

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HİPOKSİK KOŞULLARDA UYGULANAN NARİNGENİNİN
VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALI ARACILI
KANSER HÜCRE HAREKETİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Melike TANRIVERDİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2023**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri	3
2.2. Prostat Bezi	4
2.3. Prostat Kanseri	5
2.4. Hipoksi	6
2.5. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları	8
2.6. Flavonoidler	9
2.6.1. Naringenin	10
3. MATERYAL ve YÖNTEM	12
3.1. Hücre Kültürü	12
3.2. Bileşiklerin Hazırlanması	12
3.3. Hücre Proliferasyon Analizi	13
3.4. Toksikite Analizi	14
3.5. Motilite İndeksinin Belirlenmesi (Yara iyileşme analizi)	15
3.6. Hücre İçi Sodyum İyon Konsantrasyonunun ICP Yöntemi İle Belirlenmesi	15
3.7. İstatistiksel Değerlendirme	16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	17
4.1. Bulgular	17
4.1.1. Hücre proliferasyonu üzerindeki etkiler	17
4.1.2. Toksikite sonuçları	20
4.1.3. Hücre migrasyonu üzerindeki etki	21
4.1.4. Hücre içi sodyum iyon konsantrasyonları üzerindeki etki	23
4.2. Genel Değerlendirme ve Tartışma	26
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	31
KAYNAKLAR	32
ÖZGEÇMİŞ	40

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HİPOKSİK KOŞULLARDA UYGULANAN NARİNGENİNİN VOLTAJ KAPILI SODYUM KANALI ARACILI KANSER HÜCRE HAREKETİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Melike TANRIVERDİ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hatice AKTAŞ

Yıl: 2023, Sayfa: 40

Hipoksi normal koşullara göre daha az oksijen seviyelerini ifade eder. Tümörlerde hacim arttıkça mikroçevresinde oksijen azlığı ortaya çıkmaya başlar. Aynı zamanda damarlanmanın yetersiz olması ve tümörün bazı bölgelerinin kan damarına uzak yerleşimi nedeniyle hipoksik koşullar ortaya çıkar. Tümör hücreleri de sağ kalımı sürdürebilmek için bu koşullara adapte olur. Hipoksiyle indüklenebilir faktör (HIF) aracılığıyla hücre sağ kalımını, anjiyogenezi, apoptozu, invazyon ve metastazları kendi lehine destekleyecek genlerin ekspresyonunu indükler. Hipoksinin, metastatik süreçte rol oynayan matriks metalloproteinazlar ve katepsinleri aktive etmenin yanı sıra voltaj kapılı sodyum kanalı (VGSC) aracılı hücre hareketi ve invazyonu da desteklediğine dair bulgular mevcuttur. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile VGSC'lerin prostat, meme, akciğer, kolon vb birçok kanser hücresinde metastatik hücre davranışları ile ilişkili olduğuna dair bulgular artmaktadır. Bu çalışmanın amacı, yüksek metastatik özelliğe sahip ve metastatik yeteneği VGSC'ler ile ilişkili olan PC-3 prostat kanseri hücrelerinin hareketi üzerinde, naringenin doğal bileşiminin, normoksik ve hipoksik koşullarda oluşturacağı etkileri araştırmaktır. Bunun için öncelikle hücre proliferasyonunu etkilemeyen bileşik konsantrasyonu Alamar blue kullanılarak belirlendi. Daha sonra yara kapanma analizi yapılarak bu konsantrasyondaki naringenin hücrelerin yanal yöndeki hareketi üzerindeki etkisi tespit edildi. Ayrıca bileşik uygulamasından sonra hücre içi sıvıdaki sodyum iyon konsantrasyonları indüktif eşleşmiş plazma spektroskopisi (ICP) yöntemi ile ölçüldü. Naringenin hücre proliferasyonunu etkilemeyen konsantrasyonları 75 ve 100 μ M olarak tespit edildi. Bu konsantrasyonlarda naringenin her iki koşulda hücrelerin hareketini etkilemediği görüldü. ICP analizi sonuçlarına göre naringenin uygulanan grupta, normoksik koşulda hücre içi sodyum iyon konsantrasyonu kontrol grubuna (59.5mM) göre azalırken (NAR75: 47.8mM; NAR100: 54.8mM), hipokside arttığı (K: 47.7mM; NAR75: 51.6mM; NAR100: 61.9mM) dikkat çekmiştir. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde naringenin insan prostat kanseri PC-3 hücrelerinin hareketini normokside etkilemezken hipoksik koşulda arttırabileceği tespit edilmiştir. Bu nedenle naringenin özellikle kanser hastaları tarafından kullanımı konusunda dikkatli olunması gerektiğini vurgulamak istiyoruz.

ANAHTAR KELİMELER: Naringenin, Hipoksi, Metastatik hücre davranışı, Voltaj kapılı sodyum kanalları, prostat kanseri

ABSTRACT

MSc Thesis

EFFECT OF NARINGENIN AT HYPOXIC CONDITIONS ON VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNEL-MEDIATED CANCER CELL MOTILITY

Melike TANRIVERDİ

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Hatice AKTAŞ

Year: 2023, Page: 40

Hypoxia refers to fewer oxygen levels than normal conditions. In growing tumors, hypoxic conditions (oxygen deficiency) arise due to insufficient vascularization and the remote location of some tumor areas from the blood vessel. In response, tumor cells adapt to hypoxic conditions to sustain survival. Hypoxia-inducible factor (HIF) induces the expression of genes related to cell survival, angiogenesis, apoptosis, invasion, and metastases. There is some evidence that hypoxia supports voltage-gated sodium channel (VGSC) mediated cell movement and invasion. There are increasing findings that VGSCs are associated with metastatic cell behavior in many cancer cells such as prostate, breast, lung, etc. The metastatic behavior of PC-3 prostate cancer cells is related to VGSCs, and *SCN8A* encodes the VGSCs of these cells. This study aimed to investigate the effect of naringenin on the PC-3 prostate cancer cell movement in normoxia and hypoxia. For this purpose, cell proliferation analysis was performed by using Alamar blue. The effect of naringenin on the movement of the cell in a lateral direction was determined by performing wound healing assay. The intracellular sodium ion concentrations ($[Na^+]_i$) were measured by the inductive coupled plasma spectroscopy (ICP) method. Concentrations of naringenin that did not affect cell proliferation were determined as 75 and 100 μ M. At these concentrations, naringenin did not affect cell motility in both conditions. According to the results of the ICP analysis, it was noted that the $[Na^+]_i$ in the naringenin-treated group decreased compared to the control group (C: 59.5mM; NAR75: 47.8mM; NAR100: 54.8mM) in normoxia, but it increased in hypoxia (C: 47.7mM; NAR75: 51.6mM; NAR100: 61.9mM). When all the results are evaluated together, it has been revealed that naringenin can increase the movement of human prostate cancer PC-3 cells in hypoxic conditions, while it does not affect the movement of it in normoxia. For this reason, we would like to emphasize that naringenin should be used cautiously, especially by cancer patients.

KEYWORDS: Naringenin, Hypoxia, Metastatic cell behaviour, Voltage gated sodium channels, prostate cancer

TEŐEKKÖR

Tez alıőmam boyunca her tűrlű yardım ve desteęi veren danıőmanım Do. Dr. Hatice AKTAŐ'a; laboratuvar alıőmalarında yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Zeynep ELİK, Bűőra TOSUN, Őilan GÖZENOęLU ÜCAN ve Semra ALMAS'a teőekkűr etmeyi bor bilirim.

Ayrıca daima beni destekleyen anneme, babama ve kardeőlerime teőekkűrlerimi sunarım.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Prostat bezi. PZ: periferik bölge, CZ: santral bölge, TZ: transisyonel bölge, AFS: anterior fibromüsküler stroma bölgesi	4
Şekil 2.2. Tümör gelişiminde hipoksiyle indüklenebilir faktör HIF'in rolü.....	7
Şekil 2.3. Voltaj kapılı sodyum kanalı şematik gösterimi.....	8
Şekil 3.1. Naringenin'in kimyasal yapısı	13
Şekil 3.2. Tetrodotoksin'in kimyasal yapısı	13
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda naringenin PC-3 hücrelerine normoksik koşullarda uygulanması ile elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (\pm standart hata)	18
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda naringenin PC-3 hücrelerine hipoksik koşullarda uygulanması ile elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (\pm standart hata)	19
Şekil 4.3. Toksikite grafiği: (A) Normoksi, (B) Hipoksi koşulu.	20
Şekil 4.4. PC-3 hücrelerine normoksi koşullarında 75 μ M ve 100 μ M naringenin uygulanması ile elde edilen motilite indeks (MoI) değerleri (\pm standart hata)	22
Şekil 4.5. PC-3 hücrelerine hipoksi koşullarında 75 μ M ve 100 μ M naringenin uygulanması ile elde edilen motilite indeks (MoI) değerleri (\pm standart hata)	22
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlardaki naringenin PC-3 hücrelerine normoksi koşulunda uygulanması sonucunda hücre içi sodyum iyonu [Na^+] _i ; konsantrasyonu (mM) üzerinde meydana gelen etkiler (\pm standart hata)	24
*: Kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).....	24
Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlardaki naringenin PC-3 hücrelerine hipoksi koşulunda uygulanması sonucunda hücre içi sodyum iyonu [Na^+] _i ; konsantrasyonu (mM) üzerinde meydana gelen etkiler (\pm standart hata)	25
*: Kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).....	25

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Flavonoid sınıfları, molekül yapıları ve bazı örnekler	9
Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda naringenin PC-3 hücrelerine normoksik koşullarda uygulanması ile elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±standart hata).....	18
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda naringenin PC-3 hücrelerine hipoksik koşullarda uygulanması ile elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±standart hata).....	19
Çizelge 4.3. PC-3 hücrelerine 100 µM naringenin uygulaması sonucunda elde edilen canlı ve ölü hücre sayıları (%)	20
Çizelge 4.4. PC-3 hücrelerine normoksi ve hipoksi koşullarında naringenin uygulanması ile elde edilen motilite indeks değerleri (±standart hata)	21
Çizelge 4.5. PC-3 hücrelerine normoksi ve hipoksi koşullarında naringenin uygulanması ile elde edilen hücre içi sodyum iyonu [Na ⁺] _i konsantrasyonu (mM) değerleri (±standart hata)	24

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

HIF	Hipoksiyle indüklenebilir faktör
VGSC	Voltaj kapılı sodyum kanalı
NAR	Naringenin
TTX	Tetrodotoksin
DMSO	Dimetil sülfoksit
KD	Çözücü kontrol grup (Kontrol - DMSO)
MMP	Matriks metalloproteinaz
BPH	Benign prostat hiperplazisi

1. GİRİŞ

Prostat kanserinde diyet önemli bir risk faktörüdür (Patel ve Klein, 2009). Doğal bileşikler, diyetle alınabilir özellikte olduklarından ve sentetik bileşiklere oranla daha az yan etki oluşturabildiklerinden dolayı kanserin ve metastazların önlenmesi ya da tedavisinde önemli rol oynayabilirler (Reddy ve ark., 2003). Naringenin doğal bileşiğinin prostat ve meme kanseri hücrelerinde proliferasyonun yanı sıra hücre migrasyon ve invazyonunu azaltabildiği gösterilmiştir (Harmon ve Patel, 2004; Gao ve ark., 2006; Lentini ve ark., 2007; Liao ve ark., 2014). Bileşiklerin kanser hücre migrasyonu üzerindeki etkilerinin matriks metalloproteinazların (MMP) inhibe edilmesi gibi mekanizmalar ile başarıldığı dikkat çekmektedir.

İyon kanallarının kanser hücrelerinin büyümesinde ve göçünde önemli rol oynadığı ve kanser gelişiminin birçok evresine katkıda bulunduğu bilinmektedir (Lastraioli ve ark., 2015). Voltaj kapılı sodyum kanalı (VGSC), merkezi sinir sisteminin nöronal fonksiyonlarında, nöronal aksiyon potansiyelinin başlatılmasından ve yayılmasından sorumlu olan önemli bir rol oynar (Kruger ve Isom, 2016). VGSC'ler, nöronlar arasındaki sinyal iletişimde kritiktir ve çeşitli fizyolojik düzenlemelere katılır. Ayrıca yapılan çalışmalarla VGSC'lerin fonksiyonel ekspresyonunun prostat, meme, kolon, akciğer gibi birçok kanser hücresinde arttığı, bu kanalların artan düzenlenmesinin metastatik hücre davranışlarıyla ilişkili olduğu ve metastatik yayılımı teşvik ettiği gösterilmiştir (Grimes ve ark., 1995; Laniado ve ark., 1997; Brackenbury ve ark., 2007; Brackenbury, 2012). Bennett ve ark. (2004), prostat kanseri hücreleri ile yaptıkları çalışma sonucunda VGSC ekspresyonundaki artışın hücrelerin metastatik karakter kazanması için gerekli ve tek başına yeterli olduğunu ortaya çıkarmışlardır.

Oksijen, organizmanın metabolik regülasyonu için en önemli elementlerden biridir. Oksijen seviyesinin homeostazdan daha düşük olduğu durumu tanımlayan hipoksi, tümörün büyümesiyle tümörü oluşturan hücrelerin maruz kaldığı koşuldur. Tümör, mikroçevresindeki bu düşük oksijen seviyelerine çeşitli hücresel karakterleri

değiştirerek, örneğin, hücre sağ kalımını, anjiyogenezi, tümör invazyonunu ve apoptozu destekleyen anahtar moleküler programların ekspresyonunu indükleyerek adapte olur. Bu adaptasyon hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF) tarafından düzenlenir. HIF, hücresel oksijendeki değişiklikleri algılayarak ve bunlara yanıt oluşturur (Berra ve ark., 2003; Vapuel ve Mayer, 2007; Avni ve ark., 2011). HIF, α ve β alt birimlerinden oluşan heterodimerik bir transkripsiyon faktörüdür. Oksijen seviyesini algılayarak cevap oluşturan, α alt birimidir. HIF- α 'nın esas olarak üç izoformu bulunmaktadır: HIF-1 α , HIF-2 α ve HIF-3 α (Jaakkola ve ark., 2001). HIF-1 α akut, HIF-2 α ise kronik hipoksi koşullarında aktifleşir (Semenza, 2000; Koh ve Powis, 2012).

Diğer çalışmalar ile hipoksinin, VGSC proteininde konformasyonel değişikliklere neden olan moleküller arası disülfidlerin oluşumu veya bozulmasıyla kanal kapısını etkileyebileceği bildirilmiştir (Hammarström ve Gage, 2002). Rızaner (2010), VGSC'leri ekspresyonu yüksek ve metastatik yeteneği de bu kanallar ile ilişkili olan güçlü metastatik sıçan prostat kanser hücreleri MAT-LyLu ile yaptığı çalışma sonucunda, hipoksik koşulların hücre göçünü ve VGSC'lerin ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir.

