

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

TÜRK PROPOLİSİ EKSTRAKTLARININ PROSTAT KANSER
HÜCRE SERİLERİNİN PROTEOMİĞİNE ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

Yaşam BARLAK

TRABZON – 2009

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

TÜRK PROPOLİSİ EKSTRAKTLARININ PROSTAT KANSER
HÜCRE SERİLERİNİN PROTEOMİĞİNE ETKİSİ

Yaşam BARLAK

Tezin Enstitüye Veriliş Tarihi : 13.11 2009

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 24.11.2009

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Orhan DEĞER

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Caner KARAHAN

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Hasan EFE

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ALVER

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Orhan DEĞER

KASIM 2009

TRABZON

ÖNSÖZ

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmada, değerli katkılarından dolayı bölüm başkanı ve tez danışman hocam Prof. Dr. Orhan DEĞER'e, Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü'nden Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI ve Senem Ceren Karataylı'ya, PC-3 ve MCF-7 kanser hücre serilerini bana ve çalışma arkadaşlarıma temin eden G.A.T.A. Hematoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ali UĞUR URAL'a, kimyasal malzeme ve her türlü laboratuvar araç gereçlerini hizmetimize sunan K.T.Ü. Hematoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ercüment OVALI'ya, Doç. Dr. Mehmet SÖNMEZ'e ve laboratuvar deneyimlerini bizimle paylaşan Münür İNAN'a, Biyokimya Anabilim Dalındaki kıymetli hocalarım Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Ekin ÖNDER, Prof. Dr. Asım Örem, Prof. Dr. S. Caner KARAHAN, Doç. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Doç. Dr. Birgül KURAL ve Doç. Dr. Ahmet ALVER'e, Sağlık Bilimleri Enstitüsüne ve çalışma arkadaşlarıma, ayrıca bana her zaman ve her yerde bütün güçleriyle destek olan annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yaşam BARLAK

Bu alışma K.T.Ü. B.A.P. 2007.114.001.3 kod numaralı
proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Propolis	5
2.1.1. Propolisin Arılar Tarafından Yapımı ve Kullanımı	5
2.1.2. Propolisin Fiziksel Özellikleri	6
2.1.3. Propolisin Kimyasal Özellikleri	6
2.1.4. Propolisin Kimyasal Kompozisyonundaki Farklılıklar	7
2.1.5. Propolisin İçeriğinde Bulunan Flavonoidler	8
2.1.6. Propolisin Farmakolojik Özellikleri	9
2.1.7. Propolisin Hastalıkların Tedavisinde Kullanımı	11
2.2. Proteomik Yaklaşımlar	12
2.2.1. Proteom	12
2.2.2. Proteomiks ve Klinik proteomik	12
2.2.3. Proteomik Analizler için Kullanılan Yöntemler	14
2.2.3.1. İki Boyutlu Elektroforez	14
2.2.3.2. İki Boyutlu Elektroforezin Dezavantajları	15
2.2.3.3. Proteomik Çalışmalarında Kullanılan Metodların Karşılaştırılması	17
2.2.4. SELDI-TOF-MS	19
2.2.4.1. SELDI-TOF-MS'in Prensibi	20
2.2.4.2. SELDI-TOF-MS'in Avantajları	24
2.3. Kanser	25

2.3.1. Kanser Tedavisi	26
2.3.2. Antioksidanlar ve Kanser Tedavisi	26
2.4. Prostat Kanseri	27
3. MATERYAL VE METOD	30
3.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	30
3.1.1. Cihaz ve Malzemeler	30
3.1.2. Kimyasal Malzemeler	30
3.2. Metodlar	31
3.2.1. Propolis Örneklerinin Temini	31
3.2.1.1. Propolisin DMSO ve Sulu Ekstraktının Hazırlanması	31
3.2.1.2. Ekstraktlarda Total Polifenol Miktarının Belirlenmesi	32
3.2.1.3. Ekstraktlarda Flavonoid Miktarının Belirlenmesi	33
3.2.1.4. Demir İdirgeyici Antioksidan Potansiyel Tayini (Ferric Reducing Antioxidant Potential FRAP)	35
3.2.1.5. Total Antioksidan Kapasite (TAK)	37
3.2.2. Hücre Kültürü	38
3.2.2.1. PC-3 Hücre Serilerinin Çoğaltılması	39
3.2.2.2. Hücre Kültüründe Kullanılacak Ekstraktların Hazırlanması	39
3.2.2.3. PC-3 Hücre Serileri için Hücre Canlılığının Belirlenmesi	39
3.2.2.4. Hücrelerin Ekstraktlarla Muamele Edilmesi	41
3.2.2.5. Ekstraktlar ile Muamele Edilen PC-3 Hücrelerinin Parçalanması	41
3.2.3. SELDI-TOF-MS Cihazının Kalibrasyonu	43
3.2.4. Hücre Lizatlarının SELDI Çip Dizinlerine Yüklenmek Üzere Hazırlanması	44
3.2.4.1. Hücre Lizatlarının SELDI Çip Dizinlerine Yüklenmesi	45
3.2.5. SELDI-TOF-MS ile Veri Oluşturulması	48
3.2.6. İstatistiksel Analiz	49
4. BULGULAR	51
4.1. Ekstraktlarda Polifenol, Flavonoid, Demir İdirgeyici Antioksidan Potansiyel ve Total Antioksidan Kapasite Tayini Sonuçları	51
4.2. Ekstraktlarla Muamele Edilen PC-3 Hücrelerinin Canlılık Testi Sonuçları	53
4.3. Ekstraktlarla Muamele Edilen PC-3 hücrelerinin SELDI-TOF-MS Analizi Sonuçları	54

4.3.1. CM10 ProteinÇip Dizinine Düşük Enerji Seviyesinde Uygulanan Örneklerin Sonuçları	55
4.3.2. CM10 ProteinÇip Dizinine Yüksek Enerji Seviyesinde Uygulanan Örneklerin Sonuçları	57
4.3.3. Q10 ProteinÇip Dizinine Düşük Enerji Seviyesinde Uygulanan Örneklerin Sonuçları	58
4.3.4. Q10 ProteinÇip Dizinine Yüksek Enerji Seviyesinde Uygulanan Örneklerin Sonuçları	61
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	80
6.1. Sonuçlar	80
6.2. Öneriler	83
7. ÖZET	84
8. SUMMARY	85
9. KAYNAKLAR	86
ÖZGEÇMİŞ	

TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Propolisde bulunan başlıca bileşenler	7
Tablo 2. Propolisin içeriğinin iklim, coğrafik yerleşim ve bitki örtüsüne göre değişimi	8
Tablo 3. Propolis içeriğinde bulunan flavonoid türleri	9
Tablo 4. Propolisin yapısında bulunan bileşiklerin biyolojik aktiviteleri	10
Tablo 5. Proteomiks çalışmalarında kullanılan metodların prensipleri, avantajları ve dezavantajları	17
Tablo 6. ProteinÇip dizin türleri ve özellikleri	21
Tablo 7. SELDI-temeline dayanan Protein Çip Biyomarkır Sisteminin Özellikleri	24
Tablo 8. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarında total polifenol tayininin yapılışı	32
Tablo 9. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarında flavonoid miktarının belirlenmesi	34
Tablo 10. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarında demir indirgeyici antioksidan potansiyelin ölçülmesi	36
Tablo 11. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarında total antioksidan kapasitenin ölçülmesi	38
Tablo 12. Hücre kültüründe ve MTT testinde kullanılan ekstrakt konsantrasyonları	39
Tablo 13. PC-3 hücrelerinin propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktları ile muamele edilmesi	41
Tablo 14. ProteinChip All-in-One-Protein Standart II'nin içeriği	43
Tablo 15. % 0,008 DMSO çözeltisi, 20 µg propolis/ml DMSO ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasının istatistiksel analiz sonuçları (CM10, düşük lazer enerjisi protokolü)	56
Tablo 16. 20 µg propolis/ml su ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasının istatistiksel analiz sonucu (CM10, düşük lazer enerjisi protokolü)	56
Tablo 17. % 0,008 DMSO çözeltisi, 20 µg propolis/ml DMSO ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasının istatistiksel analiz sonucu (CM10, yüksek lazer enerji protokolü)	58

Tablo18. 20 µg propolis/ml su ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasının istatistiksel analiz sonucu (Q10, düşük lazer enerji protokolü)	59
Tablo 19. % 0,008 DMSO çözeltisi, 20 µg propolis/ml DMSO ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasının istatistiksel analiz sonucu (Q10, yüksek lazer enerji protokolü)	63
Tablo 20. 20 µg propolis/su ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasının istatistiksel analiz sonucu (Q10, yüksek lazer enerjisi protokolü)	63
Tablo 21. Kontrol PC-3 hücrelerinin ve % 0,008 DMSO ve 20 µg/ml DMSO-propolis ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin ekspresyon değişimi sonuçları	64
Tablo 22. Kontrol PC-3 hücrelerinin ve % 0,008 DMSO ve 20 µg/ml DMSO-propolis ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin ekspresyon değişimi sonuçları	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Propolis	6
Şekil 2. Propoliste bulunan en önemli falvonoidlerin ve kafeik asit fenil esterinin (CAPE) kimyasal yapıları	9
Şekil 3. İki boyutlu elektroforezin şematik gösterimi	15
Şekil 4. Bireysel ve Kurumsal SELDI-TOF-MS	19
Şekil 5. Protein Çip Dizin Biyoişlemci ve Protein Çip dizini	20
Şekil 6. Protein Çip Dizinlerinin farklı tipleri	20
Şekil 7. Protein Çip spotlarına örnek uygulanması ve protein çip okuyucusunda analiz için hazır hale getirilmesi	22
Şekil 8. Protein Çip Sistemi kullanılarak SELDI-TOF-MS ile ekspresyon farklılığı haritalandırması	23
Şekil 9. Total polifenol tayini için gallik asit standart grafiği	33
Şekil 10. Flavonoid tayini için kuersetin standart grafiği	34
Şekil 11. Demir indirgeyici antioksidan potansiyel (frap) tayini için troloks standart grafiği	36
Şekil 12. Total antioksidan kapasite için troloks standart grafiği	38
Şekil 13. Düşük moleküler ağırlıklı protein standartları	44
Şekil 14. Yüksek moleküler ağırlıklı protein standartları	44
Şekil 15. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarında polifenol miktarı (Ortalama \pm 1SD mg GA /g propolis)	52
Şekil 16. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarında flavonoid miktarı (Ortalama \pm 1SD mg K /g propolis)	52
Şekil 17. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarında demir indirgeyici antioksidan potansiyel (FRAP) sonuçları (Ortalama \pm 1SD mg Tro / propolis)	53
Şekil 18. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarında total antioksidan kapasite (TAS) sonuçları (Ortalama \pm 1SD mmol Tro / 100 g propolis)	53

Şekil 19. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktları ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin % canlılıkları	54
Şekil 20. CM10 dizinine düşük lazer enerjisinde uygulanan örneklerin pik spektrumları	55
Şekil 21. CM10 dizinine yüksek lazer enerjisinde uygulanan örneklerin pik spektrumları	57
Şekil 22. Q10 dizinine düşük lazer enerjisinde uygulanan örneklerin pik spektrumları	59
Şekil 23. Düşük lazer enerjisinde Q10 çip dizinine yüklenen örneklerde, 20 µg propolis/ml su ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin kontrol PC-3 hücrelerinin genel pik spektrumu	60
Şekil 24. Q10 protein Çip dizininde düşük enerjili protokolde propolisin sulu ekstraktı ile muamele edilen örneklerde m/z değeri 11.603 Da olan pikin ekspresyonundaki değişimin barlı grafiği	60
Şekil 25. Q10 protein Çip dizininde düşük enerjili protokolde propolisin sulu ekstraktı ile muamele edilen örneklerde m/z değeri 11.603 Da olan pik için pik spektrumu	61
Şekil 26. Q10 protein Çip dizininde düşük enerjili protokolde propolisin sulu ekstraktı ile muamele edilen örneklerde m/z değeri 11.603 Da olan pik için jel görüntüsü	61
Şekil 27. Q10 dizinine yüksek lazer enerjisinde uygulanan örneklerin pik spektrumları	62

KISALTMALAR LİSTESİ

ACN	: Asetonitril
Akt (PKB)	: Protein kinaz B
AP-1	: Aktivatör protein 1
A549	: İnsan akciğer adenokarsinoma hücre serisi
B16-BL6	: Metastatik murin melanoma kanser hücre serisi
BCG-823	: İnsan gastrik kanser hücre serisi
BEL-7402	: İnsan hepatoma hücre serisi
BG-9	: İnsan normal fibroblast hücre serisinin
8-Br-cAMP	: 8-bromo-siklik-adenozin monofosfat
Caco-2	: Kolon adenokarsinoma hücre serisi
CAKE-1	: Renal karsinoma hücre serisi
CAPE	: Kafeik asit fenil esteri
CDK	: Cyclin bağımlı kinaz (cyclin dependent kinase)
CHAPS	: 3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate
CHCA	: α -siyano-4-hidroksisinnamikasit
CHO-K1	: Çin hamster over hücre serisi
Da	: Dalton
DIGE	: Differential in Gel Electrophoresis
DJ-1 protein	: Parkinson hastalığı proteini 7
DMEM/F12	: Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12.
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DPPH	: Difenil pikril hidrazil
DU-145	: Androjen-sensitiv prostat kanser hücre serisi
2D-PAGE	: İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi
EAM	: Enerji absorbe edici molekül
EC 50	: 50% etkili konsantrasyon
EDM	: Ekspresyon Farklılığı Haritalandırılması (Expression Difference Mapping)
EDTA	: Etilendiamintetra asetikasit

ERP 60	: Önceden fosfatidilinositol-spesifik fosfolipaz C olarak adlandırılan ERp61 olarak da bilinen bir polipeptid
ES	: Endometrial stromal hücrelerinde
ESI	: Elektrosprey iyonizasyon
FBS	: Fetal Bovine Serum
GA	: Gallik asit
GM-CSF	: Granülosit-makrofaj koloni-stimule edici faktör
GRP 75	: Glukoz-ile düzenlenen protein (Mortalin)
GRP 58	: ERp57 veya ERp60 olarak da bilinen glukoz regüle edici protein
HCT-8	: İnsan kolorektal adenokarsinoma hücre serisi
Hela	: İnsan epitelyal karsinoma hücre serisi
HEPES	: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etansülfonik asit
HL-60	: İnsan promyelositik lösemi hücreleri
HNTG	: Hepses, sodyum klorür, triton ve gliserol içeren liziz tamponu
HO8910	: Over kanseri hücre serisi
HSP 70	: Isı şok proteini 70
HT-1080	: İnsan fibrokarsinoma hücre serisi
ICAT	: İzotop kodlu affinite işaretleyicileri (isotope-coded affinity tags)
IC 50	: 50% inhibe edici konsantrasyon
IGF-I	: İnsülin-benzeri büyüme faktörü
İTRAQ	: Rölativ ve kesin kantitasyon için izotop işaretleyicileri (isotope tags for relative and absolute quantification)
K	: Kuersetin
KB	: İnsan ağız epidermoid karsinoma hücre serisi
KML-562	: Kronik myelositer lösemi
KS	: Kütle spektrometrisi
LC50	: 50% öldürücü konsantrasyon
LNCap	: Metastatik prostat kanseri hücre serisi
26-L5	: Murin kolon kanseri hücre serisi
MALDI	: Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon
MAPK	: Mitojen ile aktifleşen protein kinaz
MCF-7	: Meme karsinoma hücre serisi
MMP-2, -9	: Matriks metalloproteinaz 2 ve 9

MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NF-κB	: Nükleer faktör kapa B
NK3	: Neuromedin K
NKX 3.1	: NK3 homebox1 insan geni (NK3 traskripsiyon faktörü ile ilişkili gen bölgesi)
NTA	: Nitriлотriasetikasit
ω -3	: Omega-3
PBP74	: Peptid bağlayıcı protein (ısı şok proteini)
PBS	: Fosfat tuz tamponu (phosphate buffered saline)
PC-3	: Prostat kanseri hücre serileri
PEBP-1	: Fosfatidil etanol amin bağlayıcı protein 1
PEE	: Propolisin etanolik ekstraktı
PKP	: Peptid kütle parmak izi
PMA	: Forbol 12-miristat-13-asetat (phorbol 12-myristate-13-acetate)
PMN	: Polimorfo nükleer
PPAR-γ	: Peroksizom proliferator ile aktive olan reseptör gamma
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
PTM	: Post translasyonel modifikasyon
Raf	: Sitoplazmik serin/treonin protein kinaz
Ras	: GTPaz ailesi bir protein
RC58T/h/SA#4:	İnsan prostatik kanser hücrelerinden türetilen malign tümör hücreleri
RKIP	: Raf kinaz inhibitör protein
ROC	: Alıcı Çalışma Karakteristikleri (Receiver Operation Characteristics)
ROT	: Reaktif oksijen türleri
RPTS	: Rhizoma Paridis total saponin
SD	: Standart sapma (standart deviation)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SELDI MS	: Yüzey ile geliştirilmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon kütle spektrometrisi (surface enhanced laser desorption ionization)
SK	: Sıvı kromatografisi
SK-Hep1	: İnsan hepatosellüler karsinoma hücre serisi
SOD	: Süperoksit dismutaz
SPA	: Sinapinikasit

TFA	: Trifloroasetikasit
TOF	: Uçuş zamanı (Time of flight)
Tro	: Troloks
U937	: Histiolitik lenfoma hücre serisi
UZ-KS	: Uçuş zamanı kütle spektrometrisi
VGSC Na _v	: Voltaj kapılı sodyum kanalı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Propolis, ya da diğer adıyla ‘bee glue’ bitkilerin tomurcuk ve terlerinden bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından toplanan ve arı enzimlerinin varlığında dönüştürülen reçinemi maddenin jenerik ismidir (1-4). Etimolojik olarak, propolis, pro- (savunmada ve savunma için) ve -polis (şehir ya da topluluk) kelimelerinden türetilmiştir ve ‘şehrin (veya kovanın) savunulmasındaki madde’ anlamına gelmektedir (1-3).

