



Galangin AML-12 Hücrelerini Daktinomisine Bağlı Gelişen Hepatotoksisiteye Karşı Korur

Galangin Protects AML-12 Cells Against Dactinomycin Induced Hepatotoxicity

Melek AKINCI¹, Çağatay OLTULU², Elvan BAKAR³, Zatiye Ayça ÇEVİKELLİ YAKUT⁴

¹Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

²Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

³Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Temel Bilimler Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

⁴Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Edirne; Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı galangin (Gal) daktinomisin kaynaklı hepatotoksisite üzerindeki etkilerini *in vitro* olarak incelemektir.

Gereç ve Yöntem: AML-12 hücre hattı, kontrol, Gal, daktinomisin ve Gal+daktinomisin olmak üzere 4 gruba ayrıldı. IC50 dozu tiazolil mavi tetrazolium bromid yöntemi ile belirlendi. Glutatyon (GSH), süperoksid dismutaz (SOD), katalaz, kaspaz-3 (Cas-3), Cas-9, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1), Bcl-2, Bax, p53, apoptoz bağlayıcı protein inhibitörü (smac/DIABLO), topoizomerez (Top) I ve Top II gen ekspresyonları Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizi ile incelendi.

Bulgular: Daktinomisin, oksidatif etkilere yanıt olarak SOD, katalaz ve GSH ekspresyonunu artırdı. Gal+daktinomisin grubunda Gal uygulaması, antiapoptotik etkilere Apaf-1 ekspresyonunu azaltırken, Bcl-2 ekspresyonunu artırdı. Daktinomisin grubunda DNA hasarına karşı savunma mekanizması nedeniyle p53 seviyeleri arttı. Gal, hasarlı yapıları kaldırmak amacıyla smac/DIABLO ekspresyonunu artırdı. Gruplardaki Bcl-2 ve smac/DIABLO ekspresyon seviyeleri ters orantılı idi. Gal+daktinomisin grubunda Top II ekspresyon düzeyi, daktinomisin grubuna göre daha düşük bulundu. Bu durum, çift sarmal DNA hasarının Gal tarafından azaltıldığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Daktinomisin, galangin, AML-12 hücre hattı, hepatotoksisite, oksidatif stres, apoptoz

ABSTRACT

Aim: The purpose of this study was to evaluate the effects of galangin (Gal) on dactinomycin induced hepatotoxicity *in vitro*.

Materials and Methods: AML-12 cell line was divided into 4 groups as the control, Gal, dactinomycin, and Gal+dactinomycin groups. IC50 dose was determined by the thiazolyl blue tetrazolium bromide test. Gene expressions of glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase, caspase 3 (Cas-3), Cas-9, apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1), B cell CLL/lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), tumor protein p53 (p53), second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein (smac/DIABLO), topoisomerase (Top) I, and Top II were determined with quantitative real-time polymerase chain reaction analysis.

Results: Dactinomycin elevated the expression of SOD, catalase, and GSH in response to oxidative effects. In the Gal+dactinomycin group, Gal administration reduced Apaf-1 expression and increased Bcl-2 expression with antiapoptotic effects. In the dactinomycin group, p53 levels increased due to the defense mechanism against DNA damage. Gal increased smac/DIABLO expression to remove damaged structures. Bcl-2 and smac/DIABLO expression levels in the groups were inversely proportional. In the Gal+dactinomycin group, Top II expression level was lower than in the dactinomycin group. This result indicated that double strand of DNA damage was diminished by Gal.

Conclusion: Gal protected against the hepatotoxicity due to dactinomycin with antioxidant and antiapoptotic effects. Further experimental studies are needed to establish the use of Gal in liver damage.

Keywords: Dactinomycin, galangin, AML-12 cell line, hepatotoxicity, oxidative stress, apoptosis

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Melek AKINCI, Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

Tel.: +90 505 896 45 58 **E-posta:** melektamer@trakya.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0003-3879-4232

Geliş tarihi/Received: 11.05.2023 **Kabul tarihi/Accepted:** 20.06.2023



©Telif Hakkı 2023 Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi / Namık Kemal Tıp Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.
©Copyright 2023 by Tekirdağ Namık Kemal University / Namık Kemal Medical Journal is published by Galenos Publishing House.
Creative Commons Atıf-GayriTicari-Türetilemez 4.0 (CC BY-NC-ND) Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

GİRİŞ

Daktinomisin, *Streptomyces parvulus*'tan türetilen, anti-kanser aktivitesine sahip polipeptit yapısı olan sitotoksik bir ilaçtır. Daktinomisin çocuklarda Wilms tümörünü tedavi etmek için kullanılır¹. Daktinomisin yaygın yan etkileri arasında miyelosüpresyon, mukozit ve hepatotoksisite vardır^{1,2}. Daktinomisin radyasyon tedavisiyle birleştirildiğinde hepatotoksisite riski artar³. Daktinomisin tedavisi alan bireylerin serumunda alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST) düzeylerinin yüksek olduğu belirlendi. Daktinomisin tedavisinde hepatotoksisite riski özellikle küçük çocuklarda daha yüksektir^{4,5}. Hepatik venlerin obliterasyonu, ciddi hepatik obstrüksiyon, portal hipertansiyon ve hepatosit yıkımı daktinomisinin karaciğer hasarına yol açan zararlı etkileri arasındadır⁶.

