

Metastatik Prostat Kanserinde Nobiletinin Sitotoksik ve Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

Determination of Cytotoxic and Apoptotic Effects of Nobiletin on Metastatic Prostate Cancer

Gamze Güney Eskiler, Asuman Deveci Özkan, Süleyman Kaleli

Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Sakarya, Türkiye

Yazışma Adresi / Correspondence:

Gamze Güney Eskiler

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi SÜDETAM, Korucuk Mahallesi Konuralp Bulvarı No:81/1 Korucuk Kampüsü, Adapazarı/Sakarya

T: +90 505 201 01 38 E-mail: gamzeguney@sakarya.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 20.11.2018 Kabul Tarihi / Accepted : 10.12.2018

Öz

Amaç Nobiletin, C21H22O8 kimyasal formülü ve 402.39 kD molekül ağırlığına sahip, turuncu kabuklarında bulunan bir O-metillenmiş flavanoiddir. Nobiletinin sahip olduğu antikanser, antiviral ve anti-inflamatuar etkilerden dolayı, kanser tedavisinde potansiyel terapötik bir ajan olarak dikkat çekmektedir. Prostat kanserinde metastaza neden olan kanser hücrelerinin invaziv özelliğinin yüksek olması, hastalığın tedavisini zorlaştırmakta ve hastalarda kötü prognoza neden olan en önemli faktörlerden birisidir. Bu nedenle mevcut çalışmada, nobiletinin yüksek metastatik potansiyeli olan insan prostat kanseri (PC-3) ve insan göbek kordonu veni endotel hücrelerinde (HUVEC) sitotoksik ve apoptotik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. (*Sakarya Tıp Dergisi* 2018, 8(4):766-774)

Gereç ve Yöntemler Mevcut çalışmada, PC-3 ve HUVEC hücrelerinde nobiletinin sitotoksik etkisi WST-1 analizi ile, apoptotik etkisi ise Annexin V, akridin oranji boyaması ve hücre siklusu analizleri ile kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir.

Bulgular WST-1 analizi ile elde edilen bulgulara göre, 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda nobiletin uygulanan PC-3 hücrelerinde canlılık oranının anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Annexin V ve hücre siklusu analizleri ile elde edilen verilere göre, nobiletinin PC-3 hücrelerinde özellikle erken apoptoza ve G0/G1 fazında artışa neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, HUVEC hücrelerinde 80 µM konsantrasyona kadar toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Sonuç Kontrol hücreleri ile karşılaştırmalı olarak nobiletinin metastatik prostat kanseri hücrelerinde anti-proliferatif etkisinin, erken apoptoz ve G0/G1 fazında hücre miktarında artış ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Ancak, nobiletinin metastatik prostat kanserinde neden olduğu apoptotik ölümün moleküler mekanizmasının in vitro ve in vivo olarak detaylı araştırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler Prostat kanseri; Flavonoidler; Nobiletin; Apoptoz

Abstract

Objective Nobiletin is an O-methylated flavanoid found in citrus with a C21H22O8 chemical formula and 402.39 kD molecular weight. Nobiletin has a potential therapeutic agent in the treatment of cancer due to the anticancer, antiviral and anti-inflammatory effects. The high invasive property of cancer cells leading to metastasis, has complicated prostate cancer treatment and this is one of the most important factor causing poor prognosis in the patients with prostate cancer. Therefore, the aim of this study was to investigate the cytotoxic and apoptotic effects of nobiletin in high metastatic potential human prostate cancer cell line (PC-3) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). (*Sakarya Med J* 2018, 8(4):766-774).

Materials and Methods In the present study, the cytotoxic effect of nobiletin was determined by WST-1 analysis, and the apoptotic effect was determined qualitatively and quantitatively by Annexin V, acridine orange staining and cell cycle analysis in PC-3 and HUVEC cells.

Results According to the results obtained by WST-1 analysis, the viability of PC-3 cells significantly reduced after treatment with different concentrations of nobiletin for 24 and 48 hours. According to the results obtained by Annexin V and cell cycle analysis, it was determined that nobiletin induced especially early apoptotic cell population and increased the proportion of PC-3 cell in the G0/G1 phase. Additionally, no toxic effects were observed up to 80 µM concentration of nobiletin in HUVEC cells.

Conclusion Nobiletin has been shown to exert anti-proliferative effect through early apoptosis and increased number of cells arrested in G0/G1 phase in metastatic prostate cancer cells compared with control cell. However, the molecular mechanism of apoptotic cell death caused by nobiletin in metastatic prostate cancer should be investigated by in vitro and in vivo.