Propolisin kompozisyonu, propolisin toplandığı bölgedeki yerel bitki örtüsünde arılar tarafından kullanılan bitki türleri, toplanan bitki bileşenleri, toplama mevsimi, iklim, arıların beslenme tipi ve kraliçe arıdaki genetik çeşitlilik gibi faktörlere bağlı olarak çeşitlilik gösterir (2, 5-9). Propoliste en fazla bulunan bileşenler, fenolik bileşikler ve esterleri, flavonoidlerin her formu (flavonoller, flavonlar, flavononlar, dihidroflavonoller ve kalkonlar (chalcones), terpenler, beta-steroidler, aromatik aldehitler ve alkoller, seskuiterpenler, stilben terpenler ve kafeik asit fenil esteri (CAPE) dir (7).

Propolisin anti-bakterial (6, 10), anti-viral (10-11), anti-fungal (9-10), anti-karyojenik (8), anti-ülser (12), immunomodülatör (13), anti-inflammatuar (14), anti-oksidan (15), hepatoprotektif (16), anestezik (1), anti-tümör (17-18), anti-kanser (19-20), radyoprotektif (21), nöroprotektif (22), anti-proliferatif (23-24) ve tümör indüklü anjiogeneze karşı koruyucu (25) gibi çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğu yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Propolisin farmakolojik özellikleri, çoğunlukla flavonoidlerin varlığına atfedilmektedir (26). Propolisin genel biyolojik özellikleri, kendi bileşenlerinin doğal karışımından kaynaklanmaktadır (2).

Daha önce yaptığımız çalışmalarda, polenin sulu ve PBS’li ve propolisin DMSO’lu ekstraktlarının HL-60 miyeloid hücre serilerinde kaspaz-3 aktivitesini farklı oranlarda artırarak kanser hücrelerini apoptoza sürüklediğini flowsitometrik analizler sonucu ortaya koyduk (27, 28). Aliyazıcıoğlu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, polen ve propolisin DMSO’lu ekstraktlarının konsantrasyona bağlı olarak solunumsal patlamayı inhibe ettiğini flowsitometrik analizlerle ortaya koyduk (29). Barlak’ın yaptığı çalışmada,

solunumsal patlama sonrası propolisin DMSO'lu ekstraktlarının PMN lökositlerinden PMN elastaz salınımına etkisini inceledik. Solunumsal patlamanın uyarıldığı PMA'lı örneklerde propolis konsantrasyonu arttıkça hem PMN elastaz salınımının hem de solunumsal patlamanın azaldığını, PMA'sız örneklerde ise PMN elastaz salınımının propolis ekstraktı ilave edilmeyenlere göre bir miktar azaldığını ancak solunumsal patlamada bir farklılık olmadığını tespit ederek propolisin anti-inflamatuar aktiviteye sahip olabileceğini teyid ettik (30).

Propolisin kullanımı, MÖ 300 gibi çok eski zamanlara kadar dayanmaktadır ve dünyanın birçok bölgesinde hem internal hem de eksternal olarak yöresel halk ilacı olarak kullanılmıştır (2). Son zamanlarda, propolis sağlığı geliştirmek ve hastalıkları önlemek için yiyecek ve içecekler içinde kullanılmaktadır (4).

Proteom terimi, yaklaşık olarak onbeş yıl önce 'bir genom veya doku tarafından eksprese edilen bütün proteinler'i açıklamak için ilk kez Marc Wilkins tarafından tanıtıldı (31). Proteom, hücrelerin, bir dokunun veya organizmanın genomunun sonucu olan bütün proteinleri içine alır (32).

Kanser, birçok genetik ve çevresel faktörün etkileşimi sonucu oluşan multifaktoriyel bir hastalıktır (33). Kanser, teşhis ve tedavideki gelişmelere rağmen, hala başlıca halk sağlığı sorunudur (34). Genom bilgisi, kanserin genetik temelini iç yüzünün kavranmasını büyük ölçüde artırmıştır. Fakat gen analizleri, tek başına yeterli değildir. Hem mRNA'nın hem de proteinlerin alternatif splicingi, proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonları (fosforilasyon, glikozilasyon, ubikuitinasyon) ve genetik polimorfizmlerin sonucu olarak meydana gelen konformasyonel değişikliklerden dolayı benzer fizikokimyasal özellik beraberinde birden çok ilişkili yapı meydana gelir (31-32). Kısacası bir gen hatırı sayılır büyüklükte bir protein popülasyonu kodlayabilir (32, 34). Farklı mRNA ekspresyonu çalışılması aydınlatıcı olmasına rağmen, bunlar protein konsantrasyonları ile orantılı değildir. Proteinler, çoğunlukla, proteolitik yıkıma uğrarlar (34).

Proteom, genom gibi statik bir parametre değildir. Proteom, hücrenin intrinsik genetik programı ve kendi yakın çevrelerindeki etkilerin her ikisini de yansıtan proteinlerin dinamik bir kolleksiyonudur. Genom ile karşılaştırıldığında, proteom biyolojik durumun daha gerçekçi bir görünümünü sağlar. Bundan dolayı, proteomun hastalık varlığı, gelişimi ve tedaviye cevabı ölçmekte gen analizlerinden daha kullanışlı olması beklenmektedir.

Sonuç olarak, proteomik, genom dizisi ve hücresel davranış arasındaki bağlantıyı kurabilir (32).

Proteomiks, tanımlanmış sistem (hücre veya organizma) içindeki proteinlerin kimliğini, miktarını ve fonksiyonunu dikkate alarak proteinlerin sistematik analizi olarak açıklanabilir (31, 35). Klinik proteomik, proteomik tekniklerinin veya stratejilerinin tıp alanına uygulanmasıdır (35). Klinik proteomik, mevcut teknolojiyi kullanarak, farklılaşan fizyolojik ve hastalık durumları arasındaki proteom profillerini karşılaştırarak teşhis, prognoz ve tedavi etkinliği için biyomarkır gibi tedavi ve tedavi uygulamalarında yeni hedeflerin belirlenmesi için umut verici kanıtlar sağlayan hızla büyüyen bir alandır (31).

Sağlıklı bir hücrenin neoplastik bir hücreye (tümör veya kanser gibi kontrolsüz bir şekilde çoğalan hücrelerdir) dönüşümü sırasında, protein seviyesinde, belirgin değişiklikler meydana gelir. Bunlar, değişmiş ekspresyon, farklı protein modifikasyonu, spesifik aktivitedeki değişiklik, anormal lokalizasyondur ve hepsi hücresel fonksiyonu etkiler. Kanser proteomiksinin temeli, bu değişiklikleri tanımlamak ve anlamaktır (34).

Yüzey ile geliştirilmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon kütle spektrometrisi [surface enhanced laser desorption ionization (SELDI) MS], kromatografik kolonu taklit eden ve lazer desorpsiyonuna dayanan bir metodudur. Bu teknik, kanser proteomiksinde yaygın olarak kullanılmaktadır (31).

Bu teknik ilk kez erken dönemdeki over kanserinde kullanılmıştır ve bazı ayırt edici proteinler belirlenmiştir (36). Bu ilk kullanımdan beri kanser (37-40) ve diğer hastalıklarda SELDI-TOF uygulamaları birçok raporda açıklanmıştır. SELDI-TOF, bir dokudan veya bir hücre serisinden hücre lizatlarının analizi (41-43) için kullanışlıdır (32).

Prostat kanseri, son on yılda, batı ülkelerinde erkeklerde en sık teşhis edilen kanserdir. Prostat kanseri, birçok genetik ve çevresel faktörle ortaya çıkan bir kanser olarak gözükmektedir. Genetik faktörlerin etkisi %10'dan daha azdır (44). Son çalışmalar, birçok diyetel kanser kemopreventiv ajanların prostat kanserinin insidansını düşürmek için ümit verici stratejiler sağladığını göstermiştir (45). Selenyum, E ve D vitaminleri, likopen, izoflavonoidler ve düşük yağlı diyet tüketiminin prostat kanseri riskini düşürdüğüne dair deliller vardır (46).

Bu çalışmada, Trabzon bölgesinden toplanan propolisin dimetil sülfoksit (DMSO) ve sulu ekstraktlarının prostat kanseri hücre serileri (PC-3) üzerine sitotoksik aktivitesi ölçülecektir. Propolisin genel biyolojik özellikleri, kendi bileşenlerinin doğal karışımının bir sonucu olduğu için, çalışmada propolisin total ekstraktı kullanılacaktır. Türk

propolisinin sulu ve DMSO'lu ekstraktlarının sitotoksik etkisinin PC-3 hücrelerinin proteomunda nasıl bir değişiklik yaparak meydana geldiği, total ekstraktlarla muamele edilen PC-3 hücrelerinin protein ekspresyon farklılığı haritalandırması SELDI-TOF-MS ile analiz edilerek incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Propolis

Propolis, ya da diğerk adıyla ‘bee glue’ bitkilerin tomurcuk ve terlerinden bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından toplanan ve arı enzimlerinin varlığında dönüştürülen reçinensi maddenin jenerik ismidir (1-4).

Propolis etimolojik olarak, pro- (savunmada ve savunma için) ve -polis (şehir ya da topluluk) kelimelerinden türetilmiştir ve ‘şehrin (veya kovanın) savunulmasındaki madde’ anlamına gelmektedir (1-3).

2.1.1. Propolisin Arılar Tarafından Yapımı ve Kullanımı

Bal arıları (*Apis mellifera* L.), propolisi yapmak için, çeşitli ağaçların kabuklarındaki çatlaklardan, yapraklarından ve tomurcuklarından, aktif olarak bitkiler tarafından salgılanan veya bitkilerdeki yarıklardan sızan materyalleri (yapraklardaki lipofilik materyaller, zambk, sakız, reçine, vs.) toplayarak, kullanırlar (1,3). Arıların reçineyi topladığı ağaç türleri, huş ağacı, kavak, çam, kızılğaç, söğüt, palmiye ve hurma ağaçlarıdır (1). Bu reçine, toplandığı zaman, arının tükrük bezi enzimleri eklenerek çiğnenir ve kısmen sindirilen materyal balmumu ile karıştırılarak kovan içinde kullanılır (1,3).

Arılar, propolisi kovanlarındaki oyukları kapatmak, kovanın iç duvarlarını sıvamak, birçok yapıyı tamir etmek, girişi davetsiz misafirlere karşı korumak ve kovan içindeki ölmüş olan istilacıların cesetlerini mumyalamak için kullanırlar (1-3, 5). Propolis, kovanın içinin sıcak tutulmasına yardımcı olur ve mikrobial kontaminasyona karşı en iyi savunmayı sunar (6), antiseptik yararları ile de koloniyi hastalıklardan korur (2).

2.1.2. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis, reçinemsi, yapışkan bir zamktır (sakızdır). Rengi kaynağına ve yaşına bağlı olarak sarı-yeşilden koyu kahverengiye kadar değişiklik gösterir (4). Propolis, hoş bir aromatik kokuya sahiptir ve insan derisinin yağları ve proteinleri ile güçlü bir şekilde etkileşir (2-3, 23) Propolis, 60 – 69 °C arasında erime noktasına sahiptir (47). Soğutulduğunda sert ve kırılığandır fakat ısıtıldığında yumuşak ve yapışkan hale gelir (3, 47). Şekil 1’de propolis gösterilmiştir.



Şekil 1. Propolis (48)

2.1.3. Propolisin Kimyasal Özellikleri

Ham propolis (işlenmemiş propolis), genel olarak, 30% balmumu, 50% reçine ve sebze balsamı, 10% esansiyel ve aromatik yağlar, 5% polen ve %5 diğer organik maddelerden oluşur (2, 3, 49). Propolisin içeriğinde bulunan polen, magnezyum, nikel, kalsiyum, demir, çinko, potasyum, sodyum ve bakır gibi esansiyel elementlerin, çoğunlukla glutamat, prolin, aspartat, lösin ve lizin olmak üzere serbest aminoasitlerin ve vitaminlerin zengin bir kaynağıdır (1, 50-52). Propolis, çeşitli türde enzimler, vitaminler, mineraller, şeker, eser elementler, serbest ve konjuge aminoasitler de içermektedir (53, 21, 54).

Propolis ekstraktı, doğal maddelerin son derece komplike bir karışımıdır (26). Kimyasal analizler, propolisin kompozisyonunda en az 300 bileşenin varlığına dikkat

çekmektedir. Bu organik bileşenlerin arasında, fenolik bileşikler ve esterleri, flavonoidlerin her formu [(flavonoller, flavonlar, flavanonlar, dihidroflavonoller ve kalkonlar (chalcones)], terpenler, beta-steroidler, aromatik asitler, aromatik aldehitler ve alkoller, seskuiterpenler, stilben terpenler ve kafeik asit fenil esterleri (CAPE) bulunmaktadır (7, 55). Tablo 1’de propolisde bulunan başlıca bileşenler özetlenmiştir.

Tablo 1. Propolisde bulunan başlıca bileşenler (2, 47, 50-52, 56)

Bileşenler	Ana Maddeler	Miktar (%)
Reçine	Flavonoidler	45-55
	Terpenler	
	Kumarinler	
	Fenolik asitler ve esterleri	
Mum ve yağ asitleri	Arılardan veya bitkilerden mum	25-35
	Bitkilerden çoklu doymamış yağ asitleri	
Esansiyel yağlar	Uçucu bileşenler	10
	Proteinler	
Polen	Eser elementler	5
	Serbest aminoasitler	
	Vitaminler (A, B, C, E, PP, vs)	
	Eser elementler (Cu, Mn, Fe, Zn, Al, Ag, Ca, Mg, Co, vs)	
	Ketonlar	
Diğer Maddeler	Laktonlar	5
	Kuinonlar	
	Steroidler	
	Şekerler	

Propolisin içeriğindeki bileşiklerin çoğu, lipofilik bileşiklerdir. Lipofilik bileşikleri etanol kullanarak ekstrakte etmek kolay olduğu için, propolisin etanolik ekstraktı (PEE), iyi bilinmektedir (22). Farklı çözücüler, farklı bileşenleri çözüp ekstrakte edeceği için, propolis ekstraksiyon metodları, onun aktivitesini etkileyebilir. Biyolojik ölçümlerde en çok kullanılan ekstraktlar, farklı konsantrasyonlardaki etanol, metanol ve sudur (2).