Antikanser ilaçlarının karaciğer üzerindeki birçok olumsuz etkisini önlemek ve oluşmuşsa hepatotoksisiteyi tedavi etmek için fitoterapinin yararlı bir strateji olduğu düşünülmektedir. Bitkiler hepatotoksisiteyi çeşitli mekanizmalarla iyileştirir. Hepatoprotektif etkiler flavonoidler, monoterenler ve fenoller dahil olmak üzere çeşitli fitokimyasallarda bulunabilir. Bal ve *Alpinia officinarum*'da galangin (Gal) adı verilen biyoaktif bir flavonoid bulunur. Gal'in kemirgenlerde yan etkileri olmaksızın iyi tolere edildiği ve güvenli olduğu gösterilmiştir⁷. Gal'in birçok deneysel hayvan çalışmasında antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olduğu bulunmuştur. Ek olarak Gal, oksidatif stresi azaltarak ve hepatik stellat hücrelerinin aktivasyonunu ve çoğalmasını inhibe ederek karbon tetraklorür (CCl₄) kaynaklı hepatotoksisite ve fibrozise karşı koruma sağlamıştır. Gal'in ayrıca iskemi-reperfüzyon (I/R) kaynaklı karaciğer hasarı olan sıçanlarda antioksidan savunma mekanizmalarını modüle ederek apoptozu iyileştirdiği de bulunmuştur. Gal'in diyabetik sıçanlarda oksidatif stresi azalttığı ve mitokondriyal aktiviteyi sürdürdüğü, böylece karaciğer hasarını hafiflettiği gösterilmiştir⁸.

Gal'in bazı farmakolojik etkileri araştırılmış olmasına rağmen, AML-12 hücre hattında daktinomisin kaynaklı karaciğer hasarını önleme yeteneği üzerine herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda Gal'in daktinomisinin hepatotoksisitesini önleme potansiyelini araştırdık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gruplar

Çalışmamız kontrol, Gal, daktinomisin ve Gal+daktinomisin olmak üzere 4 grup halinde planlandı.

Kimyasallar

Gal ve daktinomisin çözeltileri %0,01 DMSO içeren sulu çözelti içerisinde hazırlandı ve Gal+daktinomisin karışımı 1:1 oranında hazırlandı.

Hücre Kültürü

AML-12 hücreleri (ATCC®, CRL-2254 TM), Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), %5 fetal sıgır serumu, 100 IU/mL penisilin, 10 mg/mL streptomisin ve %1 L-glutamin ile desteklenen Ham's F-12 büyüme ortamında çoğaltıldı. 37 °C'de %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirildiler. Çalışmamız 5. pasajda başlayıp 12. pasajda sona erdi.

Hücre Hatlarına Uygulanacak Madde Konsantrasyonlarının Tiazolil Mavi Tetrazolyum Bromür Yöntemiyle Belirlenmesi

Araştırmada kullanılacak tüm grupların IC₅₀ değerlerini hesaplamak için her kuyucuğa 1x10⁵ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara 180 µL hücre kültür medyumuna inokule edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından kontrol grubu dışındaki ilgili gruplara maddeler uygulanmış olup dozları Şekil 1'de gösterilmiştir (20 µL hacimde). Daha sonra tüm gruplar 24 saat süreyle inkübatörde (37 °C, %5 CO₂) bırakıldı. Kontrol grubuna %0,01 DMSO içeren sulu bir çözelti uygulandı. Her kuyucuğa MTT çözeltisi (20 µL, 5 mg/mL) eklendi. 3 saat sonra formazan kristallerini çözmek için DMSO (200 µL) ilave edildi. Absorbsiyon değeri, 492 nm'de (Thermo Scientific Multiskan Go) bir mikropilaka tarayıcı kullanılarak ölçüldü. Kontrol grubunun %100 canlı olduğu kabul edildi ve IC₅₀ dozu probit analizi ile hesaplandı. MTT testi tüm gruplarda dört tekrarlı olarak yapıldı.

RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

AML-12 hücreleri, her kuyucukta 3x10⁶ hücre olacak şekilde kültür plakalarına 3 kez inoküle edildi. Yirmi dört saat sonra AML-12 hücresi IC₅₀ dozunda kimyasallar uygulandı. Üreticinin talimatlarına göre elde edilen hücrelerden RNA izole edildi (PureLink RNA Mini Kit). Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık değerleri nanodrop (NaNoQ OPTIZEN) ile belirlendi. Üreticinin talimatlarına göre RNA örneklerinden (yüksek kapasiteli cDNA ters transkripsiyon kiti) cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi

Süperoksid dismutaz (SOD), CAT, glutatyon (GSH) ile ilişkili hücrelerin gen ekspresyonu ile kaspaz-3 (Cas-3), Cas-9, Apaf-1, Bcl-2 ile ilişkili X proteini (Bax), B hücresi CLL/lenfoma-2 (Bcl-2), tümör proteini p53 (p53), smac/DIABLO, Top I, Top II ile ilişkili gen ekspresyonunun kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) analizi için Quant Studio 6 Flex device of SYBR Select Master Mix kullanıldı.

PCR koşulları şu şekilde belirlendi: 1 döngü 50 °C'de 2 dakika, 95 °C'de 10 dakika, ardından denatürasyon için 50 döngü 95 °C'de 15 saniye, tavlama ve uzatma için 60 °C'de 1 saniyeydi.