Literatür bilgisi, metastatik sürecin başlaması, sürdürülmesi ve metastatik hücre davranışlarının ortaya çıkmasında VGSC'ler ve hipoksi arasındaki ilişkinin önemli olduğunu düşündürmektedir. "Metastazların önlenmesi / durdurulması için VGSC'lerin bloklanması" tedavi hedefinde, araştırmaların, tümör mikroçevresini taklit edecek şekilde hipoksik koşullarda yapılarak mekanizmaların aydınlatılması önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı, yüksek metastatik özelliğe sahip ve metastatik yeteneği VGSC'ler ile ilişkili olan PC-3 insan prostat kanseri hücrelerinin hareketi üzerinde naringenin doğal bileşiğinin normoksik ve hipoksik koşullarda oluşturacağı etkileri araştırmaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri

Tümör hücrelerinin normal hücrelerden farklı fenotipik özelliklere sahip olduğunu dile getiren Hanahan ve Weinberg (2011), yayınladıkları makalede ayırt edici özellikleri şu şekilde özetlemişlerdir: Proliferatif (çoğalma) sinyallerin sürekliliği kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran en temel özelliktir. Büyüme faktörlerini kendileri üretebilen kanser hücreleri herhangi bir poliferatif sinyal olmadığı durumlarda dahi otokrin uyarılma ile tümör hücrelerinin poliferasyonu sağlanır. Normal dokular gibi kanser hücreleri de besin maddeleri ve oksijene ihtiyaç duyarlar. Kanserli hücrelerin bu gereksinimi yeteri kadar karşılanmadığında anjiyogenez büyüme faktörlerini salgırlar. Yeni kan damarlarının oluşumu uyarılır. Bu sayede besin ve oksijen alımı gerçekleşir. Aynı zamanda kanserli hücrelerin metabolik atıkların atılması da sağlanır (Bertram, 2000; Hanahan ve Weinberg, 2011).

İmmün sistem yanıtından kaçarak tümör hücrelerinin ilerlemesi kolaylaşır. Genomik kararsızlık tümör hücrelerinin bir diğer özelliğidir. Bu durum DNA genlerindeki mutasyonlar ile bağlantılıdır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Tümör hücrelerinin özelliklerinden biri de çevresindeki dokulara invazyon ve metastaz yapma yetenekleridir. Kanser hücrelerinin morfolojik yapılarının değişmesi sonucunda hücre-hücre ve hücre matriks adezyon moleküllerinin etkileşimleri bozulur. Tümörler geliştikçe çevre dokulara girme yetenekleri artar ve yeni doku meydana getirmek için başka bölgelere büyüme sağlayarak metastaz oluştururlar (Abramczyk ve ark., 2009; Colotta ve ark., 2009; Gonzalez-Perez ve ark., 2014).

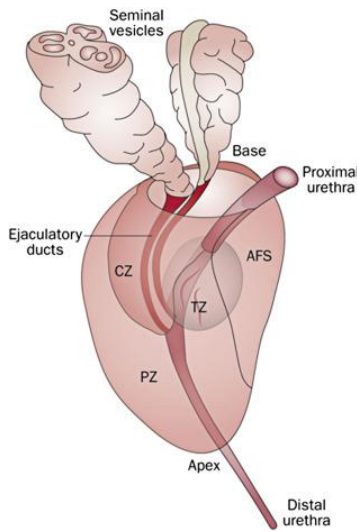
Normal hücreler sınırlı sayıda çoğalma potansiyeline sahiptirler. Bu sağlıklı hücrelerin her bölünmesinde tekrar dizileri kısılır ve hücrelerde yaşlanma uyarılır. Yaşlanan hücre fonksiyonlarını kaybederek apoptozise yönlendirilir (Favaloro ve ark., 2012). Kromozom uçlarında bulunan telomerler hücre bölünmesi esnasında kısılma olmadığından hücreler sınırsız bölünme potansiyeli kazanırlar (Engelhardt ve Martens, 1998; Shay ve Wright, 2000; Blasco, 2005).

Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran en temel özellik poliferatif (çoğalma) sinyallerinin süreklilik göstermesidir. Büyüme faktörlerini kendileri üretebilen kanser hücreleri otokrin uyarılma ile tümör hücresinin poliferasyonu sağlanır (Bhowmick ve ark., 2004; Cheng ve ark., 2008). Hücrel enerji metabolizmalarının yeniden programlama kanser hücrelerine özgüdür (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.2. Prostat Bezi

“Prostat bezi, mesanenin tabanında bulunan ve üretrayı çevreleyen yardımcı bir erkek üreme organıdır” (Risbridger, 2018). Sperm sağlığı ve hareketliliği için gerekli olan çinko, sitrik asit, kalsiyum, fosfatlar ve diğer enzimleri içeren prostat salgılarını üretir (Risbridger, 2018).

Prostat bezi anatomik olarak dört bölgeye ayrılır (Şekil 2.1.). Prostat bezinin yaklaşık %70’ini oluşturan periferik bölge, distal üretrayı saran en büyük bölgedir. Santral bölge ise bezin %25’lik kısmıdır. Boşalma kanallarının etrafını sarar ve daralarak koni şeklini alır. Bezin sadece %5’ini çevreleyen transisyonel zon en küçük bölgedir. Dördüncü zon ise anterior fibromusküler stroma bölgesi olup lifli bağ doku ve düz kastan meydana gelmektedir (Bhavsar ve Verma, 2014).



Şekil 2.1. Prostat bezi. PZ: periferik bölge, CZ: santral bölge, TZ: transisyonel bölge, AFS: anterior fibromusküler stroma bölgesi (Risbridger, 2018)

Prostat, yaşlı erkeklerde hastalığa son derece yatkındır ve en yaygın bozukluklar iyi huylu prostat hiperplazisi (BPH), prostatit ve prostat kanseridir. BPH, stromal prostat hücrelerinin progresif hiperplastik büyümesi olarak tanımlanır ve bezin genişlemesiyle sonuçlanır. Prostat üretrayı çevrelediğinden, BPH'ye bağlı genişleme üretral akışı kısıtlar. Prostatit, prostat iltihabı olarak tanımlanır. Prostatit vakalarının çoğu bakteriyel değildir. Kronik prostatit öyküsü olan erkeklerde prostat kanseri riski artar. Prostat kanseri, kontrolsüz hücresel proliferasyon, epitelyal farklılaşma ve kademeli duktal yapı kaybı ile karakterizedir ve ilerleyici bir hastalıktır. Prostat kanserleri genellikle bezin periferik bölgesinde ortaya çıkar (Risbridger, 2018).

2.3. Prostat Kanseri

2020 yılında Dünya'da yaklaşık 1.4 milyon yeni prostat kanseri vakası ile 375000 prostat kanserine bağlı ölüm kaydedilmiştir. Bu rakamlar, prostat kanserini erkekler arasında insidans bakımından ikinci, mortalite oranı bakımından beşinci sıraya yerleştirmektedir. Totalde, bölgelere göre 100000 erkekte 6.3 ila 83.4 arasında değişen insidans oranlarının, Kuzey ve Batı Avrupa, Karayipler, Avustralya/Yeni Zelanda, Kuzey Amerika ve Güney Afrika'da en yüksek; Asya ve Kuzey Afrika'da en düşük seviyede olduğu belirlenmiştir (Sung ve ark., 2021).

Prostat kanseri etyolojisi ile ilgili yapılan çalışmalar, hastalığın görülmesinde genetik duyarlılık ve çevre şartlarının etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Risk faktörlerinin başında yaş, ırk ve genetik faktörler gelmektedir. Ayrıca sigara ve alkol kullanımı ile beslenme tarzı da risk etmenleridir (Platz ve ark., 2003; Chan ve ark., 2005; Stacewicz-Sapuntzakis ve ark., 2008; Rawla, 2019).

Prostat kanserinde insidans oranı artan yaşla ilgilidir. 40 yaşın altındaki erkeklerde prostat kanseri nadir görülürken, 50 yaşından sonra risk hızla artar. Prostat kanseri vakalarının yaklaşık 10'da 6'sı 65 yaşından büyük erkeklerde teşhis edilmektedir (American Cancer Society, 2023).

Aile öyküsü ve genetik faktörler prostat kanserinin bir diğer risk faktörüdür. Genellikle erken yaşta görülen prostat kanseri vakalarında, genetik yatkınlık ve aile öyküsünün etkili olduğu yapılan birçok çalışmada görülmüştür. Genetik faktörlerin prostat kanseri üzerindeki etkisi yaklaşık %40 oranındadır (Bratt, 2002). Prostat kanseriyle ilgili gen mutasyonlarının çoğunun kalıtsal değil, edinilmiş mutasyonlar sonucu oluştuğu belirlenmiştir. Prostat kanseri vakalarının yaklaşık %10'unda kalıtsal gen değişikliklerinin rol oynadığı düşünülmektedir (American Cancer Society, 2023). Gen bağlantı analizleri yapılan çalışmalarda bazı genlerin [*HPC1 (RNASEL)*, *PCaP*, *ELAC2*, *HPC20*] kalıtsal olarak prostat kanserinde rol oynayabilecekleri gösterilmiş, ancak bu genlerin hiçbirinin yüksek riskli prostat kanseri yatkınlık geni olmadığı bildirilmiştir (Heise ve Haus, 2014). 2018 yılında 102 prostat kanserli ve 98 prostat kanseri şüphelisi bireylerle yapılan bir çalışmanın sonuçları, *ELAC2* geninin Ser217Leu ve Ala541Thr arasındaki polimorfizminin prostat kanseri ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle araştırmacılar, bu mutasyonu taşıyan bireylerin prostat kanseri bakımından değerlendirilerek koruyucu önlemlerin alınması gerektiğini belirtmişlerdir (Zahiri ve Zahiri, 2020). Ayrıca, kadınlarda meme ve over kanserleri için risk faktörlerinden olan *BRCA1* ve *BRCA2* tümör baskılayıcı genlerindeki mutasyonların (özellikle *BRCA2*), az sayıda prostat kanseri vakası ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. DNA tamir genleri olan *CHEK2*, *ATM*, *PALB2* ve *RAD51D*'deki mutasyonların ise bazı kalıtsal prostat kanserlerinden sorumlu olabileceği gösterilmiştir. Prostat bezinin gelişiminde önemli rolü olan *HOXB13* genindeki mutasyonlar, bazı ailelerde görülen erken başlangıçlı prostat kanseri (genç yaşta teşhis edilen prostat kanseri) ile ilişkilendirilmiştir (American Cancer Society, 2023).

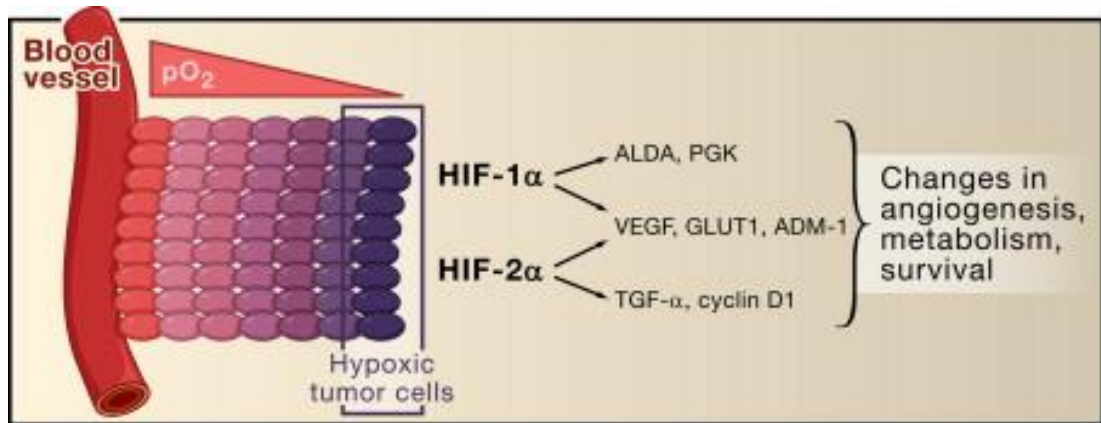
2.4. Hipoksi

Hipoksi, oksijenin yeterli homeostazı sürdürmek için doku seviyesinde yeterli miktarlarda mevcut olmadığı bir durumdur. Bu durum, yetersiz kan beslemesi veya kandaki düşük oksijen içeriği nedeniyle dokulara yetersiz oksijen sunumundan kaynaklanabilir. Hipoksinin yoğunluğu hafif ila şiddetli arasında değişebilir ve akut veya kronik formlarda ortaya çıkabilir. Hipoksiye yanıt değişkendir. Bazı dokular bazı

hipoksi/iskemi formlarını daha uzun süre tolere edebilir. Diğerleri düşük oksijen seviyelerinden ciddi şekilde zarar görür (Hiraga, 2018; Watts ve Walmsley, 2019).

Hipoksik koşullarda, bir hipoksi sensörü ve hücrel hipoksik tepkinin düzenleyicisi olarak görev yapan Hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF) aktifleşir. HIF, bir α -alt birimi ve bir β -alt biriminden oluşan heterodimerik bir komplekstir. Normoksik koşullar altında HIF-1 α proteasomal bozunma için hedeflenir. Ancak hipoksik koşullar altında, HIF-1 α birikerek hedef genlerin transkripsiyonunun aktive olmasına izin verir. HIF, bazı servikal, meme, yumurtalık, endometriyal ve mide kanserlerinde aşırı eksprese edildiğinden ve kötü prognozla ilişkili olduğundan, bir onkogen olarak işlev görebilecek gibi görünmektedir (Harbour ve Onken, 2007).

Katı tümörlerde, kan damarlarına daha yakın olan tümör hücreleri nispeten iyi oksijenlenir, daha uzak bölgelerdekiler ise hipoksiktir. Bu hücrelerde HIF- α proteinlerinin stabilizasyonu, hipoksik strese adaptasyona aracılık eden faktörleri kodlayan çok sayıda hedef genin ekspresyonunu uyarır (Şekil 2.2.) (Keith ve Simon, 2007).