2.1.4. Propolisin Kimyasal Kompozisyonundaki Farklılıklar

Propolisin kompozisyonu, propolisin toplandığı bölgedeki yerel bitki örtüsünde arılar tarafından kullanılan bitki türleri, toplanan bitki bileşenleri, toplama mevsimi, iklim, arıların beslenme tipi ve kraliçe arıdaki genetik çeşitlilik gibi faktörlere bağlı olarak

çeşitlilik gösterir (2, 5-9). Propolisin kaynağına bağlı olarak kimyasal kompozisyonundaki geniş çeşitlilikten dolayı, kimyasal standardizasyon oldukça güçtür (9). Arıların spesifik bir coğrafi bölge içinde propolisin kimyasal kompozisyonunu değiştirmedeği çünkü esasen aynı bitkisel kaynakları ziyaret ettiği rapor edilmiştir (2). Tablo 2’de, propolis örneklerinin içeriğindeki farklılıklar, iklim, coğrafik bölge ve bitki örtüsüne göre özetlenmiştir (2, 6, 16, 57).

Tablo 2. Propolisin içeriğinin iklim, coğrafik yerleşim ve bitki örtüsüne göre değişimi

İklim Türü	Coğrafik Bölge	Yaygın Bitki Türü	Propolis İçeriği
Ilıman Bölge	Avrupa, Kuzey Amerika, Yeni Zellanda, Batı Asya	Çeşitli Kavak ağacı türleri (<i>Populus</i> spp) yaygın bitki türüdür. Kavak tomurcuğu, fenolik bileşiklerin zengin bir kaynağıdır.	Fenolik bileşikler açısından zengindir: Flavonoidler, aromatik asitler ve esterlerini içerir.
Tropikal Bölge	Avustralya, Güney Amerika, Venezuela, Brezilya	Kavak ağacı yoktur <i>Clusia minor</i> , <i>Clusia. Major</i> , <i>Araucaria heterophylla</i> , <i>Baccharis dracunculifolia</i> ve farklı türleri yaygın bitki türleridir.	di- ve triterpenler açısından zengindir., p-kumarikasit, prenillenmiş p-kumarik asit, dihidrosinamik asit içerir. Flavonoidler, bitki aleminde geniş bir şekilde yayıldığı için flavonoid de içerir. Fakat az miktardadır. Artepilin C (Brezilya propolisinde)

Bu nedenle, propolis ile yapılacak olan biyolojik çalışmalar, o propolisin bitkisel kaynaklarının ve kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi ile gerçekleştirilmelidir (2).

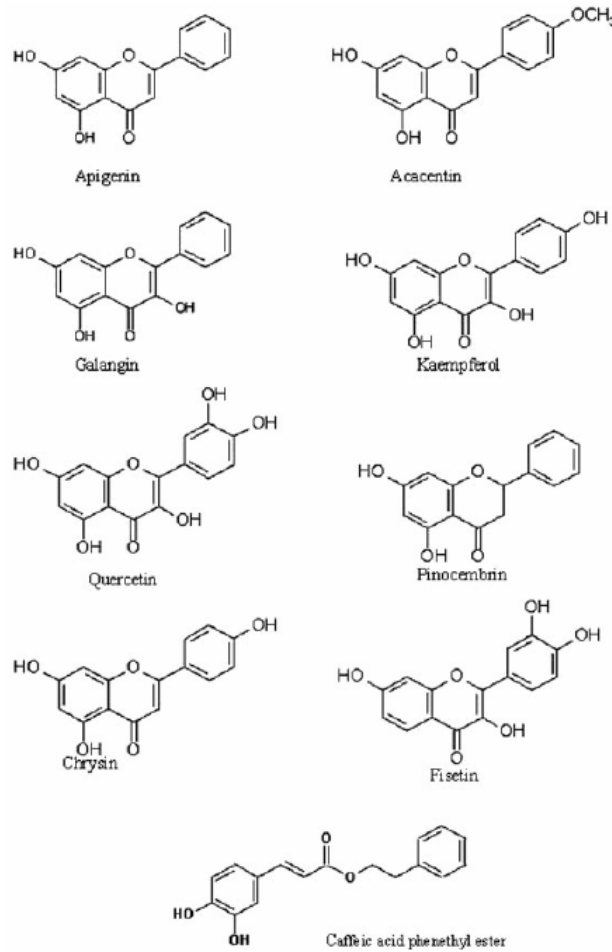
2.1.5. Propolisin İçeriğinde Bulunan Flavonoidler

Propolis örneklerinden izole edilen bileşiklerin en büyük grubu, bitki aleminde oldukça yaygın olan flavonoid pigmentleridir (3, 15). Bu bileşikler, sekonder bitki metabolitleri olduğu için, insanlar tarafından sentezlenemezler ve insan diyetinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadırlar (15). Tablo3’de propolisin içeriğinde bulunan flavonoid türleri verilmiştir.

Tablo 3. Propolis içeriğinde bulunan flavonoid türleri (7)

Flavonoid Türü	Bileşik
Flavonoller	Kuersetin, kaempferol, galangin, fisetin
Flavononlar	Pinosembrin, naringin, hesperidin
Flavonlar	Apigenin, acacetin, krisin, luteolin

Şekil 2’de propolisin içeriğinde bulunan flavonoidlerin ve kafeik asit fenil esterinin (CAPE) kimyasal yapıları gösterilmiştir (7).



Şekil 2. Propoliste bulunan en önemli flavonoidlerin ve kafeik asit fenil esterinin (CAPE) kimyasal yapıları (7) .

2.1.6. Propolisin Farmakolojik Özellikleri

Propolisin anti-bakterial (6, 10), anti-viral (10-11), anti-fungal (9-10), anti-karyojenik (8), anti-ülser (12), immunomodülatör (13), anti-inflammatuar (14), anti-

oksidan (15), hepatoprotektif (16), anestezi (1), anti-tümör (17-18), anti-kanser (19-20), radyoprotektif (21), nöroprotektif (22), anti-proliferatif (23-24) ve tümör indüklü angiogeneze karşı koruyucu (25) gibi çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğu yapılan araştırmalarla gösterilmiştir.

Propolisin farmakolojik özellikleri, çoğunlukla flavonoidlerin varlığına atfedilmektedir. Flavonoidlerin, antiinflamatuvar, antihepatotoksik, antikanser, antiviral ve antibakterial aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiştir. Yaygın bir görüşe göre, flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri, serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı koruyucu yeteneğe sahip olmaları ile ilişkilidir (26).

Flavonoidlerin hayvan sistemlerindeki biyokimyasal etkileri dört kategoriye bölünmüştür. Bunlar, biyolojik polimerlere bağlanma affinitesi, ağır metal iyonlarını bağlama, elektron transportunun katalizi ve serbest radikalleri yakalama yeteneğidir (3).

Tablo 4’de propolisin yapısında bulunan bileşiklerin biyolojik aktiviteleri özetlenmiştir (1, 47, 7, 16).

Tablo 4. Propolisin yapısında bulunan bileşiklerin biyolojik aktiviteleri

Bileşik	Biyolojik Aktiviteler
Galangin	Anti-inflamatuvar, anti-oksidan, anti-viral, anti-bakterial, hepatoprotektif
Kafeikasit fenil esteri (CAPE)	Anti-inflamatuvar, anti-bakterial, anti-tümör, hepatoprotektif, anti-kanser
Kafeikasit	Anti-bakterial, anti-fungal, anti-viral, anti-inflamatuvar
Krisin	Anti-inflamatuvar, anti-viral,
İzopentil ferulat	Anti-viral,
Acacetin	Anti-viral, anti-oksidan, anti-inflamatuvar
Pigenin	Anti-viral,
Kaempferol	Anti-viral, anti-ülser
Kuersetin	Anti-viral, anti-bakterial, anti-histamin, anti-ülser, kapiller güçlendirici
Rutin	Anti-viral,
Hesperitin	Anti-ülser
Naringin	Anti-ülser
Pinocembrin	Anti-bakterial, anti-fungal, lokal anestezi
Pinobanksin	Anti-mikrobial, anti-fungal
prenillenmiş <i>p</i> -kumarik	anti-bakterial, sitotoksik
Diterpenik asitler	anti-bakterial, sitotoksik
Kaffeoilkuinik asit türevleri	İmmunomodulatör, hepatoprotektif
Dikeafeoilkuinik asit türevleri	Güçlü anti-oksidan
Atrepilin C (Brezilya propolisi)	Anti-tümör
Propol (Brezilya propolisi)	Güçlü anti-oksidan

Propolis örnekleri, çoğunlukla, Gram pozitif (*Staphylococci*, *Streptococci* spp. *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacillus cereus* ve *B. subtilis*) ve Gram negatif bakteri (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* ve *P. Aeruginosa Mycobacterium tuberculosis*), *Helicobacter pylori*, protozoa (*T. cruzi*), fungi (*Candida albicans*) ve virüslere (*HIV*, *Herpes virüsleri* veya *influenza virüsleri*) karşı in vitro anti- mikrobial aktivite gösterir. Propolisin ekstraksiyonu için kullanılan çözücünün, propolisin anti- mikrobial aktivitesini etkileyebileceği rapor edilmiştir (1,5).

Propolisin anti bakterial aktivitesinin, reçinede bulunan flavonoidler, aromatik asitler ve esterlerinden dolayı olduğu rapor edilmiştir, fakat propolisin bileşenlerinin yapısı ve antibakterial aktivitesi arasındaki ilişki bilinmemektedir. Antimikrobial aktivitenin mekanizması komplekstir ve reçinedeki fenolik ve diğer bileşenler arasındaki sinerjistik etkiden kaynaklanır (57).

Tek bir propolis bileşeni total ekstraktından daha büyük bir aktiviteye sahip değildir. Bu nedenle propolisin genel biyolojik özelliklerinin kendi bileşenlerinin doğal karışımından dolayı olduğu ileri sürülmektedir (2).

2.1.7. Propolisin Hastalıkların Tedavisinde Kullanımı

Propolisin kullanımı, MÖ 300 gibi çok eski zamanlara kadar dayanmaktadır ve dünyanın birçok bölgesinde hem internal hem de eksternal olarak yöresel halk ilacı olarak kullanılmıştır (2). Son zamanlarda, propolis sağlığı geliştirmek ve hastalıkları önlemek için yiyecek ve içecekler içinde kullanılmaktadır (4).

Bugün, propolis içeren ürünler, ilaç endüstrisi ve aktarlar tarafından şurup, sprey, tablet ve kapsul olarak yoğun bir şekilde pazarlanmaktadır (2, 53, 16). Propolis, kapsul formlarında (ya saf formunda ya da aloe jel ve rosa canina veya polen ile kombine edilmiş olarak), ekstrakt olarak (hidroalkolik veya glikolik), gargara olarak (melisa, adaçayı, ebegümeci ve/veya biberiye ile kombine edilmiş olarak), toz formunda (gargaralarda kullanılmak için veya bir kez suda çözüldükten sonra internal kullanım için) mevcuttur; boğaz pastillerinde ve kremlerde de bulunur. Propolis, ayrıca bal mumunun uzaklaştırıldığı saf ürün şeklinde ticari olarak da bulunmaktadır (1). Propolisin insan sağlığını geliştirdiği ve inflamasyon, kalp hastalığı ve hatta kanser gibi hastalıkları önlediği düşünülmektedir (23, 16).

Propolisin yararlı kullanımlarına zıt olarak, propolis, bazı toksik ve alerjik etkilere de sahiptir. Propolisin yapısındaki 1,1-dimetilallil kafeikasitin allerjiden sorumlu olan bileşen olduğu belirlenmiştir (16). Burdock'a göre propolis toksik değildir ve insanlar için güvenli konsantrasyonunun 1.4 mg/kg/gün veya ortalama 70 mg/gün olabileceğini önermektedir (3).

2.2. Proteomik Yaklaşımlar

2.2.1. Proteom

Proteom terimi, yaklaşık olarak onbeş yıl önce 'bir genom veya doku tarafından ekspresye edilen bütün proteinler'i açıklamak için ilk kez Marc Wilkins tarafından tanımlandı (31). Proteom, hücrelerin, bir dokunun veya organizmanın genomunun sonucu olan bütün proteinleri içine alır (32).

2.2.2. Proteomiks ve Klinik proteomik

Proteomiks, tanımlanmış sistem (hücre veya organizma) içindeki proteinlerin kimliğini, miktarını ve fonksiyonunu dikkate alarak proteinlerin sistematik analizi olarak açıklanabilir (31, 35).

Onkoloji alanında proteomikse olan ilgi, en belirgin olanıdır. Kanseri, mutasyona uğramış genlerden meydana gelen ve normalin dışında protein ekspresyonuna yol açan bir DNA hastalığıdır (32).

Kanser, teşhis ve tedavideki gelişmelere rağmen, hala başlıca halk sağlığı sorunudur (34). Genom bilgisi, kanserin genetik temelini iç yüzünün kavranmasını büyük ölçüde artırmıştır. Fakat gen analizleri, tek başına yeterli değildir. Hem mRNA'nın hem de proteinlerin alternatif splicingi, proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonları (fosforilasyon, glikozilasyon, ubikuitinasyon) ve genetik polimorfizmlerin sonucu olarak meydana gelen konformasyonel değişikliklerden dolayı benzer fizikokimyasal özellik beraberinde birden çok ilişkili yapı meydana gelir (31-32). Kısacası bir gen hatırı sayılır büyüklükte bir protein popülasyonu kodlayabilir (32, 34). Proteom, genom gibi statik bir parametre değildir. Proteom, hücrenin intrinsik genetik programı ve kendi yakın çevrelerindeki etkilerin her ikisini de yansıtan proteinlerin dinamik bir koleksiyonudur.

Genom ile karşılaştırıldığında, proteom biyolojik durumun daha gerçekçi bir görünümünü sağlar. Bundan dolayı, proteomun hastalık varlığı, gelişimi ve tedaviye cevabı ölçmekte gen analizlerinden daha kullanışlı olması beklenmektedir. Sonuç olarak, proteomik, genom dizisi ve hücrel davranış arasındaki bağlantıyı kurabilir. Proteomiksin potansiyeli çeşitli medikal alanlarda (örn: infekte edici hastalıklar, Alzheimer hastalığı ve kardiyovasküler hastalıklar) keşfedilmiştir (32).

Klinik proteomik, proteomik tekniklerinin veya stratejilerinin tıp alanına uygulanmasıdır (35). Klinik proteomik, mevcut teknolojiyi kullanarak, farklılaşan fizyolojik ve hastalık durumları arasındaki proteom profillerini karşılaştırarak teşhis, prognoz ve tedavi etkinliği için biyomarkır gibi tedavi ve tedavi uygulamalarında yeni hedeflerin belirlenmesi için umut verici kanıtlar sağlayan hızla büyüyen bir alandır (31).

Spesifik bir proteinin veya protein sınıflarının (örn: kinazlar) yapı, fonksiyon ve etkileşimini çalışmak 'fonksiyonel proteomik' olarak, bir proteomun genel ekspresyon seviyesini çalışmak 'ekspresyon proteomiks' olarak adlandırılır (32).

Belirleme, teşhis, tedavi, izleme ve prognozu ölçmek için kritik olan önemli araçlardan biri biyomarkırlardır. Biyomarkırlar, fizyolojik durumun ve ayrıca hastalık mekanizması sırasındaki değişikliğin belirteci olan biyolojik moleküllerdir. Bir biyomarkırın faydası, kendisinin hastalığın erken belirlenmesi, hastalık ilerleyişinin izlenmesi, ölçüm kolaylığı sağlaması ve populasyonlar arasında ölçülebilir bir faktör sağlaması gibi yeteneklerine bağlıdır (34).

Kanser proteomik çalışmaları, kanserin erken teşhisi için hastalık ilişkili biyomarkırları, terapi etkinliği ve toksisitesi için yeni biyomarkırları belirleyebilir, en iyi antikanser ilaç kombinasyonlarına rehberlik sağlayabilir, uygun terapiye olanak sağlayabilir. Bundan başka, yeni farmakolojik hedeflere (hedeflerin bulunmasına) yol açabilir. Eğer bu markırlar, doku biyopsisine gerek kalmadan, serum gibi kolay elde edilebilir bir vücut sıvısında ölçülebilirlerse, gelecekteki kanser teşhisi ve tedavinin izlenmesi için büyük bir etkiye sahip olacaktır (32).

Sağlıklı bir hücrenin neoplastik bir hücreye (tümör veya kanser gibi kontrolsüz bir şekilde çoğalan hücrelerdir) dönüşümü sırasında, protein seviyesinde, belirgin değişiklikler meydana gelir. Bunlar, değişmiş ekspresyon, farklı protein modifikasyonu, spesifik aktivitedeki değişiklik, anormal lokalizasyondur ve hepsi hücrel fonksiyonu etkiler. Kanser proteomiksinin temeli, bu değişiklikleri tanımlamak ve anlamaktır (34).