MRNA ekspresyon seviyelerinin analizi için karşılaştırmalı eşik döngüsü (2- $\Delta\Delta Ct$) yöntemi (Kullanıcı Bülteni 2, Applied Biosystems) uygulandı. GSH gen dizilimlerinin bir kopyasını elde etmek için Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nden "Nükleotid" seçildi. Daha sonra arama kutusuna ilgili organizma/gen adı girilerek FASTA belirlendi ve ilgili genler tasarlandı. Gen ekspresyonundaki rölatif kat değişiklikleri, deney grupları ile kontrol grubunun karşılaştırılmasıyla hesaplandı ve β -aktin mRNA ekspresyonuna göre normalize edildi (Tablo 1).

İstatistiksel Analiz

MTT testi ile elde edilen hücre canlılık yüzde verilerine probit analizi uygulanarak IC_{50} değeri hesaplandı. Gen ekspresyonlarının rölatif kat değişim değerlerine one-way ANOVA testi ve post-hoc Tukey uygulandı. $P<0,05$ 'teki değerler anlamlı kabul edildi. Probit analizi ve ANOVA testi Statistical Package for the Social Sciences 20 yazılımı (IBM) ile yapıldı.

BULGULAR

Gal, daktinomisin ve Gal+daktinomisinin AML-12 hücre hatlarının canlılığı üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla 24

saat boyunca MTT analizleri yapıldı. MTT tahlili sonuçları Gal, daktinomisin ve Gal+daktinomisinin AML-12 hücre hattında doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını ortaya koydu (Şekil 1). IC_{50} dozları Gal'de 30,354 μM , daktinomisin'de 2,853 μM ve Gal+daktinomisinde 3,262 μM olarak belirlendi.

SOD mRNA ekspresyon düzeyleri daktinomisin (281,43 kat) ve Gal+daktinomisin (15,04 kat) gruplarında kontrol grubuna göre arttı ($p<0,05$). Gal grubuna göre daktinomisin grubunda SOD mRNA ekspresyon düzeyleri (33,62 kat) yüksekti ($p<0,05$) (Şekil 2A).

Daktinomisin grubu, kontrol (58,86 kat) ve Gal gruplarına (5,98 kat) yanıt olarak CAT mRNA ekspresyonunda artış gösterdi ($p<0,05$) (Şekil 2B).

Gal (20,88 kat), daktinomisin (75 kat) ve Gal+daktinomisin (76,92 kat) gruplarının tümü, kontrollere kıyasla GSH mRNA ekspresyonunda artış gösterdi ($p<0,05$). Gal grubuyla karşılaştırıldığında daktinomisin (3,61 kat) ve Gal+daktinomisin (3,7 kat) gruplarında GSH mRNA ekspresyon seviyeleri arttı ($p<0,05$) (Şekil 2C).

Kontrol grubuna göre, Cas-3 mRNA ekspresyonu Gal (6,89 kat) ve Gal+daktinomisin (5,68 kat) gruplarında yüksek bulundu ($p<0,05$). Gal grubuyla karşılaştırıldığında Daktinomisin grubu (4,82 kat) Cas-3 mRNA ifadesinde azalma gösterdi ($p<0,05$) (Şekil 2D).

Gal (12,12 kat) ve Gal+daktinomisin (4,25 kat) gruplarında Cas-9 mRNA ekspresyonu kontrol grubuna göre daha yüksekti ($p<0,05$). Diğer yandan Daktinomisin (8,78 kat) ve Gal+daktinomisin (2,85 kat) gruplarında Cas-9 mRNA ekspresyonu Gal grubuna göre düşüktü ($p<0,05$) (Şekil 2E).

Kontrol ve Gal grupları ile karşılaştırıldığında, apaf-1 mRNA ekspresyonu Daktinomisin (30,34 kat ve 14,81 kat) ve Gal+daktinomisin (62,61 kat ve 10,26 kat) gruplarında daha yüksekti ($p<0,05$) (Şekil 2F).

Bax mRNA ekspresyonu Gal (11,90 kat), daktinomisin (12,19 kat) ve Gal+daktinomisin (14,04 kat) gruplarında, kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu ($p<0,05$) (Şekil 3A).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Bcl-2 mRNA ekspresyonu Gal+daktinomisin grubunda artarken (2,43 kat), Gal grubunda ise (0,45 kat) düştü ($p<0,05$). Gal grubuyla karşılaştırıldığında ise Bcl-2 mRNA ekspresyonu daktinomisin (2,11 kat) ve Gal+daktinomisin (5,4 kat) gruplarında daha yüksekti (Şekil 3B).

p53 mRNA ekspresyonu tüm gruplarda kontrol grubuna göre arttı (Gal grubu için 54,55 kat, daktinomisin grubu için 201,59 kat, Gal+daktinomisin grubu için 11,99 kat) ($p<0,05$). p53 mRNA ekspresyonu, Gal grubuna kıyasla, daktinomisin