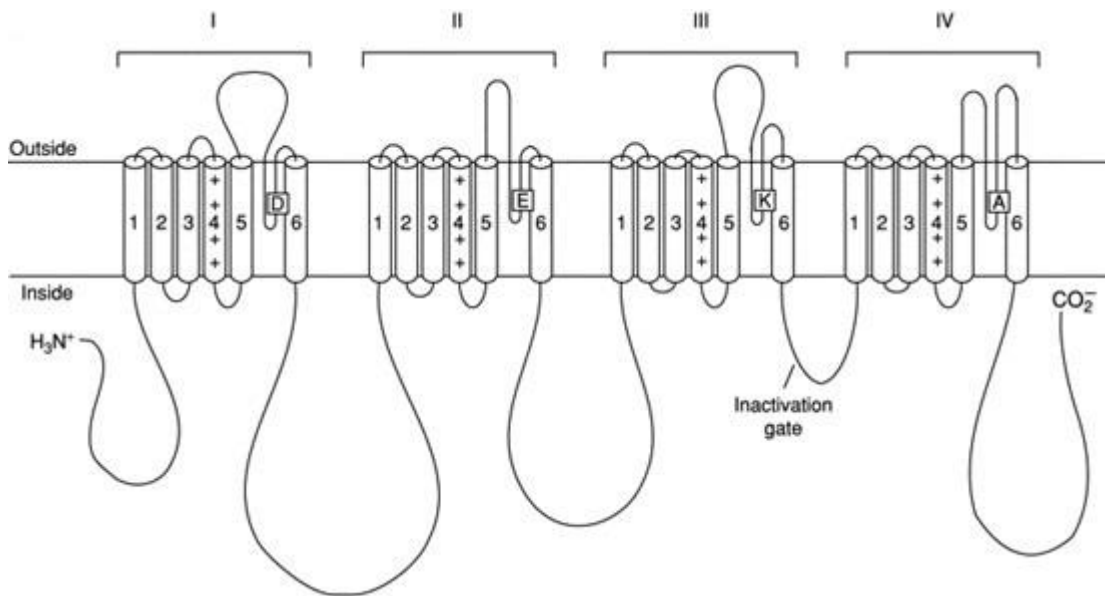


Şekil 2.2. Tümör gelişiminde hipoksiyle indüklenebilir faktör HIF'in rolü (Keith ve Simon, 2007)

Primer tümörde, hipoksi metastazı teşvik eder. Son çalışmalar, hipoksi ve HIF'e bağımlı sinyalleme aktivasyonunun, metabolik yeniden programlama, kök hücre fenotipi, invazyon, anjiyogenez, immün baskılama, premetastatik niş, intravazasyon ve/veya ekstrasvazasyonun düzenlenmesi ve apoptoza direnç yoluyla metastazı teşvik ettiği mekanizmaları ortaya çıkarmıştır (Rankin ve ark., 2016).

2.5. Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları

Voltaj kapılı sodyum kanalları (VGSC), nöronlarda ve diğer uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyellerini başlatır ve yayar. Bunun yanı sıra elektriksel olarak uyarılabilir olmayan hücrelerde de eksprese edildikleri gösterilmiştir. Bir veya iki küçük β alt birimi ile büyük bir α alt biriminin kompleksleridir. α alt birimleri, bir voltaj algılama modülü (sensör) ve bir gözenek oluşturma modülünden (por) oluşan dört homolog alan içerir. Lokal anestezi, antiepileptik ve antiaritmik ilaçlar, gözenek içindeki bir reseptör bölgesine bağlanır ve bloke eder. Aynı zamanda birçok nörotoksin de farklı reseptör bölgelerine bağlanır ve kanal fonksiyonunu değiştirir. Bu kanallardaki mutasyonlar kalıtsal epilepsi formları, kronik ağrı, miyopati, kardiyak aritmiler ve diğer sendromlara neden olur (Mantegazza ve Catterall, 2012; Hernandez ve Richards, 2022). Bunların yanı sıra, VGSC'lerin metastatik kanser hücrelerinde ekspresyonunun olduğuna dair güçlü kanıtlar elde edilmiştir (Diss ve ark., 2004). Meme, prostat, akciğer, rahim ağzı, kolon, lenfoma, melanoma gibi çeşitli kanser hücreleri ile yapılan çalışmalar VGSC'lerin, galvanotaksi, lateral motilite, endositik membran aktivitesi, adezyon, gen ekspresyonu ve invazyon gibi metastatik kanser hücreleri davranışlarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Brackenbury, 2016).

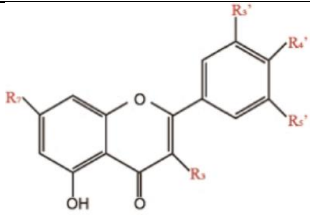
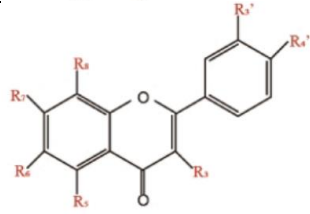
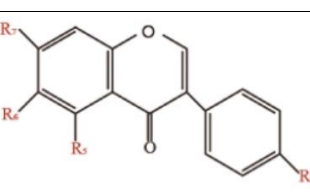


Şekil 2.3. Voltaj kapılı sodyum kanalı şematik gösterimi (Soderlund, 2005)

2.6. Flavonoidler

Flavonoidler meyve ve sebzelerde doğal şekilde oluşan, düşük molekül ağırlıkta fenolik bileşik grubunu oluştururlar. Bitkilerden özellikle sarı ve kırmızı sebzelerde bulunan flavonoidler bitkilerin ikincil metabolit grubudur (Lane ve Kubanek, 2008). Ayrıca aromatik ve tıbbi bitkilerde, çay ve kırmızı şarapta da flavonoid bileşikleri bol miktarda bulunmaktadır. Flavonoidler genellikle bitki hücrelerinin vakuollerinde glikozitler şeklinde birikir (Shen ve ark., 2022). Yapılan birçok çalışmada flavonoidlerin antitümör etkilerinin çok güçlü olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra antioksidan ve antiproliferatif özelliklere sahip olmasından dolayı da apoptozu indüklediği, hücre farklılaşmasını ve hücre döngüsünü düzenlediği bilinmektedir (Choi ve ark., 2008). Flavonoidlerin karakteristik özelliklerini heterosiklik (C) halkasının oksidasyonu belirler. Buna göre flavonoidler; flavonol, flavon, izoflavon, antosiyanidin, flavanon, flavanol ve şalkon olmak üzere yedi sınıfta toplanır. Çizelge 2.1.'de flavonoid gruplarının molekül yapıları ve bazı örnekler ile bulunduğu bazı kaynakların isimleri verilmiştir (Shen ve ark., 2022).

Çizelge 2.1. Flavonoid sınıfları, molekül yapıları ve bazı örnekler (Shen ve ark., 2022)

Flavonoid sınıfları	Molekül yapısı	Bazı örnekler	Bulunduğu bazı kaynaklar
Flavonol		Kaempferol Kuersetin Rutin	Yeşil çay, soğan, brokoli, vb.
Flavon		Apigenin Luteolin	Papatya, havuç, maydanoz, vb.
İzoflavon		Daidzein Genistein	Soya, tofu, nohut, vb.

Çizelge 2.1. devamı

Antosiyanidin		Siyanidin Pelargonidin Malvidin	Üzüm, domates, patlıcan, kırmızı şarap, vb.
Flavanon		Naringenin Hesperetin	Narenciye (Greyfurt, portakal, limon, vb.)
Flavanol		Kateşin, Epikateşin, Gallokateşin	Elma, kayısı, kiraz, kakao, çay, vb.
Şalkon		Naringenin şalkon, Eriyodiktiyol şalkon	Zencefil, Elma, portakal, vb.

2.6.1. Naringenin

Naringenin (4, 5, 7- trihidroksi – flavanon-7 rhamnoglukozit) flavanon grubunda yer alan doğal bileşiktir. Hidrofobik molekül olan naringenin organik çözücülerde (etanol, DMSO) çözünür. Özellikle turuncgil meyveler, greyfurt ve domates naringenin temel kaynaklarıdır. Naringenin, aktif metaboliti olan naringenin türevi olup bu şekilde vücuda alınır (Venkateswara Rao ve ark., 2017; Arafah ve ark., 2020).

Naringenin antiyabetik (Den Hartogh ve Tsiani, 2019), antiateroskleroz (Mulvihill ve ark., 2010), antiinflamatuvar (Tsai ve ark., 2012) gibi terapötik özellikleri yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Ayrıca naringenin antiproliferatif ve antioksidan aktivitelerinin olduğu da tespit edilmiştir (Ekambaram ve ark., 2008). Yapılan bir çalışmada naringenin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkilerinin olduğu belirtilmiştir. Deneylede narenciye meyvelerinden elde edilen naringenin özütlerinin

sıçanlarda kan beyin bariyerini geçtiği kanıtlanmıştır (Yi ve ark., 2010). A431 insan epidermoid karsinom hücrelerinde farklı konsantrasyonlara bağlı olarak uygulanan naringenin canlı hücre sayısını azaltabildiği tespit edilmiştir (Ahamad ve ark., 2014). Akciğer kanseri hücre soyu A549 hücreleri üzerinde yapılan çalışmada naringenin Akt yolağı ve MMP-2, ve MMP-9 aktivitelerini düşürerek tümör hücrelerinin göçünü engellediği belirlenmiştir (Hsiao ve ark., 2007). Başka bir çalışma naringenin diğer bir flavonoid bileşik olan kuersetin ile birlikte kombinasyonunda deneysel diyabetik hayvanın karaciğer ve böbrek fonksiyonlarında oksidatif stres azaltılarak bu hayvanların organlarındaki DNA hasarı üzerinde iyileştirici etkisi olduğu gösterilmiştir (Or ve ark., 2011). Lim ve arkadaşları (2017), yapmış oldukları çalışmada naringenin prostat kanseri üzerindeki etkisini araştırmışlar; Naringenin hücrelere uygulanmasıyla PI3K/Akt, ERK1/2, P38 ve JNK sinyal yollarını modüle ederek PC-3 ve DU145 hücrelerinin göçünü ve poliferasyonunu azalttığını göstermişlerdir. LNCaP insan prostat kanseri hücre hattının kullanıldığı başka bir çalışmada, naringenin hücrelere verilmesiyle DNA onarım mekanizması aktivitesinin yükseltgenerek hücrelerin mutasyondan korunduğu tespit edilmiştir (Gao ve ark., 2006).

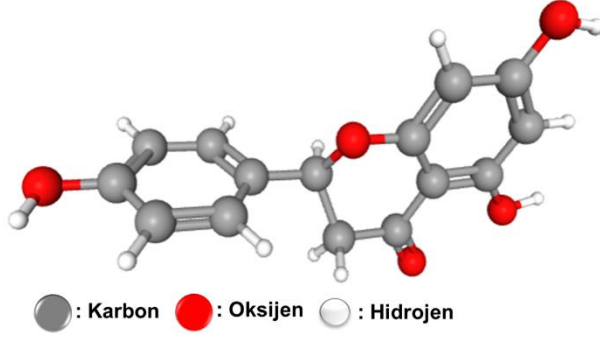
3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Deneyler, insan prostat kanseri hücre hattı PC-3 üzerinde yapılmıştır. Bu hücre hattı İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü tarafından laboratuvarımıza hediye edilmiştir. Hücreler, laboratuvarımızda seri pasajları yapılarak çoğaltılmış, dondurularak stok yapılmıştır. Tez deneylerinde kullanılan hücrelerin pasaj numarası 15-19 aralığında seçilmiştir. PC-3 hücreleri için yaşama ortamı şu şekilde hazırlanmıştır: Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640, Invitrogen, ABD) medium içerisine %10 oranında fetal dana serumu (FBS) ve 2 mM L-Glutamine ilave edilmiştir. Hücreler, standart hücre kültürü koşulları olan %5 CO₂, 37°C sıcaklık ve %100 nem koşullarını sağlayan inkübatörde yaşatılmaktadır. Standart hücre kültür koşulları normoksik koşul olarak kabul edilmektedir ve atmosfer seviyesinde (%21) oksijen içermektedir. Hipoksik koşul için azot gazı kullanılarak oksijen oranının %2’de tutulduğu çok gazlı inkübatör kullanılmıştır.

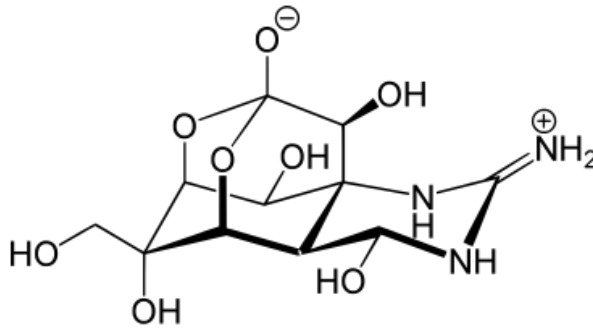
3.2. Bileşiklerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan naringenin bileşiği (C₁₅H₁₂O₅; ma: 272.25 g/mol) (Sigma Aldrich, ABD) (Şekil 3.1.) ticari olarak satın alınmıştır. Naringenin (NAR) suda çözünmediği için, üretici firmanın önerisine göre çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmıştır. Öncelikle DMSO içerisinde 10 mM konsantrasyonlu ana stok çözeltisi, buradan PC-3 hücrelerinin yaşama ortamı olarak hazırlanan medium ile dilüsyon yapılarak 1mM konsantrasyonlu ara stok çözeltisi elde edilmiştir. Ara stok çözeltisi, sterilizasyon için 0.2µm por çaplı filtreden geçirilmiştir. Bunu takiben, deneylerde kullanılmak üzere, maksimum DMSO oranı %1 olacak şekilde, farklı konsantrasyonlarda dilüsyonlar hazırlanmıştır. Naringenin, DMSO içerisinde çözünmektedir. Bu nedenle çözücü kontrol grupları (KD) oluşturulmuş ve bu grupların mediumları içerisine deney gruplarının içerdiği kadar DMSO eklenmiştir.



Şekil 3.1. Naringenin'in kimyasal yapısı (PubChem, 2023)

Tetrodotoksin (TTX) ($C_{11}H_{17}N_3O_8$; ma: 319.27 g/mol) (Alomone Labs, İsrail) (Şekil 3.2.), voltaj kapılı sodyum kanal blokeridir ve bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. TTX (1 mg), 313.2 μ L distile su içerisinde çözülmüş ve 10mM konsantrasyonda stok elde edilmiştir. Stok çözelti, yapılan porsiyonlamanın ardından -20 °C'de saklanmaktadır. TTX, deneylerde 2 μ M konsantrasyonda kullanılmıştır. Bunun için, medium içerisinde dilüe edilmiş ve 0.2 μ m por çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiştir.



Şekil 3.2. Tetrodotoksin'in kimyasal yapısı (Alomone Labs, 2022)

3.3. Hücre Proliferasyon Analizi

Laboratuvarımızda daha önce yapılan optimizasyon çalışmalarıyla hem normoksi hem hipoksi koşullarında hücre proliferasyon analizi için bir kuyucuğa ekilecek başlangıç hücre sayısı 3000 olarak belirlenmiştir (Gözenoğlu Ücan, 2022).