Farklı mRNA ekspresyonu çalışılması aydınlatıcı olmasına rağmen, bunlar protein konsantrasyonları ile orantılı değildir. Proteinler, çoğunlukla, proteolitik yıkıma veya fosforilasyon veya glikozilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlara uğrarlar. Ekspresyon edilen proteinleri hedefleyen kanser biyomarkırı keşfi stratejileri, popüler hale gelmektedir çünkü proteomik yaklaşımlar, kanser gelişiminde yer alan proteinleri (modifiye olmuş veya olmamış) karakterize eder (34).

Proteomik teknolojisi, hastalıklı ve sağlıklı durumlar arasındaki protein değişikliklerini açıklığa kavuşturabilir (35).

1985'den beri iki boyutlu jel elektroforezi kullanılarak prostat kanseri, meme kanseri, hepatosellüler kanser, özofegal kanser, akciğer kanseri ve glioblastoma için muhtemel biyomarkır belirleme amacıyla, 132 den fazla çalışma yapılmıştır (58).

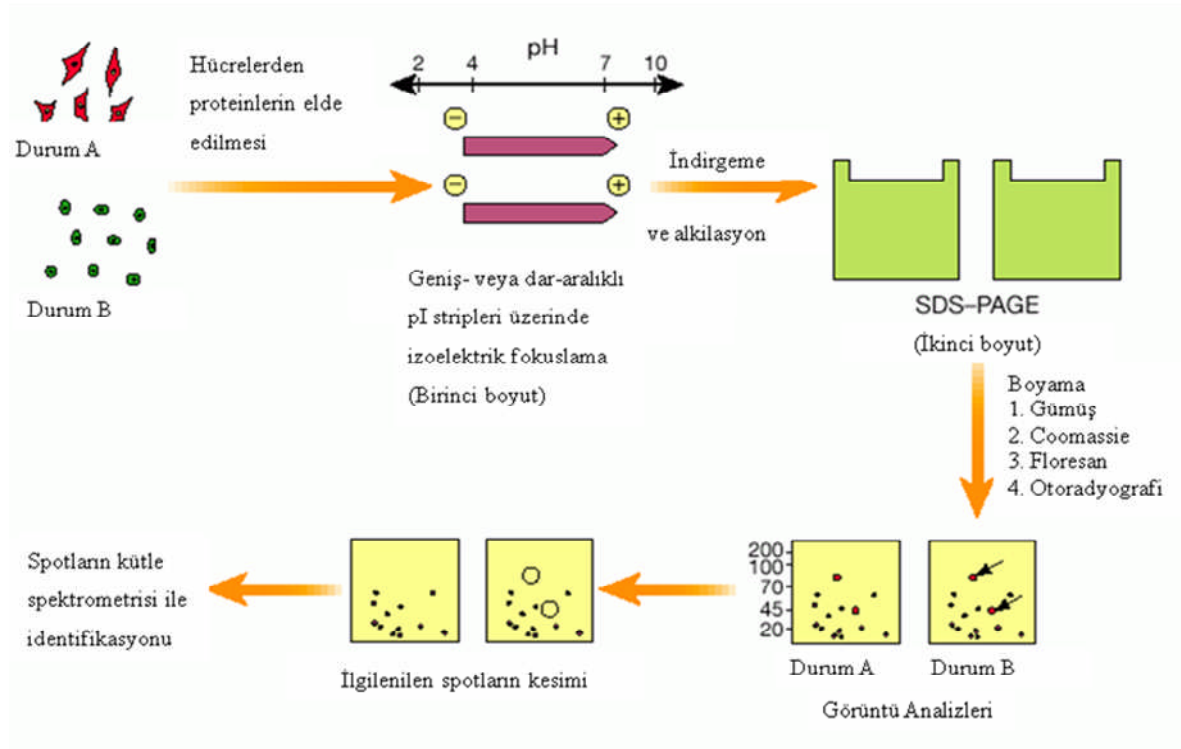
2.2.3. Proteomik Analizler için Kullanılan Yöntemler

2.2.3.1. İki Boyutlu Elektroforez

Proteomik deneyleri, iki boyutlu jel elektroforezi analizleri esas alınarak uygulanır. İki boyutlu jel elektroforezi, oldukça geniş bir analit kapasitesine sahiptir. Standart formatta iki boyutlu jel elektroforezi, spot ölçme metoduna bağlı olarak 3000-10000 proteini görüntüleyebilir. İki boyutlu jel elektroforezi, proteinleri iki farklı protein karakterine bağlı olarak birbirinden ayırır. Bunlar, büyüklük ve yüküdür. Birinci boyut elektroforezde, proteinler poliakrilamid veya agaroz jel ile pH gradienti kullanılarak izoelektrik odaklama vasıtasıyla birbirinden ayrıştırılırlar. Örnekteki proteinler, uygulanan elektrik alanı vasıtasıyla kendi pI değerleri ile aynı pH daki gradient alanına ulaşınca kadar göç ederler. pI ya dayanan ilk ayrıştırmadan sonra, proteinler, ikinci boyut elektroforez için SDS (sodyum dodesil sülfat) içeren tampondaki çapraz bağlı poliakrilamid jelle transfer edilirler. İkinci boyut elektroforezde, proteinler, büyüklüklerine göre ayrıştırılırlar. İkinci ayrıştırmadan sonra, proteinler, Coomassie Blue veya gümüş boya ile görünür hale getirilirler. Daha yüksek sensitiviteli ölçümler için, floresan boyalar ya da radyoaktif işaretleme kullanılabilir (31, 35). Değişmiş ekspresyon gösteren proteinlerin belirlenmesi, bu proteinlerin bulunduğu spotların kesilip, jelde triptik parçalama ile jelden ayrıştırılması ile sağlanır. Spot içinde bulunan protein(ler) kütle spektrometrisi kullanılarak aydınlatılabilirler (58). Kütle spektrometrisi (KS), gaz fazındaki

iyonların kütlelerinin yüklerine oranlarını (kütle/yük, m/z) her m/z değerindeki iyonların sayısı ile birlikte ölçen bir tekniktir. Kütle spektrometrisi, ilgilenilen analiti dikkate alarak hem kantitatif hem de kalitatif bilgi sağlar (31).

Normal ve transforme olmuş hücrelerden elde edilen protein spotlarının görsel olarak karşılaştırılması, malignan transformasyon mekanizması sırasında birçok değişikliğin meydana geldiğinin kalitatif resmi sağlanır (58). Şekil 3’de iki boyutlu elektroforezin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 3. İki boyutlu elektroforezin şematik gösterimi (59)

2.2.3.2. İki Boyutlu Elektroforezin Dezavantajları

İki boyutlu-poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE) tekniği, zahmetlidir, kompleks çok basamaklı aşamalarından dolayı, yüksek verimli değildir. (35, 60). 2D-PAGE bütün proteinlerin görüntülenebilmesi için yetersizdir (35). Çok asidik veya bazik proteinler, membran proteinleri ve çok küçük ya da çok büyük proteinler, iki boyutlu jel elektroforezinde analiz edilemezler. Jeldeki proteinlerin % 50-75 inin düşük yoğunlukta oldukları ve boyama ile ölçülemedikleri belirlenmiştir. İki boyutlu jel ayırımı sırasında, proteinlerin birlikte göç etmesi de bir problemdir (58).

Biyomarkır belirlenmesi için diğer bir kritik nokta da düşük miktardaki proteinleri, istatistiksel olarak güvenilirliği yüksek derecede ölçme yeteneğinde olan uygun analitik yöntemin seçimidir. Bu ihtiyaç, özellikle plazma veya serum biyomarkırlarının belirlenmesinde önemlidir. Serumda protein konsantrasyonlarının çok geniş bir dinamik aralığı ile karşı karşıya kalınır. Albumin ve immunoglobulinler, tipik 2D jellerin büyük bir bölgesini etkin bir şekilde maskeler, birlikte göç eden düşük miktardaki proteinlerin varlığını gizler (58).

Aynı zamanda fazla miktarda örneğe ihtiyaç vardır. Bu klinik örnekler için bir problemdir. Biyopsi örnekleri gibi invasiv teknikler vasıtasıyla elde edilen örnekler, sınırlı miktarda elde edilmektedir. Kısacası, bu teknik, proteomik analizler için yüksek verimli değildir. Düşük miktarda örnek ihtiyacı olan dizinlerin kullanımı mevcuttur (60).

1980'lerin sonunda ortaya çıkan matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon [matrix assisted laser desorption ionization (MALDI)] ve elektrosprey iyonizasyon (ESI) teknikleri kullanılarak yapılan kütle spektromesi, protein analizleri ve proteomiksteki gelişmeler için önemli bir yapı taşı sağlamıştır. Bu iyonizasyon teknikleri (MALDI ve ESI) protein biyokimyasında büyük bir etkiye sahiptir çünkü büyük proteinlerden çok parçalanma olmadan gaz fazında iyon üretme yeteneğine sahiptir. Önceki iyonizasyon teknikleri, bunu yapamamaktadır (31).

MALDI, Karas ve Hillenkamp tarafından geliştirilmiştir. Örnek moleülleri, α -siyano-4-hidroksisinnamikasit veya dihidroksibenzoikasit gibi matriks maddesi ile çöktürülür. Çöken katı, sonradan, lazer ışınlarına maruz kalır ve matriks maddesi, enerjiyi biyomoleküllere verir (34). MALDI-MS, iyonları, proteinleri kuru kristalize bir matriks dışında, süblimleştirip iyonize ederek üretir (31). Sonra kütle spektrometrisi ile protein, peptid veya peptid fragmentlerinin kütle/yük (m/z) oranları ölçülür (34). Bu tip iyonizasyonla üretilen kütle spektrumunu yorumlamak nispeten basittir çünkü primer olarak tek yüklü iyonlar oluşturulur bu nedenle her pik tek bir örnek bileşenine karşılık gelir (31).

2D-PAGE'den kesilen spot, tripsin ile parçalandıktan sonra MALDI-TOF-MS de analiz edilebilir ve örnekten peptid kütle parmak izi (PKP) oluşturur. Elde edilen PKPler, protein veritabanı içinde bulunan bilinen teorik PKPler ve DNA dizisi türevli PKPler ile karşılaştırılır. Proteinin tanımlanması yapılmış olur (35). MALDI-TOF-MS çok küçük miktardaki proteinlerin belirlenmesine imkân verir (34).

2.2.3.3. Proteomik Çalışmalarında Kullanılan Metodların Karşılaştırılması

Tablo 5’de proteomiks çalışmaları için kullanılan metodların prensipleri, avantajları ve dezavantajları özetlenmiştir (32).

Tablo 5. Proteomiks çalışmalarında kullanılan metodların prensipleri, avantajları ve dezavantajları (32)

Teknoloji	Prensibi	Avantajları	Dezavantajları
İki boyutlu jel elektroforezi (2D-PAGE)	Örneğin protein içeriği jel üzerinde ayrılır, kütle ve yüke göre iki boyutlu elektroforez yapılır. Jeller boyanır, farklı jeller arasındaki örneklerdeki spot yoğunlukları karşılaştırılır.	Yüksek ayırma (Bir jelde binlerce protein ayrılabilir), post-translasyonel modifikasyonlar belirlenebilir.	Düşük verimlidir. (Bir jele bir örnek yüklenebilir) Zahmetlidir. Otomasyonu zordur. Jeller arasında tekrarlanabilirlik düşüktür. Büyük moleküler ağırlıklı ve çok asidik veya bazik proteinlerin ayırma gücü zayıftır. Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında, fazla miktarda başlangıç materyali (50-100 µg protein) gereklidir.
DIGE	Bir jelde üç örneğin ölçüldüğü 2DPAGE dir. Her örnek, farklı bir floresan boya ile işaretlenir. Her örnek için her jel spotunun yoğunluğu, işarete spesifik dalga boyunda ölçülür.	Bir jelde örneklerin direkt olarak karşılaştırılması mümkünüdür. Daha iyi tekrarlanabilirlik sağlar.	Düşük verimlidir. Bir jele üç örnek yüklenebilir.
Protein mikrodizinleri	Forward mikrodizin üzerinde, bir örnekteki hedeflenmiş proteinin (veya protein sınıfının) prob (antikor gibi) bağlı spotlara bağlanması; Reverse mikrodizin üzerinde, spesifik problemlerin, spota bağlı örnekteki hedeflenmiş proteine (veya protein sınıfına) bağlanmasıdır. Bağlı proteinler, direkt işaretleme (floresan) ile ya da sekonder antikorların işaretleme ile ölçülür.	Bir dizindeki spot sayısı kadar örnek yüklenebilir. Yüksek verimlidir. Biyomarkır belirlenmesi veya sınıf kolayca ayırt edilir	Birçok farklı probun sentezlenmesi, gereklidir. Hedeflenen proteinlerin sınıfı ve özellikleri bilinmelidir. Problemler tarafından hedeflenen proteinlerin sınırlı ölçümü, çapraz reaksiyon, post translasyonel modifikasyonlu proteinlerin bağlanması
SK-MS-MS (Tandem KS)	Tripsin ile protein parçalanması ile oluşan peptid karışımının, bir-, iki- veya üç-boyutlu LC ile ayırımıdır. Peptid kütleleri, KS-KS ile ölçülür.	Peptidlerin KS-KS ile örnek başına yüzlerce veya 1000 den fazla proteinin direkt olarak belirlenmesi (üç boyutluda) PTM belirlenmesi	Düşük verimlidir (bir yüklemde bir örnek) Zaman alıcıdır. KS-KS ile ölçüm, geniş kapsamlı değildir. Bundan dolayı, farklı örneklerin karşılaştırılması zordur.

Tablo 5'in devamı

ICAT isotope-coded affinity tags	Proteinlerin kararlı ağır veya hafif izotopik işaretleyici ile sistein rezidüleri üzerinden kimyasal olarak etiketlenmesidir. (iki farklı örnek için) İşaretleme sonrası, örnekler karıştırılır, proteinler tripsin ile parçalanır ve işaretli peptidler affinite kromatografisi ile izole edilir. Her iki örnek, birlikte, SK-MS-MS ile analiz edilir.	Peptidlerin KS-KS analizi ile biyomarkırların direkt olarak belirlenebilmesi, kısmen miktar tayini, daha az karmaşıktır	Düşük verimlidir (Bir yüklemde iki örnek) Sadece sistein içeren peptidlerin işaretlenmesi, PTM kaybı olabilir.
İTRAQ isotope tags for relative and absolute quantification	Proteinlerin amin grupları üzerinden, aynı kütlelerdeki (izobarik) kararlı izotopik işaretleyiciler ile kimyasal olarak etiketlenmesidir. Dört farklı örnek için dört farklı işaretleyici mevcuttur. İşaretleme sonrası, örnekler karıştırılır, tripsin ile parçalanır ve beraberce SK-KS-KS ile analiz edilirler.	Peptidlerin KS-KS analizi ile biyomarkırların direkt olarak belirlenebilmesi, İzobarik işaretleyicilerden dolayı, tek bir KS yürütmesinde dört örneğin hepsinde aynı peptidin KS-KS için seçimi, kitteki miktarı bilinen referans peptid işaretleyicilerden biri ile işaretlendiğinde, kesin miktar tayini	Düşük verimlidir (bir yüklemde dört örnek) zaman alıcıdır, fazla örnek gereklidir PTM izobarik değildir, bu nedenle, aynı KS yürütmesinde seçilemez. Örnek kompleksliliği yüksektir. Ayırım sınırlıdır. İzobarik peptidlerin birlikte elue olmasıyla karmaşıktır.
MALDI-TOF-MS	Protein karışımı, altın bir plate üzerine uygulanır, proteinler plateden lazer enerjisi ile desorbe edilir, proteinlerin kütleleri ve piklerinin yoğunlukları uçuş zamanı ile ölçülür, Bir çok örnek arasında pik yoğunlukları karşılaştırılır.	Yüksek verimlidir. (Bir biyoişlemci başına 96 örnek yüklenebilir) Bütün örneğin direkt olarak uygulanması mümkündür. Düşük miktarda örnek yeterlidir. Hızlıdır. PTM belirlenebilir.	Kompleks örneklerin fraksiyonlarına Plate başına 1536 ayrıştırılması gerekir, fazla miktarda örneğe ihtiyaç vardır, yüksek molekuler ağırlıklı (>100kDa) proteinler için uygun değildir.
SELDI-TOF-MS	MALDI-TOF-MS in bir varyasyonudur. Protein karışımının seçilen kısmı, spesifik kromatografik yüzeye bağlanır ve kalanı yıkanıp uzaklaştırılır.	Yüksek verimlidir (Bir biyoişlemci başına 96 örnek yüklenebilir) Bütün örneğin direkt olarak uygulanması mümkündür. Düşük miktarda örnek yeterlidir. Hızlıdır. PTM belirlenebilir.	Yüksek molekuler ağırlıklı (>100kDa) proteinler için uygun değildir. Bağlanan proteinler ölçüldüğü için sınırlı ölçüm, MALDI-TOF dan daha düşük ayırma gücü ve kütle doğruluğu

2.2.4. SELDI-TOF-MS

Yüzey ile geliştirilmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon kütle spektrometrisi [surface enhanced laser desorption ionization (SELDI) MS], MALDI-MS'in bir varyasyonudur. SELDI'de, MALDI'nin yüzeyi, daha kompleks karışımlarda kullanılmak için kromatografik kolonu taklit ederek modifiye edilmiştir ve lazer desorpsiyonuna dayanan bir metoda imkan verir. Bu teknik, kanser proteomiksinde yaygın olarak kullanılmaktadır (31).