Keywords Prostate Cancer; Flavonoids; Nobiletin; Apoptosis

Giriş

Prostat kanseri kanser kaynaklı ölümlerde akciğer kanserinden sonra gelen ve erkeklerde en sık görülen ikinci malign tümör tipidir.^{1,2} Bununla birlikte, prostat kanseri hastalarında hormonal tedaviye karşı gelişen ilaç direncine bağlı ölümlerin kaçınılmaz olmasından dolayı prostat kanseri tedavisinde mevcutta kullanılan tedavi seçenekleri yetersizdir.³ Yapılan çalışmalar, diyetin prostat kanseri tümörogenezinde ve biyolojisinde önemli bir rol oynadığını ve çevresel faktörlerin de prostat kanseri oluşmasına ve gelişmesine katkıda bulunduğunu göstermektedir.⁴

Flavonoidler; meyveler, sebzeler, çaylar ve şaraplarda bulunan fitokimyasallardır. Turunçgil flavonoidleri bakımından zengin doğal besinlerin tüketilmesinin kanser tedavisinde kimyasal ilaç kullanımını önlemede etkin bir rol alabileceği öne sürülmektedir. Meyve, sebze ve çay gibi gıdalarda 400'den fazla flavonoid bulunmaktadır.⁵⁻⁷ Tangeretin, nobiletin, hesperetin, hesperidin, naringenin ve naringin gibi turunçgil flavonoidlerinin kanser tedavisinde potansiyel terapötik etkileri bilinmektedir. Literatürde, in vitro anti-kanserojen özelliklerinden dolayı flavonoidlerin, farklı moleküler mekanizmalar aracılığıyla belirli kanser tiplerinde anti-proliferatif etkiye sahip olduğu belirtilmektedir.^{5,8} Ayrıca flavonoidler kanser hücrelerinde oksidasyon veya inflamasyonu önleyerek, anjiogenez ve hücre proliferasyonunu azaltarak veya apoptozu uyularak anti-kanser etkilerini göstermektedirler.⁹

Nobiletin, C₂₁H₂₂O₈ kimyasal formülü ve 402.39 kD molekül ağırlığına sahip, turunçgil kabuklarında bulunan bir O-metillenmiş flavanoiddir.¹⁰ Nobiletinin sahip olduğu antikanser, antiviral ve anti-inflamatuar etkilerden dolayı nobiletin ve kanser riski arasında ters bir ilişki tespit edilmiştir.^{11,12} Yeni bulgular nobiletinin bir hücre farklılaşma modülatörü olarak tanımlanmaktadır. Hücre farklılaşması anjiyogenez de çok önemli bir adımdır ve bu nedenle hem tümör büyümesini hem de metastazı etkilemektedir.¹³ Bu bulgular nobiletinin inflamasyonla ilişkili tümör oluşumunda muhtemel bir kemopreventif ajan olabileceğini önermektedir.¹⁴

Günümüzde metastatik prostat kanseri tedavisi zordur ve hastaların ölümüyle sonuçlanabilmektedir.^{15,16} Prostat kanserinde metastaza neden olan kanser hücrelerinin invaziv özelliğinin yüksek olması, hastalığın tedavisini zorlaştırmakta ve hastalarda kötü prognoza neden olan en önemli faktörlerden birisidir.¹⁶ Nobiletinin prostat kanseri riskini azalttığı literatürde belirtilmektedir.¹⁷ Ayrıca, farklı kanser tiplerinde (meme, over ve kolon) potansiyel terapötik etkisi belirlenmesine rağmen, metastatik prostat kanserinde etkisine dair literatürde sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.¹⁸⁻²⁰ Bu nedenle mevcut çalışmanın amacı, bir flavonoid olan nobiletinin yüksek metastatik potansiyeli olan insan prostat kanseri (PC-3) ve insan göbek kordonu veni endotel hücrelerinde (HUVEC) sitotoksik ve apoptotik etkilerinin kalitatif ve kantitatif olarak incelenmesidir.

Gereç ve Yöntemler

Hücre Kültürü ve Kültür Koşulları

Mevcut çalışmada, bir in vitro araştırması olduğu için, prostat kanseri hücre hattı olarak PC-3 ve kontrol hücre hattı olarak HUVEC hücreleri kullanılmıştır ve hücreler American Type Culture Collection'dan temin edilmiştir. PC3 hücre hattı RPMI besiyeri (Sigma-Aldrich, ABD), HUVEC hücre hatları ise Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) (Sigma-Aldrich, ABD) besiyerinde üretilmiş olup besiyeri ortamlarına % 10 Fetal Sığır Serumumu (FBS) (Gibco, Invitrogen, ABD) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Sigma-Aldrich, ABD) eklenerek kültüre edilmiştir. Hücreler üreme kaplarını

yaklaşık %80-90'ını doldurana kadar 37°C'de %95 nem ve %5 CO2 şartlarındaki etüv içerisinde inkübe edilmiştir ve invert mikroskop altında hücrelerin takibi gerçekleştirilmiştir.

Sitotoksitenin Belirlenmesi

10 mg Nobiletin 10 ml dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde stok solüsyon 25 mM olacak şekilde hazırlanarak -20°C' de ve karanlık koşullarda saklanmıştır. PC-3 ve HUVEC hücreleri her bir kuyuya 2x10⁴ hücre olacak şekilde 96'lı kuyucuklu kültür plakalarında ekildikten sonra 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sonrasında hücrelere 10, 20, 40 ve 80 µM nobiletin eklendikten sonra hücreler 24 ve 48 saat boyunca 37°C'de %95 nem ve %5 CO2 ortamında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir kuyuya 10 µL WST-1 (Proliferation Colorimetric Reagent WST-1, BioVision (ABD)) reaktifi eklenerek hücreler hücreler 37°C' de ve karanlıkta 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Ardından reaktif ile inkübe edilen hücreler 450 nm' de multi- mikropate okuyucu (BioTek Instruments, ABD) yardımı ile analiz edilmiştir. Her bir deney 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Doza bağlı canlılık oranları betimsel istatistikleri yüzde (%) olarak belirtilmiştir.