Naringenin, her iki oksijen koşulunda, hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri, Alamar Blue yöntemiyle tespit edilmiştir. Analiz için 96 kuyucuklu mikrolakalarda çalışılmış olup kuyucuklara 3000 hücre ekilmiştir. Deney mediumları, Bölüm 3.2.2’de anlatılan şekilde hazırlanmıştır. Hücre ekiminden 24 saat sonra, kontrol (K) grubu kuyucuklarına normal büyüme mediumu; deney grubu (NAR) kuyucuklarına ise 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 μM konsantrasyonlarda naringenin içeren deney mediumları konulmuştur. Ayrıca deney gruplarının içerdiği kadar DMSO eklenmiş çözücü kontrol (KD) grupları da oluşturulmuştur. Pasajdan 24 saat sonra başlayarak, 2 gün boyunca, 24 saatte bir medium değiştirilmiştir. Her değişim periyodunda mediumlar taze hazırlanmıştır. Son medium değişiminden 24 saat sonra her kuyucuğa 10 μL alamar blue solüsyonu eklenmiştir. Mikrolakalar, 37 °C’de, 4 saat boyunca ışıktan korunarak inkübe edilmiştir. Süre bitiminde, bir mikrolaka okuyucu kullanılarak absorbans ölçümleri (570 ve 600 nm) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak, canlı hücre yoğunlukları % indirgenme olarak hesaplanmıştır (ThermoFisher, 2022). Daha sonra veriler normalize edilmiştir. Normalizasyonda, çözücü kontrol grupları için kontrol grubunun, deney grupları için ise çözücü kontrol gruplarının canlılık oranı 100 kabul edilmiştir.

3.4. Toksikite Analizi

Naringenin’in, normoksi ve hipoksi koşullarında, PC-3 hücrelerine karşı olası toksisitesini değerlendirmek için tripan mavisi kullanılarak boya dışlama analizi yapılmıştır. Öncelikle 35 mm çaplı steril petrilere 3×10^4 hücre ekilmiştir. Pasajdan 24 saat sonra kontrol grubu petrilere normal büyüme mediumu, deney grubu petrilere 100 μM naringenin içeren medium, çözücü kontrol grubu petrilere ise DMSO ilave edilmiş medium eklenmiştir. 2 gün boyunca 24 saatte bir medium değiştirilmiş ve süre bitiminde petrilereki medium çıkarılarak yerine normal büyüme mediumu (800 μL) ve tripan mavisi (200 μL) eklenmiştir. 10 dk’lık inkübasyonun ardından inverted ışık mikroskopunda (Olympus, Japonya) her petri için 40 farklı alandaki canlı ve ölü hücre sayıları tespit edilmiştir.

3.5. Motilite İndeksinin Belirlenmesi (Yara iyileşme analizi)

Bu kısımda, naringenin PC-3 insan prostat kanser hücrelerinin lateral yöndeki hareketi üzerindeki etkisi, normoksik ve hipoksik koşullarda araştırılmıştır. Bunun için 100 µM naringenin hücrelere 48 saat boyunca uygulanarak yara iyileşme analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda hücrelerin lateral yönde hareket ettikleri mesafeyi ifade eden motilite indeksi hesaplanmıştır. Analiz kısaca şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Öncelikle, 35 mm'lik petri kaplarının alt yüzeyine dikey ve yatay çizgiler çizilmiştir. Bu petrilere 15×10^4 PC-3 hücresi ekildikten 24 saat sonra petriyi kaplayan ve dikey çizgiler hizasında bulunan hücre tabakası, 200 µL'lik steril pipet ucuyla kazınmış ve yara izi oluşturulmuştur (0. Saat). Yatay ve dikey çizgilerin kesişme noktalarındaki yara genişliklerinin, 0., 24. ve 48. saatlerde inverted mikroskopta fotoğrafları çekilmiştir (büyütme oranı: 10x). Ek olarak, 0. saatte başlanarak 24 saatte bir olmak üzere toplam 2 kez petrilereki mediumlar atılıp taze hazırlanmış kontrol ve deney mediumları ilave edilmiştir. Her üç deney saatinde kaydedilen fotoğraflardaki yara genişlikleri, Image J analiz programında ölçülmüştür. Elde edilen veriler kullanılarak motilite indeksi (MoI) Formül (3.1) ile hesaplanmıştır (Bahar ve Yoon, 2021). Deneylede pozitif kontrol olarak tetrodotoksin (2 µM), çözücü kontrol olarak DMSO eklenmiş medium uygulanmıştır.

$$MoI = 1 - (W_t/W_0) \quad (3.1)$$

MoI: Motilite İndeksi

W_0 : 0.saatte ölçülen yara genişlikleri

W_t : 24. ve 48. saatlerde ölçülen yara genişlikleri

3.6. Hücre İçi Sodyum İyon Konsantrasyonunun ICP Yöntemi İle Belirlenmesi

Naringenin, insan metastatik prostat kanseri PC-3 hücrelerinde voltaj kapılı sodyum kanal aktivitesi üzerindeki etkisini dolaylı olarak gösterebilmek için İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometresi (ICP) yöntemiyle hücre içi sodyum iyon konsantrasyonu ölçülmüştür. Bu ölçüm için öncelikle 35 mm çaplı petrilere 10^5

hücre ekilmiş; ekimden 24 saat sonra petrilereki mediumlar çıkarılmış; kontrol grubu petrilere normal büyüme mediumu, deney grubu petrilere 75 ve 100 μM naringenin içeren medium ilave edilmiştir. Ayrıca pozitif kontrol (TTX, 2 μM) ve çözücü kontrol (KD75 ve KD100) grupları da oluşturulmuştur. Mediumlar her gün aynı saatte taze hazırlananlar ile değiştirilmiş ve bu işleme 2 gün devam edilmiştir. Süre sonunda petrilereki mediumlar çıkarılmış, 1X PBS ile yıkama yapılarak ölü hücrelerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra petrilere tripsin (%0.25) eklenmiş, 3dk inkübasyonun ardından hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerine toplanmış, 1500 dev/dk hızda 3 dk santrifüj yapılmış ve süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 1 ml nitrik asit (HNO_3 , 1M) ilave edilerek 70°C inkübatörde 90 dk bekletilmek suretiyle lizise uğratılmış ve hücre içindeki iyonların serbest hale geçmesi sağlanmıştır (Ohayon-Courtes ve ark., 2013; Stephenson ve ark., 2022). Hazırlanan örnekler içerisindeki iyon konsantrasyonları, Harran Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (HÜBTAM) hizmet alımı yapılarak ICP cihazında (PerkinElmer, ABD) ölçülmüştür.

3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Tez çalışması kapsamında bütün deneyler üç paralelli kurulmuş olup her deney üç kez tekrarlanmıştır. Elde edilen verilerden, aritmetik ortalamalar ile her ortalama değerin standart sapma ve standart hatası hesaplanmıştır. Tez içerisinde sonuçlar, ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. Deney ve kontrol grupları arasındaki farkların anlamlılığı; Excel (Office 2019) programı kullanılarak ONE WAY ANOVA varyans analizi ve student *t*-testi ile değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki farklar için anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu çalışmada, naringenin, PC-3 prostat kanseri hücrelerine, normoksi ve hipoksi koşullarında uygulanmış ve hücre proliferasyonunu etkilemeyen nontoksik bileşik konsantrasyonu tespit edilmiş; belirlenen konsantrasyonlardaki bileşiğin hücre hareketi üzerindeki etkisi fenotipik olarak incelenmiştir. Ardından, naringenin voltaj kapılı sodyum kanal aktivitesi üzerindeki etkisi hakkında fikir sahibi olmak için hücre içi sodyum iyonu konsantrasyonları ICP ile ölçülmüştür.

4.1. Bulgular

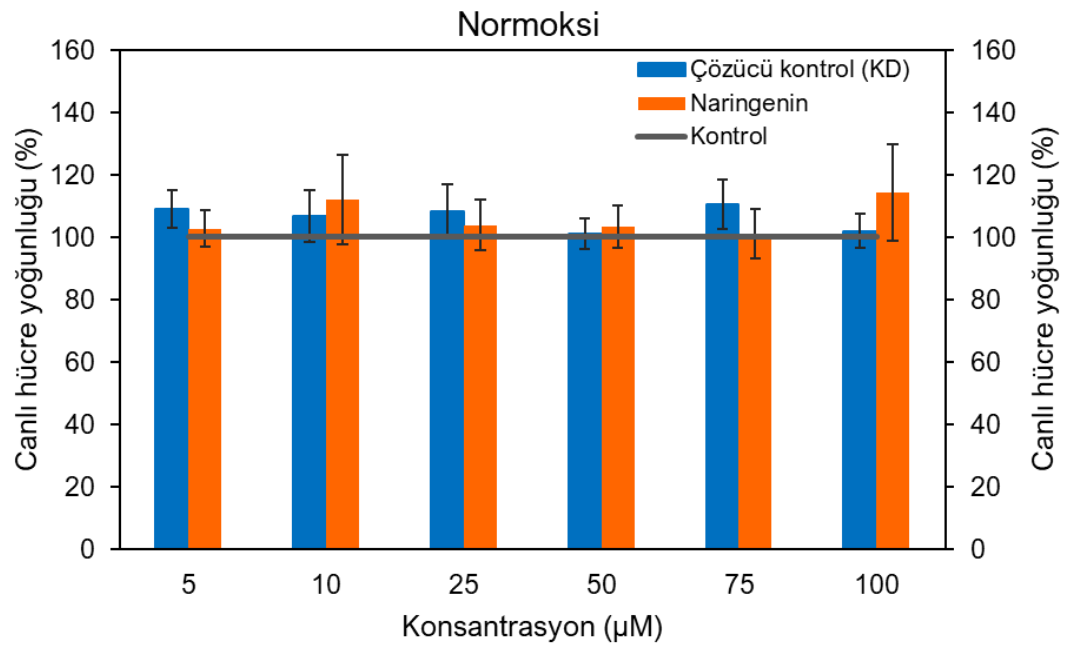
4.1.1. Hücre proliferasyonu üzerindeki etkiler

Naringenin (5, 10, 25, 50, 75, 100 µM), PC-3 hücre proliferasyonu üzerinde, normoksi ve hipoksi koşullarındaki etkisini tespit etmek için, Bölüm 3.2.3'te anlatılan şekilde Alamar Blue analizi yapılmıştır. Naringenin farklı konsantrasyonlarda 48 saat süreyle uygulandıktan sonra canlı hücre yoğunlukları (%) spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Normoksi koşullarında yapılan naringenin uygulaması sonucunda elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1.de verilmiştir. Bu verilerle çizilen grafik ise Şekil 4.1.de izlenmektedir. Buna göre naringenin, normoksik koşullarda, hücre proliferasyonu üzerinde istatistiksel bakımdan anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı ($p>0.05$); benzer şekilde, naringenin için çözücü olarak kullanılan DMSO'nun da hücre canlılığını etkilemediği anlaşılmıştır.

Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda naringenin PC-3 hücrelerine normoksik koşullarda uygulanması ile elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (\pm standart hata)

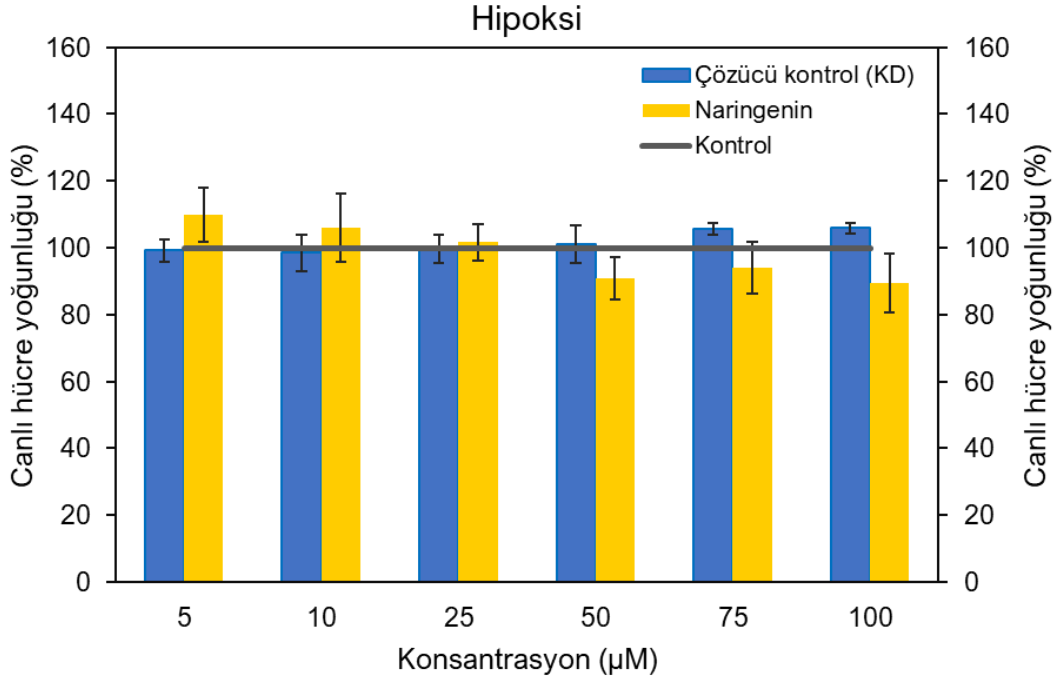
Konsantrasyon (μ M)	Canlı hücre yoğunluğu (%)		
	Kontrol	Çözücü kontrol (KD)	Naringenin (NAR)
0	100.0 \pm 6.77	-	-
5	-	109.0 \pm 6.17	102.7 \pm 5.88
10	-	106.7 \pm 8.25	112.2 \pm 14.4
25	-	108.4 \pm 8.52	103.9 \pm 8.23
50	-	101.1 \pm 4.93	103.3 \pm 6.68
75	-	110.5 \pm 7.79	101.1 \pm 8.01
100	-	102.0 \pm 5.44	114.2 \pm 15.51

Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda naringenin PC-3 hücrelerine normoksik koşullarda uygulanması ile elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (\pm standart hata)

Oksijen seviyesinin %2 olduğu hipoksik koşullarda, çözücü kontrol grubunda canlı hücre yoğunlukları (%) kontrol grubu ile benzer bulunmuştur (Çizelge 4.2., Şekil 4.2.). Düşük konsantrasyonlarda naringenin uygulanmasıyla hücre canlılığında bir değişiklik gözlemlenmemiştir. 50 μ M ve daha yüksek konsantrasyonlarda ise canlı hücre yoğunluğunun (%) azalma eğilimine girdiği ancak aradaki farkın istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı ($p > 0.05$) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda naringenin PC-3 hücrelerine hipoksik koşullarda uygulanması ile elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (\pm standart hata)