Tablo 1. qRT-PCR analizi için değerlendirilen genlerin primer dizilimleri

Gen	Primer dizilimler (ileri/geri)
SOD	F: AGCTGCACCACAGCAAGCAC ⁸ R: TCCACCACCCTTAGGGCTCA
CAT	F: TCCGGGATCTTTTAACGCCATTG ⁹ R: TCGAGCACGGTAGGGACAGTTCA
GSH	F: ACTTGGCACTCTCTCTCTGA R: AGGCACTAGAACCTGCTGGA
Cas-3	F: GGATTGAGACAGACAGTGG ¹⁰ R: CATGGGATCTGTTCTTTGC
Cas-9	F: GAGTCAGGCTCTCCTTTG ¹⁰ R: CCTCAAACCTCAAGAGCAC
Apaf-1	F: GATATGGAATGTCTCAGATGGCC ¹¹ R: GGTCTGTGAGGACTCCCCA
Bax	F: TTCATCCAGGATCGAGCAGA ¹⁰ R: GCAAAGTAGAAGGCAACG
Bcl-2	F: ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA ¹⁰ R: ACAGTCCACAAAGGCATCC
p53	F: CACGAGCGCTGCTCAGATAGC ¹⁰ R: ACAGGCACAAACACGCACAAA
Smac/DIABLO	F: CTCTGTGGCTGAGGGTTGAT ¹² R: TTGTAGATGATGCCACAGG
Top I	F: TCATACTGAACCCAGCTCC ¹⁰ R: GTCCTGCAAGTGCTTGTCA
Top II	F: CTTCTCTGATATGGACAAACATAAGATTCC ¹⁰ R: GGACTGTGGGACAACAGGACAATAC

SOD: Süperoksid dismutaz, Cas: Kaspaz, GSH: Glutasyon, qRT-PCR: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

grubunda artarken (3,64 kat) ve Gal+daktinomisin grubunda (4,72 kat) azaldı ($p<0,05$) (Şekil 3C).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda Smac/DIABLO mRNA ekspresyonu arttı (Gal grubu için 105,12 kat, daktinomisin grubu için 59,75 kat, Gal+daktinomisin grubu için 56,55 kat) ($p<0,05$). Gal grubuyla karşılaştırıldığında ise, daktinomisin (1,76 kat) ve Gal+daktinomisin (2,26 kat) gruplarında Smac/DIABLO mRNA ekspresyonu azaldı ($p<0,05$) (Şekil 3D).

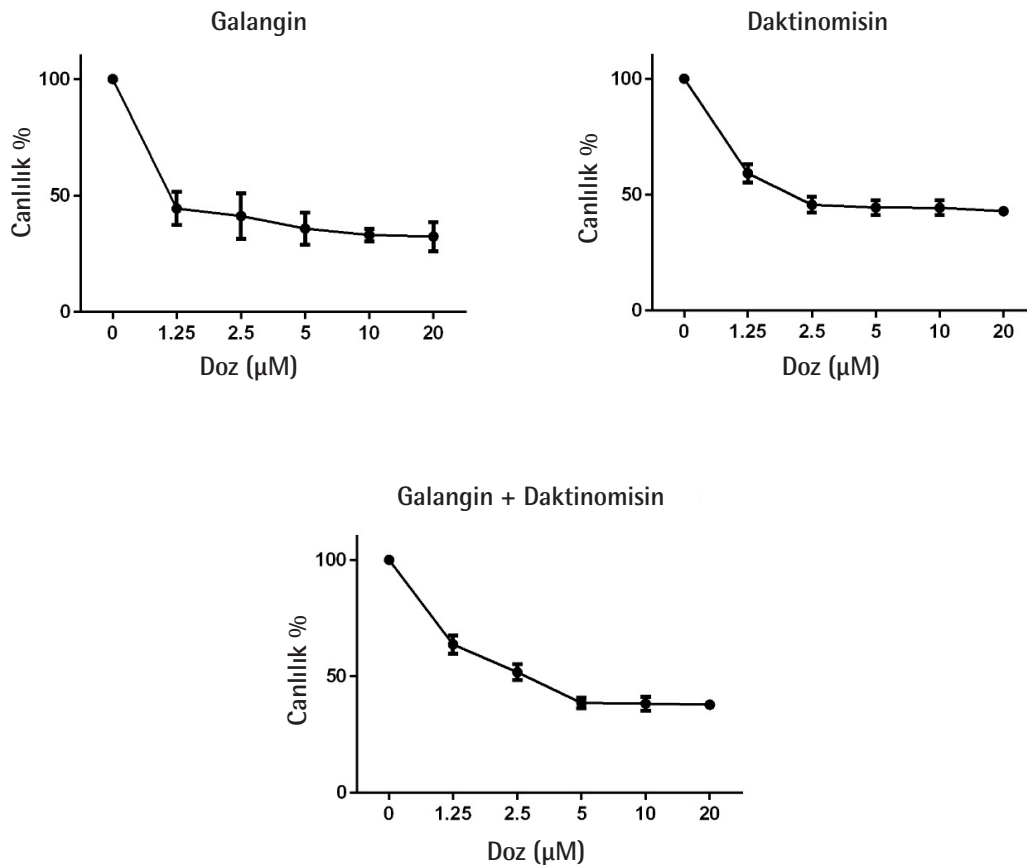
Kontrol grubu ve Gal grubuyla karşılaştırıldığında, top 1 mRNA ekspresyonunun Daktinomisin (3,13 kat ve 3,52 kat) ve Gal+daktinomisin gruplarında (6,83 kat ve 7,67 kat) daha yüksek olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil 3E).

Top II mRNA ekspresyonu daktinomisin grubunda kontrol grubuna göre daha yüksekti (1,58 kat) ($p<0,05$). Top II mRNA ekspresyonu, Gal grubuna kıyasla ($p<0,05$) (Şekil 3F) daktinomisin grubunda (1,98 kat) artış gösterdi.

