www.biodicon.com Biological Diversity and Conservation

ISSN 1308-8084 Online; ISSN 1308-5301 Print 11/1 (2018) 80-86

Research article/Araştırma makalesi

Determination of Growth Inhibitory and Apoptotic Effects of Protocatechuic Acid on Prostate Carcinoma Cells

Pınar ÖZTOPCU-VATAN [*1], Emine İNAN [1]

[1] Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Meşelik, Eskişehir, Türkiye

Abstract

Protocatechuic acid (PCA) is a phenolic acid and widely found spread throughout in many plants as aromatic secondary metabolites. Previous studies have shown different biological and pharmacological activities of PCA, as well as, suppression of proliferation of cancer cells. Prostate cancer is one of the most common cancer types in men and the treatment is very limited. In this study, we determined the cytotoxic and apoptotic effects of PCA on human prostate cancer (DU145) cells. The cytotoxic effect of PCA (0.5 to 3.5 mM) was examined in cells for 24 and 48 hours by MTT and Neutral Red (NR) assay. All statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) and followed up by Tukey's multiple comparison tests. Morphological changes in cells were evaluated by inverted microscope. Apoptotic cell death was assessed in cells treated with 1 and 1.5 mM PCA by DAPI staining. The cell viability started to decrease at 1 mM ($p<0.001$) for 24 hours, 0.75 mM ($p<0.001$) for 48 hours. The IC_{50} values at 24 and 48 hours were estimated as 1.29 and 0.90 mM by MTT and 1.23 and 0.88 mM by NR assay respectively. Increased PCA doses caused circular cell morphology, diminished the cell number as well as increased the nuclear condensation and fragmentation on DU145 cells. We reported for the first time that PCA possess cytotoxic and apoptotic effects on prostate cancer cells. Further studies are needed to clarify the mechanism of PCA in order to induce apoptotic death.

Key words: protocatechuic acid, prostate carcinoma, cytotoxicity, DAPI, apoptosis

---------- * ----------

Prostat Kanseri Hücreleri Üzerinde Protokatekuik Asitin Büyümeyi Önleyici ve Apoptoz İndükleyici Etkilerinin Belirlenmesi

Özet

Protokatekuik asit (PCA); fenolik bir asittir ve pek çok bitkide yaygın olarak bulunan aromatik sekonder bir metabolitdir. Önceki araştırmalar, PCA'nın farklı biyolojik ve farmakolojik aktiviteleri yanında özellikle kanser hücrelerinin çoğalmasını da baskıladığını göstermiştir. Prostat kanseri, erkeklerde görülme oranı yüksek kanser çeşitlerinden birisidir ve tedavisi oldukça sınırlıdır. Çalışmamızda, PCA'nın insan prostat kanseri (DU145) hücreleri üzerindeki sitotoksik, morfolojik ve apoptotik etkileri araştırıldı. PCA dozlarının (0,5 ile 3,5 mM) 24 ve 48 saatteki sitotoksik etkileri MTT ve Nötral Kırmızısı (NR) yöntemleriyle araştırıldı. Deney grupları arasındaki farklılıklar, SPSS programında, tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma yöntemiyle değerlendirildi. Hücrelerdeki morfolojik değişiklikler ters ışık mikroskobu ile incelendi. Ayrıca 1 ve 1,5 mM PCA ile muamele edilen hücrelerdeki apoptotik hücre ölümü, DAPI boyaması ile araştırıldı. PCA'nın hücrelerindeki çoğalmayı baskılayıcı etkisinin 24 saatte 1 mM ($p<0.001$); 48 saatte ise 0,75 mM ($p<0.001$) dozundan itibaren başladığı belirlendi. MTT yöntemine göre; 24 ve 48 saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 1,29 ve 0,90 mM, NR yöntemine göre ise; 1,23 ve 0,88 mM hesaplandı. PCA dozlarındaki artışa bağlı olarak hücrelerin yuvarlaklaştığı ve sayıca azaldığı ve bununla beraber hücre çekirdeklerinde yoğunlaşma ve parçalanmaların olduğu belirlendi. Çalışmada ilk defa PCA'nın, DU145 hücre çoğalması üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri belirlenmiştir. Tüm bu veriler ışığında, PCA ile indüklenen apoptotik hücre ölümünün mekanizmasını açıklığa kavuşturmak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: protokatekuik asit, prostat kanseri, sitotoksisite, DAPI, apoptoz

[*] *Corresponding author* / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902222393750; Fax.: +902222393578; E-mail: poztopcu@ogu.edu.tr
© 2008 *All rights reserved* / Tüm hakları saklıdır BioDiCon. 679-0417