Hutchens ve Yip'in çalışmaları temelinde, CIPHERGEN Biosystems Inc., yüzey ile geliştirilmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon (SELDI) Protein çip® KS teknoloji platformunu geliştirdi (34).

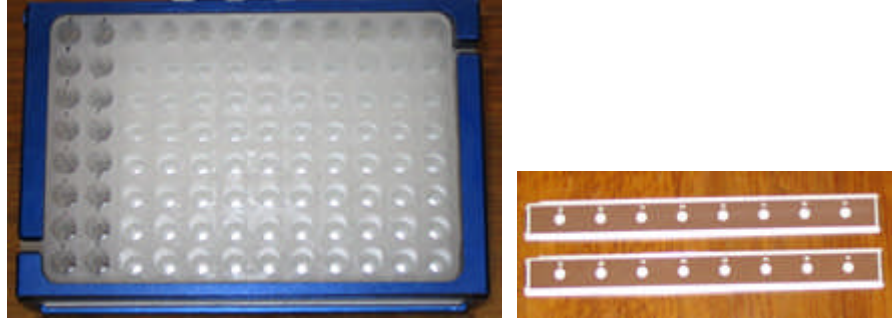


Şekil 4. Bireysel ve Kurumsal SELDI-TOF-MS (61)

Bu teknik ilk kez erken dönemdeki over kanserinde kullanılmıştır ve bazı ayırt edici proteinler belirlenmiştir (36). Bu ilk kullanımdan beri kanser (37-40) ve diğer hastalıklarda SELDI-TOF uygulamaları birçok raporda açıklanmıştır. SELDI-TOF, bir dokudan veya bir hücre serisinden hücre lizatlarının analizi (41-43) için kullanışlıdır. Fakat klinik uygulamada, beklenti daha çok serum gibi kolay elde edilebilen vücut sıvılarının uygulanabilir olması yönündedir (32).

Protein çip dizin biyoislemcisi, 12 adet protein çip dizini içerir. Her protein çip dizini, 8 adet kromatografik spota sahiptir. Bu, 96 örneğin paralel olarak çalışmasına ve

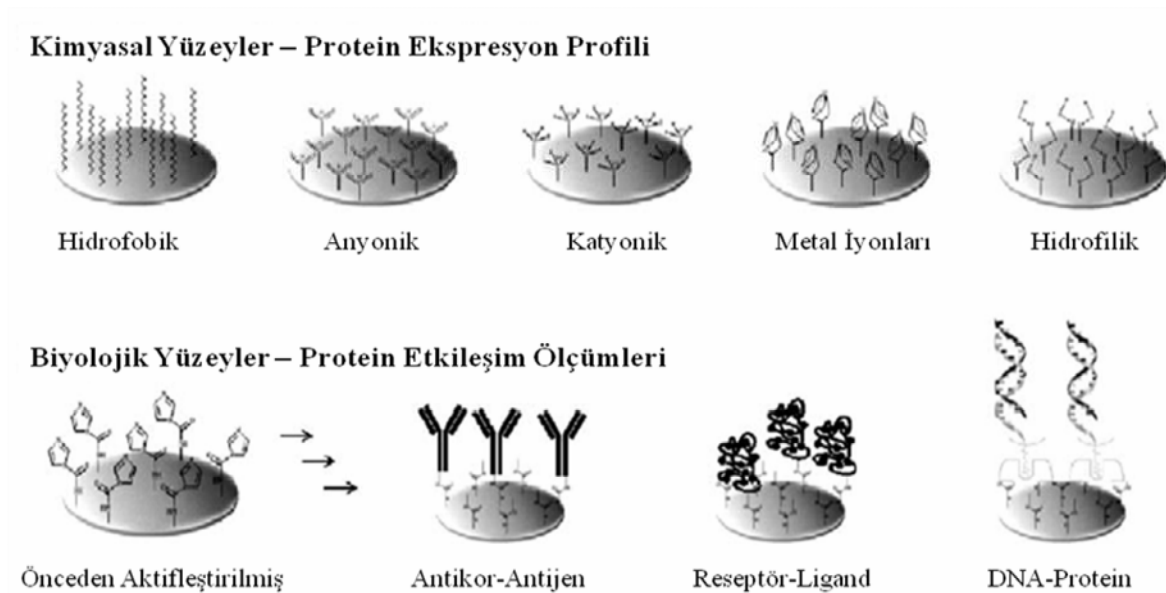
matriksin robotik işleme uygulanmasına imkân verir (62). Şekil 5’de Protein çip Dizin Biyoişlemcisi ve bir adet protein çip dizini gösterilmiştir.



Şekil 5. Protein çip Dizin Biyoişlemci ve Protein çip dizini (63)

2.2.4.1. SELDI-TOF-MS’in Prensibi

Protein içeren çözeltinin her hangi bir tipi, protein çip dizinlerinin spotlarına direkt olarak uygulanabilir. Bu spotlar, belli fizikokimyasal karakterli (hidrofobik, katyonik, anyonik, metal iyonu içeren veya hidrofilik) yüzeylerden oluşur veya örnek yüklemesinden önce, elde edilecek moleküllerin (protein, DNA, RNA) bağlanması için önceden aktifleştirilmiştir (60). Şekil 6’da protein çip dizinlerinin farklı tipleri gösterilmiştir.



Şekil 6. Protein çip Dizininin farklı tipleri (60)

Kromatografik Protein çip dizinleri hidrofobik, katyonik, anyonik, metal iyonları ve hidrofilik spotlar içerir. Bu 'kimyasal yüzeyler' protein ekspresyonu profili çalışmaları için en iyi şekilde dizayn edilmiştir. Protein çip dizinlerinin diğer bir serisi, antikör-antijen ölçümleri, reseptör-ligand etkileşim çalışmaları ve DNA-protein bağlanma deneylerindeki biyomoleküllerin uygulama ile bağlanması için tasarlanmış, önceden aktive edilmiş 'biyolojik yüzeyler'dir (60). Tablo 6'da protein çipi dizinlerinin türleri ve özellikleri özetlenmiştir.

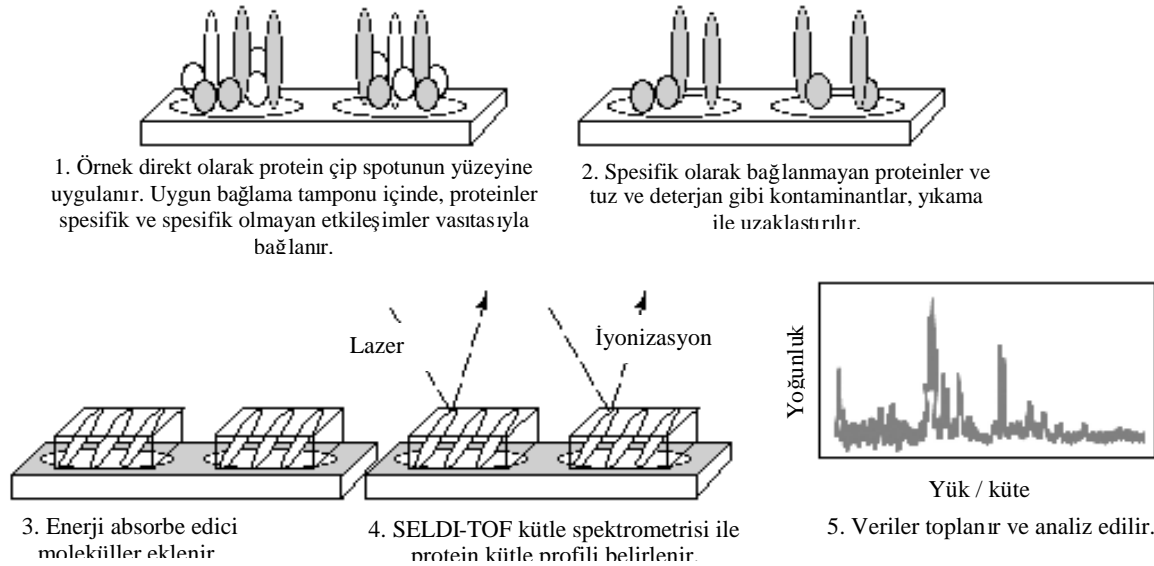
Tablo 6. Protein çip dizin türleri ve özellikleri (64)

Dizin Türü	Yüzey Kimyası	Amaç
Kuvvetli Anyon Değişimi Q10	Hedef proteinin yüzeyindeki negatif yüklerle (Aspartik veya glutamik asit) etkileşen katyonik, kuaterner amonyum grupları içerir.	Negatif yüklü molekülleri bağlar. Düşük izoelektrik noktasına (pI) sahip proteinlerin analizi yapılır.
Zayıf Kayon Değişimi CM10	Analitin yüzeyindeki pozitif yüklerle (lizin, arginin, histidin) etkileşen zayıf anyonik karboksilat grupları içerir.	Pozitif yüklü molekülleri bağlar. Yüksek izoelektrik noktasına (pI) sahip proteinlerin analizi yapılır.
İmmobilize Metal Affinite Yakalama IMAC30	Metal iyonlarını şelatlayan nitrilotriasetik asit (NTA) grupları içerir. Yüzeğe uygulanan protein şelatlanmış metal iyonunu histidin, triptofan, sistein ve fosforillenmiş aminoasit rezidüleri vasıtasıyla bağlayabilir.	Metal bağlayıcı, fosforillenmiş ve polihistidin(His)-işaretli proteinlerin analizi
Hidrofobik/ Ters faz		
H50	C6, C12 alkil kromatografik ortamlarının özelliklerini taklit eden metilen zincirleri içerir.	Hidrofobik veya ters faz etkileşimlerle büyük proteinleri bağlar
H4 ⁺	16 metilen gruplarının zincirlerini içeren aktif spotlardır. Proteinleri ters faz kimyası ile bağlar. Alanin, valin, lözin, izolösin, fenilalanin, triptofan veya tirozin açısından zengin proteinleri bağlar.	Hidrofobik veya ters faz etkileşimler vasıtasıyla daha küçük proteinler ve peptidleri bağlar.

SELDI-TOF-MS'de ekspresyon farklılığı haritalandırması deneyleri için kromatografik yüzeyler kullanılır. Örnek ihtiyacı düşüktür (1-10 µg total protein/spot) ve örnek hacmi özgürce seçilebilir (0,5 µL dan yaklaşık 400 µL'e kadar) Kısa bir inkübasyon periyodu sonrası, spot yüzeyine bağlanmayan proteinler ve kontaminantlar yıkayarak uzaklaştırılır. Bunu takiben, MALDI matriksi olan enerji absorbe edici molekül (EAM) çözeltisi, her spota uygulanır ve protein çip dizini protein çip okuyucusunda analiz için hazır hale gelir (60, 62). Kullanılan matriksler CHCA (α -siyano-4-hidroksisinnamik asit) ve SPA (sinapinik asit)'dir. CHCA, kütle/yük oranı 3,000–10,000 Da arasında olan küçük

moleküller için; SPA ise kütle/yük oranı 8.000–25,000 Da arasında olan daha büyük protein ve peptidler için kullanılır (39, 64).

Şekil 7’de Protein çip spotlarına örnek uygulanması ve protein çip okuyucusunda analiz için hazır hale getirilmesi gösterilmiştir (65).



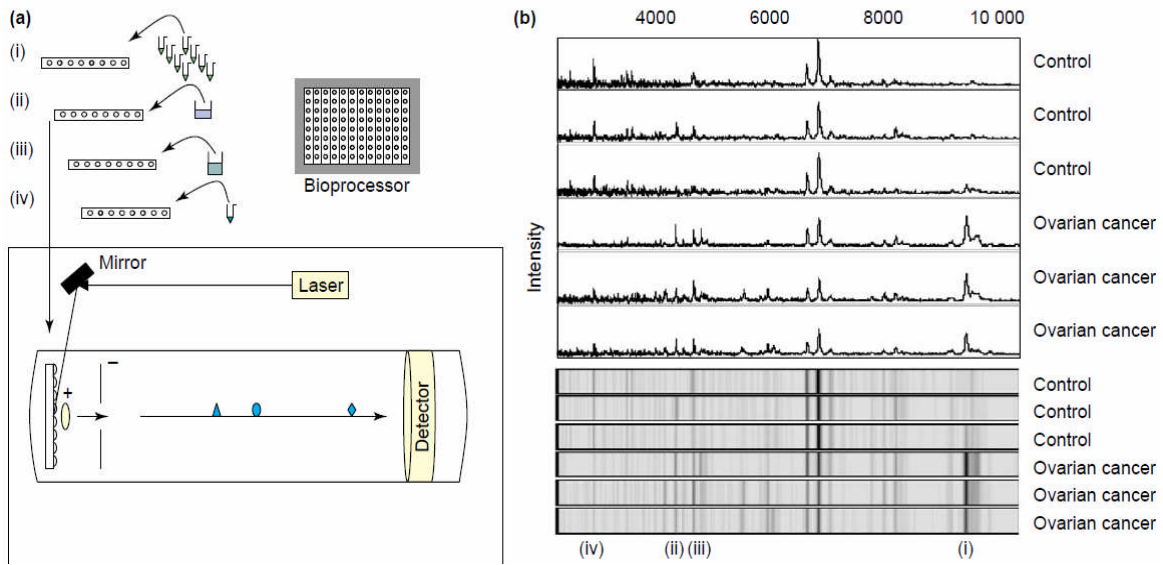
Şekil 7. Protein çip spotlarına örnek uygulanması ve protein çip okuyucusunda analiz için hazır hale getirilmesi (65)

Protein çip okuyucusu, yüksek oranda sensitif olan lazer dezorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisidir (Time of flight Analyzer-TOF-MS) (UZ-KS). UZ-KS, proteinlerin kütle/yük oranına ve proteinlerin çip yüzeyine bağlanma affinitesine bağlı olarak kompleks protein karışımlarının spektrumunu üretir. Farklı olarak ekspresse olan proteinler, pik yoğunluklarının karşılaştırılması vasıtasıyla bu protein profillerinden belirlenir (60).

Protein çip stripi, vakum bölmesinin içine yerleştirilir ve her spotta lazer ışını ile ateş edilir. Lazer enerjisi, iyonize olmuş proteinleri desorbe eder ve iyonlaşan proteinler, zıt yüklü elektroda doğru vakum tüpünden aşağı uçarlar. Her iyonun (m/z) değeri, uçan iyonun elektroda ulaşmak için geçirdiği zaman ile değerlendirilir (62). Uçuş zamanı analizöründe, bir iyonun vakum içinde detektöre ulaşma süresi, proteinin moleküler ağırlığı ile orantılıdır (31). Küçük iyonlar daha hızlı hareket eder (62).

Sonuçlar başlangıçta grafik içinde gösterilir. Grafikte; örnek bileşenlerinin kütle/yük oranı x-ekseninde, karşılık gelen sinyal yoğunlukları, y-eksenindedir. Protein çip

yazılımı, kullanıcıya, otomatik ölçümü kontrol etme ve etkileme olanağını verir ve yüksek sayıdaki örneklerin karşılaştırmalı analizi için yazılım araçlarının geniş bir aralığını birleştirir. Böylece, bütün ekspresyon farklılığı haritalandırması tekniği, hızlı birkaç basamaklı işlem ile uygulanabilir (60). Şekil 8’de, Protein çip Sistemi kullanılarak SELDI-TOF-MS ile ekspresyon farklılığı haritalandırması deneyi gösterilmiştir (32).



