curr Res Pharmacol Drug Discov*, 10, 2:100008.

Harsha, C., Banik, K., Bordoloi, D., & Kunnumakkara, A. B. (2017). Antiulcer properties of fruits and vegetables: A mechanism based perspective. *Food and Chemical Toxicology*, 108(Pt A), 104-119.

Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 96, 67-202.

Hui, K. M., Huen, M. S., Wang, H. Y., Zheng, H., Sigel, E., Baur, R., et al. (2002). Anxiolytic effect of wogonin, a benzodiazepine receptor ligand isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochem Pharmacol*, 64(9), 1415-1424.

Huynh, D. L., Sharma, N., Singh, A. K., Sodhi, S. S., Zhang, J. J., Mongre, R. K., Ghosh, M., Kim, N., Park, Y. H. & Jeong, D. K. (2017). Anti-tumor activity of wogonin, an extract from *Scutellaria baicalensis*, through regulating different signaling pathways. *Chin J Nat Med*, 15(1), 15-40.

Khatoon, E., Banik, K., Harsha, C., Sailo, B. L., Thakur, K. K., Khwairakpam, A. D., et al. (2020). Phytochemicals in cancer cell chemosensitization: Current knowledge and future perspectives. *Seminars in Cancer Biology*, S1044-579X(20), 30150-4.

Koran, K., et al., (2017). Synthesis, structural and thermal characterizations and in vitro cytotoxic activities of new cyclotriphosphazene derivatives. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 192(9), 1002-1011.

Liu, J., Huang, R., Lin, D., Peng, J., Wu, X. & Lin, Q. (2005). Expression of survivin and bax/bcl-2 in peroxisome proliferator activated receptor- γ ligands induces apoptosis on human myeloid leukemia cells in vitro. *Ann Oncol*, 16, 455-459.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.

Martens, S. & Mithöfer, A. (2005). Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, 66(20), 2399-2407.

Miyasaki, Y., Rabenstein, J. D., Rhea, J., Crouch, M. L., Mocek, U. M., Kittell, P. E., et al. (2013). Isolation and characterization of antimicrobial compounds in plant extracts against multidrug. *PlosOne*, 8, 4.

Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H., Liebermann, D. A., et al. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, 9, 1799-1805.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 1983. 65(1), 55-63.

Parama, D., Boruah, M., Yachna, K., Rana, V., Banik, K., Harsha, C., et al. (2020). Diosgenin, a steroidal saponin, and its analogs: Effective therapies against different chronic diseases. *Life Sciences*, 260, 118182.

- Ravishankar, D., Rajora, A. K., Greco, F. & Osborn, H. M. I. (2013). Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*, 45, 2821-2831.
- S Herzog, T. J & Wright J. D. (2007). The impact of cervical cancer on quality of life--the components and means for management. *Gynecol Oncol*, 107(3), 572-577.
- Singh, M., Maninder, K. & Om, Si. (2014). Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *Eur J Med Chem*, 84, 206-239.
- Srivastava, S., Somasagara, R. R., Hegde, M., Nishana, M., Tadi, S. K., Srivastava, M, et al. (2016). Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Sci Rep*, (12)6, 24049.
- Tewari, D., Patni, P., Bishayee, A., Sah, A. N., & Bishayee, A. (2019). Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: A novel therapeutic strategy. *Seminars in Cancer Biology*, (19), 30405–5.
- Waggoner, S. E. (2003). Cervical cancer. *The Lancet*, (361)9376, 2217-2225.
- Wang, Z., Zhang, Q., Zhou, L., Liu, G., Wu, Q. & Chen, C. (2020). Nor-wogonin flavone suppresses the growth of human colon cancer cells via mitochondrial mediated apoptosis, autophagy induction and triggering G2/M phase cell cycle arrest. *J Buon*, 25(3), 1449-1454.