1. Giriş

Bitkilerde bulunan çeşitli doğal maddelerin hastalıklardan koruyucu ya da tedavi edici etkileri çok eski dönemlerde keşfedilmiştir. Günümüzde de bitkilerden elde edilen çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek olan doğal maddelerin başında sekonder metabolitler gelmektedir (Aydın et al., 2016). Özellikle biyolojik aktif olan sekonder metabolitlerin hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek ilaçlar için potansiyel kaynaklar olduğu düşünülmektedir. Fenolik asitler, bitkilerde yaygın olarak bulunan aromatik sekonder metabolitlerdir (Robbins, 2003). Yapılan çalışmalarda, fenolik asitlerin çeşitli farmakolojik aktiviteleri olduğu rapor edilmiştir (Kakkar and Bais, 2014). Protokatekuik asit (3,4-dihidroksi benzoik asit, PCA), besinlerle alınan pek çok bitki ve meyvede yüksek oranda bulunan fenolik bir asittir. Üzüm, erik, badem, fındık, ceviz, soğan, zeytin, siyah pirinç ve zeytinyağı gibi günlük diyetle alınan pek çok besinde bol miktarda bulunmaktadır. Ayrıca melisa, anason ve biberiye gibi çeşitli baharatlarda da bulunduğu bilinmektedir (Tanaka et al., 2011). Yapılan farklı çalışmalarda PCA'nın; anti-oksidan (Liu et al., 2002), anti-inflamatuvar (Min et al., 2010) anti-bakterial, anti-ülser, anti-fibrotik ve anti-viral olmak üzere farklı farmakolojik aktiviteleri olduğu rapor edilmiştir (Khan et al., 2015). Ayrıca melanoma (Lin et al., 2011), lösemi (Tseng et al., 2000), meme, akciğer, karaciğer ve serviks (Yin et al., 2009) gibi farklı kanser hücrelerinde de çoğalmayı baskılayıcı anti-tümöral etkisi olduğu yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla belirlenmiştir.

Kanser hala dünyada görülen en tehlikeli hastalıklardan birisidir. Pek çok farklı türü olmakla beraber özellikle prostat kanseri erkeklerde sıklıkla görülen bir kanser çeşididir. Tüm dünyada teşhis konulan kanser türleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (Jemal vd., 2011). Yaşlanma ile beraber prostat kanseri riski de arttığı için 65 yaş ve üstü erkeklerde sıklıkla görülmektedir. Hastalık erken evrelerde herhangi bir olumsuz durum yaratmadığı için genellikle geç teşhis edilebilmektedir. Ayrıca tedavide kullanılan kemoterapötik ilaç sayısı oldukça sınırlıdır (Kawabata et al., 2011). Hastalık teşhis edildikten sonra çoğunlukla doksataksel ve kabazitaksel gibi taksanlar ile standart bir kemotöropötik tedavi başlatılmaktadır (Hwang, 2012). Fakat kullanılan ilaçların yan etkilerinin fazla olması ve ilaçlara karşı hücrelerin yüksek direnç göstermesi tedavi şansını azaltmaktadır (Shen et al., 2010; Petrányi, 2012). Bu nedenle hastalığın tedavisi için yeni kemoterapötik ajanlar ya da mevcut ilaçların etkinliğini arttıracak farklı moleküller halen araştırılmaktadır.

Çalışmamızda, bir fenolik asit olan ve besinlerde bol miktarlarda bulunan protokatekuik asitin doza ve zamana bağlı olarak insan prostat kanseri (DU145) hücre dizisi üzerindeki sitotoksik, morfolojik ve apoptotik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve yöntem

2.1. Hücre canlılığının MTT yöntemi ile belirlenmesi

Çalışmada Amerikan Kültür Koleksiyonu (ATCC)'dan satın alınan insan prostat kanseri, DU145 (ATCC® HTB-81™) hücreleri kullanıldı. Hücreler, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ile %10 Fetal Dana Serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin karışımı içeren besi ortamında, 37 °C, %5 CO_2 ve % 95 nem içeren ortamda çoğaltıldıktan sonra 96 kuyucuklu kültür kaplarına $1x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Deneylerde toz halinde ticari olarak satın alınan protokatekuik asit (Sigma-Aldrich, 37580) etanol içinde çözüldü. Protokatekuik asitin 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 ve 3,5 mM dozları DMEM ile dilue edilerek hazırlandı ve hücreler 24 ve 48 saat süreyle muamele edildikten sonra MTT testine alındı. Çalışmada sadece hücre+besiyeri içeren kuyular kontrol grubu olarak kullanıldı. Deneylerde çözücü olarak kullanılan etanolun 3 ve 3,5 mM konsantrasyonları içerisindeki miktarı çözücü kontrol grubu olarak deneylere ilave edildi.

