

Myricetin'in LNCaP Androjen Bağımlı Prostat Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisinin Araştırılması

Özlem CESUR GÜNAY¹, Mücahit SEÇME²

¹ Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Karabük.

² Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ordu.

ÖZET

Prostat kanseri dünyada erkekler arasında en sık görülen ikinci kanser türüdür. Prostat kanserinin morbidite ve mortalitesi son zamanlarda artmıştır. Tedavisi için birçok alternatif yaklaşımlar geliştirilmeye çalışılsa da, prostat kanseri hala kötü prognoz sergilemekte ve yüksek ölüm oranları ile karşılaşılmaktadır. Myricetin, antikanser özelliği ile ilgi çeken doğal bir flavonoid bileşiktir. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar myricetin'in çeşitli mekanizmalar yoluyla prostat kanserini etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir. Bu çalışmanın amacı artan dozlarda myricetin uygulamasının androjen reseptör bağımlı insan prostat kanser hücre hattı olan LNCaP hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek ve apoptozla ilişkili BAX ve BCL2 genlerinin ekspresyon seviyelerini tespit etmektir. LNCaP hücreleri myricetin'in 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM'lık konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat süresince inkübe edilmiş ve hücre canlılığındaki değişimler 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2Htetrazolyum-5-karboksanilid (XTT) yöntemiyle belirlenerek IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. BAX ve BCL2 gen ifadelerindeki değişimler ise Real-Time PCR metoduyla belirlenmiş ve elde edilen verilerin analizinde ΔΔCT metodu kullanılmıştır. Myricetin'in uygulanan bütün dozlarda kontrole göre LNCaP hücre canlılığını azalttığı gösterilmiş olup IC₅₀ değeri 24. saat için 123.76 µM, 48. saat için ise 84.79 µM olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, myricetin uygulamasının apoptoz ilişkili BAX gen ifadesini istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde artırırken BCL2 gen ifadesini ise azalttığı görülmüştür. Myricetin'in LNCaP hücrelerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkileri daha detaylı olarak araştırılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Myricetin. LNCaP Hücre Hattı. Apoptoz. Bax ve Bcl-2 Gen Ekspresyonu.

'Investigation of the Effect of Myricetin On Human Androgen Dependent Prostate Cancer Cells'

ABSTRACT

Prostate cancer is the second most common type of cancer amongst men worldwide. The morbidity and mortality of prostate cancer has increased recently. Although many alternative approaches have been tried to be developed for the treatment, prostate cancer still has a poor prognosis and high mortality rates. Myricetin is a natural flavonoid compound of interest for its anticancer properties. *In vitro* and *in vivo* studies show that myricetin effectively impedes prostate cancer through several mechanisms. The aim of this study was to determine the effects of increasing doses of myricetin on the viability of LNCaP cells, an androgen receptor-dependent human prostate cancer cell line, and to determine the expression levels of the apoptosis-related BAX and BCL2 genes. LNCaP cells were incubated with myricetin at concentrations of 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM for 24 and 48 hours and alterations in cell viability were determined by 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenil))-2Htetrazolium-5-carboxanilide (XTT) method and IC₅₀ values were calculated. Changes in BAX and BCL2 gene expressions were investigated by Real-Time PCR and the data was analysed using ΔΔCT method. It was shown that myricetin decreased LNCaP cell viability at all doses used compared to the control, and the IC₅₀ value was determined as 123.76 µM for the 24th hour and 84.79 µM for the 48th hour. In addition, it was observed that myricetin administration increased apoptosis associated BAX gene expression at a statistically significant level, while it was decreasing BCL2 gene expression. The antiproliferative and apoptotic effects of myricetin on LNCaP cells need to be investigated in more detail.

Keywords: Myricetin. LNCaP Cell Line. Apoptosis. BAX ve BCL2 Gene Expressions.

Geliş Tarihi: 28 Mart 2023

Kabul Tarihi: 21 Temmuz 2023

Dr. Özlem CESUR GÜNAY
Karabük Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Karabük
Tel.: 444 0 478
E-posta: ozlemcesur@karabuk.edu.tr

Yazarların ORCID Bilgileri:

Özlem CESUR GÜNAY: 0000-0002-1670-696X
Mücahit SEÇME: 0000-0002-2084-760X

Dünya çapında kanser ilişkili ölümler değerlendirildiğinde prostat kanseri erkekler için ikinci sırada gelen ölüm nedenidir¹. Erken teşhis ile prostat kanseri metastaz yapmadan önce büyük olasılıkla başarılı bir şekilde tedavi edilmektedir². Bugüne kadar prostat kanseri tedavisinde kullanılan yaklaşımlar cerrahi girişim, radyoterapi, kemoterapi, tıbbi kastrasyon ve hormon tedavisidir. Kapsamlı araştırmalar alternatif tedavi yaklaşımları geliştirmeye çalışsalar da, prostat kanseri hala kötü prognoz sergilemekte ve yüksek ölüm oranları ile karşılaşılmaktadır^{3,4}. Ayrıca hastalığın ilerleyen

evrelerinde kanser hücrelerinin geliştirdiği kemoterapi ve antiandrojenik tedavi dirençleri mevcut tedavi protokollerini zorlamaktadır; bu nedenle de yeni terapötik stratejilerin formülize edilmesi ve düşük toksisiteye sahip etkili antikanser ilaçların bulunması önemlidir⁵. Bu düşünceler ışığında, prostat kanserinin tedavisi ve önlenmesi için etkili, güvenli ve doğal kemopreventif ve kemoprotektif bileşikler kullanılması gündeme gelmiştir.