Annexin V Analizi

PC-3 ve HUVEC hücrelerinde nobiletinin apoptotik etkisinin belirlenmesi için Muse Annexin V & Dead Cell Assay (Millipore, Almanya) kullanılmıştır. PC-3 ve HUVEC hücreleri 6 kuyucuklu plaka içerisinde her bir kuyuya 1 x 10⁵ olacak şekilde ekildikten 24 saat sonra, 10, 20, 40 ve 80 µM nobiletin ile 48 saat boyunca 37°C'de % 95 nem ve % 5 CO2 ortamında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, hücreler 5 dakika boyunca 2000 x g'de santrifüj edildikten sonra, iki kez soğuk fosfat tamponu (PBS) ile yıkanmıştır. Sonrasında, her bir hücre grubu Annexin V & Dead Cell Assay kiti ile boyanarak karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dakika süreyle ile inkübe edilmiştir. Boyama işlemi tamamlanan hücreler Muse® Cell Analyzer (Millipore, Almanya) kullanılarak analiz edilmiştir.

Hücre Siklusu Analizi

Nobiletinin PC-3 ve HUVEC hücrelerinde hücre siklusu üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla Muse Cell Cycle Kit (Millipore, Almanya) kullanılmıştır. PC-3 ve HUVEC hücreleri 6 kuyucuklu plaka içerisinde her bir kuyuya 5 x 10⁵ olacak şekilde ekildikten 24 saat sonra, 10, 20, 40 ve 80 µM nobiletin ile 48 saat boyunca 37°C'de % 95 nem ve % 5 CO2 ortamında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler % 70 etil alkol (EtOH) içinde fikse edilerek ve 3 saat boyunca -20 ° C'de saklanmıştır. Fikse edilen hücreler soğuk PBS ile yıkandıktan sonra, santrifüj yardımıyla toplanmıştır (5 dk/ 2000 x g). Toplanan hücreler 30 dakika boyunca karanlıkta Muse Cell Cycle Kit ((Millipore, Almanya) ile boyandıktan sonra, hücreler Muse® Cell Analyzer (Millipore) ile analiz edilmiştir.

Akridin Oranj Boyama

Nobiletinin PC-3 ve HUVEC hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişimlerin görüntülenmesi için, 6 kuyucuklu plaka içerisinde her bir kuyuya 5 x 10⁵ olacak şekilde hücreler ekildikten 24 saat sonra, 10, 20, 40 ve 80 µM nobiletin ile 48 saat boyunca 37°C'de % 95 nem ve % 5 CO2 ortamında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi dolan hücreler oda sıcaklığında 15 dakika boyunca %4 paraformaldehid ile fikse edilerek karanlık koşullarda 30 dakika boyunca akridin oranj (AO) (100 mg/ml) ile boyanmıştır. Ardından her bir hücre PBS ile üç kez yıkanmıştır ve görüntüler EVOS FL Hücre Görüntüleme Sistemi (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) yardımıyla analiz edilmiştir.

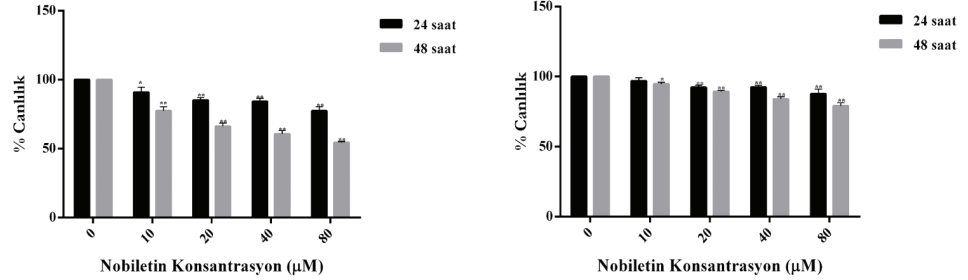
İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA, ABD) programı kullanılmıştır. Bütün deneyler en az 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen değerler ortalama \pm standart hata olarak ifade edilmiş olup, doza bağlı ölüm oranlarının, apoptotik hücre ve hücre siklusundaki hücre miktarlarının karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve gruplar arası karşılaştırmalarda Post Hoc Tukey testi kullanılmıştır. $p < 0.05^*$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