Bir tetrazolyum tuzu olan 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid (MTT), ilk olarak Mossmann tarafından tanımlanan, hücre çoğalmasını kantitatif ve kolorimetrik olarak ölçen bir yöntemdir. Bu yöntemde, canlı hücrelerin sarı renkli MTT boyasını mitokondriyal redüktaz enzimi aracılığıyla, mor renkli formazana indirgenmesi spektrofotometrik olarak belirlenmektedir (Abe and Matsuki, 2000). Muamele süreleri sonunda her bir kuyuya 20 µL MTT solüsyonu eklenerek kültür kapları 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi. Ölçümler mikroplaka okuyucu (BioTek, Powerwave XS) ile 550 nm dalga boyunda yapıldı. MTT ürünü olan formazan; yaşayan hücre sayısı ile ilişki gösterdiğinden, ilaç verilen kuyucuklarda okunan optik yoğunluk kontrole göre yaşayan hücrelerin yüzdesine çevrildi (Oztopcu-Vatan et al., 2012). Her bir deney birbirinden bağımsız olarak en az 3 kez tekrar edildi.

MTT yönteminden elde edilen veriler, Statistics Program for Social and Science 12.0 (SPSS) programında, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma yöntemiyle istatistiksel olarak değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi olarak $p<0,05$ kabul edildi.

2.2. Nötral kırmızısı yöntemi

Çalışmada; DU145 hücreleri %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin karışımı içeren DMEM besi yerinde, 37 °C, %5 CO_2 ve % 95 nemli ortamda çoğaltıldıktan sonra 96 kuyucuklu kültür kaplarına $1x10^4$ hücre/kuyucuk olacak

şekilde ekildi. Ertesi gün hücreler; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 ve 3,5 mM protokatekuik asit dozları ile 24 ve 48 saat süre ile muamele edildi. Çalışmada sadece hücre+besiyeri içeren kuyular kontrol grubu olarak kullanıldı. Deneylerde çözücü olarak kullanılan etanolun 3 ve 3,5 mM konsantrasyonları içerisindeki miktarı çözücü kontrol grubu olarak deneylere ilave edildi.

Sitotoksik etki kolorimetrik hücre canlılığı belirleme yöntemlerinden biri olan nötral kırmızısı (3-amino-7-dimetil-2-metilphenazin hidroklorid; NR) yöntemi ile belirlendi. Nötral kırmızısı; hücre içine geçerek, canlı hücrelerin lizozomunda biriken suda çözünebilen katyonik bir boyadır. Eğer hücrelerin lizozomal zarlarında herhangi bir hasar oluşursa, nötral kırmızısı lizozoma geçemez. Bu yöntem sayesinde yaşayan-sağlıklı veya hasarlı-ölü hücreler tespit edilebilir (Komissarova et al., 2005).

Deneylerde muamele süreleri sonunda her bir kuyucuğa 100 µL NR ilave edilerek 37 ˚C' de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda tüm kuyucuklar 100 µL fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandı. Ardından taze hazırlanmış fiksatif solüsyonundan (1 mL formaldehit:1 mL kalsiyum klorür) 100 µL ilave edilerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra döküldü. Taze hazırlanan okutma solüsyonundan (1 mL asetik asit:99 mL %50'lik etanol) tüm kuyucuklara 100 µL ilave edilerek oda ısısında 5 dakika bekletildi. Süre sonunda kültür kapları mikroplaka okuyucu (BioTek, Powerwave XS) da 540 nm dalga boyunda okutuldu. Optik yoğunluk kontrole göre yaşayan hücrelerin yüzdesine çevrildi. Bu işlem için "Sitotoksisite (%) = Doz grubunun absorbansı x 100 / Kontrol grubunun absorbansı" formülü kullanıldı. Her bir deney en az üç kez tekrar edildi.

NR yönteminden elde edilen veriler, Statistics Program for Social and Science 12.0 (SPSS) programında, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma yöntemiyle istatistiksel olarak değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi olarak $p<0,05$ kabul edildi.

2.3. Hücre morfolojisi

Protokatekuik asit dozları (0,5 ile 3,5 mM) ile 24 saat süreyle muamele edilen DU145 hücrelerindeki morfolojik değişiklikler ters ışık mikroskobu (Olympus, CK2) yardımıyla görüntülendi.