Konsantrasyon (μ M)	Canlı hücre yoğunluğu (%)		
	Kontrol	Çözücü kontrol (KD)	Naringenin (NAR)
0	100.0 \pm 2.36	-	-
5	-	99.2 \pm 3.40	109.8 \pm 8.10
10	-	98.5 \pm 5.48	105.9 \pm 10.2
25	-	99.7 \pm 4.14	101.8 \pm 5.49
50	-	100.9 \pm 5.62	90.9 \pm 6.38
75	-	105.6 \pm 1.72	94.0 \pm 7.74
100	-	105.9 \pm 1.60	89.6 \pm 8.85



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda naringenin PC-3 hücrelerine hipoksik koşullarda uygulanması ile elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (\pm standart hata)

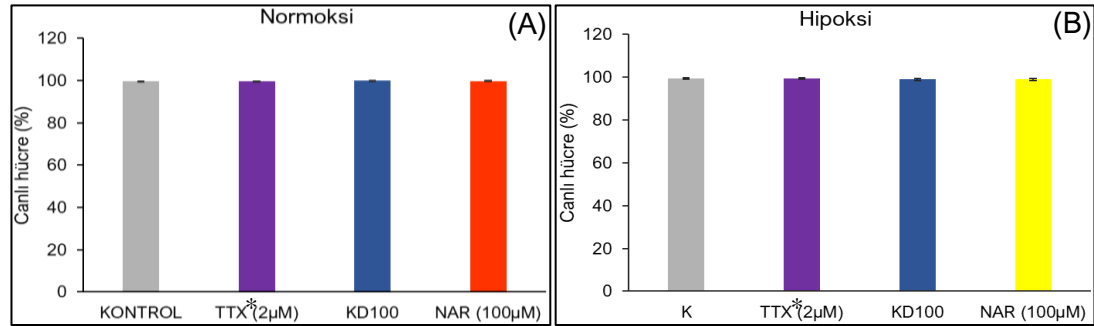
Çizelge ve Şekiller incelendiğinde naringenin, hem normal hem de düşük oksijen seviyelerinde PC-3 hücre proliferasyonunu etkilemeyerek canlı hücre yoğunluğunda anlamlı değişiklik oluşturmadığı görülmektedir.

4.1.2. Toksikite sonuçları

Naringenin hücre proliferasyonunu etkilemeyen en yüksek konsantrasyonunun (100 μ M) yüksek metastatik özellikteki PC-3 hücrelerine karşı toksik olup olmadığını belirlemek için Bölüm 3.2.4.'te anlatılan şekilde tripan mavisi kullanılarak boya dışlama analizi yapılmıştır. Analiz sonucu elde edilen veriler, Çizelge 4.3.'te gösterilmiş, grafik Şekil 4.3.'te verilmiştir. Tetrodotoksin'in 2 μ M konsantrasyonda toksik etki göstermediği laboratuvarımızda daha önce yapılmış çalışmalarla belirlenmiştir (Gözenoğlu Ücan, 2022).

Çizelge 4.3. PC-3 hücrelerine 100 μ M naringenin uygulaması sonucunda elde edilen canlı ve ölü hücre sayıları (%)

	Canlı hücre sayısı (%)	
	Normoksik koşul	Hipoksik koşul
KONTROL	99.6 \pm 0.13	99.5 \pm 0.29
Tetrodotoksin (2 μM) (Gözenoğlu Ücan, 2022)	99.7 \pm 0.16	99.3 \pm 0.28
Çözücü kontrol (KD100)	99.9 \pm 0.04	99.1 \pm 0.46
Naringenin (100 μM)	99.8 \pm 0.10	99.0 \pm 0.51



Şekil 4.3. Toksikite grafiği: (A) Normoksi, (B) Hipoksi koşulu.

*: TTX verisi laboratuvarımızda daha önce yapılmış olan Gözenoğlu Ücan'ın (2022) çalışmasından alınmıştır.

PC-3 hücrelerine 100 μ M naringenin uygulanması sonucunda hücre canlılık oranı normoksik koşulda %99.8, hipoksik koşulda ise %99.0 olarak bulunmuştur. Yapılan analizler sonucunda hem naringenin hem de çözücü olarak kullanılan dimetil sülfoksitin PC-3 hücreleri üzerinde toksik olmadığı ortaya çıkarılmıştır.

4.1.3. Hücre migrasyonu üzerindeki etki

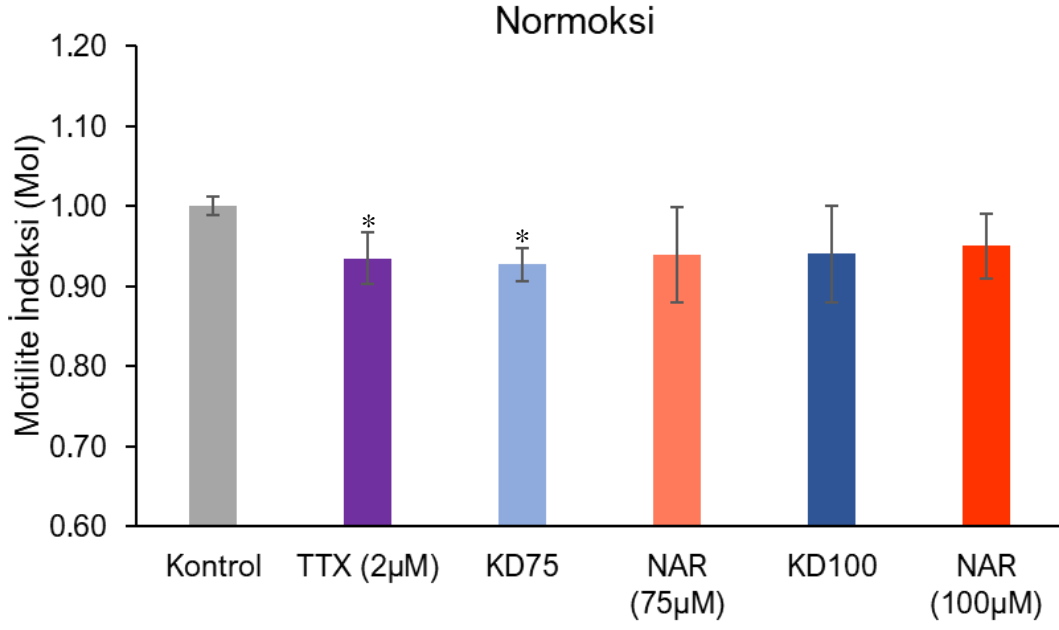
Naringenin PC-3 insan prostat kanser hücrelerinin lateral yöndeki hareketi üzerindeki etkisi normoksi ve hipoksi şartlarında araştırılmıştır. Bunun için hücre proliferasyonunu etkilemeyen ve nontoksik olan 75 ve 100 µM konsantrasyonlarında naringenin kullanılarak Bölüm 3.2.6.'da anlatılan şekilde yara kapanma analizi yapılmıştır. Deneylerden elde edilen veriler Çizelge 4.4.te sunulmuştur.

Çizelge 4.4. PC-3 hücrelerine normoksi ve hipoksi koşullarında naringenin uygulanması ile elde edilen motilite indeks değerleri (±standart hata)

Grup	Normoksik koşul		Hipoksik koşul	
	Motilite İndeksi (MoI)	Hareket mesafesindeki değişim (%)	Motilite İndeksi (MoI)	Hareket mesafesindeki değişim (%)
KONTROL	1.00 ± 0.01	-	1.00 ± 0.03	-
Tetrodotoksin (2 µM)	0.93 ± 0.03*	6.57 (↓)*	0.92 ± 0.03*	7.78 (↓)*
Çözücü kontrol (KD75)	0.93 ± 0.02*	7.32 (↓)*	1.08 ± 0.04	8.21 (↑)
Çözücü kontrol (KD100)	0.93 ± 0.03	6.00 (↓)	1.08 ± 0.05	7.77 (↑)
Naringenin (75 µM)	0.94 ± 0.06	6.11 (↓)	1.04 ± 0.05	3.74 (↑)
Naringenin (100 µM)	0.95 ± 0.05	5.00 (↓)	1.01 ± 0.04	0.86 (↑)

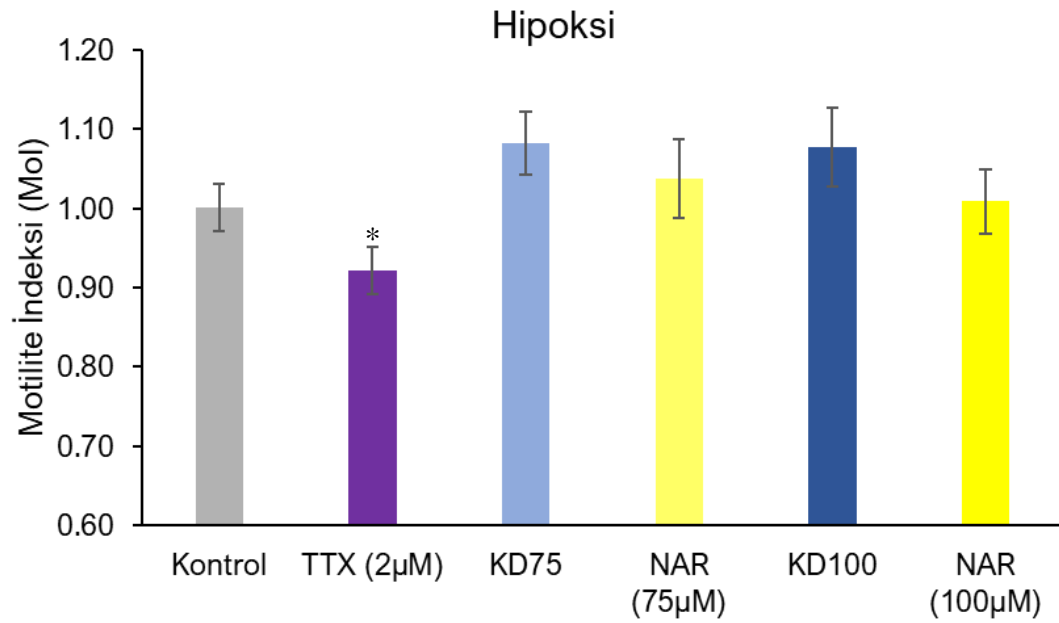
*: Kontrol grubuna göre istatistiksel bakımdan anlamlı fark (p<0.05).

Hücrelerin yanal yönde hareket mesafesini ifade eden motilite indeks değerleri hesaplanmış ve 2 µM TTX'in PC-3 hücrelerinde normoksik ve hipoksik koşullarda hücre hareketini anlamlı (p<0.05) şekilde azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.4. ve 4.5.). Çizelge 4.4. ve Şekil 4.4.te izlendiği üzere, normoksik koşullarda naringenin (75 ve 100 µM) uygulanmasıyla hücre hareketinin kontrole göre sırasıyla %6.11 ve %5.00 azaldığı; ancak bu değişimin istatistik bakımdan anlamlı olmadığı (p>0.05) tespit edilmiştir. İlginç şekilde, motilite indeksi, 75 µM naringenin için hazırlanan çözücü kontrol grubunda (KD75) kontrole göre %7.32 oranında ve istatistiksel bakımdan anlamlı (p<0.05) şekilde azalmıştır. KD100 grubunda ise hücrelerin hareket mesafesinin %6.00 oranında azaldığı ancak istatistiksel anlamın ortadan kalktığı (p>0.05) dikkat çekmiştir.



Şekil 4.4. PC-3 hücrelerine normoksi koşullarında 75µM ve 100 µM naringenin uygulanması ile elde edilen motilite indeks (MoI) değerleri (± standart hata)

*: Kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p < 0.05$).



Şekil 4.5. PC-3 hücrelerine hipoksi koşullarında 75µM ve 100 µM naringenin uygulanması ile elde edilen motilite indeks (MoI) değerleri (± standart hata)

*: Kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p < 0.05$).

Hipoksik koşullarda DMSO uygulamasının çözücü kontrol gruplarındaki hücrelerin hareketlerini teşvik ettiği, ancak motilite indeksindeki bu artışın (K: 1.00; KD75/KD100: 1.08) istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir (Çizelge 4.4. ve Şekil 4.5.). Benzer şekilde naringenin uygulaması da hücrelerin motilite indeksini kontrole göre hafifçe arttırmıştır (NAR75: 1.04; NAR100: 1.01). Veriler istatistiksel bakımdan değerlendirilmiş ve bu değişimin anlamlı olmadığı ($p>0.05$) görülmüştür.

4.1.4. Hücre içi sodyum iyon konsantrasyonları üzerindeki etki

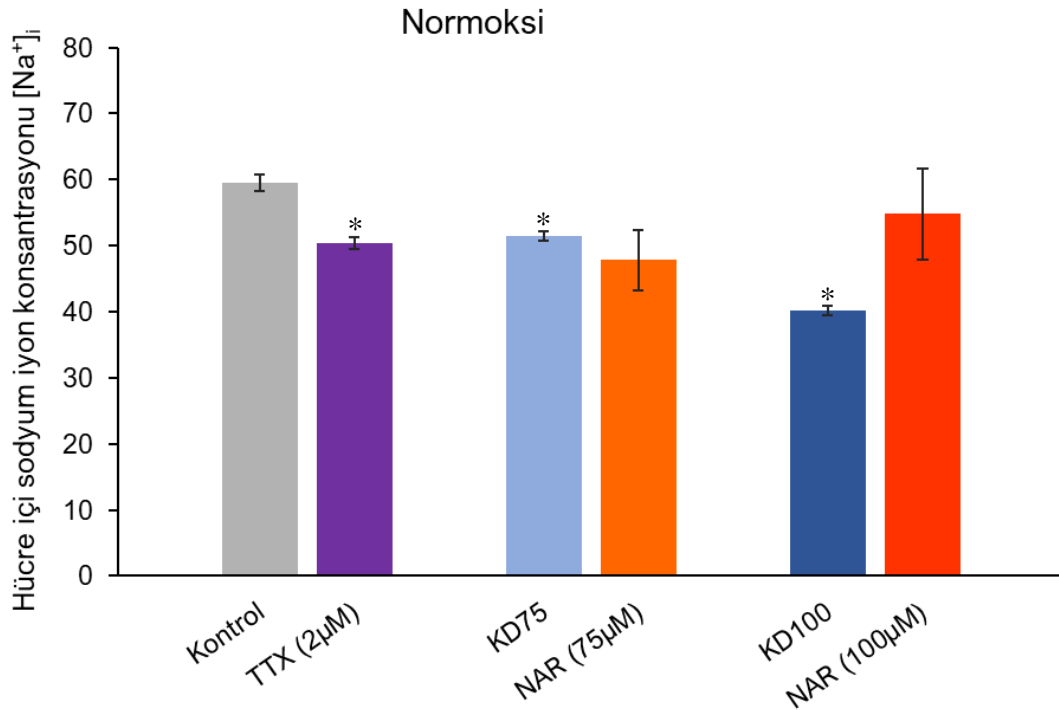
Naringenin PC-3 hücrelerinde aşırı eksprese edilen voltaj kapılı sodyum kanal aktivitesi üzerindeki etkisi hakkında fikir edinebilmek için bileşik (75 ve 100 μM), 48 saat süreyle uygulanmıştır. Süre bitiminde Bölüm 3.2.6.da anlatılan şekilde hazırlanan örneklerde hücre içi sodyum iyonu $[\text{Na}^+]_i$ konsantrasyonu ICP yöntemi ile ölçülmüştür. Normoksik koşullarda elde edilen verilere göre herhangi bir uygulamanın yapılmadığı kontrol grubunda 59.5 mM olan $[\text{Na}^+]_i$, TTX (2 μM) uygulanmasıyla istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) şekilde azalmış ve 50.4 mM olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.5., Şekil 4.6). Bu sonuç bize spesifik bir sodyum kanal blokleri olan TTX'in, PC-3 hücrelerinde kanalı bloklayarak hücre içine sodyum girişini engellediğini göstermektedir.