Nobiletinin Metastatik Prostat Kanseri Hücrelerinde Sitotoksik Etkisi

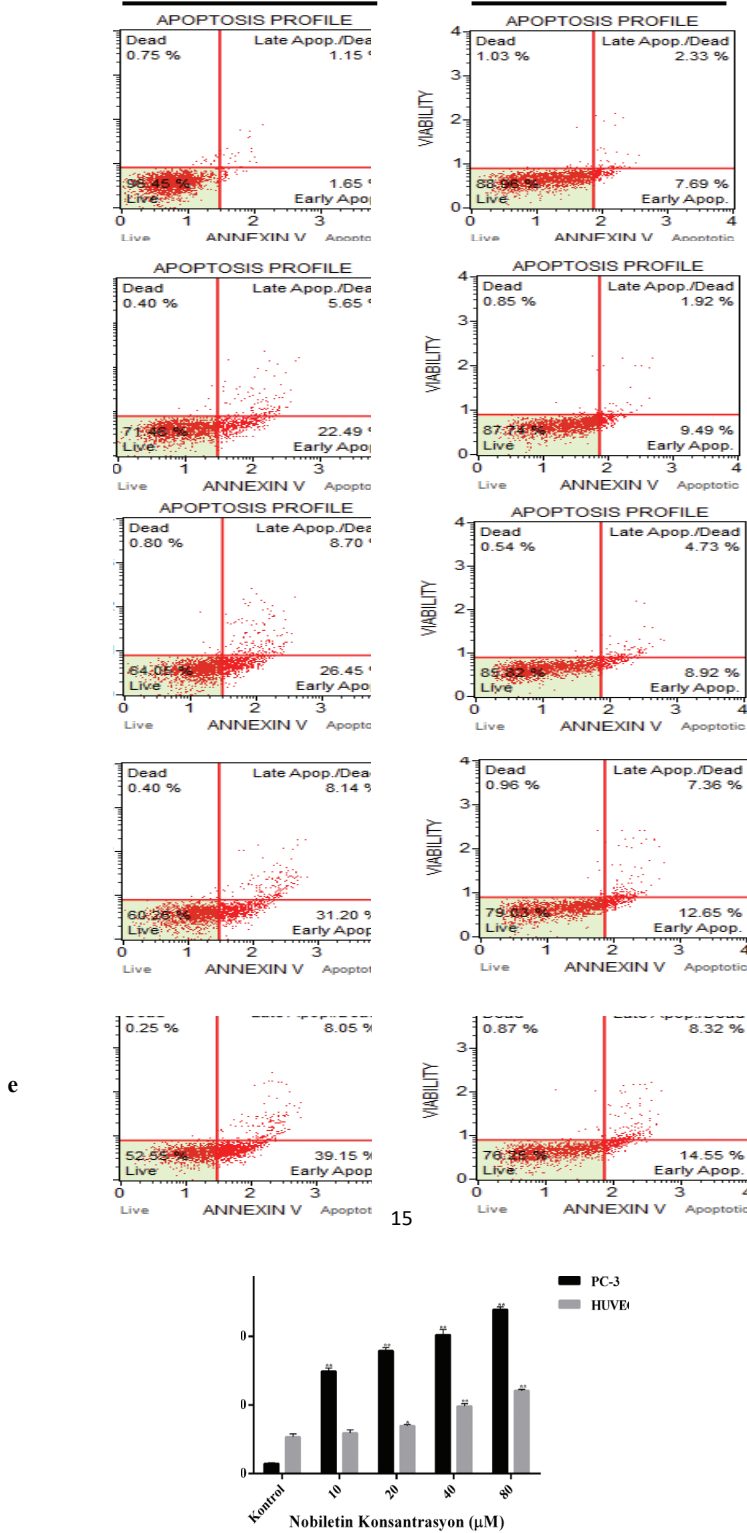
Nobiletinin PC-3 ve HUVEC hücre hatlarında sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde, hücrelerde canlılık oranlarının doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi (Şekil 1, $p < 0.05$). 48 saat boyunca 10 μM nobiletin uygulanan PC-3 ve HUVEC hücrelerinde canlılık oranları sırasıyla $77,50 \pm 2,92$ ve $94,60 \pm 1,30$ iken, 80 μM nobiletin uygulanan hücrelerde canlılık oranlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sırasıyla $54,40 \pm 0,77$ ve $79,05 \pm 2,26$ 'a azaldığı belirlendi ($p < 0.01$, $n=3$).



Şekil 1. Nobiletinin (A) PC-3 ve (B) HUVEC hücrelerinde sitotoksik etkisinin belirlenmesi. Farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 40 ve 80 μM) nobiletinin uygulanan PC-3 ve HUVEC hücrelerinde 24 ve 48 saat için canlılık yüzdeleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Nobiletinin Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi

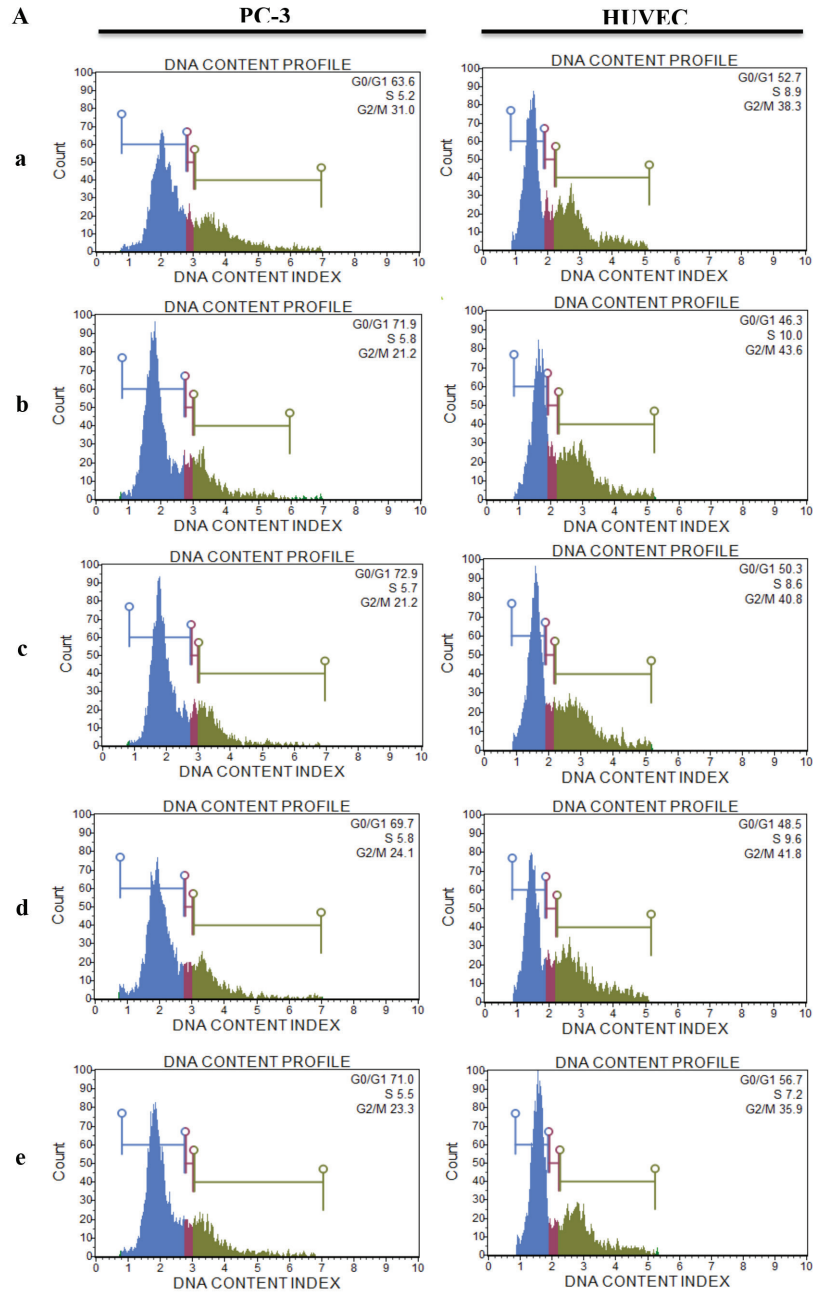
Nobiletinin PC-3 ve HUVEC hücrelerinde apoptotik etkisi incelendiğinde, doza bağlı olarak özellikle erken apoptoz yüzdelerinde anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0.01$, Şekil 2). PC-3 hücrelerinde nobiletinin apoptotik etkisi incelendiğinde, kontrol grubu ($2,90 \pm 0,28$) ile karşılaştırıldığında, 10 μM nobiletin uygulanan hücrelerde erken ve geç apoptoz oranı sırasıyla $22,49 \pm 0,52$ ve $5,65 \pm 0,95$ iken, 80 μM nobiletin uygulandığında bu oranların sırasıyla $39,15 \pm 1,25$ ve $8,05 \pm 0,91$ 'e arttığı tespit edildi ($p < 0.01$). HUVEC hücrelerinde ise, kontrol grubu ($10,66 \pm 0,90$) ile karşılaştırıldığında 10 μM ve 80 μM nobiletin uygulanması sonucunda, hücrelerde erken apoptoz oranları sırasıyla $9,49 \pm 0,90$ ve $14,55 \pm 0,51$ olarak belirlendi. Sonuç olarak, nobiletinin metastatik prostat kanseri hücrelerinde özellikle erken apoptoza neden olduğu analiz edilmiştir ve elde edilen bulgular WST-1 analizinden elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

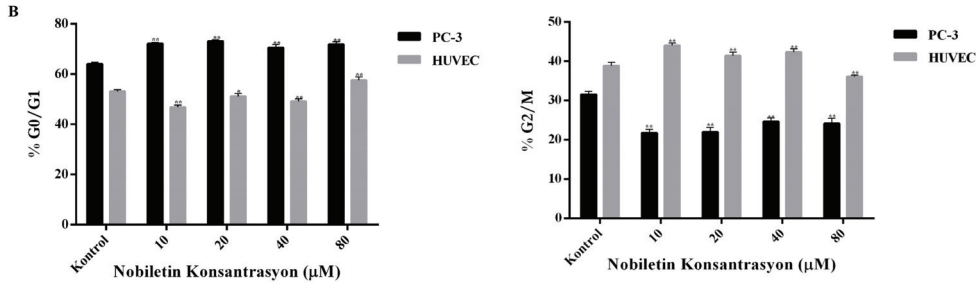


Şekil 2. Nobiletinin PC-3 ve HUVEC hücrelerinde apoptotik etkisinin belirlenmesi. (A) (a) Kontrol, (b) 10 µM, (c) 20 µM, (d) 40 µM ve (e) 80 µM nobiletin uygulanan PC-3 ve HUVEC hücrelerinde apoptotik etki Annexin V analizi ile belirlenmiştir. (B) Nobiletinin PC-3 ve HUVEC hücrelerinde toplam apoptotik etkisi kontrol grubu ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir (*p<0.05, **p<0.01).