Günümüzde klinikte kullanılan çoğu ilaç molekülünün köklerinin doğal ürünlere dayandığı bilinmektedir. Bunlar arasında yer alan polifenoller, bitkilerde ikincil metabolizma ürünü olarak oluşan ve oldukça yaygın olarak bulunan, UV ışınlarına, mikrobiyal enfeksiyonlara karşı bitkiyi koruyan, bitkisel hormonları düzenleyen, enzim inhibisyonunda ve tozlayıcıları cezbetme gibi çeşitli aktivitelerde rol oynayan bitkisel kaynaklı bir molekül grubudur⁶. İnsanların tükettiği gıdalar içerisinde en yaygın olarak bulunan polifenol sınıfı, flavanlar, flavonlar, flavonoller ve antosiyanidinleri içeren flavonoidlerdir. Flavonoidler bakımından zengin içerikli diyetler prostat kanseri görülme sıklığında ve mortalitesinde azalma ile ilişkilendirilebilir. Prostat kanseri görülme sıklığının diyetlerinde batı ülkelerine kıyasla yaklaşık 100 kat daha fazla flavonoid bulunan (soya ve yeşil çayda olduğu gibi) Çin ve Japonya gibi Doğu Asya ülkelerinde daha az olduğu söylenebilir^{7,8}.

Quercetin, kaempferol ve isorhamnetin ile birlikte flavonoller içerisinde yer alan myricetin, 3,3',4',5,5',7-hekzahidroksiflavon, ağırlıklı olarak meyvelerde, sebzelerde, sert kabuklu yemişlerde, tıbbi bitkilerde, çaylarda ve şarapta bulunur. Myricetin antikanser, antidiyabetik, antiaging, antihipertansif, antienflamatuvar, antialerjik ve analjezik aktiviteler gibi önemli farmakolojik potansiyellere sahip olması bu molekülü oldukça ilgi çekici bir hale getirmiştir⁹. Birçok prelinik ve klinik çalışmada, doğal kaynaklardan elde edilen myricetin çeşitli kanser türlerine karşı umut verici etkileri bildirilmiştir. Ayrıca bu molekülün kanserin başlaması ve ilerlemesinde önemli rol oynayan enzimleri inhibe etme potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. Myricetin HCT-15 insan kolon kanseri hücrelerinde BCL2 ile ilişkili X proteini (BAX)/BCL2 oranını anlamlı seviyede artırarak sitotoksik etki gösterdiği ve doza bağlı olarak apoptozu tetiklediği gösterilmiştir¹⁰. Benzer şekilde, insan yumurtalık kanseri hücreleri (SKOV3, A2780 ve OVCAR3) ile yapılan çeşitli çalışmalarda, myricetin hücre canlılığını ve büyümesini inhibe ettiği, hücre döngüsünü durdurduğu, hücre invazyonunu önemli ölçüde engelleme potansiyeline sahip olduğu ve endoplazmik retikulum stresi ve DNA çift sarmal kırıkları yoluyla apoptozu indükleyebildiği gözlenmiştir¹¹⁻¹⁴. Myricetin ayrıca radyoterapi veya kemoterapi ile birlikte kombine olarak uygulanarak sırasıyla insan akciğer

adenokarsinomu A549 hücrelerini radyoterapiye ve özofagus kanseri EC9706 hücrelerini ise 5'fluorourasil ile kemoterapiye daha duyarlı hale getirmiştir^{15,16}. Myricetin apoptotik ve antiproliferatif etkileri tiroid kanseri, meme kanseri, servikal kanser, hepatosellüler karsinom ve glioma hücrelerinde olduğu gibi fare modellerinde de gösterilmiştir^{15,17-23}. Bu hücrelerde gözlenen apoptotik etkiler BAX/BCL2 oranının ve Bad ve p53 düzeylerinin artması, caspazların aktivasyonu, H₂O₂ üretimi, ya da Mad1, PIM1, AKT ve ERK1/2 gibi farklı yollarda yer alan proliferasyonla ve hücre sağkalımı ile ilişkili genlerin ifadelerinin değişmesinden kaynaklanmaktadır²⁴.

Bu çalışma, farklı dozlarda uygulanan myricetin androjen reseptör bağımlı insan prostat kanser hücre hattı olan LNCaP hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek ve bu bileşiğin terapötik potansiyelini araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca myricetin LNCaP hücrelerinde apoptoz ilişkili genler olan proapoptotik BAX ve anti-apoptotik BCL2 genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişimler Real-Time PCR metoduyla çalışılmıştır.