Naringenin 75 ve 100 μM uygulandığı gruplarda $[\text{Na}^+]_i$ konsantrasyonları sırasıyla 47.8 mM ve 54.8 mM bulunmuştur. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda kontrol grubu ile aradaki farkların anlamlı olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Ancak, naringenin için çözücü olarak kullanılan DMSO'nun uygulandığı gruplarda, hücre içi sodyum iyonu konsantrasyonunun kontrole göre anlamlı ($p<0.05$) şekilde azaldığı (KD75: 51.5 mM ve KD100: 40.2 mM) dikkati çekmiştir.

Çizelge 4.5. PC-3 hücrelerine normoksi ve hipoksi koşullarında naringenin uygulanması ile elde edilen hücre içi sodyum iyonu $[Na^+]_i$ konsantrasyonu (mM) değerleri (\pm standart hata)

	Hücre içi sodyum iyonu $[Na^+]_i$ konsantrasyonu (mM)	
	Normoksik koşul	Hipoksik koşul
Kontrol	59.5 \pm 1.26	47.7 \pm 1.87
Tetrodotoksin (2 μM)	50.4 \pm 0.92*	47.3 \pm 1.90
Çözücü kontrol (KD75)	51.5 \pm 0.67*	48.4 \pm 0.64
Çözücü kontrol (KD100)	40.2 \pm 0.69*	49.0 \pm 1.98
Naringenin (75 μM)	47.8 \pm 4.49	51.6 \pm 1.91
Naringenin (100 μM)	54.8 \pm 6.88	61.9 \pm 4.39*

*: Kontrol grubuna göre istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p < 0.05$).

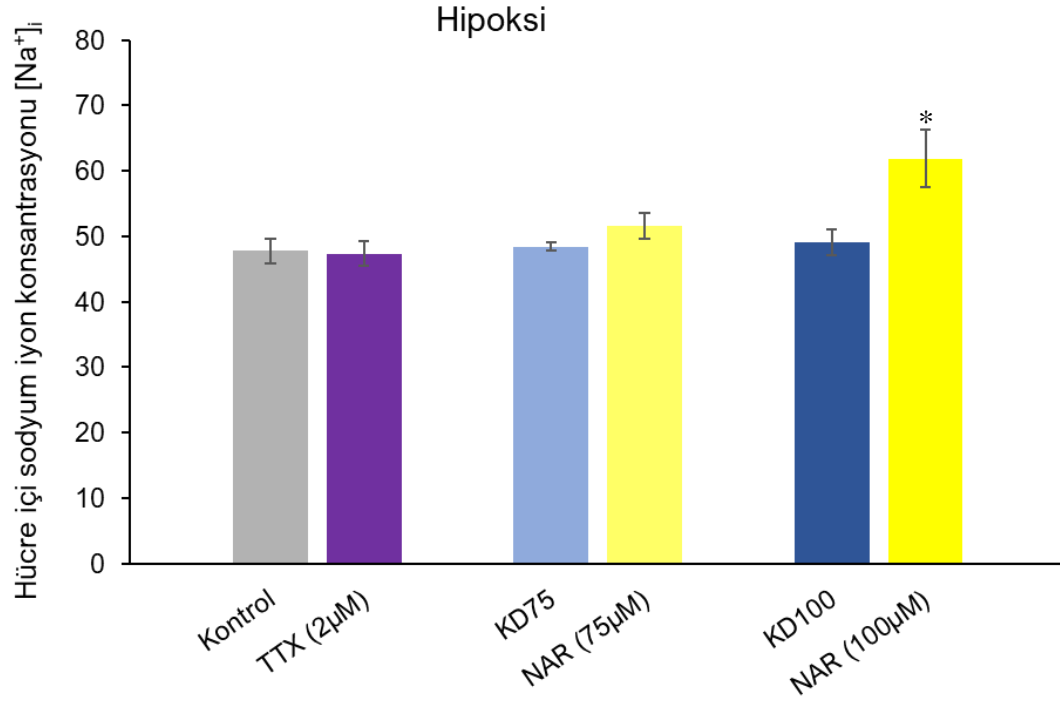


Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlardaki naringenin PC-3 hücrelerine normoksi koşulunda uygulanması sonucunda hücre içi sodyum iyonu $[Na^+]_i$ konsantrasyonu (mM) üzerinde meydana gelen etkiler (\pm standart hata)

*: Kontrol grubuna göre istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p < 0.05$).

Hipoksik koşulda kontrol grubunda hücre içi sodyum iyon konsantrasyonu 47.7 mM olarak ölçülmüş; bileşik uygulamasından sonra yapılan ölçümlerde pozitif kontrol (47.3 mM), çözücü kontrol (KD75: 48.4 mM ve KD100: 49.0 mM) ve 75 μ M naringenin (51.6 mM) uygulamalarının $[Na^+]_i$ konsantrasyonlarında anlamlı değişiklik oluşturmadığı ($p > 0.05$) belirlenmiştir. Naringenin konsantrasyonunun 100 μ M'a

çıkartılmasıyla $[Na^+]_i$ miktarının kontrole göre anlamlı ($p<0.05$) şekilde artarak 61.9 mM olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.5., Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlardaki naringenin PC-3 hücrelerine hipoksi koşulunda uygulanması sonucunda hücre içi sodyum iyonu $[Na^+]_i$ konsantrasyonu (mM) üzerinde meydana gelen etkiler (\pm standart hata)

*: Kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

4.2. Genel Değerlendirme ve Tartışma

Bu çalışmada, voltaj kapılı sodyum kanallarını aşırı eksprese eden ve buna bağlı olarak metastatik yeteneği yüksek olan insan prostat kanseri PC-3 hücrelerinin hareketi üzerinde, naringenin flavonoidinin etkileri, normoksik ve hipoksik koşullarda araştırılmıştır. Bunun için öncelikle bileşiğin hücre proliferasyonunu etkilemeyen ve hücrelere toksik olmayan konsantrasyonları belirlenmiştir. Ardından naringenin, bu konsantrasyonlarda hücrelere 48 saat uygulanmış ve motilite indeksleri hesaplanmış, hücre içi sodyum iyonu $[Na^+]_i$ konsantrasyonları ölçülmüştür.

Naringenin (5, 10, 25, 50, 75 ve 100 μM), her iki oksijen koşulunda PC-3 hücre proliferasyonunu anlamlı şekilde değiştirmedeği tespit edilmiştir. Ayrıca, bileşiğin en yüksek konsantrasyonda (100 μM) dahi hücrelere toksik etki yapmadığı belirlenmiştir. Bunun gibi, naringenin için çözücü olarak kullanılan DMSO (KD100; DMSO oranı %1) ile pozitif kontrol TTX (2 μM) hücrelere toksik değildir. Bu nedenlerle hücre hareketi ve hücre içi iyon konsantrasyonlarının belirlenmesi analizlerinde 75 ve 100 μM naringenin kullanılmıştır. Literatürde, normoksik koşulda uygulanan 75 μM naringenin, Dunning modeli sıçan prostat kanseri hücresi olan güçlü metastatik MAT-LyLu hücre proliferasyonunu baskıladığı bildirilmektedir (Gumushan Aktas ve Akgun, 2018). Lim ve ark. (2017), PC-3 ve LNCaP prostat kanseri hücrelerine naringenini 0–100 μM aralığında uyguladıklarını, PC-3 hücre canlılığının konsantrasyona bağlı olarak azalırken 20 ve 50 μM konsantrasyonlarda apoptotik hücre sayısının arttığını bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada VK2/E6E7 ve End1/E6E7 endometrium hücrelerine 0–100 μM aralığında uygulanan naringenin doza bağlı olarak proliferasyonu azalttığı; mitokondriyal proapoptotik proteinler Bax ve/veya Bak ekspresyonunu arttırarak apoptozu indüklediği; hücre ölümünü indüklemek için ROS ve ER stres düzenleyici genlerin üretimini önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir. Ancak araştırmacılar, aynı konsantrasyondaki naringenin endometriozisli hastalardan alınan ötopik endometriyum hücrelerinde proliferasyon ve apoptozu etkilemediğini, ER stresini düzenleyen proteinler olan IRE1a, GADD153 ve GRP78'in ekspresyonlarını azalttığını ve ROS seviyelerini etkilemediğini bulmuşlardır (Park ve ark., 2017).

Elde ettiğimiz bulgulara göre Tetrodotoksin (2 μ M), hem normoksi hem de hipoksida hücre hareketini inhibe ederek motilite indeksini azaltmıştır. Buna göre çalıştığımız hücreler deneyler sırasında VGSC ekspresyonu yapmış ve VGSC ilişkili metastatik yeteneklerini korumuştur. Bu sonuçla uyumlu olarak, normoksida, TTX uygulanan grupta hücre içi sodyum iyon konsantrasyonu da kontrole göre azalmıştır. Bu sonuç bize spesifik bir sodyum kanal blokeri olan TTX'in, PC-3 hücrelerinde kanalı bloklayarak hücre içine sodyum girişini engellediğini göstermektedir. Ancak hipoksida kontrol grubu ile aradaki farkın ortadan kalkması dikkat çekmiştir. Katı tümörlerin ortak bir özelliği olan hipoksi, anjiyogenezi aktive ederek invazivliği ve metastaz riskini artırmanın yanı sıra tümörün sağ kalımını arttırdığı, anti-tümör bağışıklığını baskıladığı ve terapötik yanıtı engellediği gösterilmiştir. Hipoksik koşullarda gen ekspresyonu değişir; onkogenler aktive, tümör baskılayıcı genler inaktive olur; genomik stabilite azalır ve klonal seçim gerçekleşir (Emami Nejad ve ark., 2021). Çalışmamızda, hipoksik koşulda artan/değişen gen ekspresyonları sonucunda aktif kanal miktarının artması (Rızaner, 2010) nedeniyle kullanılan TTX konsantrasyonunun yetersiz/etkisiz kalmış olabileceği düşünülmektedir. Bu durumun aydınlatılması için ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çözücü kontrol grubunda DMSO, normal oksijen seviyelerinde hücre hareketini baskılayarak motilite indeksini azaltmıştır. Hipoksi koşullarında ise migrasyon üzerinde anlamlı bir etki oluşturmadığı gözlemlenmiştir. DMSO, migrasyon analiz sonucu ile benzer şekilde, normoksik koşulda hücre içi sodyum iyon konsantrasyonunu azaltmış; hipoksida anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. Naringenin (75 ve 100 μ M), normoksik ve hipoksik koşullarda hücrelerin yanal yönde hareket ettikleri mesafeyi ifade eden motilite indeksleri üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. Naringenin uygulamasıyla hücre içi sodyum iyon konsantrasyonunda da, normoksida anlamlı değişiklik oluşmazken; hipoksida, $[Na^+]_i$ kontrole göre artış eğilimine girmiş ve bu artış 100 μ M naringenin konsantrasyonunda anlamlı bulunmuştur. DMSO'nun normoksida sergilediği baskılama etkisinin hipoksik koşulda ortadan kalkmasıyla naringenin hücre hareketini stimüle edici etkisinin anlam kazandığı düşünülmektedir.

Literatürde naringenin, prostat kanseri hücrelerinin hareketleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Gumushan Aktas ve Akgun (2018), Dunning modeli sıçan prostat kanseri MAT-LyLu hücrelerine naringenin uyguladıkları çalışmalarında, bileşiğin proliferasyonu etkilemeyen 5 ve 10 μM konsantrasyonlarda hücrelerin yanıl ve dikey yöndeki hareketlerini baskılayarak motilite indeksini ve invazyonu azalttığını göstermişlerdir. Normoksik koşulda gerçekleştirilen bu çalışmada elde edilen verileri moleküler yöntemlerle de desteklemişlerdir. Araştırmacılar, naringenin (5 ve 10 μM) MAT-LyLu hücrelerinde VGSC'leri kodlayan *SCN9A*'nın ekspresyonunu mRNA düzeyinde baskıladığını tespit etmişlerdir (Gumushan Aktas ve Akgun, 2018). Bulgularımız, sıçan prostat kanseri MAT-LyLu hücrelerinin aksine, insan prostat kanseri PC-3 hücre migrasyonunun, naringenin uygulamasından en yüksek konsantrasyonda (100 μM) dahi etkilenmediğini göstermiştir. MAT-LyLu ve PC-3 hücre orjinlerinin farklı olması bu durumu açıklayabilir.

Naringenini PC-3 ve DU145 prostat kanseri hücrelerine normoksik koşullarda uygulayan Lin ve ark. (2014), bileşiğin (10 – 50 μM) konsantrasyon artışıyla uyumlu şekilde hücre canlılığını azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca 50 μM naringenin matriks metalloproteinazlar MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunu aşağı yönde düzenleyerek invazyon ve metastazı baskılayabileceğini bildirmişlerdir (Lin ve ark., 2014). Lim ve ark (2017) ise normoksik koşullarda 50 μM naringenin PC-3 hücrelerinin invazyonunu %50 oranında baskıladığını belirtmişlerdir. Başka bir araştırmacı grubu naringenini 25, 50, 100, 200, ve 300 μM konsantrasyonlarda PC-3 hücrelerine uygulamış ve bileşiğin konsantrasyon artışıyla uyumlu şekilde hücre proliferasyonunu baskıladığını, aynı zamanda epitelden mezenkimale geçişte ve uPA aktivitesinin aşağı regülasyonunda yer alan proteinlerin ekspresyonunu tersine çevirerek PC-3 hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (Han ve ark., 2018).