Nobiletinin Hücre Siklusu Üzerinde Etkisinin Belirlenmesi

Nobiletinin PC-3 ve HUVEC hücrelerinde hücre siklusu evreleri üzerinde etkisi incelendiğinde, hücrelerde G0/G1 fazında anlamlı derecede bir artışa neden olduğu analiz edilmiştir ($p < 0.01$, Şekil 3). 48 saat boyunca $10 \mu\text{M}$ ve $80 \mu\text{M}$ nobiletin uygulanan PC-3 hücrelerinde kontrol grubu ($\%63,60 \pm 0,63$) ile karşılaştırıldığında G0/G1 fazında hücre miktarının sırası ile $\%71,90 \pm 0,42$ ve $\%71,00 \pm 1,13$ 'e arttığı belirlendi ($p < 0.01$). HUVEC hücrelerinde ise, kontrol grubu ($\%52,70 \pm 0,63$) ile karşılaştırıldığında $10 \mu\text{M}$ ve $80 \mu\text{M}$ nobiletin uygulanması sonucunda, hücrelerde G0/G1 fazında hücre miktarı sırasıyla $\%46,30 \pm 0,77$ ve $\%56,70 \pm 1,27$ olarak belirlendi ($p < 0.01$). Sonuç olarak, PC-3 hücrelerinde nobiletin G0/G1 fazında hücre miktarında anlamlı bir şekilde artışa neden olmasına rağmen, HUVEC hücrelerinde toksik etkisinin az olmasından dolayı G0/G1 fazında önemli derecede bir farklılık tespit edilmemiştir.

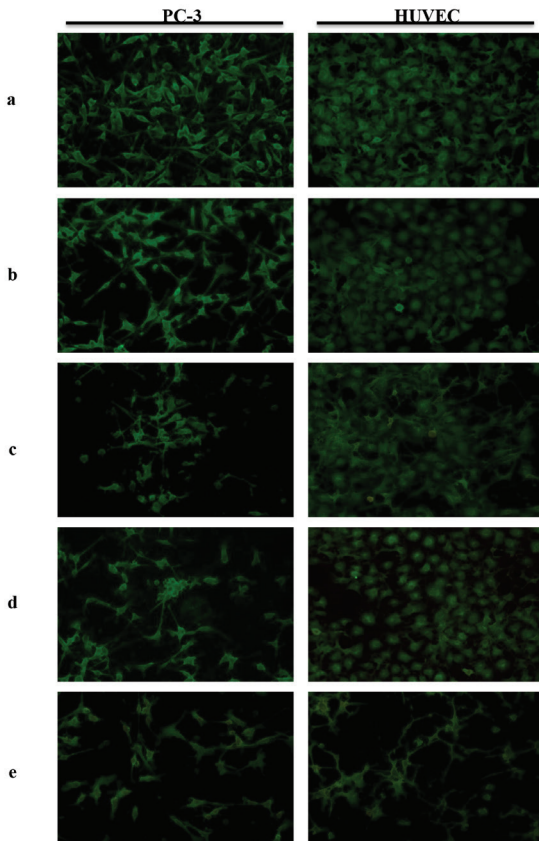




Şekil 3. Nobiletinin PC-3 ve HUVEC hücrelerinde hücre siklusu üzerinde etkisinin belirlenmesi. (A) (a) Kontrol, (b) 10 µM, (c) 20 µM, (d) 40 µM ve (e) 80 µM nobiletin uygulanan PC-3 ve HUVEC hücrelerinde hücre siklusu analizi gerçekleştirilmiştir. (B) Nobiletinin PC-3 ve HUVEC hücrelerinde neden olduğu G0/G1 ve G2/M fazlarında artış kontrol grubu ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir (*p<0.05, **p<0.01).

Nobiletinin Hücre Morfolojisindeki Neden Olduğu Apoptotik Değişikliklerin Görüntülenmesi

48 saat boyunca nobiletin ile inkübe edilen PC-3 ve HUVEC hücrelerinde morfolojik değişimler AO boyaması ile görüntülenmiştir (Şekil 4). PC-3 hücrelerinde nobiletinin artan konsantrasyonuna bağlı olarak hücrelerin genel morfolojik yapısının bozulduğu, hücre membranının da tomurcuklanmalarının olduğu ve hücre ve sitoplazma küçülmesinin olduğu gözlemlendi. Ayrıca özellikle 80 µM nobiletin uygulanan deney grubunda kromatin yoğunlaşmasının yanı sıra bazı nekrotik hücreler de belirlendi. HUVEC hücrelerinde ise genel olarak hücre morfolojisinin korunduğu gözlemlendi. Ancak 80 µM nobiletin uygulanan HUVEC hücrelerinde, bazı nekrotik hücreler ve membran tomurcuklanmaları belirlendi.



Şekil 4. Nobiletinin PC-3 ve HUVEC hücrelerinde apoptotik etkisinin akridin oranj boyaması ile görüntülenmesi. (a) Kontrol, (b) 10 µM, (c) 20 µM, (d) 40 µM ve (e) 80 µM nobiletin uygulanan PC-3 ve HUVEC hücrelerinde morfolojik değişimler görüntülenmiştir.