2.4. DAPI Çekirdek boyaması yöntemi

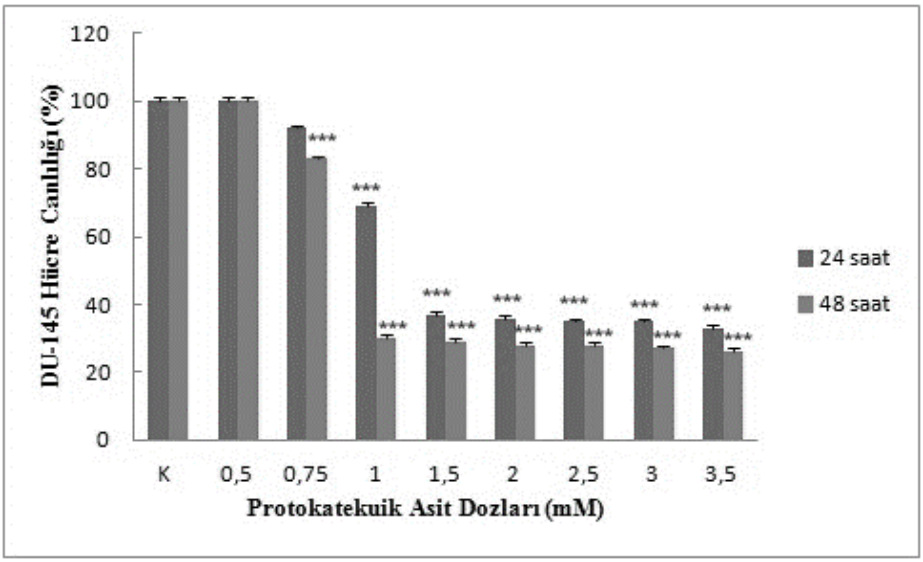
Çalışmamızda PCA dozlarının apoptotik etkisi belirlemek için floresan bir boya olan **4, 6-diamidino 2 fenil indol** (DAPI) çekirdek boyama yöntemi kullanılmıştır. Hücreler standart besin ve kültür koşullarında çoğaltıldıktan sonra 24 kuyucuklu kültür kaplarına $3x10^4$ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Yirmi dört saatlik inkübasyondan sonra hücre canlılığı üzerinde etkili bulunan 1 ve 1,5 mM PCA dozları seçilerek kültür kaplarına ilave edildi. Çalışmada kontrol grubu olarak ise sadece hücre+besiyeri içeren kültür kapları kullanıldı. Bir gün sonra, hücreler % 0,5'lik paraformaldehit ile sabitlendikten sonra, % 70'lik soğuk etanol ile muamele edildi. DAPI boyası (1 µg/mL) ile karanlık ortamda boyama yapıldıktan sonra kültür kapları 3 kez **PBS** ile yıkandı (Park et al., 2007). Floresan mikroskopta en az 100 hücre olacak şekilde inceleme yapıldı.

3. Bulgular

3.1. Mitokondriyal aktiviteye dayalı hücre çoğalmasının belirlenmesi

PCA dozlarının prostat karsinoma hücre çoğalması üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla MTT yöntemi kullanıldı. DU145 hücreleri ile 24 saat süre ile muamele edilen 0,5 ve 0,75 mM PCA dozlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre yaşam oranı üzerinde herhangi bir etki oluşturmadığı gözlendi ($p>0,05$). Denenen 1; 1,5; 2; 2,5; 3 ve 3,5 mM dozlarının ise sırasıyla % 31, 63, 64, 65, 65 ve 67 oranında hücre çoğalmasını baskıladığı belirlendi ($p<0,001$; Şekil 1). Hücrelerin %50'sini öldüren IC_{50} değeri ise 1,29 mM olarak hesaplandı.

Protokatekuik asitin DU145 hücreleriyle 48 saat muamelesi sonucunda ise 0.5 mM dozunda herhangi bir etki görülmezken ($p>0,05$), 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 ve 3,5 mM dozlarında yaklaşık olarak sırasıyla % 17, 70, 71, 72, 72, 73 ve 74 oranında çoğalmayı baskılayıcı etkisinin olduğu kontrol grubu ile kıyaslandığında belirlendi ($p<0,001$; Şekil 1). IC_{50} değeri ise 0,90 mM olarak hesaplandı. Deneylerde çözücü olarak kullanılan etanolun 3 ve 3,5 mM konsantrasyonları içerisindeki miktarının ise hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etki göstermediği belirlendi ($p>0,05$).

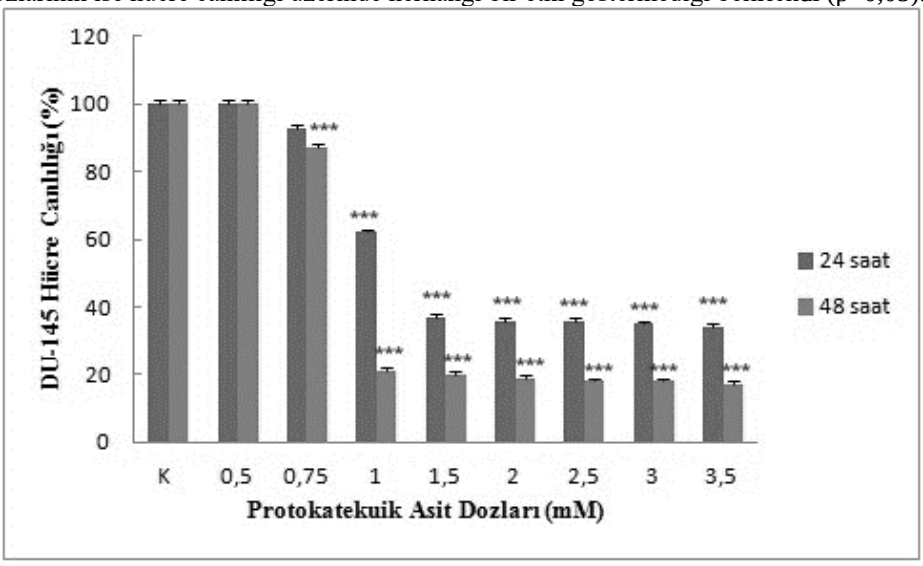


Şekil 1. Protokatekuik asitin DU145 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi. K: Kontrol. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***:p<0,001)