Şekil 8. Protein çip Sistemi kullanılarak SELDI-TOF-MS ile ekspresyon farklılığı haritalandırması (32)

(a) Protein profilinin çıkartılması

- (i) Hastalıklı ve sağlıklı şahıslardan alınan mikrolitre düzeyindeki örneğin hidrofilik, hidrofobik, katyonik, anyonik veya immobilize metal affinite yakalama kromatografik yüzeyli sekiz spotlu dizin üzerine uygulanması
- (ii) Uygun bağlanma tamponunun eklenmesi
- (iii) Bir veya daha fazla yıkama tamponu ile çip üzerinde örnek saflaştırması
- (iv) Lazer enerjisinin absorpsiyonu için enerji absorbe edici matriksin (sinapik asit) uygulanması. Lazer irradasyonu bağlı proteinleri resorbe eder ve onları pozitif olarak yükler. Elektrik alanından ötürü, iyonlaşan proteinler, kütle analizörü (TOF-MS) içinde göç ederler: küçük (karo) ve çok yüklü proteinler (oval), büyük ve tek yüklü olanlardan (üçgen) daha hızlıdır. Böylece proteinler ayrılır. Uçuş zamanı, (t) proteinin kütesinin yüküne oranı ile orantılıdır. m/z : sabit $\times t^2$

(b) SELDI-TOF kütle spektrumu ve spektrumun jel görünümü olarak gösterilmesi:

Proteinin m/z değeri, x-ekseni üzerinde, protein miktarı ise y-ekseni üzerinde gösterilir. Spektra, ProteinChip® biyoinformatik yazılımı veya diğer uygun istatistikler ve biyoistatistikler kullanılarak, farklı ekspresse olan protein m/z değerleri araştırılır. Bilgisayar algoritmaları, hastalıklı ve sağlıklı örnekleri ayırt edici m/z değerleri ile modeller (örn: sınıflandırma ağacı) inşa etmek için kullanılır.

- (i) 9.2 kDa daki bir pik (haptoglobin fragmenti) over kanserinde fazla ekspresse olmuştur. Ekspresyonu artan diğer pikler (ii) 4,1 kDa (iii) 4,5 kDa da görünmektedir ve ekspresyon azalması olan bir pik (iv) 2,7 kDa da görünmektedir.

Tablo 7’de SELDI-temeline dayanan protein çip biyomarkır sisteminin özellikleri özetlenmiştir.

Tablo 7. SELDI-temeline dayanan Protein çip Biyomarkır Sisteminin Özellikleri (60)

Örnek	Önişleme gerek yoktur. Örnek direkt olarak uygulanabilir. Örnek ihtiyacı düşüktür. Peptid sensitivitesi femtomolar seviyededir.
Analiz	Tamamen otomatize edilmiştir. Lazer pozisyonunun manual olarak ayarlanması yoktur.
Ölçme	Sinyal yoğunluğu protein konsantrasyonu ile orantılıdır. Standart eğriler, kesin ölçüme izin verir.
Karşılaştırmalı Analiz	Karşılaştırmalı ekspresyon profili ve markır teşhisi için yazılım araçları çeşitlidir. Biomarker Patterns yazılımı ile çok değişkenli karar ağacı analizleri yapılır.
Protein Saflaştırması	Saflaştırma protokollerinin uygulanması spot üzerindedir.
Spot üzerinde İşlem	Örnek kaybı yoktur. Enzimatik reaksiyonlar, analiz öncesi direkt olarak spot üzerinde yapılabilir.
Protein Belirlenmesi	Protein çip okuyucusu ile spot üzerinde peptid haritalandırması vasıtasıyla yapılır. Ek dizi belirleme kapasitesi, Tandem-MS-arayüzeyi ile olur.
Zaman	Manual modda günde 100 örnek, Otomasyonla günde 400 örnek
Kullanım	Bir haftalık eğitim sonrası profesyonel kullanım

2.2.4.2. SELDI-TOF-MS’in Avantajları

SELDI, mevcut diğer teknolojilere göre birçok avantaja sahiptir. SELDI, hızlıdır, kullanımı kolaydır, tekrarlanabilir, yüksek derecede hassastır (ölçüm limiti, femtomolar seviyededir) ve diagnostik formata kolaylıkla adapte edilebilir. Ek olarak, belirlenmesi zor olan moleküller, SELDI platformunun kullanımı ile kolaylıkla ölçülebilir (34). SELDI-MS, özellikle 20 kDa dan daha hafif ağırlıklı molekülleri (bu kütle aralığı sitokinler, sinyal peptidleri ve kan serumunda bulunan proteolitik fragmentlere karşılık gelir) ölçmek için adapte edilmiştir (58).

KS ile analiz öncesi, fazla örnek işlemi olmadan, kompleks protein karışımlarını kolaylıkla ayırabilme potansiyeline sahiptir. Bu özellik, proteinleri selektif olarak yakalayan kromatografik çip yüzey teknolojisinin kullanılması ile kazanılmıştır. Proteinler parçalanmadan, bozulmamış bir şekilde analiz edilir (35).

SELDI’nin en belirgin olan avantajlarından biri, diğer analitik yöntemlerde problemlere neden olan tuzların ve deterjanların, analiz öncesi uzaklaştırılmasıdır. Bundan başka, diğer bütün spesifik olmayan bileşenler uzaklaştırıldığı için, Protein çip okuyucusunda sadece spot yüzeyi ile aktif bir şekilde etkileşen proteinler analiz edilir. Bu,

düşük konsantrasyonlarda bulunan biyomarkırların belirlenmesinin artmış olasılığı ile sonuçlanır (60).

Protein piklerindeki değişiklikler veya spektralarındaki m/z oranları, patofizyolojik olayların altında yatabilecek protein değişikliklerini belirlemek için kullanılabilir. Alternatif olarak, SELDI-TOF peptid kütle pırmakızı (PKP) oluşturmak için de kullanılabilir. Oluşturulan bu PKPler, sonradan veritabanında yer alan proteinlerin teorik PKPleri veya DNA-dizi-türevli PKPler ile karşılaştırılabilir (35).

2.3. Kanser

Kanser, birçok genetik ve çevresel faktörün etkileşimi sonucu oluşan multifaktoriyel bir hastalıktır (33). Kanser ayrıt edilebilir fakat birbiri ile yakından bağlantılı üç evreden oluşan karsinogenez mekanizmalarının bir sonucudur (66). Bu evreler, başlangıç, ilerleme ve gelişme evreleridir (67) .

Başlangıç fazı karsinojenin hedefe bağlanmasını ve DNA hasarını içine alan hızlı bir mekanizmadır (67). Başlangıç evresinde, hücreye hızlı ve onarılamaz bir saldırı olur. Saldırı, başlangıçta bir karsinojenin alınmasından dolayıdır ve daha sonraki kararlı genotoksik hasara, karsinojenin kendisinin metabolik aktivasyonu neden olur. Kanserin başlangıcının diğer sebepleri oksidatif stres, kronik inflammasyon ve hormonal dengesizliktir (66).

İlerleme ve gelişme fazlarının her ikisi, uzun süreçlidir, muhtemelen birkaç yıl sürer. Genellikle geri dönüşümsüz olan ilerleme fazında, mitojen olarak fonksiyon gösteren tümör promotörleri (destekleyicileri) başlangıç aşamasındaki hücreleri büyümeleri için indükler. Bu evrede, proliferasyon ve apoptoz için önemli olan hücresel kontrol noktalarının ve düzenleyici proteinlerin fonksiyonel kaybı meydana gelir (67). Dönüşüm geçirmiş hücreler, preneoplastik hücreleri oluşturmak için birçok değişikliğe doğru gider. Serin treonin kinaz, Akt kinaz/protein kinaz B (Akt [PKB]), aktivatör protein 1 (AP-1), nüklear faktör kappa B (NF-κB), mitojen ile aktifleşen protein kinaz (MAPK), androjen reseptör, östrojen reseptör ve Raf/Ras mekanizmaları gibi regüle edilemeyen sinyal iletim mekanizmaları karsinogeneze katkıda bulunur (66).

Gelişme fazında, fenotipik ve genotipik olarak değişen hücreler, geri dönüşümsüz makroskopik değişiklikler geliştirir (67).

2.3.1. Kanser Tedavisi

Karsinogenez, çok basamaklı bir olay olduğu için her basamakta meydana gelen olayların bilinmesi, kanserin gelişimini önlemek ve inhibe etmek için hareket biçimini yönlendirebilir (2). Kemopreventasyon, karsinogenez mekanizmasını bloke etmek veya geciktirmek için spesifik ajanların kullanımı olarak açıklanır (44). Bu ajanlar, etkilerini oksijen radikallerini yakalayarak, poliamin metabolizmasını inhibe ederek veya hücrelerde bulunan sinyal iletim mekanizmalarını, hormonları, büyüme faktörlerini veya hedef reseptörleri düzenleyerek gösterebilir. Bu ajanlar, tümör hücrelerinin büyümesini geciktirmek için, immün cevabın yenilenmesi, apoptozun indüksiyonu, anjiogenezin inhibisyonu ve antimetastatik genlerin ve diğer mekanizmaların aktivasyonu vasıtasıyla etki gösterebilir (46). Birçok araştırmanın hedefi, kanserin önlenmesi ve/veya tedavisinde kullanılacak doğal veya sentetik bileşikler keşfetmektir (68).

Kemoterapi, genellikle, birçok kanser tipinde teşhis sonrası en iyi sonucu almak için erkenden verilir. Fakat kemoterapötik ilaçlar, toksisite ile ilişkilidir. Bu toksisiteye, antikanser ilaçların karaciğerde biyotransformasyonu vasıtasıyla oluşan reaktif metabolitler neden olur. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, heterosiklikaminler ve nitrozaminler gibi diyetel karsinojenler, DNA hasarına ve kansere sebep olmak için metabolik aktivasyona ihtiyaç duyarlar. Karsinojenin aktivasyonu, primer olarak faz I enzimleri tarafından katalizlenir. Korunma, aktive edici enzimlerin inhibisyonu veya detoksifikasyona ve karsinojenin idrarla hızlı bir şekilde atılmasına yol açan faz II enzimlerinin indüksiyonu vasıtasıyla sağlanabilir (33).

Bütün terapötik rejimler, hematolojik toksisiteyi içeren birçok yan etki üretir. Farklı kemoterapötik ajanların tek dozda bile alınmasının kemik iliği aplazisi ile sonuçlandığı genel bir kabuldür. Bu hematolojik toksisite, doğal orijinli olsa bile bütün kemoterapötik ajanlarla gözlenmektedir (17).

2.3.2. Antioksidanlar ve Kanser Tedavisi

Reaktif oksijen türleri (ROT), ikinci haberci, antibakteriyel ajan, mutajen, yaşlanma ve büyüme stimüle edici gibi birçok hücrel fonksiyon gösterir (69). Serbest radikaller, karbohidratlar, proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllerde oksidatif hasarı indükler. Bu oksidatif hasar, hücrede değişikliğe ve hücrenin ölümüne sebep olabilir (7).

Oksijen radikalleri, özellikle hidroksil radikali (.OH), azotlu bazları modifiye eder, DNA yı parçalar, onkogen aktivatörlerini stimule eder ve muhtemelen diğer yollarla karsinogeneze katkıda bulunur (67). Kısacası ROT leri DNA hasarının indükleyerek ve intrasellüler sinyalleri değiştirerek kansere neden olur (69).

Yaşayan organizmaların dokuları, oksidatif hasara karşı kendi koruyucu ajanlarına sahiptirler. Bunlar başlıca süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz gibi antioksidatif enzimatik sistemler ve tokoferol, askorbik asittir (7).

Antioksidanların endojen veya eksojen olarak üretilen zararlı reaktif oksijen türlerine karşı organizmanın savunmasını artırdığı önerilmektedir. Bitkilerde bulunan düşük moleküler ağırlıklı moleküller olan polifenoller bu sınıfın büyük çoğunluğunu oluşturur (7, 67).

Antioksidan vitaminlerin (askorbik asit, beta-karoten, alfa tokoferol), minerallerin (selenyum) ve vitamin olmayan doğal antioksidanların (glutasyon) kanserin önlenmesindeki potansiyel rolü, belirlenmiştir. Birçok deneysel ve epidemiyolojik çalışma, laboratuvar hayvanlarında ve insanlarda, düşük antioksidan içeriği ile artmış kanser riski arasında korelasyon olduğunu önermektedir (67).

Flavonoidler, çeşitli bitkiler tarafından yüksek miktarda üretilen iyi bilinen fitokimyasallardır (bitkilerde bulunan biyolojik olarak aktif çeşitli bileşiklerdir). Flavonoidlerin gözlenen *in vitro* biyolojik etkileri şunlardır: serbest radikal yakalama, enzimatik aktivitenin düzenlenmesi, hücresel proliferasyonun inhibisyonu, anti-biyotik, anti-allerjik, anti-ülser ve anti-inflammatuar ajanlar. Flavonoidlerin kemopreventiv aktiviteleri onların yapısal özelliklerine bağlıdır (67). Doğal flavonoidlerle kanser terapisinin yeni yaklaşımı, tedavinin kalitesini geliştirmek ve kanser ve anti kanser ilaçlara karşı maksimum koruma sağlamak için araştırılmaktadır (33).

2.4. Prostat Kanseri

Prostat kanseri, son on yılda, batı ülkelerinde erkeklerde en sık teşhis edilen kanserdir. Prostat kanseri, birçok genetik ve çevresel faktörle ortaya çıkan bir kanser olarak gözükmektedir. Genetik faktörlerin etkisi %10'dan daha azdır (44).

Prostat kanserinin sıklığı ve mortalitesinde ırksal ve etnik farklılıklar teşhis edilmiştir. Prostat kanserinin sıklık ve ölüm oranları, Afrika-Amerika ırkında 271.3 ve 70.4; Kafkas ırkında 167.4 ve 28.8; İspanyol ırkında 140.0 ve 23.5 ve Asya-Amerika

ırkında 100.7 ve 13.0 dır (44). Prostat kanseri, ABD’de ve diğer batı ülkelerindeki erkek kanserlerinin en sık olanıdır ve ABD’de erkek kanser ölümlerine yol açan ikinci kanserdir (24, 45).

Bundan başka, prostat kanserinin sıklığında coğrafik varyasyonlar da gözlenmiştir. Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa’da en sık; Akdeniz Bölgesinde orta seviyede; Asya’da ise en düşük seviyededir. Ekolojik çalışmalar sonucunda prostat kanseri gelişiminde batı diyetinin etkisi olduğu gösterilmiştir. Batı diyetini benimsemiş olan Asya göçmenlerinde prostat kanserinin sıklık oranında artış görülmüştür ve prostat kanserinin çevresel faktörlerle ve diyet içeriği ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (44). Prostat kanserinin pek çok ülkede paralel insidans oranı gösterdiği ve benzer diyet faktörlerinden (ör: yağ tüketimi) etkilendiği öne sürülmektedir (70). Siyah ırkta daha sık görülen prostat kanserinden fruktozdan zengin, kalsiyumdan fakir diyet uygulanmasıyla ve D vitamini hidroksilasyonunun uyarılması vasıtasıyla korunmanın mümkün olabileceği ileri sürülmektedir (71).

Prostat kanseri çok yaygın olmasına rağmen, prostat kanserinin etyolojisi ve gelişimini tetikleyen faktörler iyi anlaşılamamıştır (24). Prostat kanserinin gelişim mekanizması, normal bez epitelyumunun preneoplastik lezyonlara ve invaziv karsinomaya dönüştüren genetik ve epigenetik (genetik faktörlerden çok çevresel faktörlerin sonucudur) değişikliklerin sonucudur. Epigenetik olgu (fenomen) ve artan prostat spesifik antijen (PSA) ve insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF-I) gibi biyokimyasal değişiklikler, prostat kanseri gelişiminden daha önce meydana gelir. Prostat kanserinin belli evrelerinde olguların büyük çoğunluğunda görülen 6q, 7q, 8p, 10q, 13q, 16q, 17q ve 18q kromozomlarının kaybı beraberinde kromozomal anormallikler belgelenmiştir. 8p21.2 üzerinde yer alan bir gen olan NKX3.1, prostatik tümörögenезin başlangıç evresinde yer almaktadır. Ek olarak DNA hipermetilasyonu, DNA hipometilasyonu ve histon asetilasyonu prostatik tümörögenезe katkıda bulunmaktadır. Prostat kanserinde, DNA hasarını tamir eden enzimlerin genlerinde (Glutasyon S-transferaz ve O-metilguanin DNA metiltransferaz) hipermetilasyon olduğu rapor edilmiştir. Prostat kanseri tiplerinin % 70’inden fazlasında Glutasyon S-transferaz1 gen promotorunun metilasyonu ölçülmüştür (44). Prostat kanseri nedeniyle ölümün başlıca nedeni, kanser hücrelerinin kemik ve lenf nodlarına metastazıdır (45).