Gereç ve Yöntem

1- Hücre Kültürü:

LNCaP hücreleri %1 L-glutamin, 100 U/ml penisilin ve 0,1 mg/ml streptomisin ve %10 FBS ile zenginleştirilmiş RPMI-1640 (Gibco, ABD) besi ortamlarını içeren 75 cm² kültür flasklarında beslenmişlerdir. Hücreleri içeren flasklar nemli bir inkübatör içerisine yatay pozisyonda tutulmuştur (37°C; 5% CO₂). Hücreler konflüent olduklarında flasklardan Tripsin-EDTA (Gibco, ABD) solüsyonu kullanılarak ayrıldıktan sonra 96-kuyucuklu ya da 6-kuyucuklu plaklara aktararak sırasıyla 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2Htetrazolyum-5-karboksanilid (XTT) ve Real-Time PCR analizlerinde kullanılmıştır.

2- XTT Analizi:

Myricetin LNCaP hücrelerine uygulanıp zamana ve doza bağımlı olarak hücre canlılığının belirlenmesi ve hücrelerin %50'sinin yaşadığı dozun tespit edilmesi için XTT yöntemiyle hücre proliferasyon testi gerçekleştirilmiştir. Myricetin LNCaP hücrelerindeki doz ve zamana bağlı sitotoksik etkisinin belirlenmesi için hücreler 96-kuyucuklu hücre kültürü plaklarına 2x10⁴/kuyucuk miktarında ekilmiştir. Hücrelerin kültür plaklarına yapışabilmesi için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Myricetin 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM'lık konsantrasyonları %10 serum içeren tam besiyerinde binde bir oranında Dimethylsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek hazırlanmıştır. Literatür bilgileri ışığında uygulanacak dozlara karar verilmiştir^{20,25-27}. Kontrol grubuna tam besi yeri içerisinde etken madde olmaksızın

Myricetin'in Prostat Kanseri Üzerine Etkisi

uygulanmıştır. Hücre proliferasyonu Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit (Cat # 20-300-1000-Biological Industries) ile belirlenmiştir. Zamana bağımlı etkinin ortaya çıkartılması için analizler 24. ve 48. saatlerde gerçekleştirilmiştir. Bu saatler sonunda her bir kuyucuğa 100 µL besiyeri eklendikten sonra 50 µL aktive edilmiş XTT solüsyonu (49 µL XTT Reagent Solüsyonu ve 1 µL Aktivatör Solüsyonu) ilave edilmiştir. Madde ilavesini 4 saat takiben çalışılan grupların absorbans değerlerinin (OD) okumaları ELISA cihazında (Multiskan GO, Thermo) 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı yüzdesi (%) hesaplanırken her bir kuyucukta tespit edilen optik dansite değeri kontrol optik dansite değerine bölünmüş ve yüz ile çarpılmıştır. IC₅₀ dozu online IC₅₀ hesaplama platformu kullanılarak (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>) probit sayıları (y) ve karşılık gelen log doz konsantrasyonu (x) olacak şekilde hazırlanan non-linear bir regresyon eğrisi ile belirlenmiştir.

3. RNA İzolasyonu:

Gen ifadesindeki değişimleri belirleyebilmek için kontrol ve doz gruplarında RNA izolasyonu için Trizol Reagent (HibriGen, Türkiye) kullanılmıştır. Hücreler öncelikle 3x10⁶ hücre olacak şekilde 6-kuyucuklu plaklara ekilmiştir ve XTT analizi sonucu belirlenen dozlar uygulanmıştır (IC₅₀ 84.79 µM ve 48 saat). Hücreler, 6-kuyucuklu kültür plakalarında her plaka için 500 µl olacak şekilde Trizol eklenip scraper kazıyıcı ile toplanarak ependorf tüplere (1 ml) aktarılmıştır. Her bir ependorf tüpe 200 µl kloroform ilave edilip iyice pipetlendikten sonra oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. Soğutmalı santrifüj ile +4°C'de 15.000g'de 20 dk santrifüj edilmiş ve renksiz olan üst faz toplanıp ayrı bir ependorf tüpüne alınmıştır. Toplanan bu üst fazın üzerine 500 µl izopropanol eklenip 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra tekrar +4°C'de 15.000 g'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Pelet üzerine %70'lik etanol ilave edilerek +4°C'de 12.000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp pelet kısa süreli hava temasıyla kurutulmuş ve sonrasında 40 µl RNase-DNase free su ile çözülmüştür. İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı (Thermo) ile ölçülmüştür.

4- cDNA Sentezi:

İzole edilen total RNA'lardan Real-Time PCR (RT-PCR) için kullanılmak üzere cDNA sentezi High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, ABD) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda 96-kuyucuklu plaklar (Applied Biosystems™ MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate) kullanılarak StepOne Plus Real-Time (Applied Biosystem, ABD) PCR cihazı ile gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi total RNA son

konsantrasyonu 2 µg olacak şekilde kit protokolü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen cDNA örnekleri -20°C'de muhafaza edilmiştir.