3.2. Lizozomal aktiviteye dayalı hücre çoğalmasının belirlenmesi

Prostat kanseri hücre çoğalması üzerindeki PCA dozlarının etkisini araştırmak amacıyla kullanılan diğer bir hücre canlılık belirleme yöntemi olan NR boyaması kullanıldı. DU145 hücre canlılığı üzerinde 0,5 ve 0,75 mM PCA dozlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hiçbir etkisinin olmadığı belirlendi (p>0,05). 1; 1,5; 2; 2,5; 3 ve 3,5 mM dozlarında ise yaklaşık sırasıyla % 38, 63, 64, 64, 65 ve 66 oranında baskılandığı belirlendi (p<0,001; Şekil 2). 24 saatteki IC_{50} değeri ise 1,23 mM olarak hesaplandı.

48 saatte ise 0,5 mM PCA dozunda sitotoksik bir etkisi gözlenmezken (p>0,05), 0,75 mM dozundan itibaren diğer denen dozlarda ise sırasıyla % 13, 79, 80, 81, 82, 82 ve 83 oranında çoğalmayı baskılayıcı etkisi olduğu belirlendi (p<0,001; Şekil 2). 48 saatteki IC_{50} değeri ise 0,88 mM olarak hesaplandı. Yapılan deneylerde çözücü olarak kullanılan etanol dozlarının ise hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etki göstermediği belirlendi (p>0,05).

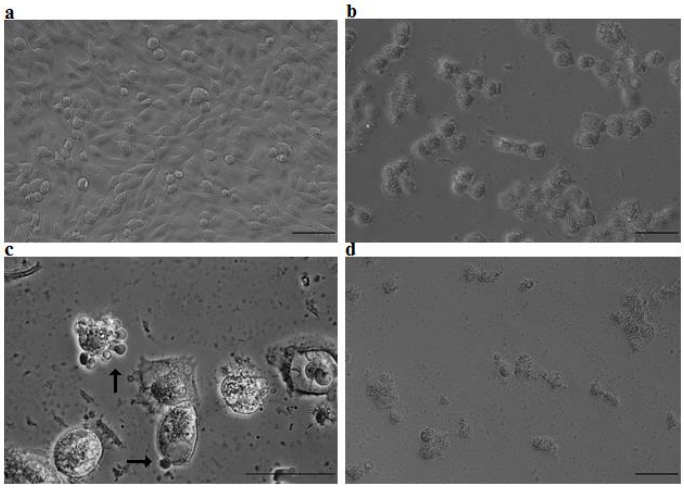


Şekil 2. Protokatekuik asitin DU145 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin lizozomal aktivite bakımından değerlendirilmesi. K: Kontrol. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***:p<0,001)

3.3 Dozlarının hücre morfolojisi üzerindeki etkileri

PCA dozlarının DU145 hücre morfolojisi üzerindeki etkileri ters ışık mikroskobu ile incelendiğinde 0,5 ve 0,75 mM PCA dozlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir morfolojik değişikliğe neden olmadığı gözlendi. Fakat 1 mM dozundan itibaren doz artışına bağlı olarak hücrelerin normal mekik şeklindeki hücre morfolojilerini kaybederek, yuvarlaklaştığı ve birbirlerinden ayrıldıkları tespit edildi (Şekil.3). Ayrıca hücrelerde apoptotik cisimciklerin oluşmaya başladığı yine 1 mM dozunda gözlendi. Hücre morfolojilerinin 1,5 mM dozunda ise