TARTIŞMA

Daktinomisin karaciğer hasarına yol açabilecek ciddi toksik etkilere sahiptir. Doza, kombinasyon tedavisine ve hastayla ilgili koşullara bağlı olarak daktinomisin serum AST ve ALT düzeylerini yükseltir. Bu klinik durum karaciğer hasarına kadar ilerleyebilir¹³. En önemli ve doğal flavonoidlerden biri polifenolik molekül Gal'dir¹⁴. Gal'in kanser tedavisindeki yararlı etkilerinin yanı sıra kemoterapi ve radyoterapiye karşı antijenotoksik olduğu da gösterilmiştir^{14,15}. Çalışmamız Gal'in daktinomisin kaynaklı hasara karşı hepatoprotektif etkiler sağladığını *in vitro* göstermiştir.

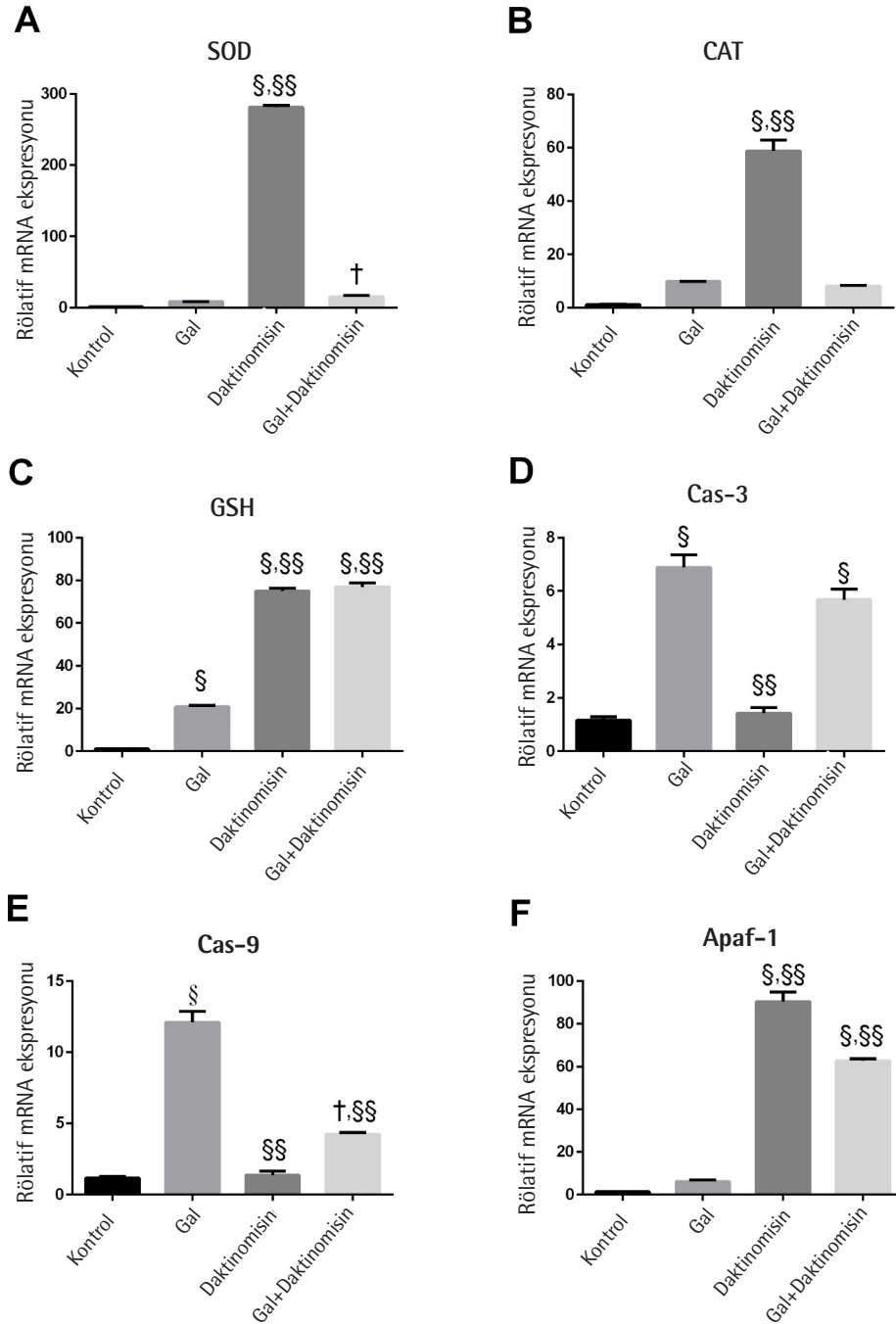
Hücrelerde bulunan antioksidan enzimler arasında SOD ve CAT bulunmaktadır. SOD, süperoksit anyonunu H_2O_2 'ye dönüştürür ve bu daha sonra CAT tarafından H_2O 'ya indirgenir. Ayrıca antioksidan bileşik GSH serbest radikallerle reaksiyona girerek oksitlenmiş GSH üretir. Önceki çalışmalara göre Gal'in antioksidan aktivitesi vardır¹⁶. Destekleyici olarak, çalışmamızda Gal uygulamasının antioksidan enzimler SOD ve CAT mRNA ekspresyonunu artırdığını görüldü. Ayrıca GSH mRNA



Şekil 1. Her tedavi grubunun MTT tahlil sonuçları. Dikey çubuklar standart sapmayı temsil etmektedir ($n=4$, ortalama±standart sapma) (canlılık %'si=Örneklem absorbans ortalaması / kontrol absorbans ortalaması $\times$ 100)

ekspresyonunu artırmıştır. Sonuçlarımıza göre daktinomisin SOD, CAT ve GSH mRNA ekspresyonlarını da artırdı. Hücrenin antioksidan aktiviteyi artırabilmesi nedeniyle bu durum daktinomisin oksidan etkilerine verilen cevaba bağlı olabilir.