5- RT-PCR Testi:

Myricetin'in LNCaP hücre hattında BAX ve BCL2'nin mRNA düzeyindeki gen ekspresyon değişimine olan etkisi StepOne Plus Real-Time PCR (Applied Biosystems, ABD) ile tespit edilmiştir. GAPDH normalizasyon amaçlı housekeeping olarak kullanılmıştır. Genlerin primer sekans bilgileri şu şekildedir: BAX forward 5'-TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG-3' ve reverse 5'-TGTGTCCACGGCGCAATCATC-3'; BCL2 forward 5'-TGCACCTGACGCCCTTAC-3' ve reverse 5'-AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG-3'; GAPDH forward 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3' ve reverse 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGA-3'. Çalışmamızda RealQ Plus 2X Master Mixgreen (Ampliqon, Danimarka) kullanılmış ve ilgili SyberGreen Master Mix protokolü uygulanmıştır. Reaksiyon koşulları her bir kuyucukta 5,5 µl SyberGreen, 6,5 µl nükleaz içermeyen su, 2 µl (1 µl reverse+ 1 µl forward) primer ve 1 µl cDNA olacak şekilde 96-kuyucuklu plaklarda kurulmuş ve yüzeyleri şeffaf yapışkan etiketle (Applied Biosystems™ 96-Well Reaction Plate seal, ABD) kapatılmıştır. StepOne Plus Real-Time PCR cihazına yüklenen plaklarda yer alan cDNA molekülleri, 1 döngü 95°C'de 15 dakika denatürasyon, 40 döngü olacak şekilde, 95°C'de 15 sn ve 60°C'de 30 sn ve 72°C 30 saniye olarak amplifiye edilmiştir. Reaksiyona ayrıca 1 döngü Melting curve basamağı da eklenmiştir (95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 1 dakika).

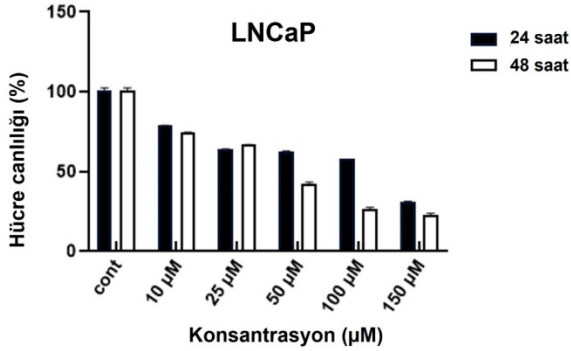
6. İstatistiksel Analiz:

Elde edilen mRNA'ların ekspresyonlarındaki değişimin verileri ΔΔCT metodu ile analiz edilmiştir. Web tabanlı "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" <https://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>) programında ekspresyon değerleri ±3SD karşılaştırılması temeline bağlı olarak analiz edilmiştir ve gruplar arasındaki istatistiksel değişim "Student's t-test" ile karşılaştırılmıştır. Kat değişimi değerleri (Fold change ve Fold regulation) de ΔΔCT tabanlı olarak belirlenmiştir.

Bulgular

Myricetin değişen dozlarda LNCaP hücrelerine uygulanarak zamana ve doza bağlı hücre canlılığı tespit edilmiştir. Myricetin'in test edilen konsantrasyonları 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM olup, 24 veya 48 saat süre uygulanan bütün dozlarda kontrole göre hücre canlılığının azaldığı gösterilmiştir (Şekil 1). Myricetin LNCaP hücrelerinde artan doza bağlı olarak hücre

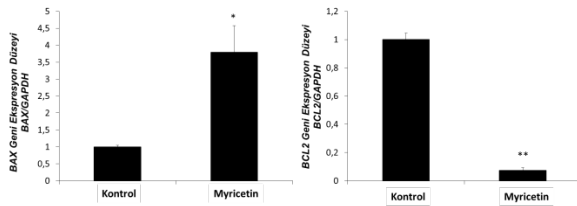
proliferasyonunu azaltmıştır. IC₅₀ değeri 24. saat için 123.76 µM, 48. saat için ise 84.79 µM olarak tespit edilmiştir. 48. saatte daha düşük dozda etki gösterdiği için gen ifadelerindeki değişimin tespiti için 48. saatteki 84.79 µM doz ve zaman ile çalışmaya devam edilmiştir.



Şekil 1:

Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Myricetin'in LNCaP hücrelerinin 24 ve 48 saat sonundaki hücre canlılığı üzerine etkisinin XTT analizi ile gösterilmesi.