Tartışma

Mevcut çalışmada, nobiletinin PC-3 ve HUVEC hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, nobiletinin uygulanan doza ve zamana bağlı olarak PC-3 hücrelerinde apoptotik hücre ölümüne ve G0/G1 fazında hücre miktarında artışa neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, HUVEC hücrelerinde belirli bir konsantrasyona kadar (80 µM) toksik etkiye neden olmadığı analiz edilmiştir.

Turuncgillerdeki çok sayıdaki aktif flavonoidlerin arasında, nobiletin potansiyel anti-inflamatuar, anti-kanser, anti-oksidan, anti-metastaz ve nöroprotektif özelliklerinden dolayı dikkat çekmektedir.^{5,21} Bu nedenle, hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda farklı kanser tiplerinde nobiletinin anti-proliferatif etkisi ve sinyal yolları ile ilişkisi araştırılmıştır.^{18-20,22-27} Chen ve ark., nobiletinin üç farklı alt tipe ait MCF-7, SK-BR-3 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücrelerinde etkisi inceledikleri çalışmada, nobiletinin meme kanseri hücrelerinde G0/G1 fazında hücre miktarına artışa neden olduğunu ve bu artışın ERK1/2 ve Siklin D ekspresyonunun baskılanması ile gerçekleştiğini belirlemişlerdir. Ayrıca, nobiletinin hücrelerde neden olduğu apoptotik ölümün Bcl-XL ekspresyon seviyesinde azalış ve AKT sinyal yolağının inhibisyonu ile meydana geldiğini tespit etmiştir.²² Nobiletinin prostat kanserinde etkisinin incelendiği çalışma sayısı ise oldukça sınırlıdır. Chen ve ark. nobiletinin PC-3 ve DU-145 prostat kanseri üzerinde etkisini inceledikleri çalışmalarında, nobiletinin PC-3 hücrelerinde DU-145 hücrelerine göre daha etkin olduğunu ve nobiletinin hücre proliferasyonunu AKT yolağının inhibisyonu ile sağladığını belirlemişlerdir.²⁸ Tang ve ark. ise, insan prostat adenokarsinoma modeli geliştirdikleri transgenik sıçanlarda sitrus nobiletin ve auraptenin koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Nobiletinin ventral, lateral ve dorsal prostat loblarında belirgin bir azalmaya neden olurken, ventral ve lateral loblarda yüksek dereceli lezyonları azalttığını göstermişlerdir.²⁹

Mevcut çalışmada, nobiletinin PC-3 hücrelerinde sitotoksik etkisi WST-1 analizi ile tespit edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda nobiletin uygulanan PC-3 hücrelerinde canlılık oranının anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir.

Kanser hücrelerinin proliferasyonu G1/S ve G2/M kontrol noktaları tarafından düzenlenen ve kontrol edilen, tamamlanan hücre döngülerine bağlıdır. Hücre döngüsü kontrol noktasının düzenlenmesi apoptozu indükleyerek veya hücre döngüsü ilerlemesini engelleyerek (apoptozu neden olarak) bozulmuş hücreleri ortadan kaldırır.^{30,31} Bu amaçla, mevcut çalışmada nobiletinin apoptoz ve hücre siklusu üzerinde etkisinin belirlenmesi için Annexin V ve hücre siklusu analizleri gerçekleştirilmiştir. Nobiletinin PC-3 hücrelerinde özellikle erken apoptozu ve G0/G1 fazında artışa neden olduğu analiz edilmiştir. Ayrıca, HUVEC hücrelerinde 80 µM konsantrasyona kadar toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Elde edilen bulgular akrinin oranj boyaması ile desteklenmiştir.

Sonuç

Sonuç olarak, mevcut çalışmada kontrol hücreleri ile karşılaştırmalı olarak nobiletinin PC-3 hücrelerinde anti-proliferatif etkisinin erken apoptoz ve G0/G1 fazında hücre miktarında artış ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Ancak, nobiletinin PC-3 metastatik prostat kanserinde neden olduğu apoptotik ölümün moleküler mekanizmasının in vitro ve in vivo deneyler ile detaylı araştırılması gereklidir. Ayrıca, nobiletinin bazı kemoterapik ajanlar potansiyel sinerjik etkisinden dolayı, metastatik prostat kanseri tedavisinde kemoterapik ilaçlar ile sinerjik etkisinin araştırılması literatüre katkı sağlayabilir.