Gal'in koruyucu etkilerinden dolayı Gal+daktinomisin grubunda SOD ve CAT mRNA ekspresyonları daktinomisin grubuna göre daha düşüktü.



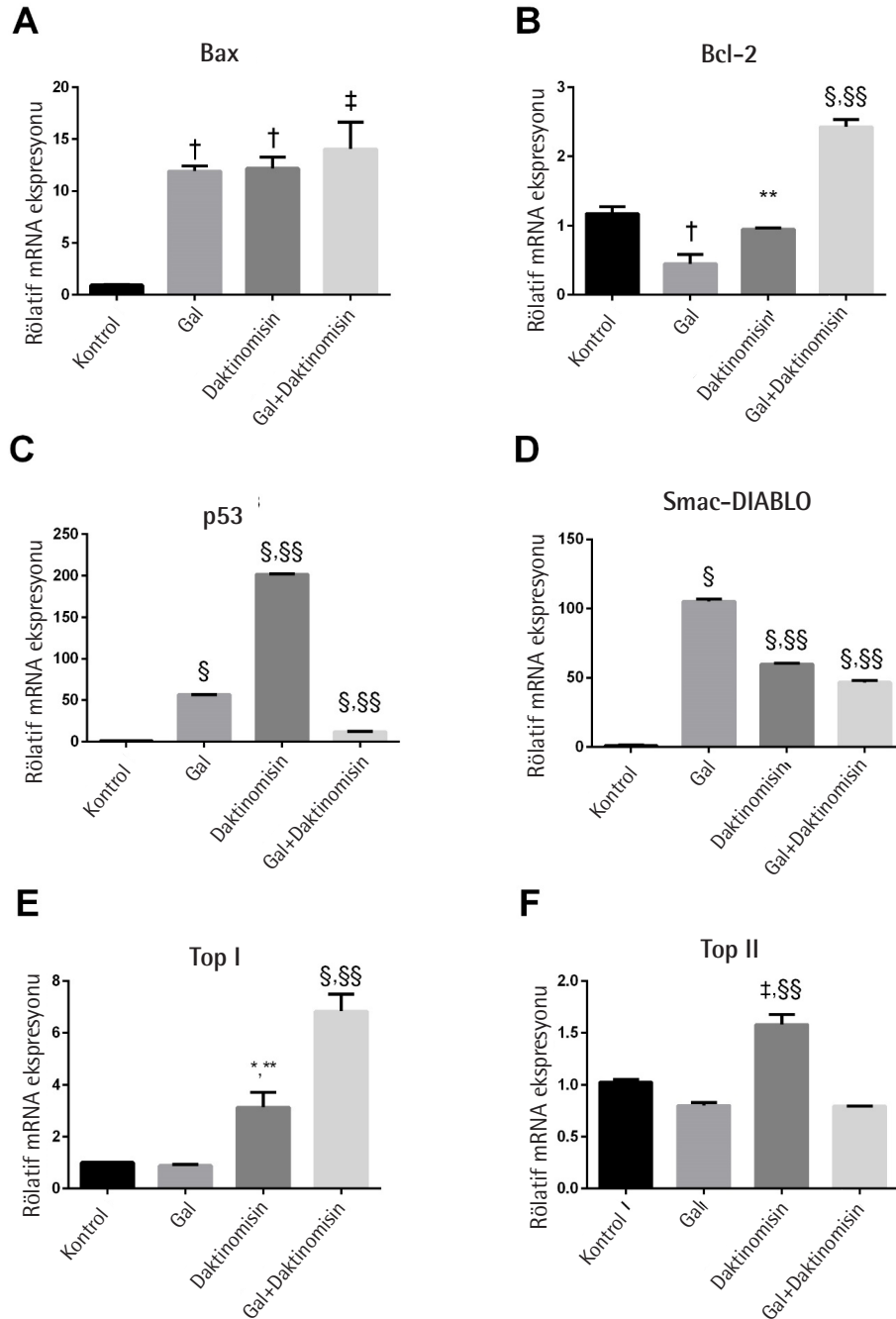
Şekil 2. SOD (A), CAT (B), GSH (C), Cas-3 (D), Cas-9 (E), ve Apaf-1 (F) rölatif mRNA ekspresyonu

*Kontrol grubuyla kıyaslandığında, $p < 0,05$, $^{\dagger}p < 0,01$, $^{\dagger\ddagger}p < 0,001$, $^{\$}p < 0,0001$, **Gal grubuyla kıyaslandığında $p < 0,05$, $^{++}p < 0,01$, $^{++\ddagger}p < 0,001$, $^{SS}p < 0,0001$

SOD: Süperoksit dismutaz, Cas: Kaspaz, GSH: Glutatyon

Apoptoz, canlı organizmalarda dengeyi koruyan kontrollü hücre ölümü için kullanılan terimdir. Apoptoz çeşitli hastalıkların ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Daktinomisin birçok dokuda apoptozu tetiklemektedir ve bu da kemoterapide olumlu etkilere sahiptir. Bununla birlikte apoptoz, karaciğer hasarı

gibi olumsuz etkilerde de rol oynayabilir. Hücrelerdeki apoptoz sırasında mitokondri, Apaf-1 ve ATP ile bir kompleks oluşturan sitokrom-c'yi serbest bırakır. Böylece sitozolde inhibitör Cas ve Cas-9'u aktive eden bir apoptozom kompleksi üretilir. Ayrıca Cas-9, efektör Cas olan Cas-3'ü aktive eder. Sonuçlarımıza göre