Myricetin'in 48. saatteki IC₅₀ doz konsantrasyonu olan 84.79 µM uygulamasının BAX ve BCL2 genlerinin ifadeleri üzerindeki yani bu genlerin mRNA ekspresyonlarındaki değişim Real-Time PCR metoduyla çalışılmış olup kontrol olarak kullanılan GAPDH gen ifadesine göre normalize edilerek ΔΔCT metodu ile analiz edilmiştir. Çalışmamızda, LNCaP hücrelerinde myricetin uygulamasının BAX gen ifadesini istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde artırırken (p<0.02), BCL2 gen ifadesini ise azalttığı görülmüştür (p<0.001) (Şekil 2).



Şekil 2:

*Myricetin'in IC₅₀ değeri olan 84.79 µM konsantrasyonda ve 48 saat süresince uygulandığı LNCaP hücrelerinde BAX ve BCL2 gen ekspresyon seviyelerinin grafikleri (*p<0.02, **p<0.001).*

Tartışma ve Sonuç

Prostat kanseri, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Globocan 2020 verilerine göre 1,4 milyon yeni vaka ve 375 bin ölüm ile dünya çapında erkeklerde akciğer kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanser türü olarak belirlenmiş olup, erkeklerde kanserden kaynaklı ölümler arasında ise akciğer, karaciğer, kolorektal ve mide kanserlerini takiben beşinci sırada yer almaktadır²⁸. Batı ülkelerinde prostat kanseri

görülme sıklığı her 100 bin kişide 70-100 kişi iken, Türkiye'de 35 kişi olarak bildirilmiş ve yüz bin kişiden ise sadece birinin 40 yaşına gelmeden prostat kanseri tanısı aldığı belirtilmiştir²⁹. Prostat kanseri, etiolojisi tam bilinmeyen multifaktöriyel bir hastalıktır. Bilinen risk faktörleri arasında yaş, genetik yatkınlık, etnik köken, coğrafik konum, çevresel faktörler ve diyet yer alır.

Kanser kemoprevensiyonu kanserin gelişimini ve ilerlemesini engellemek ve tedavi etmek amacıyla toksik olmayan doğal veya sentetik maddelerin kullanımını³⁰. Yüksek prevalansı ve yavaş ilerlemesi nedeniyle prostat kanseri kemoprevensiyon stratejileri için ideal bir hedef olmuştur. Vitaminler, mineral maddeler ve özellikle polifenoller gibi doğal bileşiklerin kronik bazı hastalıklar üzerinde antienflamatuvar, antiviral, antialerjik, antioksidan ve antitümör etkileri olduğu bilinmektedir³¹. Epidemiyolojik ve prelinik birçok çalışma polifenollerden özellikle flavonoidlerin meme, akciğer ve kolon kanserleri gibi çeşitli kanser türlerine karşı tümör gelişimini ve büyümesini baskılayan antiproliferatif etkilere sahip olduğunu göstermektedir. İlave olarak, flavonoidler farklı moleküler yapı özelliklerinden dolayı geniş çeşitlilik gösterirler ve bu sebeple hem insan sağlığı açısından hem de deneysel olarak çeşitli biyolojik etkilere sahip olabilirler. Bu çalışmada androjen bağımlı bir prostat kanseri hücre hattı olan LNCaP hücrelerinde myricetin'in hücre canlılığı ve apoptoz ilişkili bazı gen ifadeleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hücre canlılığını test etmek için yapılan XTT deneyi sonuçlarına göre myricetin, doza bağımlı olarak hücre canlılığını azaltmış olup 48. saatteki IC₅₀ doz konsantrasyonu 84.79 µM olarak belirlenmiştir. Literatüre bakıldığında androjen bağımsız prostat kanseri PC-3 hücrelerinde myricetin'in antiproliferatif etkisi MTT deneyi ile değerlendirilmiş ve bizim çalışmamızdaki ile benzer olarak IC₅₀ doz konsantrasyonu 94.48 µM olarak bulunmuştur³². Başka bir çalışmada yine androjen bağımsız prostat kanseri hücreleri olan PC-3 ve DU-145'te 48 saat sonrası hücre canlılığı kolorimetrik olarak test edilmiş ve IC₅₀ değerleri sırasıyla 47.6 µM ve 55.3 µM olarak bulunmuştur²⁶. Aynı çalışmada sağlıklı prostat RWPE-1 hücrelerinde de canlılığa bakılmış ve IC₅₀ değeri prostat kanseri hücrelerine kıyasla daha yüksek olarak (362.1 µM) olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla myricetin'in benzer konsantrasyonlarda sağlıklı prostat hücrelerinde hücre canlılığını daha az azalttığı belirtilmiş olması bizim çalışmamıza da katkı sunmaktadır. Diğer bir çalışmada ise myricetin ile muamele edilmiş LNCaP hücrelerinin 72 saat sonraki hücre canlılığı MTT testi ile kolorimetrik olarak analiz edilmiş ve IC₅₀ değeri 18.5 µM olarak hesaplanmıştır³³.