Prostat kanseri hastalarını tedavi etmek için prostatektomi, radyasyon terapisi ve hormon tedavisi kullanılmasına rağmen, prostat kanserinin tekrarlaması ve metastazı,

prostat kanseri terapisindeki başlıca problemlerdir. Bugünkü kullanılabilir tedaviler çoğunlukla idrar tutamama, erektil fonksiyon kaybı gibi yan etkilere yol açmaktadır (24). Bu nedenle, prostat kanserinin tedavisi ve önlenmesi için yeni terapötik yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Son çalışmalar, birçok diyetsel kanser kemopreventiv ajanların prostat kanserinin insidansını düşürmek için ümit verici stratejiler sağladığını göstermiştir (45). Selenyum, E ve D vitaminleri, likopen, izoflavonoidler ve düşük yağlı diyet tüketiminin prostat kanseri riskini düşürdüğüne dair deliller vardır (46).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

3.1.1. Cihaz ve Malzemeler

Hücre kültür kabini (Kendro Hera Safe Laminar flow SN: 40475981), invert mikroskop (Olympus CK-2), CO₂ inkübatörü (Steri-Cycle ThermoForma Hepa Filter SN: 301896-251 model 381), ısıtmalı karıştırıcı (eppendorf AG 22331 SN: 535509550), mikrosantrifüj (Beckman Counter SN: 270-605133-A), mikrosantrifüj (Thermo micromax SN: 8035/2), masaüstü santrifüj (eppendorf centrifuge 5810 SN: 11259), hassas terazi (Oertling NA 164), ELİSA okuyucu (Tunable VERSAmax microplate reader,US), çalkalayıcı inkübatör (Shelleb/Sheldon Mod:514,USA), öğütücü (Retsch ZM 200, Germany), vorteks (MS2 Minishaker IKA SN: 03-205515), çalkalayıcı (SN:02-1182), SELDI-TOF (CIPHERGEN Biosystems, Fremont; CA, USA, PCS4000 TOF-MS Personal Seri No: 5A1108P), aspiratörlü pipet (Vitalp, pipet controller), membran filtreleri (SCH Schleicher&Schuell FB 030/3 0.2µm/7bar max), semiotomatik pipetler (0.5-10 µl, 10-100µl, 100-1000µl), steril 96'kuyucuklu pleyt (Orange Scientific), standart T-25, T-75, T-150 hücre kültür flaskları, 15 ml'lik ve 50 ml'lik steril falcon tüpler, steril cam pipet (HBG W-GERMANY), 25 ml, 10 ml ve 2 ml'lik steril disposable pipetler, steril pipet uçları (Sorenson Bioscience, inc Muti Fit Guard Filter Tips), mikrosantrifüj tüpü, beher, baget, balon joje, cam şişe gibi çeşitli cam malzemeler, 20 ve 50 ml'lik steril enjektör, steril cerrahi eldiven, dondurucular (-80 C° ve -20 C°) ve buzdolabı (+4C°).

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

Dimetil sülfoksit (DMSO, Merck), Na₂CO₃ (Sodyum karbonat), Folin Reaktifi, gallikasit, etanol, Al(NO₃)₃, Potasyum Asetat (KCH₃COO), kuersetin, NaH₂PO₄.2H₂O,

Na₂HPO₄.2H₂O, K₃Fe(CN)₆, TCA (Trikloroasetik asit), FeCl₃, troloks, total antioksidan kapasite (TAK) kiti (Kat No: RL001), PC-3 prostat kanseri hücre serileri, EDTA, tripan blue, DMEM/F:12, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür), NaCl, KCl, KH₂PO₄, HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etansülfonik asit), gliserol, Triton X-100, Proteaz İnhibitör kokteyli (SIGMA, Kat No: P8340-5 ML.), RPMI 1640 (1x + L-Glutamine) (GIBCO), DMEM/Ham's F12 + L-glutamine (Sigma), Penisilin + Streptomisin (Sigma), FBS (Fetal Bovine Serum GIBCO), Bovine Serum Albumin (SIGMA, Kat No: A9576-50ML), CHAPS (3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate), DTT (ditiyoteritol), tris, HCl, NaOH, NH₄Ac (amonyum asetat), Triton X-100, TFA (Trifloroasetik asit), SPA (Sinapinik asit) (Kat. No:0705161), ACN (Asetonitril), ProteinChip All-in-One-Protein Standart II (Bio-Rad) (Kat No: #C10-00007), NP20 çip dizini (Çip No:1050177250), CM10 çip dizini (Kat No: #C57-30075 CM100802112), Q10 çip dizini (Kat No: #C57-30080 Q100704122).

3.2. Metodlar

3.2.1. Propolis Örneklerinin Temini

Propolis numuneleri S.S. Trabzon Merkez Tarımsal Kalkınma Kooperatifi tarafından temin edildi. Propolis numuneleri Trabzon ilinin çeşitli yörelerinden toplanarak elde edildi.

3.2.1.1. Propolisin DMSO ve Sulu Ekstraktının Hazırlanması

-80 C° de dondurulmuş olan propolis örnekleri rendelenip tekrar -80 C° de donduruldu. Rendelenen propolis blendırda toz haline getirildi. 5'er gram toz propolis 20 mL saf DMSO (Dimetilsülfoksit) ve 20mL saf su ile çözüldü. İyice vortekslendikten sonra 60 C° de 150 rpm'de sürekli çalkalanarak 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 4000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatanı tam çökmeyen partikül içeren propolisin sulu ekstraktları tekrar 10000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar daha sonra kullanılmak üzere aligotlanıp +4C° de, karanlıkta saklandı.

3.2.1.2. Ektraktlarda Total Polifenol Miktarının Belirlenmesi

Total polifenol miktarı modifiye edilmiş Folin-Ciocalteu spektrofotometrik metod ile belirlendi. Metod, fosfotungstikasitin ($H_3P[W_3O_{10}]_4$) bazik çözeltide fosfotungstik mavisine indirgenmesine dayanır. Oluşan fosfotungstik mavisinin absorbanansı, aromatik fenolik grupların sayısı ile orantılıdır ve standart olarak gallik asit kullanılır (72). Oluşan mavi rengin absorbanansı, 765 nm’de ölçülür (73).

- **Çözeltilerin Hazırlanışı**

1. %20’lik Na_2CO_3 Çözeltisi: 5 g Na_2CO_3 tartıldı saf su ile çözülüp 25 mL’ye tamamlandı.

2. Folin Reaktifi: 1 mL 2N derişik Folin reaktifi, 9 mL saf su eklenerek, 1:10 oranında seyreltildi. Kullanım öncesi hazırlanarak, taze olarak kullanıldı.

3. Standartlar: 0,01 g gallikasit 1 mL saf su ile çözülerek, 1000 $\mu g/mL$ lik gallik asit standardı elde edildi. 1000 $\mu g/mL$ lik gallik asit standardından su ile 200, 150, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 $\mu g/mL$ lik gallik asit standartları hazırlandı.

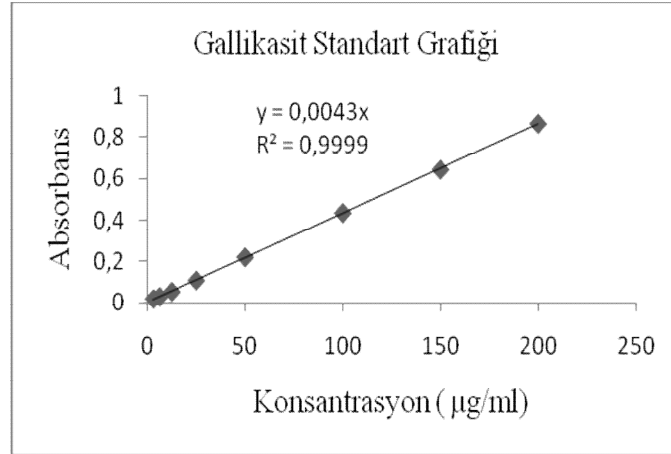
- **Deneyin Yapılışı**

Tablo 8’deki pipetlemeler 96 kuyucuklu Elisa pleytinde yapıldı (74).

Tablo 8. Propolisin DMSO’lu ve sulu ekstraktlarında total polifenol tayininin yapıılışı

	Kör	Standart	Numune
DMSO/Su	12.5 μL	-	-
Ekstrakt	-	-	12.5 μL
Standart	-	12.5 μL	-
1:10 Folin Reaktifi	62.5 μL	62.5 μL	62.5 μL
%20’lik Na_2CO_3	125 μL	125 μL	125 μL
Total Hacim	200 μL	200 μL	200 μL
Oda ısısında karanlıkta 30 dk inkübe edildi			
700 nm’de Elisa Okuyucusunda absorbanans ölçüldü			

Sonuçlar, Gallik asit standart grafiğinden yararlanılarak mg Gallik asit / g propolis olarak hesaplandı. Her örnek için üç kez ölçüm yapıldı.



Şekil 9. Total polifenol tayini için gallik asit standart grafiği

3.2.1.3. Ekstraktlarda Flavonoid Miktarının Belirlenmesi

Total flavonoid miktarı, aliminyum klorür kolorimetrik metodu ile belirlendi. Metodun prensibi, $AlCl_3$ 'ün flavonların ve flavonollerin C-4 keto grubu ve C-3 veya C-5 hidroksil grupları ile asitte kararlı kompleksler oluşturmasına dayanır. Ek olarak, $AlCl_3$, flavonoidlerin A- veya B- halkalarının ortodihidroksil grupları ile kompleks oluştururlar (75).

• Çözeltilerin Hazırlanışı

1. %80'lik Etanol Çözeltisi: 80 mL saf Etanol 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.
2. %10'luk $Al(NO_3)_3$ Çözeltisi: 2.5 g $Al(NO_3)_3$ tartıldı, saf su ile çözülüp 25 mL'ye tamamlandı.
3. 1 M Potasyum Asetat Çözeltisi: 2.453 g KCH_3COO tartıldı, saf su ile çözülüp 25 mL'ye tamamlandı.
4. Standartlar: 0,01 g Kuersetin 804 µL saf etanol ile çözülerek suyla 1000 µL'ye tamamlandı. 1000 µg/mL lik kuersetin standardı elde edildi. 1000 µg/mL lik kuersetin standardından % 80'lik etanol ile 100, 75, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 ve 1,562 µg/mL lik kuersetin standartları hazırlandı.

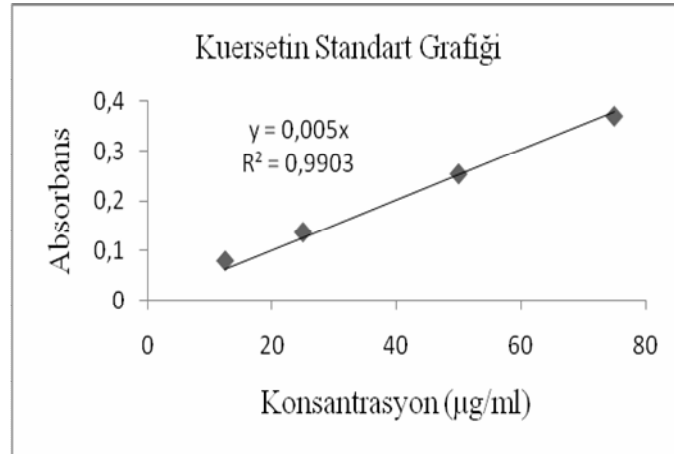
- **Deneyin Yapılışı**

Tablo 9'daki pipetlemeler 96 kuyucuklu Elisa pleytinde yapıldı (76).

Tablo 9. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarında flavonoid miktarının belirlenmesi

	Kör	Standart	Numune
%80'lik ve DMSO/Su	20 µL	-	-
Ekstrakt	-	-	20 µL
Standart	-	20 µL	-
% 80'lik Etanol	172 µL	172 µL	172 µL
% 10'luk Al(NO ₃) ₃	4 µL	4 µL	4 µL
1M KCH ₃ COO	4 µL	4 µL	4 µL
Total Hacim	200 µL	200 µL	200 µL
Oda ısısında karanlıkta 40 dk inkübe edildi			
415 nm'de Elisa Okuyucusunda absorban ölçüldü			

Sonuçlar, kuersetin standart grafiğinden yararlanılarak, mg kuersetin/g propolis olarak hesaplandı. Her örnek için üç kez ölçüm yapıldı.



Şekil 10. Flavonoid tayini için kuersetin standart grafiği

3.2.1.4. Demir İdirgeyici Antioksidan Potansiyel Tayini (Ferric Reducing Antioxidant Potential FRAP)

Ekstraktların antioksidan potansiyeli, düşük pH'da Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye indirgenmesine dayanan bir metod olan demir indirgeyici antioksidan potansiyel yöntemi ile belirlendi. İdirgeyici antioksidan potansiyel, troloks standart grafiğinden faydalanılarak hesaplandı (77).

- **Çözeltilerin Hazırlanışı**

1. Fosfat Tamponu (pH:6,6): 3,12 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, su ile çözülüp 100 mL ye tamamlandı. 3,56 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, su ile çözülüp 100 mL ye tamamlandı. 68,5 mL $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ çözeltisi ve 31,5 mL $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ çözeltisi karıştırıldı. pH sı 6,6'ya ayarlandı.

2. %1 lik $K_3Fe(CN)_6$: 1 g $K_3Fe(CN)_6$ tartıldı su ile çözülüp 100 mL'ye tamamlandı.

3. %10 luk Trikloroasetikasit (TCA): 5 g TCA tartıldı, su ile çözülüp 50 mL'ye tamamlandı.

4. %0,1 lik $FeCl_3$: 0,1 g $FeCl_3$ tartıldı, su ile çözülüp 100 mL'ye tamamlandı.

5. Standartlar: 0,001 g troloks, 1000 μ L etanol ile çözülerek 1000 μ g/mL lik Troloks standardı elde edildi. 1000 μ g/mL lik troloks standardından etanol ile 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.812 ve 3.9 μ g/mL troloks standartları hazırlandı.

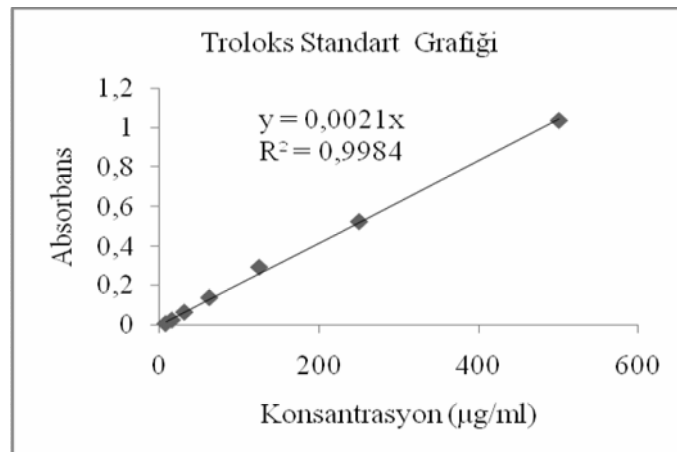
- **Deneyin Yapılışı**

Deney, modifiye edilerek Tablo 10'daki gibi yapıldı (78). Pipetlemelerin ilk dört aşaması 1,5 mL lik ependorfta yapıldı.

Tablo 10. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarında demir indirgeyici antioksidan potansiyelin ölçülmesi

	Kör	Standart	Numune
DMSO/Su	40 µL	-	-
Ekstrakt	-	-	40 µL
Standart	-	40 µL	-
Fosfat Tamponu (pH:6,6)	100 µL	100 µL	100 µL
%1 lik $K_3Fe(CN)_6$	100 µL	100 µL	100 µL
50°C'de 20 dak inkübe edilip, soğutuldu.			
%10 luk TCA	100 µL	100 µL	100 µL
Örnekler, 3000 g'de 5 dak santrifüjlendi.			
Üstteki fazlardan 100'er µL alınıp, 96 kuyucuklu Elisa pleytine aktarıldı.			
Saf Su	100 µL	100 µL	100 µL
% 0,1 lik $FeCl_3$	20 µL	20 µL	20 µL
Oda ısısında karanlıkta 5 dak inkübe edildi			
700 nm'de Elisa Okuyucusunda absorbans ölçüldü			

Sonuçlar, troloks standart grafiğinden yararlanılarak, mgTroloks /g propolis olarak hesaplandı. Her örnek için üç kez ölçüm yapıldı.