Şekil 3. Bax (A), Bcl-2 (B), p53 (C), smac/DIABLO (D), Top I (E) ve Top II (F) rölatif mRNA ekspresyonu

*Kontrol grubuyla kıyaslandığında, $p<0,05$, † $p<0,01$, ‡ $p<0,001$, \$ $p<0,0001$, **Gal grubuyla kıyaslandığında, $p<0,05$, †† $p<0,01$, ††† $p<0,001$, \$\$\$ $p<0,0001$

Gal: Galangin

daktinomisin grubunda Apaf-1 mRNA ekspresyon düzeyleri anlamlı düzeyde arttı; ancak Cas-3 ve Cas-9'un ekspresyon seviyeleri yükselmedi. Bu durum karaciğer hasarına bağlı apoptoz yolunun Cas-9 ve Cas-3'e kadar ilerlemediğini göstermektedir¹⁷.

Bax proapoptotik etki sağlayan bir proteindir. Çalışmamızda Gal ve daktinomisin, kontrol grubuna göre Bax gen ekspresyonunu artırdı ve apoptozu indükledi. Benzer şekilde Zhang ve ark.¹⁸, Gal'in Bax düzeylerinde yükselme yoluyla apoptozu tetiklediğini göstermişlerdir. Bcl-2 antiapoptotik proteinlerden biridir. Sonuçlarımıza göre Gal+daktinomisin grubunda Bcl-2 ekspresyon düzeyleri daktinomisin grubuna göre daha yüksekti, bu da Gal'in antiapoptotik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. P53 DNA onarımını sağlayan bir proteindir. Daktinomisin grubunda DNA hasarına karşı savunma mekanizması nedeniyle p53 düzeyleri yüksekti. Ayrıca p53'ün Apaf-1 düzeylerini artırarak hücreleri apoptozu duyarlı hale getirebildiği bilinmektedir. Sonuçlarımıza göre daktinomisin grubunda hem p53 hem de Apaf-1 düzeylerinin arttığı görüldü¹⁹. Ayrıca Gal, p53 seviyelerini yükseltti. Literatüre göre Gal, hücre otofajisini tetikleyen ve hücre metabolik stresi azaltan p53 düzeylerini artırmaktadır²⁰.

Apoptoz sırasında mitokondri, Cas'lardaki IAP inhibisyonunun azalmasına bağlı olarak apoptozu şiddetlendiren smac/DIABLO'yu serbest bırakır²¹. Çalışmamızda Gal uygulamasıyla artan smac/DIABLO ekspresyonunun hasarlı yapıların ortadan kaldırılmasını sağladığı görüldü. smac/DIABLO salınımı Bcl-2 tarafından zayıflatılmaktadır²². Bu bağlamda çalışmamızın sonuçları gruplarda Bcl-2 ve smac/DIABLO transkript düzeylerinin ters orantılı olduğunu ortaya koymuştur. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada fenolik bir bileşik olan ellagik asit ile de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ellagik asidin smac/DIABLO ekspresyonunu doza bağlı bir şekilde yükselterek anti-kanser aktivitesi sağladığı gösterilmiştir²³.

DNA-topoizomerazlar, DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve kromozomal segregasyon dahil olmak üzere, DNA yapısını ve metabolizmasını düzenlemek için gerekli enzimlerdir. Top I enzimleri tipik olarak DNA çift sarmalının tek zincirini kıran monomerlerdir. Diğer yandan, iki veya daha fazla alt birime sahip Top II enzimleri, DNA'nın çift sarmalının her iki zincirini de kırma kapasitesine sahiptir²⁴. Pek çok hastalık, oksidatif stres ve inflamasyon gibi çeşitli durumlarda topoizomeraz düzeylerinde artış görülebilmektedir²⁵. Sonuçlarımıza göre Gal daktinomisin ile birlikte uygulandığında Top II düzeyi daktinomisin grubuna göre azalmıştı. Bu sonuç, çift sarmallı DNA hasarının Gal tarafından azaldığını göstermiştir. Ancak Gal+daktinomisin grubunda Top I düzeyinin arttığı tespit edildiğinden, daktinomisin ile birlikte uygulanan Gal miktarı tek zincir DNA hasarını onarmaya yetmemiştir.

SONUÇ

Çalışmamız Gal'in, oksidatif stresi, apoptotik yollardaki anormallikleri ve karaciğer dokusundaki çift sarmallı DNA hasarını hafifleterek daktinomisine bağlı hepatotoksisteye karşı koruma sağlayabildiğini gösterdi. Gal'in hepatotoksisteye tedavisinde kullanılabilmesi için daha ileri deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