Naringenin normoksik koşullardaki etkileri diğer kanser hücreleri üzerinde de araştırılmıştır. Gastrik kanser (Bao ve ark., 2016), mesane kanseri (Liao ve ark., 2014),

glioblastoma (Gautam ve Gabrani, 2022) hücrelerine uygulanan naringenin proliferasyon ve migrasyonu baskıladığı bildirilmiştir.

Araştırmalarda migrasyon ve invazyon analizlerinde çalışılan naringenin konsantrasyonlarının proliferasyonu da baskılaması dikkat çekicidir (Liao ve ark., 2014; Lin ve ark., 2014; Bao ve ark., 2016; Lim ve ark., 2017; Han ve ark., 2018). Ayrıca prostat kanseri hücrelerinin kullanıldığı bazı makalelerde (Lim ve ark., 2017; Han ve ark., 2018) naringenini çözmek için kullanılan çözücü ve bu çözücünün oranı ile ilgili bilgiye rastlanmamıştır.

Naringenin hidrofobik yapıda bir flavonoid bileşik olduğundan suda çözünürlüğü oldukça zayıftır (4.5 µg/mL) (Premathilaka ve ark., 2022). Üretici firmaların önerisi dikkate alındığında, çeşitli organik çözücülerde (etanol, DMSO, dimetil formamid, vb.) bu oran 0.5 – 50 mg/mL'ye çıkabilmektedir (Sigma Aldrich, 2023; Cayman, 2023). Laboratuvarımızda yaptığımız denemelerde DMSO içerisinde 10mM konsantrasyonlu ana stok çözeltisi oluşturulduğunda medium içerisinde yapılan dilüsyonlarda presipitasyon problemi ile karşılaşılmalıdır. Bu durumda deneylerde kullandığımız maksimum naringenin konsantrasyonunda (100µM) DMSO'nun kültür ortamındaki oranı %1 olmaktadır. Dört farklı kanser hücre hattının kullanıldığı bir çalışmada DMSO için güvenli aralık %0.015 ila %0.6 olarak tespit edilmiştir (Nguyen ve ark., 2020). Başka bir çalışmada %1 DMSO'nun kültürdeki astrosit hücrelerine karşı toksik etki oluşturmadığı ancak hücre canlılık oranını azaltabileceği bildirilmiştir (Yuan ve ark., 2014). Çeşitli kaynaklarda, hücre kültürü çalışmalarında kullanılabilir DMSO oranı için \leq %0.5 güvenli, %1 nontoksik olarak bildirilmiştir (GLP BIO, 2022; Life Tein, 2023). Çalıştığımız hücrelerde %1 DMSO hücre proliferasyonunu etkilememiş ve toksik etki oluşturmamıştır. Naringenin çözünürlüğü ve DMSO'nun hücre kültüründe kullanılabilir oranı (%1) nedeniyle deneylerimizde maksimum 100 µM naringenin ile çalışılmıştır. Elde ettiğimiz bulgulara göre naringenin normoksik koşulda hücre hareketini etkilememişken çözücü kontrol grubunda (KD75; DMSO oranı %0.75) motilite indeksi kontrole göre azalmıştır. Çözücü faktörü, çalışmamız için sınırlayıcı olmuştur ve literatür ile sonuçlarımız arasındaki farkı açıklayabilir.

Literatürde kök hücrelere veya normal karakterli hücrelere naringenin uygulaması sonucunda elde edilen cevapların kanser hücrelerinden alınan cevaplardan farklı olduğu dikkati çekmektedir. Abbas ve ark. (2019), 3T3 fibroblast hücrelerine tek başına ve β -sitosterol ile kombine şekilde uygulanan naringenin (50 ve 100 μ M) antioksidan savunma mekanizmasını artırmadan ve IL-1 β 'yi azaltmadan yara kapanmasını teşvik ettiğini göstermişlerdir. Başka bir araştırmada naringenin içeren aljinat hidrojellerin *in vitro*da hücre canlılığını etkilemediği; *in vivo*da ise sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan yaranın iyileşmesini kontrole göre anlamlı şekilde hızlandırdığı tespit edilmiştir (Salehi ve ark., 2021). Kim ve ark. (2023), naringenin insan dental pulp kök hücrelerinin osteojenik / odontojenik farklılaşmalarını ve migrasyonlarını hızlandırdığını göstermişlerdir.

Elde ettiğimiz bulgular ve literatür bilgileri naringenin aynı organ olsa bile farklı orjinlerden gelen hücrelerde; oksijen seviyesi gibi farklı koşullarda; *in vitro*, *in vivo* veya *ex vivo*da değişen veya zıt sonuçlara neden olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle farklı hücrelerle ve hipoksik koşullarda daha fazla çalışma yapılmalı, bulgular *in vivo* deneylerle ve moleküler yöntemlerle teyit edilmelidir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, narenciye ve domateste bulunan bir flavonoid bileşik olan naringenin, güçlü metastatik özellikteki insan prostat kanseri PC-3 hücrelerine normoksi ve hipoksi koşullarında uygulanması sonucunda, hücrelerin voltaj kapılı sodyum kanalları ile ilişkili hareketinin nasıl etkilendiği incelenmiştir. Deneylelerden elde edilen veriler değerlendirilmiş ve aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

- Çalıştığımız hücreler voltaj kapılı sodyum kanallarını deneyler sırasında da eksprese etmişler dolayısıyla metastatik karakterlerini korumuşlardır.
- Naringenin, çalışılan konsantrasyonlarda, PC-3 hücre proliferasyonunu her iki koşulda da etkilememiştir.
- 100 μM naringenin normoksik ve hipoksik koşullarda bu hücrelere toksik değildir.
- Çözücü olarak kullanılan DMSO, motilite indeksini ve hücre içi sodyum iyon konsantrasyonunu normoksik koşulda baskımlarken, hipoksik koşulda etkilememiştir.
- Naringenin (75 ve 100 μM), normoksik ve hipoksik koşulda PC-3 hücrelerinin lateral yöndeki hareketi üzerinde etki oluşturmamıştır.
- Hücre içi sodyum iyon konsantrasyonu 100 μM naringenin uygulamasıyla kontrole göre artmıştır.

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde naringenin insan prostat kanseri PC-3 hücrelerinin hareketini normokside etkilemezken hipoksik koşulda arttırabileceği ortaya çıkarılmıştır. Bu sonucun mekanizmasının aydınlatılması için moleküler çalışmalar yapılmalıdır. Ayrıca naringenin özellikle kanser hastaları tarafından kullanımı konusunda dikkatli olunması gerektiğini vurguluyoruz.

KAYNAKLAR

- ABBAS, M. M., AL-RAWI, N., ABBAS, M. A. and AL-KHATEEB, I. 2019. Naringenin potentiated β -sitosterol healing effect on the scratch wound assay. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 14(6), 566-573. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.272565>
- ABRAMCZYK, H., SURMACK, J., BROŹEK-PŁUSKA, B., MORAWIEC, Z. And TAZBIR, M. 2009. The hallmarks of breast cancer by Raman spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 924: p. 175-182
- AHAMAD, M.S., SIDDIQUI, S., JAFRI, A., AHMAD, S., AFZAL, M. and ARSHAD, M. 2014. Induction of apoptosis and antiproliferative activity of naringenin in human epidermoid carcinoma cell through ROS generation and cell cycle arrest, *PLoS One* 9 (10), e110003.
- AHMED, O.M., MAHMOUD, A.M., ABDEL-MONEIM, A. and ASHOUR, M.B. 2012. Antidiabetic effects of hesperidin and naringin in type 2 diabetic rats, *Diabetol. Croat.* 41 (2), 53-67
- ALOMONE LABS., 2023. <https://www.alomone.com/p/tetrodotoxin-citrate/T-550>. Erişim Tarihi: 10.03.2023.
- AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023. Prostate Cancer Risk Factors. <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html> Erişim Tarihi: 03.04.2023.
- ARAFAH, A., REHMAN, M.U., MIR, T.M., WALI, A.F., ALI, R., QAMAR, W., KHAN, R., AHMAD, A., AGA, S.S. and ALQAHTANI, S. 2020. Multi-therapeutic potential of naringenin (4', 5, 7-Trihydroxyflavonone): experimental evidence and mechanisms, *Plants* 9(12), 1784.
- AVNİ, R., COHEN B. and NEEMAN M., 2011. Hypoxia stres and cancer Imaging the axis of evilin tumor metastasis. *NMRBiomed*, 24:569-582.
- BAHAR, E. and YOON, H., 2021. Modeling and Predicting the Cell Migration Properties from Scratch Wound Healing Assay on Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer Cell Lines Using Artificial Neural Network. *Healthcare*. 9(7): 911-924.
- BAO, L., LIU, F., GUO, H-B. LI, Y. TAN, B-B., ZHANG, W-X. and PENG, Y-H. 2016. Naringenin inhibits proliferation, migration, and invasion as well as induces apoptosis of gastric cancer SGC7901 cell line by downregulation of AKT pathway. *Tumor Biol.* 37, 11365–11374. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5013-2>
- BENNETT, E. S., SMITH, B. A. and HARPER, J. M. 2004. Voltage-gated Na⁺ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *European Journal of Physiology*, 447, 908-914
- BERRA, E., BENIZRI, E., GINOUVES, A., VOLMAT, V., ROUX, D. and POUYSSEGUR, J., 2003. HIF prolyhydroxylase 2 is the key oxygen sensor settin glow steady state levels of HIF-1 α in normoxia. *Embo J*, 22:4082-4090.
- BERTRAM, J. S., 2000. The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine*. 21(6):167-223.
- BHAVSAR, A. and VERMA, S. 2014. Anatomic Imaging of the Prostate. *BioMed Research International*, Article ID 728539, 9 pages. <https://doi.org/10.1155/2014/728539>

- BHIA, M., MOTALLEBI, M., ABADI, B., ZAREPOUR A., PEREIRA-SILVA, M., SAREMNEJAD, F., SANTOS, A.C., ZARRABI, A., MELERO, A. and JAFARI, S.M. 2021. Naringenin Nano-delivery systems and their therapeutic applications, *Pharmaceutics* 13 (2), 291.
- BHOWMICK, N.A., NEILSON, E.G. and MOSES, H.L., 2004. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 18(432): 332-337.
- BLASCO, M.A. 2005. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 6, 611–622.
- BRACKENBURY, W. J., CHIONI, A. M., DISS, J. K. J. and DJAMGOZ, M. B. 2007. The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 101, 149–160.
- BRACKENBURY, W. J., 2012. Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. *Channels (Austin)*, 6(5): 352-361.
- BRACKENBURY, W. J., 2016. Chapter 6: Ion Channels in Cancer. In: *Ion Channels in Health and Disease*. Editor: Pitt, G.S. p: 131-164, Elsevier Inc., ISBN: 978-0-12-802002-9.
- BRATT, O. 2002. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol*, 168(3), 906-913.
- CAYMAN, Naringenin product information. Erişim tarihi: 09/03/2023. <https://cdn.caymanchem.com/cdn/insert/14173.pdf>
- CHAN, J. M., GANN, P. H. and GIOVANNUCCI, E. L. 2005. Role of diet in prostate cancer development and progression. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(32), 8152–8160. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.1492>
- CHENG, N., CHYTIK, A., SHYR, Y., JOLY, A. and MOSES, H.L., 2008. Transforming Growth Factor- β Signaling-Deficient Fibroblasts Enhance Hepatocyte Growth Factor Signaling in Mammary Carcinoma Cells to Promote Scattering and Invasion. *Molecular Cancer Research*, 6(10): 1521- 1533. CHU, L.L., PANDEY,
- CHOI, E.J., BAE, S.M. and AHN, W.S. 2008. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. *Arch Pharm Res.* 31(10): 1281- 1285.
- COLOTTA, F., ALLAVENA, P., SICA, A., GARLANDA, C. and MANTOVANI, A. 2009. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7): p. 1073-1081
- DEN HARTOGH, D.J. and TSIANI, E. 2019. Antidiabetic Properties of Naringenin: A Citrus Fruit Polyphenol. *Biomolecules*, 12;9(3):99. doi: 10.3390/biom9030099.
- DISS, J.K., FRASER, S.P. and DJAMGOZ, M.B. 2004. Voltage-gated Na⁺ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects, *European biophysics journal: EBJ*, 33, 180-193.
- EKAMBARAM, G., RAJENDRAN, P., MAGESH, V. and SAKTHISEKARAN, D. 2008. Naringenin reduces tumor size and weight lost in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Nutrition Research*, 28(2), 106-112.
- EMAMI NEJAD, A., NAJAFGHOLIAN, S., ROSTAMI, A. SISTANI, A., SHOJAEIFAR, S., ESPARVARINHA, M., NEDAEINIA, R., JAVANMARD,

- S.H., TAHERIAN, M., AHMADLOU, M., SALEHI, R., SADEGHI, B., and MANIAN, M. 2021. The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell Int* 21, 62. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01719-5>
- ENGELHARDT, M. and MARTENS, U.M. 1998. The implication of telomerase activity and telomere stability for replicative aging and cellular immortality (Review). *Oncology Reports*, 5(5): p. 1043-1052.
- FAVALORO, B., ALLOCATI, N., GRAZIANO, V., DI ILIO, C. and DE LAURENZI, V. 2012. Role of apoptosis in disease. *Aging*, 4(5), 330–349. <https://doi.org/10.18632/aging.100459>.
- GAO, K., HENNING, S.M., T, NIU, Y., YOUSSEFIAN, A.A., SEERAM, N.P., XU, A. and HEBER, D., 2006. The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(2): 89-95.
- GAUTAM, M. and GABRANI, R. 2022. Combinatorial Effect of Temozolomide and Naringenin in Human Glioblastoma Multiforme Cell Lines, *Nutrition and Cancer*, 74:3, 1071-1078, DOI: 10.1080/01635581.2021.1952438
- GLPBIO, 2022. Misunderstanding of "universal solvent" DMSO, have you been caught? [Ziyaret tarihi: 30.03.2023] <https://www.glpbio.com/blog/post/dmsu-use-toxicity.html>
- GONZALEZ-PEREZ, A., JENE-SANZ, A., TAMBORERO, D. and LOPEZ-BIGAS, N. 2014. The role of new cancer hallmarks in tumorigenesis. *European Journal of Cancer*, 50: p. S110-
- GÖZENOĞLU ÜCAN, Ş. 2022. Oleuropeinin voltaj kapılı sodyum kanalı aracılı kanser hücre hareketi üzerindeki etkisinin hipoksik koşullarda araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 67s.
- GRIMES, J. A., FRASER, S. P., STEPHENS, G. J., DOWNING, J. E. G., LANIADO, M. E., FOSTER, C. S., ABEL, P. D. and DJAMGOZ, M. B. A. 1995. Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Letters*, 369, 290-294.
- GU, J., KAGAWA, S., TAKAKURA, M., KYO, S., INOUE, M., ROTH, J.A., and FANG, B. 2000. Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers. *Cancer Research*, 60(19): p. 5359-5364.
- GUMUSHAN AKTAS, H. and AKGUN, T., 2018. Naringenin inhibits prostate cancer metastasis by blocking voltage-gated sodium channels. *Biomed Pharmacother*, 106: 770-775.
- HAMMARSTRÖM, A.K. and GAGE, P.W. 2002. Hypoxia and persistent sodium current. *EurBiophys J* 31, 323-330.
- HAN, K-Y., CHEN, P-N., HONG, M-C., HSEU, Y-C. CHEN, K-M., HSU, L-S. and CHEN, W-J. 2018. Naringenin Attenuated Prostate Cancer Invasion via Reversal of Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Inhibited uPA Activity. *Anticancer Research*, 38 (12) 6753-6758, DOI: 10.21873/anticancer.13045
- HANAHAN, D. and WEINBERG, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5):646-674.