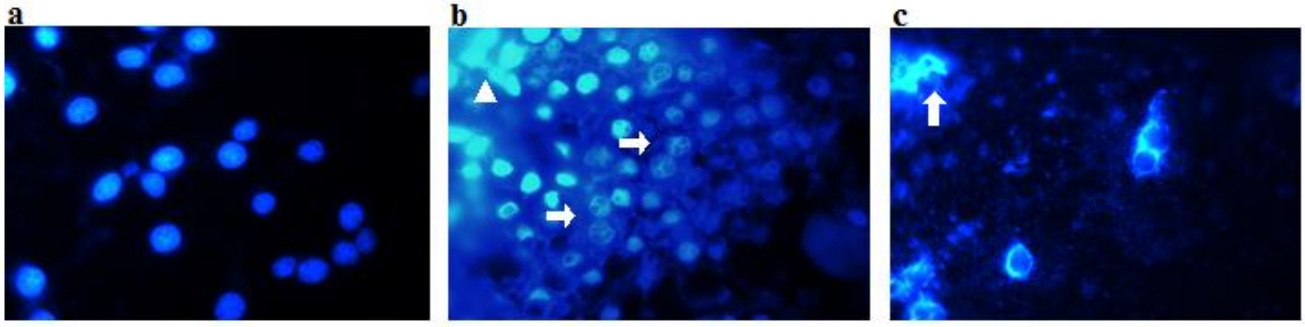
iyice bozulduğu ve hücre sayısının büyük ölçüde azaldığı tespit edildi (Şekil 3). Denenen diğer dozlarda ise hücre sayısı ve morfolojisinde hep benzer görüntüler tespit edildi. Herhangi bir farklı bir değişiklik gözlemlenmediği için sadece 1 ve 1,5 mM dozlarında görülen morfolojik değişikler değerlendirildi.



Şekil 3. DU145 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan PCA dozlarının hücre morfolojisi ve sayısı üzerindeki etkilerinin ters ışık mikroskobu altındaki görüntüleri; a: Kontrol (200X), b: 1 mM PCA (200X), c: 1 mM PCA (400X), d: 1,5 mM PCA (200X). ok (→): apoptotik cisimcikler. Skala bar: 50 µm

3.4 DAPI boyamasının değerlendirilmesi

Seçilen PCA dozlarının hücrelerde apoptotik etkisini araştırmak amacıyla DAPI çekirdek boyaması yapıldı. Hücrelere uygulanan 1 ve 1,5 mM PCA dozlarının apoptotik etkisinin olduğu belirlendi. Yapılan değerlendirmede 1 mM PCA dozu ile muamele edilen hücrelerin kromozomlarında yoğunlaşma ve çekirdeklerinde parçalanmaların olduğu kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında belirlendi. 1,5 mM PCA uygulanan hücrelerde ise belirgin bir şekilde hücre sayısının azaldığı ve var olan hücrelerinde de çekirdek ve kromatin yapısının bozulduğu gözlendi (Şekil 4).



Şekil 4. DAPI boyaması uygulanan DU145 hücreleri. a: Kontrol hücreleri, b: 1 mM PCA uygulanmış hücreler, c: 1,5 mM PCA uygulanmış hücreler. Üçgen (Δ): çekirdek yoğunlaşması, ok (→) çekirdek parçalanması (1000X)

4. Sonuçlar ve tartışma

Günümüzde bitkisel kaynaklı doğal bileşiklerin kanserleşmeyi önlediği ya da kanser hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı bilinmektedir. Bu maddeler genellikle kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar gibi normal hücreler üzerinde yüksek dozlarda bile olumsuz etkilere sahip değildirler. Bu nedenle doğal bileşikler kanser tedavisinde ilaç yapılması ve geliştirilmesi için birer potansiyel oldukları düşünülmektedir.

Protokatekuik asit de besinlerle alınan, farklı bitki türünde yaygın olarak bulunan fenolik bir bileşiktir (Tanaka et al., 2011). Çalışmada; protokatekuik asitin, insan prostat kanseri (DU145) hücrelerindeki sitotoksik etkisi iki farklı hücre canlılık belirleme yöntemi (mitokondrial/lizozomal) kullanılarak doza ve zamana bağlı olarak ilk defa araştırılmıştır. MTT yöntemine göre; 24 ve 48 saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 1,29 ve 0,90 mM, NR yöntemine göre ise 1,23 ve 0,88 mM olarak hesaplanmıştır. Sonuçlarımız PCA'nın hücrelerde hem mitokondrial hemde lizozomal hasara neden olduğunu göstermiştir. Bununla beraber her iki yöntemde de 24 saatte 1,5 mM, 48 saatte ise 1 mM PCA dozlarından sonra hücre canlılığındaki azalma oranlarında büyük bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu nedenle PCA'nın toksisitesinin doz ve zaman artışına bağlı olarak artmadığı belirlenmiştir.