Etik

Etik Kurul Onayı ve Hasta Onayı: Çalışmamız hücre kültürü çalışması olduğu için Etik Kurul Formu ve Hasta Onam Formu gerekli değildir.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Konsept: M.A., Ç.O., E.B., Dizayn: M.A., Ç.O., E.B., Veri Toplama veya İşleme: M.A., Ç.O., E.B., Analiz veya Yorumlama: M.A., Ç.O., E.B., Z.A.Ç.Y., Literatür Arama: M.A., E.B., Z.A.Ç.Y., Yazan: M.A., Z.A.Ç.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komitesi tarafından 2018/274 hibe numarasıyla finanse edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Temel MK. Sitotoksik kemoterapötiklerin yirminci yüzyıldaki gelişimi. *Türk Onkoloji Dergisi*. 2015;30:96-108.
2. Baskin Y, Amirfallah A, Calibasi G, Olgun N. Hepatopathy-Thrombocytopenia Syndrome During Actinomycin D Treatment May Be Related to MDR1 (ABCB1) Gene Polymorphisms. *Am J Ther*. 2016;23:e594-6.
3. Farruggia P, Macaluso A, Tropia S, Di Marco F, Russo D, Grigoli A, et al. Hepatopathy-thrombocytopenia syndrome (HTS) after actinomycin-D therapy: report of three cases and review of the literature. *Pediatr Hematol Oncol*. 2011;28:237-43.
4. Raine J, Bowman A, Wallendszus K, Pritchard J. Hepatopathy-thrombocytopenia syndrome--a complication of dactinomycin therapy for Wilms' tumor: a report from the United Kingdom Childrens Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 1991;9:268-73.
5. Barnett KT, Malafa MP. Complications of hepatic artery infusion: a review of 4580 reported cases. *Int J Gastrointest Cancer*. 2001;30:147-60.
6. Sandrasegaran K, Alazmi WM, Tann M, Fogel EL, McHenry L, Lehman GA. Chemotherapy-induced sclerosing cholangitis. *Clin Radiol*. 2006;61:670-8.
7. Abbaszadeh H, Keikhaei B, Mottaghi S. A review of molecular mechanisms involved in anticancer and antiangiogenic effects of natural polyphenolic compounds. *Phytother Res*. 2019;33:2002-14.
8. Aladaileh SH, Abukhalil MH, Saghir SAM, Hanieh H, Alfwuaires MA, Almainan AA, et al. Galangin Activates Nrf2 Signaling and Attenuates Oxidative Damage, Inflammation, and Apoptosis in a Rat Model of Cyclophosphamide-Induced Hepatotoxicity. *Biomolecules*. 2019;9:346.
9. Dkhil MA, Moneim AE, Al-Quraishy S. Indigofera oblongifolia Ameliorates Lead Acetate-Induced Testicular Oxidative Damage and Apoptosis in a Rat Model. *Biol Trace Elem Res*. 2016;173:354-61.

10. Oltulu C, Akıncı M, Elvan B. Antitumor Activity of Etoposide, Puerarin, Galangin and Their Combinations in Neuroblastoma Cells, *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*. 2022;5:407-23.
11. Yakovlev AG, Ota K, Wang G, Movsesyan V, Bao WL, Yoshihara K, et al. Differential expression of apoptotic protease-activating factor-1 and caspase-3 genes and susceptibility to apoptosis during brain development and after traumatic brain injury. *J Neurosci*. 2001;21:7439-46.
12. Tokatlı C, Doğanlar O, Doğalar ZB. Meriç Delta Balıklarında Çevre Kirliliğinin Genotoksik Etkileri: Antioksidan Savunma, Isı Şok Protein Sinyali ve DNA Hasar-Onarım Mekanizmaları. *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*. 2020;6:14-24.
13. Dactinomycin. NCBI Bookshelf. 2017. (Accessed 10 April 2023).
14. Fang D, Xiong Z, Xu J, Yin J, Luo R. Chemopreventive mechanisms of galangin against hepatocellular carcinoma: A review. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:2054-61.
15. Rampogu S, Gajula RG, Lee KW. A comprehensive review on chemotherapeutic potential of galangin. *Biomed Pharmacother*. 2021;141:111808.
16. Bacanlı M, Başaran AA, Başaran N. The antioxidant, cytotoxic, and antigenotoxic effects of galangin, puerarin, and ursolic acid in mammalian cells. *Drug Chem Toxicol*. 2017;40:256-62.
17. Ali N, Rashid S, Nafees S, Hasan SK, Sultana S. Beneficial effects of Chrysin against Methotrexate-induced hepatotoxicity via attenuation of oxidative stress and apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2014;385:215-23.
18. Zhang HT, Luo H, Wu J, Lan LB, Fan DH, Zhu KD, et al. Galangin induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via the mitochondrial pathway. *World J Gastroenterol*. 2010;16:3377-84.
19. Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie*. 2017;135:111-25.
20. Wen M, Wu J, Luo H, Zhang H. Galangin induces autophagy through upregulation of p53 in HepG2 cells. *Pharmacology*. 2012;89:247-55.
21. Roberts DL, Merrison W, MacFarlane M, Cohen GM. The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. *J Cell Biol*. 2001;153:221-8.
22. Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J*. 2001;20:6627-36.
23. Abubakar MB, Abdullah WZ, Sulaiman SA, Suen AB. A review of molecular mechanisms of the anti-leukemic effects of phenolic compounds in honey. *Int J Mol Sci*. 2012;13:15054-73.
24. Mastrangelo S, Attina G, Triarico S, Romano A, Maurizi P, Ruggiero A. The DNA-topoisomerase Inhibitors in Cancer Therapy. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2022;15:553-62.
25. Rialdi A, Campisi L, Zhao N, Lagda AC, Pietzsch C, Ho JSY, et al. Topoisomerase 1 inhibition suppresses inflammatory genes and protects from death by inflammation. *Science*. 2016;352:aad7993.