Kemoterapötik ajanlar aracılığıyla apoptozun indüklenmesinde mitokondriyal yollar oldukça önemlidir³⁴. Mitokondri yapısının ve işlevinin

Myricetin'in Prostat Kanseri Üzerine Etkisi

bozulması, hücre ölümü için gerekli iki ana mekanizma olan BAX/BCL2 oranında bir artışa ve kaspazların aktivasyonuna neden olur. Çeşitli kanser hücrelerinde myricetin'in indüklediği apoptotik mekanizmalar güncel çalışmalarla aydınlatılmaya devam etmektedir. Myricetin'in mitokondriyal yollarla apoptozu tetiklediği birçok çalışmada belirtilmiş olup buna ilave olarak p53 artışı, H₂O₂ üretimi, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve DNA çift sarmal kırıklarının dahil olduğu diğer yollardan da apoptozu indükleyebildiği bilinmektedir.

Hücre ölümü uyaranları BCL2 ailesine ait belirli proteinlerin lokalizasyonunu değiştirir. Örneğin, apoptotik hücre ölümü uyaranları BAX'ın sitozolden mitokondri dış membranına taşınmasını teşvik ederek geçirgenliğini değiştirir ve takiben de sitokrom c salınımı gerçekleşir. Sitokrom c'nin sitozolik birikimi de sırayla apoptozom komplekslerinin oluşumuna ve kaspazların aktivasyonuna neden olur³⁵. Bu çalışmada, LNCaP hücrelerine myricetin uygulandığında BAX ve BCL2 gen ifadelerinin anlamlı düzeyde değiştiği gözlenmiştir. BCL2, hücre sağkalımında önemlidir ve çeşitli uyaranlarla tetiklenen hücre apoptozunu inhibe ettiği için BCL2'nin hücre apoptozunun negatif bir düzenleyicisi olduğu söylenebilir³⁶. Dolayısıyla, BCL2 seviyelerindeki azalmalar, mitokondriyal bozulmanın aracılık ettiği apoptotik hücre ölümü ile doğrudan ilişkilidir³⁷. Tersine, mitokondride BAX (proapoptotik BCL2 ailesinin bir üyesi) seviyelerindeki artışlar ise apoptotik hücre ölümünün bir göstergesidir³⁸. Biz bu çalışmada, myricetin uygulamasının prostat kanseri hücrelerinde BCL2 düzeylerini düşürdüğünü, BAX düzeylerini ve sonuç olarak da BAX/BCL2 oranını ise artırdığını gözlemledik. Sadece BAX ve BCL2 ekspresyonunun araştırılması total apoptozu göstermemekle birlikte, apoptoz ilişkili iki önemli marker genin değişiminin tespit edilmesi apoptoz mekanizmasının anlaşılmasına katkı sunmaktadır. Dolayısıyla myricetin'in BCL2 seviyesini azaltıp BAX'ın sitoplazmadan mitokondriye translokasyonunu indükleyerek mitokondriyal bütünlüğün bozulmasına ve apoptozu sebep olabileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde myricetin'in hepatosellüler karsinom HepG2 ve meme kanseri MCF-7 hücrelerinde BAX/BCL2 oranını ve çeşitli kaspaz aktivitelerini artırdığı; insan papiller tiroid kanseri SNU-790 HPTC hücrelerinde ise bunlara ilave olarak kaspazdan bağımsız olan apoptoz ile ilişkili apoptoz indükleyici faktör (AIF) ifadesinin de indüklendiği gösterilmiştir^{17,39,40}. HCT-15 hücre hattı ile yapılan başka bir çalışmada myricetin'in 100 µM konsantrasyonda uygulandığında hücre canlılığının %70 oranında azaldığı ve apoptozun indüklendiği görülmüştür⁴¹. Ayrıca western blot analizi ile normal apoptotik protein profili incelendiğinde kaspaz-3, 9 veya mitokondriyal sitokrom c ifadesinde bir artış gözlenmeyip, AIF ifadesinin indüklenerek BAX/BCL2 oranında bir artışa neden olduğu rapor edilmiştir⁴¹. Deri kanseri A431 hücrelerinde de

myricetin hücre canlılığını azaltıp, hücre döngüsünü durdurmuş ve BAX/BCL2 oranında artışın yanı sıra ROS üretimini tetikleyerek hücreleri apoptozu sürüklemiştir⁴². Myricetin'in çeşitli kanser hücre hatlarındaki etkileri değerlendirildiğinde apoptozda yer alan genler ve ekspresyon düzeylerinin büyük ölçüde hücre hattının tipine bağlı olduğu görülmektedir.