PCA'nın 1-8 µmol/L arasındaki dozlarının insan meme (MCF7), akciğer (A549), karaciğer (HepG2), serviks (HeLa) kanseri hücreleri üzerinde de benzer şekilde sitotoksik etkilere sahip olduğu ve bu etkinin doz artışına bağlı

olarak arttığı rapor edilmiştir (Yin et al., 2009). Aynı çalışmada farklı bir prostat kanseri hücre dizisi olan LNCaP hücreleri ile de çalışılmış ve diğer tüm hücreler içinde PCA dozlarına karşı en hassas olanın LNCaP hücresi olduğunu ifade edilmiştir. Tseng et al. (2000) tarafından insan lösemi kanser (HL-60) hücresi ile yaptıkları farklı bir çalışmada ise 24 saatte 0,5 mM, 48 saatte ise 0,2 mM dozundan itibaren sitotoksik etkinin başladığı hesaplanmıştır. Ayrıca Lin et al., (2007)'nin yapmış olduğu çalışmada ise insan gastrik karsinom (AGS, MKN45), insan hepatoselüler karsinom (Hep3B), hepatoblastoma (HepG2) ve insan kolorektal karsinoma (Lovo) hücrelerindeki 24 saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 7,3; 15,8; 26,2; 16,8 ve >30 mM olarak hesaplanmıştır. Aynı çalışmada protokatekuik asitin normal karaciğer (CL) hücresi üzerindeki IC_{50} değeri >30 mM olarak tespit edilmiştir (Lin et al., 2007). Bu dozun oldukça yüksek olduğu düşünülürse kanserli hücreler üzerinde protokatekuik asitin daha düşük dozlarda oldukça etkili bir sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmektedir. Kanserli hücre dizilerinde denenen protokatekuik asit dozlarının zamana ve doza bağlı olarak çoğalmayı baskıladığı fakat etkili dozunun hücre çeşidine ve deney koşullarına bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Çalışmamızın sonuçları ile diğer çalışma sonuçları karşılaştırıldığında, Yin et al. (2009)'nın yapmış olduğu çalışmadaki gibi prostat kanseri hücreleri üzerinde PCA'nın daha düşük dozlarda çoğalmayı baskıladığı görülmektedir.

PCA'nın kanserli hücrelerdeki sitotoksik etki mekanizmasının belirlenmesi ile ilgili çalışmalar halen devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda PCA dozları uygulanan hücrelerin çekirdeklerinde gözlenen kromatin yoğunlaşması ve çekirdek parçalanmaları tipik apoptotik bulgular olarak değerlendirilmektedir (Yin et al., 2009;Li et al., 2009). Çalışmamızda da PCA'nın sitotoksik etki mekanizmasını araştırmak amacıyla, hem hücre morfolojisi hem de DAPI çekirdek boyaması yapılmıştır. Çalışmamızda belirlendiği üzere, protokatekuik asitin, 1 mM dozundan itibaren hücrede gözlenen apoptotik cisimciklerin varlığı, çekirdekteki kromatin yoğunlaşması ve çekirdek parçalanmaları hücre ölümünün apoptotik süreçle gerçekleştirdiğini göstermektedir. Tüm bu veriler MTT sonuçlarıyla uyumlu bir şekilde hücre sayılarındaki azalmayı da açıklamaktadır. PCA dozları ile farklı hücrelerde yapılan çalışmalarda da çalışmamızla benzer bulgular elde edilmiştir. Örneğin; Yin et al., (2009) farklı kanser hücrelerine uygulanan PCA dozlarının apoptotik etki gösterdiğini ve apoptotik etkinin yine en fazla LNCaP hücrelerinde gözlemlediklerini belirtmişlerdir. Farklı bir çalışmada ise gastrik karsinom (AGS) hücrelerinde de 6.0 mM protokatekuik asit dozunun apoptotik bir etkiye sahip olduğu DAPI çekirdek boyaması yöntemi ile gösterilmiş ve hücrelerdeki apoptotik hücre ölümünün JNK/p38 aktivasyonunu ile gerçekleştirdiğini rapor edilmiştir (Lin et al., 2007). HepG2 hücrelerinde ise, apoptoz sürecinin c-Jun N-terminal kinaz (JNK) bağımlı olarak indüklediği belirtilmiştir (Yip et al., 2006). Protokatekuik asitin ayrıca sitotoksik ve apoptotik etkilerinin yanı sıra AGS hücrelerinde, matriks bozulmasını azalttığı, migrasyonu ve metastazı engellediği de gösterilmiştir (Lin et al., 2011).

Çalışmamızın sonuçlarına göre protokatekuik asitin hem mitokondriyal hem de lizozomal aktiviteye dayalı olarak DU145 hücre çoğalmasını baskılayıcı etki gösterdiği ve bu çoğalmayı baskılayıcı etkinin, apoptotik hücre ölümünü aktive ederek gerçekleştiği de tespit edilmiştir. Prostat kanseri hücreleri üzerindeki PCA'nın etki mekanizmasının daha detaylı olarak çalışılmasına ihtiyaç vardır. Bu nedenle çalışmadan elde edilen verilerin ileride yapılacak *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara kaynak olabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: 201219A104)..

Teşekkür

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: 201219A104)

Kaynaklar

Abe, K., Matsuki, N. (2000). Measurement of cellular 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT, Neuroscience Research, 38, 325-329.