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. *Cancer Statistics, 2014*. CA: CA Cancer J Clin. 2014;64(1):9–29.
2. Williamson SC, Hartley AE, Heer R. A review of tasquinimod in the treatment of advanced prostate cancer. *Drug Des Dev Ther* 2013;7:167–174.
3. Amaral TMS, Macedo D, Fernandes I, Costa L. Castration-resistant prostate cancer: mechanisms, targets, and treatment. *Prostate cancer* 2012;2012:11.
4. Hori S, Butler E, McLoughlin J. Prostate cancer and diet: food for thought? *BJU Int* 2011;107(9):1348–1359.
5. Meiyanto E, Hermawan A, Anindyajati. Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:427–436.
6. Yang C, Wang X, Lu G, Picinich S. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat Rev Cancer* 2009;9:429–439.
7. McCann S, Freudenheim J, Marshall J, Saxon G. Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, phytochemicals and food groups. *J Nut* 2003;133:1937–1942.
8. Wu X, Song M, Qiu P, Rakariyatham K, Li F, Gao Z, et al. Synergistic chemopreventive effects of nobiletin and atorvastatin on colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2017;38(4):455–464.
9. Gates M, Vitonis A, Tworoger S, Rosner B, Titus-Ernstoff L, Hankinson S, et al. Flavonoid intake and ovarian cancer risk in a population based case-control study. *Int J Cancer* 2009;124:1918–1925.
10. Bernini R, Crisante F, Ginnasi MC. A convenient and safe O-methylation offlavonoids with dimethyl carbonate (DMC). *Molecules* 2011;16:1418–1425.
11. Knekt P, Järvinen R, Seppänen R, Heliövaara M, Teppo L, Pukkala E, et al. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol* 1997;146:223–230.
12. Li S, Yu H, Ho CT. Nobiletin: efficient and large quantity isolation from orange peel extract. *Biomed Chromatogr* 2006;20:133–138.
13. Kunimasa K, Ikekita M, Sato M, Ohta T, Yamori Y, Ikeda M, et al. Nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, suppresses multiple angiogenesis-related endothelial cell functions and angiogenesis in vivo. *Cancer Sci* 2010;101:2462–2469.
14. Murakami A, Nakamura Y, Torikai K, Tanaka T, Koshihara T, Koshimizu K, et al. Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. *Cancer Res* 2000;60:5059–5066.
15. Kim SJ, Uehara H, Yazici S, Langley RR, He J, Tsan R, et al. Simultaneous blockade of platelet-derived growth factor-receptor and epidermal growth factor-receptor signaling and systemic administration of paclitaxel as therapy for human prostate cancer metastasis in bone of nude mice. *Cancer Res* 2004;64:4201–4208.
16. Kim SJ, Johnson M, Koterba K, Herynk MH, Uehara H, Gallick GE. Reduced c-Met expression by an adenovirus expressing a c-Met ribozyme inhibits tumorigenic growth and lymph node metastases of PC3-LN4 prostate tumor cells in an orthotopic nude mouse model. *Clin Cancer Res* 2003;9:5161–5170.
17. Pulukuri SM, Gondi CS, Lakka SS, Jutla A, Estes N, Gujrati M, et al. RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J Bio Chem* 2005;280:36529–36540.
18. Sp N, Kang DY, Joung YH, Park JH, Kim WS, Lee HK, et al. Nobiletin Inhibits Angiogenesis by Regulating Src/FAK/STAT3-Mediated Signaling through PXN in ER Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 2017;18(5):E935.
19. Jiang YP, Guo H, Wang XB. Nobiletin (NOB) suppresses autophagic degradation via over-expressing AKT pathway and enhances apoptosis in multidrug-resistant SKOV3/TAX ovarian cancer cells. *Biomed Pharmacother* 2018;103:29–37.
20. Silva I, Estrada MF, V Pereira C, Silva AB, Bronze MR, Alves PM, et al. Polymethoxylated Flavones from Orange Peels Inhibit Cell Proliferation in a 3D Cell Model of Human Colorectal Cancer. *Nutr Cancer* 2018;70(2):257–266.
21. Manthey JA, Guthrie N, Grohman K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr Med Chem* 2001;8(2):135–153.
22. Chen C, Ono M, Takeshima M, Nakano S. Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of nobiletin against three subtypes of human breast cancer cell lines. *Anticancer Res* 2014;34(4):1785–1792.
23. Chen J, Chen AY, Huang H, Ye X, Rollyson WD, Perry HE, et al. The flavonoid nobiletin inhibits tumor growth and angiogenesis of ovarian cancers via the Akt pathway. *Int J Oncol* 2015;46(6):2629–2638.
24. Yoshimizu N, Otani Y, Saikawa Y, Kubota T, Yoshida M, Furukawa T, et al. Anti tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric cancer include: antiproliferative effects, induction of apoptosis and cell cycle deregulation. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:95–101.
25. Huang H, Li L, Shi W, Liu H, Yang J, Yuan X, et al. The multifunctional effects of nobiletin and its metabolites in vivo and in vitro. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2016.
26. Niu FW, Zhang YJ, Li K, Zhang MS. Nobiletin acts as a potential anticancer agent against osteosarcoma by regulating ERK and AKT signaling pathways. *Bangladesh J Pharmacol* 2014;9(3):406–412.
27. Shi MD, Liao YC, Shih YW, Tsai LY. Nobiletin attenuates metastasis via both ERK and PI3K/Akt pathways in HGF treated liver cancer HepG2 cells. *Phytomedicine* 2013; 20: 743–52.
28. Chen J, Creed A, Chen AY, Huang H, Li Z, Rankin GO, et al. Nobiletin suppresses cell viability through AKT pathways in PC-3 and DU-145 prostate cancer cells. *BMC Pharmacol Toxicol* 2014;15(1): 59.
29. Tang M, Ogawa K, Asamoto M, Hokaiwado N, Seeni A, Suzuki S, et al. Protective effects of citrus nobiletin and auroaptene in transgenic rats developing adenocarcinoma of the prostate (TRAP) and human prostate carcinoma cells. *Cancer Sci* 2007;98(4): 471–477.
30. Kastan MB, Artek, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004;432(7015): 316.
31. Funk JO. Cell cycle checkpoint genes and cancer. *e LS*, 2011.