Bitki polifenollerinin tümör hücrelerinin gelişimini ve proliferasyonunu engelleyici etkileri bilinmekle birlikte bu moleküller daha detaylı araştırılmalıdır. Çünkü, kanser mortalitesi oldukça yüksek bir hastalıktır ve tedavi protokollerinde hala eksiklikler ya da ciddi yan etkiler gözlenmekte ve ayrıca oluşabilecek kemoterapi dirençleri tedaviyi sınırlandırmaktadır. Bu sebeple, deneysel araştırmalarda kanser tedavisi için bitki kaynaklı bu ve benzeri bileşikler kombine uygulayarak ya da yaygın kullanılan kemoterapi ilaçları ile kombine ederek tedaviler planlanabilir. Bu tarz uygulamalar ile sinerjik etkiler elde edilirse, mevcut kemoterapi ajanlarının daha düşük dozlarda kullanılması sağlanarak istenmeyen yan etkileri engellenebilir. Bu çalışma myricetin'in anti-proliferatif ve apoptotik etkilerinin belirlenmesi için planlanmış ve sonuç olarak da myricetin'in hücre canlılığını azalttığı ve proapoptotik BAX geninin ifadesini artırırken antiapoptotik BCL2 gen ifadesini azalttığı ortaya çıkarılmıştır. Çalışmaya sağlıklı prostat hücrelerinin dahil edilmemiş olması ve total apoptoz durumunun Annexin-V ve TUNEL gibi yöntemlerle analiz edilmemiş olması çalışmanın kısıtlılıkları arasındadır. Bu molekülün indüklediği hücre ölüm mekanizmalarının daha net ortaya çıkartılabilmesi için daha fazla çalışma yapılmasına gerek duyulmaktadır.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Çalışmada hücre hatları kullanıldığından etik kurul onayı alınması gerekmemektedir.

Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: Ö.C.G.; Veri toplama ve işleme: Ö.C.G., M.S.; Analiz ve verilerin yorumlanması: Ö.C.G., M.S.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: Ö.C.G.

Destek ve Teşekkür Beyanı:

Makale yazarlarının destek ve teşekkür beyanı yoktur.

Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynakça

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022;72(1):7-33.
2. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med.* 2003;349(4):366-81.
3. Rebello RJ, Oing C, Knudsen KE, Loeb S, Johnson DC, Reiter RE, et al. Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers.* 2021;7(1):9.
4. Armstrong CM, Gao AC. Dysregulated androgen synthesis and anti-androgen resistance in advanced prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol.* 2021;9(4):292-300.