- HARBOUR, J.W. and ONKEN, M.D. 2007. Chapter 5 - Cancer genetics. In: Clinical Ophthalmic Oncology, Editor(s): Arun D Singh, Bertil E. Damato, Jacob Pe'er, A. Linn Murphree, Julian Perry. W.B. Saunders, Pages 31-33, ISBN 9781416031673, <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3167-3.50010-3>
- HARMON, A. W. and PATEL, Y. M. 2004. "Naringenin inhibits glucose uptake in MCF-7 breast cancer cells: a mechanism for impaired cellular proliferation", *Breast Cancer Research and Treatment*, 85, 103–110.
- HEISE, M. and HAUS, O. 2014. Dziedziczny rak gruczołu krokowego [Hereditary prostate cancer]. *Postepy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*, 68, 653–665. <https://doi.org/10.5604/17322693.1104682>
- HERNANDEZ, C.M. and RICHARDS, J.R. 2023. Physiology, Sodium Channels. [Updated 2022 Apr 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545257/>
- HIRAGA, T. 2018. Hypoxic Microenvironment and Metastatic Bone Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3523. <https://doi.org/10.3390/ijms19113523>
- HSIAO, Y.-C., KUO, W.-H., CHEN, P.-N., CHANG, H.-R., LIN, T.-H., YANG, W.-E., HSIEH, Y.-S., and CHU, S.-C. 2007. Flavanone and 2'-OH flavanone inhibit metastasis of lung cancer cells via down-regulation of proteinases activities and MAPK pathway. *Chem. Biol. Interact.*, 167, 193. doi:10.1016/j.cbi.2007.02.012
- JAAKKOLA P., MOLE DR., TIAN YM., WILSON MI., GIELBERT J., GASKELL SJ., VON KRIEGSHEIM A., HEBESTREIT HF., MUKHERJI M., SCHOFIELD CJ., MAXWELL PH., PUGH CW. and RATCLIFFE PJ. 2001. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation". *Science*, 292(5516): 468-72.
- KEITH, B., SIMON, M.C. 2007. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*, 129(3): 465-472.
- KIM, Y., PARK, H., KIM, M., KIM, Y., KIM, H. J., BAE, S., NOR, J. E. and BAE, M. 2023. Naringenin stimulates osteogenic/odontogenic differentiation and migration of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Sciences*, 18(2), 577-585. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2022.08.029>
- KOH, M.Y. and POWIS, G. 2012. Passing the button the HIF switch. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(9): 364-72.
- KRUGER, L.C. and ISOM, L.L., 2016. Voltage-Gated Na⁺ Channels: Not Just for Conduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 1;8(6).
- LANE, A.L. and KUBANEK, J. 2008. Secondary Metabolite Defenses Against Pathogens and Biofoulers. *Algal Chemical Ecology*. Edited by: Amsler CD. Berlin: Springer-Verlag Press, 229-243.
- LANIADO, M. E., LALANI, E. N., FRASER, S. P., GRIMES, J. A., BHANGAL, G., DJAMGOZ, M. B. A. and ABEL, P. D. 1997. Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. *American Journal of Pathology*, 150(4), 1213-1221.
- LASTRAIOLI, M., 2019. Potassium and Sodium Channels and the Warburg Effect: Biophysical Regulation of Cancer Metabolism. *Bioelectricity* 1,3.

- LENTINI, A., FORNI, C., PROVENZANO, B. and BENINATI, S. 2007. Enhancement of transglutaminase activity and polyamine depletion in B16-F10 melanoma cells by flavonoids naringenin and hesperitin correlate to reduction of the in vivo metastatic potential. *Amino Acids*, 32, 95–100.
- LI, W.L., ZHENG, H.C., BUKURU, J. and DE KIMPE, N. 2004. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, 92:1–21.
- LIAO, A.H., KUO, C., HUANG, Y., YEH, C., HSEU, Y., LIU, J. and HSU, L. 2014. Naringenin inhibits migration of bladder cancer cells through downregulation of AKT and MMP-2. *Molecular Medicine Reports*, 10, 1531-1536. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2375>
- LIFE TEIN, 2023. DMSO usage in cell culture. [Ziyaret tarihi: 30.03.2023]. <https://www.lifetein.com/chat/932729-DMSO-usage-in-cell-culture#:~:text=Rule%20of%20thumb%3A,but%200.5%25%20DMSO%20is%20recommended.>
- LIM, W., PARK, S., BAZER, F.W. and SONG, G. 2017. Naringenin-induced apoptotic cell death in prostate cancer cells is mediated via the PI3K/AKT and MAPK signaling pathways, *J. Cell. Biochem.* 118 (5), 1118–113
- LIN, E.J., ZHANG, X., WANG, D.Y., HONG, S.Z. and LI, L.Y., 2014. Naringenin modulates the metastasis of human prostate cancer cells by down regulating the matrix metalloproteinases -2/-9 via ROS/ERK1/2 pathways. *Bangladesh J Pharmacol.*, 9: 419-427.
- MANTEGAZZA, M. and CATTERALL W.A. 2012. Voltage-Gated Na⁺ Channels: Structure, Function, and Pathophysiology. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, et al., editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98195/>
- MULVIHILL, E. E., ASSINI, J. M., SUTHERLAND, B. G., DIMATTIA, A. S., KHAMI, M., KOPPEL, J. B., SAWYEZ, C. G., WHITMAN, S. C. and HUFF, M. W. 2010. Naringenin decreases progression of atherosclerosis by improving dyslipidemia in high-fat-fed low-density lipoprotein receptor-null mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(4), 742–748. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.201095>
- NEGRINI, S., GORGOULIS, V.G. and HALAZONETIS, T.D. 2010. Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 220–228.
- NGUYEN, S., NGUYEN, H. and TRUONG, K. 2020. Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomedical Research and Therapy*, 7(7), 3855-3859. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v7i7.614>
- NODA, D., ITOH, S., WATANABE, Y. INAMITSU, M., DENNLER, S., ITOH, F., KOIKE, S., DANIELPOUR, D., TEN DIJKE, P., and KATO, M. 2006. ELAC2, a putative prostate cancer susceptibility gene product, potentiates TGF- β /Smad-induced growth arrest of prostate cells. *Oncogene*, 25: 5591–5600. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209571>
- OHAYON-COURTÈS, C., PASSAGNE, I., DE PORTAL, C., POUVREAU, C., CAMBAR, J. and L'AZOU, B., 2007. ICP/OES Application for Assessing Cadmium Uptake (or Toxicity) in Glomerular Cells: Influence of Extracellular

- Calcium. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 70:9, 750-759.
- OR, N., GAJSKI, G., GARAJ-VRHOVAC, V., DOMAGOJ, Đ., ZVJEZDANA, Š. and SIROVINA, D. 2011. DNA protective effects of quercetin or naringenin in alloxan-induced diabetic mice, *Eur.J. Pharmacol.*656, 110-118
- PARK, S., LIM, W., BAZER, F. W. and SONG, G. 2017. Naringenin induces mitochondria-mediated apoptosis and endoplasmic reticulum stress by regulating MAPK and AKT signal transduction pathways in endometriosis cells. *Molecular Human Reproduction*, 23(12), 842-854. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax057>
- PATEL, A. R. and KLEIN, E. A. 2009. Risk factors for prostate cancer. *Natural Clinical Practice Urology*, 6 (2), 87-95.
- PLATZ, E. A., LEITZMANN, M. F., MICHAUD, D. S., WILLETT, W. C. and GIOVANNUCCI, E. (2003). Interrelation of energy intake, body size, and physical activity with prostate cancer in a large prospective cohort study. *Cancer Research*, 63(23), 8542–8548.
- PREMATHILAKA, R., RASHIDINEJAD, A., GOLDING, M. and SINGH, J., 2022. Oral delivery of hydrophobic flavonoids and their incorporation into functional foods: Opportunities and challenges. *Food Hydrocolloids*, 128, 107567. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107567>.
- PUBCHEM [Internet]. 2004. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 439246, Naringenin; [cited 2023 Mar. 9]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Naringenin>
- RAMESH, E. and ALSHATWI, A.A. 2013. Naringin Induces Death Receptor and Mitochondria-Mediated Apoptosis in Human Cervical Cancer (SiHa) Cells. *Food Chem. Toxicol.* 51, 97–105. doi:10.1016/j.fct.2012.07.033
- RANKIN, E.B., NAM, J-M. and GIACCIA, A.J. 2016. Hypoxia: Signaling the metastatic cascade. *Trends in Cancer*. 2(6): 295-304.
- RAWLA, P. 2019. Epidemiology of Prostate Cancer. *World Journal of Oncology*, 10(2), 63-89. <https://doi.org/10.14740/wjon1191>
- REAL, H.J.V., ALFAIA, A.J., CALADO, A.R.T. and RIBEIRO, M.H.L. 2007. High pressure-temperature effects on enzymatic activity: naringin bioconversion. *Food Chem.* 102, 565–570. doi:10.1016/j.foodchem.2006.05.033
- REDDY, L., ODHAV, B. and BHOOLA, K.D., 2003. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology&Therapeutics*, 99(1): 1-13.
- RISBRIDGER, G. P. 2018. Prostate Disease Overview. *Encyclopedia of Reproduction* (Second Edition), 334-340. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64373-8>
- RIZANER, N. 2010. Studies of Ionic Mechanisms in Model Cell Lines of Prostate Cancer. PhD thesis, Imperial College London Division of Cell and Molecular Biology.
- SALEHI, M., EHTERAMI, A., FARZAMFAR, S., VAEZ, A., and EBRAHIMI-BAROUGH, S. 2021. Accelerating healing of excisional wound with alginate hydrogel containing naringenin in rat model. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 11, 142–153. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00731-6>
- SEMENZA, G.L., 2000. HIF-1 mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiological*, 88:1474-80

- SHAY, J.W. and WRIGHT, W.E. 2000. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 72–76.
- SIGMA-ALDRICH, 2023. Naringenin Specification Sheet. Erişim tarihi: 09/03/2023 <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/specification-sheet/ALDRICH/N5893>
- SODERLUND, D.M., 2005. Sodium Channels In: *Comprehensive Molecular Insect Science*, Editor(s): Gilbert, L.I., Pages 1-24, Elsevier, ISBN 9780444519245. <https://doi.org/10.1016/B0-44-451924-6/00068-5>.
- STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M., BORTHAKUR, G., BURNS, J. L. and BOWEN, P. E. 2008. Correlations of dietary patterns with prostate health. *Molecular nutrition & food research*, 52(1), 114–130. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600296>
- STEPHENSON, D., NEMKOV, T., QADRI, S.M., SHEFFIELD, W.P. and D'ALESSANDRO, A., 2022. Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry–Novel Insights From an Old Technology Into Stressed Red Blood Cell Physiology. *Front. Physiol.* 13:828087. doi: 10.3389/fphys.2022.828087
- SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. and BRAY, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- THERMOFISHER SCIENTIFIC, https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cell-analysis/fluorescence-microplate-assays/microplate-assays-cell-viability/alamarblue-assay-cell-viability.html?gclid=CjwKCAiAheacBhB8EiwAIItVO26j_ix1iU-YZnhv-sfOHucI-k-aS25nrxOAPm-6nr9YMwf3shU-KKR0CjaIQAvD_BwE&ef_id=CjwKCAiAheacBhB8EiwAIItVO26j_ix1iU-YZnhv-sfOHucI-k-aS25nrxOAPm-6nr9YMwf3shU-KKR0CjaIQAvD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!585719784889!p!!g!!alamar%20blue!2031782398!70575879983&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_bt_pur_con Erişim Tarihi: 03.03.2022.
- TSAI, S.J. HUANG, C.S. MONG, M.C. KAM, W.Y. HUANG, H.Y. and YIN, M.C. 2012. Anti-inflammatory and antifibrotic effects of naringenin in diabetic mice, *J. Agric. Food Chem.* 60 (1), 514–521.
- VAUPEL, P. and MAYER, A. 2007. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev*, 26, 225–239.
- VENKATESWARA RAO, P., KIRAN, S. ROHINI, P. and BHAGYASREE, P. 2017. Flavonoid: a review on naringenin, *J. Pharmacogn. Phytochem.* 6, 2778–2783
- WANG, D.M., YANG, Y.J., ZHANG, L., ZHANG, X., GUAN, F.F. and ZHANG, L.F. 2013. Naringin enhances CaMKII activity and improves long-term memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci.* 14:5576–5586.
- WATTS, E.R. and WALMSLEY, S.R. 2019. Inflammation and Hypoxia: HIF and PHD Isoform Selectivity. *Trends Mol Med.*, 25(1):33-46.
- WEI, M., YANG, Z., LI, P., ZHANG, Y. and SSE, W.C. 2007. Anti-osteoporosis activity of naringin in the retinoic acid-induced osteoporosis model. *The American Journal of Chinese Medicine*, 35: 663–667.

- YI, L.T., LI, C.F., ZHAN, X., CUI, C.C., XIAO, F., ZHOU, L.P. and XIE, Y., 2010. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the flavonoid naringenin in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(7): 1223-1228
- YUAN, C., GAO, J., GUO, J., BAI, L., MARSHALL, C., CAI, Z., WANG, L. and XIAO, M. 2014. Dimethyl Sulfoxide Damages Mitochondrial Integrity and Membrane Potential in Cultured Astrocytes. *PLOS ONE*, 9(9), e107447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107447>
- ZAHIRI, Z. and ZAHIRI, F. 2020. A Study of Ser217Leu and Ala541Thr Polymorphism in the Men Afflicted with Prostate Cancer and in the Men being Suspicious of Prostate Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 21(6), 1551-1557. doi: 10.31557/APJCP.2020.21.6.1551