Aydın, Ç., Taşdelen, Ö. G., Turan, M., Mammadov, R. (2016). Phenolic Contents and Antioxidant Properties of *Echinops ritro* L. and *E. tournefortii* Jaup. Et. Spach Extract, International Journal of Seconder Metabolite, 3(2), 74-81.

Hwang, C. (2012). Overcoming docetaxel resistance in prostate cancer: A perspective review, Therapeutic Advances in Medical Oncology, 4, 329-340.

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011). Global Cancer Statistics. Cancer Journal for Clinicians, 61(2), 69-90.

Kakkar, S., Bais, S. (2014). A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential, ISRN Pharmacology, 34, 1-9.

Kawabata, R., S, Oie., Takahashi, M., Kanayama, H., Oka, T., Itoh, K. (2011). Up- regulation of insulin- like growth factor- binding protein 3 by 5-fluorouracil (5-FU) leads to the potent anti- proliferative effects of androgen deprivation therapy combined with 5-FU in human prostate cancer cell lines, International Journal of Oncology, 38, 1489-1500.

Khan, A. K., Rashid, R., Fatima, N., Mahmood, S., Mir, S., Khan, S., Jabeen, N., Murtaza, G. (2015). Pharmacological Activities of Protocatechuic acid, Acta Poloniae Pharmaceutica, 72(4), 643-650.

Komissarova, E. V., Saha, S. K., Rossman, T. G. (2005). Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example, Toxicology and Applied Pharmacology, 202, 99-107.

Li, H. N., Nie, F. F., Liu, W., Dai, Q. S., Lu, N., Qi, Q., Li, Z. Y., Youb, Q. D., Guo, Q. L. (2009). Apoptosis induction of oroxylinA in human cervical cancer HeLa cell line in vitro and in vivo, Toxicology, 257, 80-85.

Lin, H. H., Chen, J. H., Chou, F. P., Wang, C. J. (2011). Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF-kB pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation, British Journal of Pharmacology, 162, 237-254.

Lin, H. H., Chen, J. H., Huang, C. C., Wang, C. J. (2007). Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation, International Journal of Cancer, 120, 2306-2316.

Liu, C. L., Wang, J. M., Chu, C. Y., Cheng, M. T., Tseng, T. H. (2002). In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity, Food and Chemical Toxicology, 40, 635-641.

Min, S. W., Ryu, S. N., Kim, D. H. (2010). Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O-β-D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid, International Immunopharmacology, 10, 959-966.

Oztopcu-Vatan, P., Kabadere, S., Uyar, R., Savaroglu, F., Kus, G. (2012). Time dependent cytotoxic role of *Homalothecium sericeum* extracts on glioma, Biological Diversity and Conservation, 5(1), 1-4.

Park, W. H., Han, Y. H., Kim, S. H., Kim, S. Z. (2007). Pyrogallol, ROS generator inhibits As4.1 juxtaglomerular cells via cell cycle arrest of G2 phase and apoptosis, Toxicology, 235, 130-139.

Petrányi, Á. (2012). The treatment of castration-resistant prostate cancer. Magyar Onkologia; 56(4), 219-228.

Robbins, R.J. (2003). Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 2866-2887.

Shen, K. H., Hung, S. H., Yin, L. T., Huang, C. H., Chao, C. H., Liu, C. L., Shih, Y. W. (2010). Acacetin, a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway, Molecular and Cellular Biochemistry, 333, 279-291.

Tanaka, T., Tanaka, T., M, Tanaka. (2011). Potential Cancer Chemopreventive Activity of Protocatechuic Acid, Journal of Experimental and Clinical Medicine, 3(1), 27-33.

Tseng, T. H., Ka, T. W., Chu, C. Y., Chou, F. P., Lin, W. L., Wang, C. J. (2000). Induction of Apoptosis by *Hibiscus* Protocatechuic Acid in Human Leukemia Cells via Reduction of Retinoblastoma (RB) Phosphorylation and Bcl-2 Expression, Biochemical Pharmacology, 60, 307-315.

Yin, M. C., Lin, C. C., Wu, H. C., Tsao, S. M., Hsu, C. K. (2009). Apoptotic Effects of Protocatechuic Acid in Human Breast, Lung, Liver, Cervix, and Prostate Cancer Cells: Potential Mechanisms of Action, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 6468-6473.

Yin, M.C., Lin, C.C., Wu, H.C., Tsao, S.M., Hsu, C. K. (2009). Apoptotic Effects of Protocatechuic Acid in Human Breast, Lung, Liver, Cervix, and Prostate Cancer Cells: Potential Mechanisms of Action, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 6468-6473.

Yip, E. C. H., Chan, A .S .L., Pang, H., Tam, Y. K., Wong, Y. H. (2006). Protocatechuic acid induces cell death in HepG2 hepatocellular carcinoma cells through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism, Cell Biology and Toxicology, 22, 293-302.

(Received for publication 5 May 2017; The date of publication 15 April 2018)