5. Sumanasuriya S, De Bono J. Treatment of Advanced Prostate Cancer-A Review of Current Therapies and Future Promise. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(6):a030635.
6. Matilla MA. Chapter 10 - Metabolic Responses of Plants Upon Different Plant-Pathogen Interactions. In: Ahmad P, Ahanger MA, Singh VP, Tripathi DK, Alam P, Alyemeni MN, editors. *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*: Academic Press; 2018. p. 195-214.
7. Ganry O. Phytoestrogens and prostate cancer risk. *Preventive medicine.* 2005;41(1):1-6.
8. Haddad AQ, Venkateswaran V, Viswanathan L, Teahan SJ, Fleshner NE, Klotz LH. Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases.* 2006;9(1):68-76.
9. Imran M, Saeed F, Hussain G, Imran A, Mehmood Z, Gondal TA, et al. Myricetin: A comprehensive review on its biological potentials. *Food Sci Nutr.* 2021;9(10):5854-68.
10. Zhu ML, Zhang PM, Jiang M, Yu SW, Wang L. Myricetin induces apoptosis and autophagy by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signalling in human colon cancer cells. *BMC Complement Med Ther.* 2020;20(1):209.
11. Berköz M, Yalın S, Özkan-Yılmaz F, Özlüer-Hunt A, Krośniak M, Francik R, et al. Protective effect of myricetin, apigenin, and hesperidin pretreatments on cyclophosphamide-induced immunosuppression. *Immunopharmacology and Immunotoxicology.* 2021;43(3):353-69.
12. Li Q, Tan Q, Ma Y, Gu Z, Chen S. Myricetin Suppresses Ovarian Cancer In Vitro by Activating the p38/Sapla Signaling Pathway and Suppressing Intracellular Oxidative Stress. *Frontiers in Oncology.* 2022;12:903394.
13. Tavsan Z, Kayali HA. Flavonoids showed anticancer effects on the ovarian cancer cells: Involvement of reactive oxygen species, apoptosis, cell cycle and invasion. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019;116:109004.
14. Xu Y, Xie Q, Wu S, Yi D, Yu Y, Liu S, et al. Myricetin induces apoptosis via endoplasmic reticulum stress and DNA double-strand breaks in human ovarian cancer cells. *Mol Med Rep.* 2016;13(3):2094-100.
15. Zhang S, Wang L, Liu H, Zhao G, Ming L. Enhancement of recombinant myricetin on the radiosensitivity of lung cancer A549 and H1299 cells. *Diagn Pathol.* 2014;9:68.
16. Wang L, Feng J, Chen X, Guo W, Du Y, Wang Y, et al. Myricetin enhance chemosensitivity of 5-fluorouracil on esophageal carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Cell Int.* 2014;14:71.
17. Ha TK, Jung I, Kim ME, Bae SK, Lee JS. Anti-cancer activity of myricetin against human papillary thyroid cancer cells involves mitochondrial dysfunction-mediated apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2017;91:378-84.
18. Jiang M, Zhu M, Wang L, Yu S. Anti-tumor effects and associated molecular mechanisms of myricetin. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019;120:109506.
19. Jose J, Dhanya AT, Haridas KR, Sumesh Kumar TM, Jayaraman S, Variyar EJ, et al. Structural characterization of a novel derivative of myricetin from *Mimosa pudica* as an anti-proliferative agent for the treatment of cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2016;84:1067-77.
20. Sajedi N, Homayoun M, Mohammadi F, Soleimani M. Myricetin Exerts its Apoptotic Effects on MCF-7 Breast Cancer Cells through Evoking the BRCA1-GADD45 Pathway. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2020;21(12):3461-8.
21. Ji A, Hu L, Ma D, Qiang G, Yan D, Zhang G, et al. Myricetin Induces Apoptosis and Protective Autophagy through Endoplasmic Reticulum Stress in Hepatocellular Carcinoma. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2022;2022:3115312.
22. Li HG, Chen JX, Xiong JH, Zhu JW. Myricetin exhibits anti-glioma potential by inducing mitochondrial-mediated apoptosis, cell cycle arrest, inhibition of cell migration and ROS generation. *J BUON.* 2016;21(1):182-90.
23. Li Y, Cui SX, Sun SY, Shi WN, Song ZY, Wang SQ, et al. Chemoprevention of intestinal tumorigenesis by the natural dietary flavonoid myricetin in APCMin/+ mice. *Oncotarget.* 2016;7(37):60446-60.
24. Agraharam G, Girigoswami A, Girigoswami K. Myricetin: a Multifunctional Flavonol in Biomedicine. *Current Pharmacology Reports.* 2022;8.
25. Ni F, Gong Y, Li L, Abdolmaleky HM, Zhou JR. Flavonoid ampelopsin inhibits the growth and metastasis of prostate cancer in vitro and in mice. *PLoS one.* 2012;7(6):e38802.
26. Ye C, Zhang C, Huang H, Yang B, Xiao G, Kong D, et al. The Natural Compound Myricetin Effectively Represses the Malignant Progression of Prostate Cancer by Inhibiting PIM1 and Disrupting the PIM1/CXCR4 Interaction. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2018;48(3):1230-44.
27. Zheng AW, Chen YQ, Zhao LQ, Feng JG. Myricetin induces apoptosis and enhances chemosensitivity in ovarian cancer cells. *Oncol Lett.* 2017;13(6):4974-8.
28. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
29. Zorlu F, Zorlu R, Divrik RT, Eser S, Yorukoglu K. Prostate cancer incidence in Turkey: an epidemiological study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(21):9125-30.
30. Klein EA, Thompson IM. Chemoprevention of prostate cancer: an updated view. *World journal of urology.* 2012;30(2):189-94.
31. Huang J, Plass C, Gerhauser C. Cancer chemoprevention by targeting the epigenome. *Curr Drug Targets.* 2011;12(13):1925-56.
32. Xu R, Zhang Y, Ye X, Xue S, Shi J, Pan J, et al. Inhibition effects and induction of apoptosis of flavonoids on the prostate cancer cell line PC-3 in vitro. *Food Chemistry.* 2013;138(1):48-53.
33. Liu J-S, Fang W-K, Yang S-M, Wu M-C, Chen T-J, Chen C-M, et al. Natural product myricetin is a pan-KDM4 inhibitor which with poly lactic-co-glycolic acid formulation effectively targets castration-resistant prostate cancer. *Journal of Biomedical Science.* 2022;29(1):29.
34. Jin C, Wu S, Lu X, Liu Q, Zhang L, Yang J, et al. Conditioned medium from actinomycin D-treated apoptotic cells induces mitochondria-dependent apoptosis in bystander cells. *Toxicology letters.* 2012;211(1):45-53.
35. Zhang H, Heim J, Meyhack B. Redistribution of Bax from Cytosol to Membranes Is Induced by Apoptotic Stimuli and Is an Early Step in the Apoptotic Pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1998;251(2):454-9.
36. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry.* 2011;351(1-2):41-58.
37. Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Developmental cell.* 2011;21(1):92-101.
38. Donovan M, Cotter TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2004;1644(2):133-47.
39. Zhang XH, Chen SY, Tang L, Shen YZ, Luo L, Xu CW, et al. Myricetin induces apoptosis in HepG2 cells through Akt/p70S6K/bad signaling and mitochondrial apoptotic pathway. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry.* 2013;13(10):1575-81.
40. Jiao D, Zhang XD. Myricetin suppresses p21-activated kinase 1 in human breast cancer MCF-7 cells through downstream signaling of the β -catenin pathway. *Oncology reports.* 2016;36(1):342-8.
41. Kim ME, Ha TK, Yoon JH, Lee JS. Myricetin Induces Cell Death of Human Colon Cancer Cells via BAX/BCL2-Dependent Pathway. *Anticancer Research.* 2014;34(2):701.
42. Sun W, Tao Y, Yu D, Zhao T, Wu L, Yu W, et al. Myricetin exerts potent anticancer effects on human skin tumor cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 2018;17:1067-72.