Şekil 11. Demir indirgeyici antioksidan potansiyel (frap) tayini için troloks standart grafiği

3.2.1.5. Total Antioksidan Kapasite (TAK)

Asidik ortamda (Asetat tamponu 30 mmol/l pH:3,6) hidrojen peroksid kullanılarak indirgenmiş ABTS molekülü $ABTS^+$ 'ya (2,2-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonat) okside olur. Asetat tamponu çözeltisinde konsantre $ABTS^+$ molekülleri (koyu yeşil) kararlıdır. Daha konsantre ve daha yüksek pH'lı bir asetat tamponu (Asetat tamponu 0,4 mol/l pH:4,5) ile seyreltildiği zaman renk, kendiliğinden ve yavaşça açılır. Örnekte bulunan antioksidan, renk açılma hızını konsantrasyonu ile orantılı olarak artırır. Reaksiyon spektrofotometrik olarak gözlenebilir ve rengin açılma hızı, örneğin total antioksidan kapasitesi ile ters olarak ilişkilidir. Reaksiyon hızı, troloks ile kalibre edilir (79). Ekstraktların, total antioksidan kapasitesini ölçmek için, hazır TAK kiti kullanıldı. Deney Tablo 11'deki gibi yapıldı.

- **Reaktifler**

Reaktif 1:

0.4 mol/l Asetat tamponu çözeltisi (pH 5.8) dir. 32.8 g CH_3COONa 1000 ml deiyonize su ile çözüldü. 22.8 ml glasiyal asetik asit 1000 ml deiyonize su ile çözüldü. 940 ml sodyum asetat çözeltisi, 60 mL asetik asit çözeltisi ile karıştırılarak, pH sı 5,8'ya ayarlandı. Bu çözelti $+4^{\circ}C$ 'de 6 ay kararlıdır.

Reaktif 2:

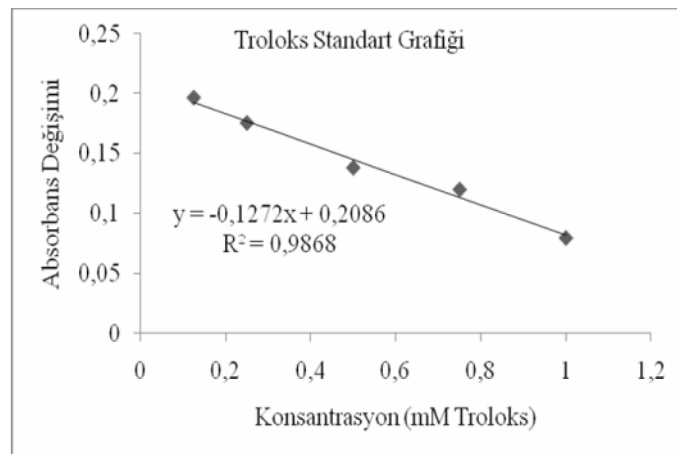
30 mmol/l Asetat tamponu çözeltisi (pH 3.6) dir. 2.46 g CH_3COONa 1000 ml deiyonize su ile çözüldü. 1,705 ml glasiyal asetik asit 1000 ml deiyonize su ile çözüldü. 75 ml sodyum asetat çözeltisi, 925 mL asetik asit çözeltisi ile karıştırılarak, pH sı 3,6'ya ayarlandı. 278 μ l H_2O_2 çözeltisi, tampon çözeltisi ile 1000 ml'ye dilüe edildi (son konsantrasyon, 2 mmol/l) 0.549 g ABTS hazırlanan çözeltinin 100 ml'si ile çözüldü (son konsantrasyon, 10 mmol/l). Oda ısısında bir saatlik inkübasyon sonrası, $ABTTS^+$ nin karakteristik rengi olan mavi-yeşil renk gözlemlendi. Renklenen reaktif $+4^{\circ}C$ 'de 6 ay kararlıdır.

- **Deneyin Yapılışı**

Tablo 11. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarında total antioksidan kapasitenin ölçülmesi

	Kör	Standart	Numune
Reaktif 1	200 µL	200 µL	200 µL
DMSO/Su	5 µL	-	-
Ekstrakt	-	-	5 µL
Standart	-	5 µL	-
660 nm de absorbans okundu.			
Reaktif 2	20 µL	20 µL	20 µL
660 nm de absorbans okundu.			

Sonuçlar, Troloks standart grafiğinden yararlanılarak, mmol Troloks /100 g propolis olarak hesaplandı. Standart grafiği, konsantrasyona karşı absorbans değişimi (R2 Absorbans- R1 Absorbans) değerleri girilerek oluşturuldu. Her örnek için üç kez ölçüm yapıldı.



Şekil 12. Total antioksidan kapasite için troloks standart grafiği

3.2.2. Hücre Kültürü

Bütün hücre kültür çalışmaları hücre kültür kabininde (air flow kabin) steril ortamda gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. PC-3 Hücre Serilerinin Çoğaltılması

PC-3 prostat kanseri hücre serileri GATA Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalından temin edildi. PC-3 hücreleri L-Glutaminli, %10 FBS, %1 penisilin + streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde %5 CO₂ ortamında 37C⁰ de T-25 ve T-75 lik flasklarda inkübatörde çoğaltıldı.

3.2.2.2. Hücre Kültüründe Kullanılacak Ekstraktların Hazırlanması

Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktları ve DMSO, hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere ve hücre canlılığının belirlenmesi için besi yeri (%1 penisilin-streptomisin RPMI-1640) ile dilüe edildi. Tablo da ekstraktların konsantrasyonları ve hücre kültüründeki son konsantrasyonları özetlenmiştir.

Tablo 12. Hücre kültüründe ve MTT testinde kullanılan ekstrakt konsantrasyonları

Ekstrakt Türü	Ekstrakt/Çözelti Konsantrasyonu	Hücre kültürü ve MTT'deki Son Konsantrasyon
Propolis DMSO 1	400 µg/ml	20 µg/ml
Propolis DMSO 2	200 µg/ml	10 µg/ml
Propolis DMSO 3	100 µg/ml	5 µg/ml
DMSO 1	% 0,16	% 0,008
DMSO 2	% 0,08	% 0,004
DMSO 3	% 0,04	% 0,002
Propolis Su 1	400 µg/ml	20 µg/ml
Propolis Su 2	200 µg/ml	10 µg/ml
Propolis Su 3	100 µg/ml	5 µg/ml

3.2.2.3. PC-3 Hücre Serileri için Hücre Canlılığının Belirlenmesi

MTT- canlılık testi, MTT'nin yaşayan hücrelerin mitokondrisi tarafından mavi formazan ürününe indirgenmesine dayanır. Sonuçlar, hem mitokondri aktivitesi/hücre'ye hem de var olan hücrelerin sayısına dayanır ve hücre çoğalması ve canlılığının belirlenmesi için kullanışlı bir metoddur (80).

Hücre canlılığı için kullanılan MTT testi, ekstraktların sitotoksik aktivitesini belirlemek ve yapacağımız ileriki çalışmalarda propolisin DMSO ve su ekstraktlarının hangi konsantrasyonlarını kullanacağımıza karar vermek için yapıldı.

PC-3 hücreleri T-75 lik flask yüzeyinin % 70-80'lik kısmını kapladıktan sonra hücreler ajite edildi. Öncelikle hücrelerin üzerindeki besi yeri uzaklaştırıldı. Hücreler FBS'u uzaklaştırmak için FBS içermeyen besi yeri (%1 penisilin-streptomisin içeren RPMI-1640) ile yıkandıktan sonra üzerlerine 37 C° de bekletilen 2 ml Tripsin-EDTA çözeltisi (200 mg tripsin/50 mL EDTA) eklendi. Flask tabanına yapışmış olan hücrelerin ajite olması için 1-2 dak beklendi. Tripsin ile muamele edilen hücrelerin üzerine tripsini etkisizleştirmek için 2 mL FBS eklendi. Hücreler, 15 mL lik steril falkon tüpe aktarıldı. 400 g'de 7 dak santrifüj edildikten sonra, hücre pelletine dokunmadan süpernatant atıldı. Çöken hücreler üzerine 5 mL besi yeri (%1 penisilin-streptomisin, %20 FBS, RPMI-1640) eklendi, iyice karıştırılarak, 0,2 mL si hücre sayımı için ayrıldı.

100 µL tripan blue (% 0,4) ile 100 µL hücre süspansiyonu karıştırılarak, thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Hücre sayısı $5,2 \times 10^6$ /ml olarak bulundu. Hücre karışımı RPMI-1640 ile 10 mL'ye tamamlanarak, Steril 96 kuyucuklu pleytlere kör kuyucukları hariç kuyucuk başına 20 µL hücre süspansiyonu yani 1×10^4 hücre eklendi. Kör kuyucuklarına sadece 200 µL DMEM/F:12 konulurken, diğer kuyucuklara hücre süspansiyonu ile birlikte 170µL DMEM/F:12 eklendi. Pleytler, hücrelerin yapışması için 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon bitiminde, kontrol hücreleri ve kör kuyucukları hariç tüm kuyucuklara uygun ekstraktlardan (son konsantrasyon 0, 5, 10, 20 µg propolis / ml su, 0, 5, 10, 20 µg propolis / ml DMSO ve 0, % 0,008 % 0,004 % 0,002 DMSO/ml olacak şekilde) 10 ar µL eklendi ve tekrar 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. 0 konsantrasyonlar kontrol hücreleri olarak kabul edildi ve ekstrakt yerine kuyucuklara 10µl DMEM/F:12 eklendi. 24 saatlik inkübasyonun bitmesine 4 saat kala her kuyucuğa 10 ar µL 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) eklenerek inkübasyona devam edildi. 24 saatlik inkübasyonun bitiminde kuyucuklara 200'er µL DMSO: Etanol (1:1) karışımı eklendi. Pleytler oda ısısında bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon bitiminde 570 nm de absorbansları belirlendi ve hücre canlılığı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Hesaplama: (81)

% Canlılık: $[(A \text{ örnek} - A \text{ kör}) / (A \text{ kontrol} - A \text{ kör})] \times 100$ formülü ile hesaplandı.

3.2.2.4. Hücrelerin Ekstraktlarla Muamele Edilmesi

PC-3 hücreleri L-Glutaminli, %10 FBS, %1 penisilin+streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde %5 CO₂ ortamında 37C⁰'de T-75 lik flasklarda inkübatörde çoğaltıldı. Hücreler flaskı kapladıktan sonra, hücreler tripsinizasyon ile ajite edilerek, 400 g de 6 dak santrifüjlendi. Çöken hücre pelleti, 4 ml besi yeri ile çözüldü. Hücreler, dört adet T-25'lik flaska bölünerek, L-Glutaminli, %10 FBS, %1 penisilin + streptomisin içeren RPMI 1640 besi yerinde %5 CO₂ ortamında 37C⁰ de inkübatörde çoğaltıldı. Prostat kanseri (PC-3) hücreleri flask yüzeyinin % 80-90'lik kısmını kapladıktan besi yeri uzaklaştırıldı, FBS'u uzaklaştırmak için iki kez steril PBS ile yıkandı ve besi yeri total hacim 5 ml olacak şekilde % 0,5 BSA ve %1 penisilin + streptomisin içeren DMEM/F:12 olarak değiştirildi. Hücreler bu besi yerinde, hücreleri yeni besi yerine adapte etmek için 24 saat inkübe edildi.

Canlılık testi sonucuna göre hücrelerin son konsantrasyon 20 µg propolis /ml DMSO-su ve % 0,008 DMSO olacak şekilde, ekstraktlar ile muamele edilmesine karar verildi. PC-3 hücreleri, kontrol çalışması hariç ekstraktlar ile muamele edildi. PC-3 hücreleri, propolisin sulu ve DMSO'lu ekstraktları ve % 0,008 DMSO ile Tablo 13'de görüldüğü gibi muamele edildi ve %5 CO₂, 37C⁰ de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Her örnek için çalışma üç kez yapıldı. (39,463 ml DMEM/F:12 ve 208,8 µL BSA karıştırılarak, DMEM/F:12 ve BSA besiyeri karışımı hazırlandı)

Tablo 13. PC-3 hücrelerinin propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktları ile muamele edilmesi

Deney No	Eklenen Ekstrakt	DMEM/F:12-BSA karışımı
1	250 µL DMEM/F:12	4750 µL
2	250 µL % 0,16 DMSO	4750 µL
3	250 µL 400 µg propolis/ml DMSO	4750 µL
4	250 µL 400 µg propolis/ml Su	4750 µL

3.2.2.5. Ekstraktlar ile Muamele Edilen PC-3 Hücrelerinin Parçalanması

Ekstraktlar ile muamele edilen PC-3 hücreleri, 24 saatlik inkübasyon süreleri dolduktan sonra modifiye edilen HNTG parçalama yöntemi ile parçalandı (82).

- **Kullanılan Çözeltiler**

- 1) Fosfat Tamponu (PBS) : 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄ ve 0.27 g KH₂PO₄ 800 ml distile su ile çözüldü, pH'sı 7,4 e ayarlandıktan sonra hacmi 1 L'ye tamamlandı. Otoklavlandı ve 0,2 µm'lik sterilizasyon filtresinden geçirilerek, +4 C° de saklandı.
- 2) Yıkama Tamponu (25 mM Hepes, 25 mM NaCl, 10% gliserol, pH 7.5): 3,25 g HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etansülfonik asit), 0,7305 g NaCl ve 50 ml gliserol 450 ml distile suda çözüldü, pH'sı 7,5'a ayarlandıktan sonra hacmi 500 ml'ye tamamlandı. 0,2 µm'lik sterilizasyon filtresinden geçirilerek, +4 C° de saklandı.
- 3) Ön Liziz Tamponu (HNTG) (25mM Hepes, 25mM NaCl, 0.1% triton, 10% glycerol, pH 7.5): 0,625 g HEPES, 0,146 g NaCl ve 10 ml gliserol 450 ml distile suda çözüldü, pH'sı 7,5'a ayarlandıktan sonra 100 µL Triton X-100 eklenerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı. 0,2 µm'lik sterilizasyon filtresinden geçirilerek, +4 C° de saklandı.
- 4) Liziz tamponu : 3996 µL ön liziz (HNTG) tamponu ve 4 µL Proteaz İnhibitör kokteyli karıştırıldı. Kullanım öncesi taze olarak hazırlandı.

Proteaz İnhibitör Kokteylinin İçeriği: 104 mM AEBSF, 80 µM Aprotinin, 2 mM Leupeptin, 4mM Bestatin, 1,5 mM Pepstatin ve 1,4 mM E-64. (serin proteazları, sistein proteazları, asit proteazları ve aminopeptidazları inhibe etmek için kullanılan bir çözeltilidir).

- **Deneyin Yapılışı**

- 1) Bütün çözeltiler buz üzerine yerleştirildi.
- 2) İnkübasyon süresi dolan hücrelerin besi yeri boşaltıldı ve flasklar buz üzerine koyuldu.
- 3) Hücreler 2 ml steril PBS ile iki kez yıkandı (BSA'yı uzaklaştırmak için) ve PBS uzaklaştırıldı.
- 4) Hücreler 5 ml steril yıkama tamponu ile iki kez yıkandı ve yıkama tamponu uzaklaştırıldı.

5) Hücrelerin üzerine 500 µL steril liziz tamponu eklenerek, 10 dak buz üzerinde inkübe edildi.

6) Flask yüzeyine yapışmış olan hücreler, steril pastör pipeti ile kazınarak parçalandı ve hücre lizatı steril 1,5 mL'lik ependorfa aktarıldı.

7) Hücre lizatları, termomikserde +4 C° de 150 rpm de sürekli karıştırılarak 1 saat inkübe edildi.

8) Hücre lizatları, 14.000 g de 10 dak santrifüjlendi ve süpernatant yeni 1,5 mL lik ependorfa aktarıldı.

9) Süpernatant tekrar 14.000 g de 10 dak santrifüjlendi ve süpernatant yeni 1,5 mL lik ependorfa aktarıldı.

10) Elde edilen hücre lizatı, en düşük düzeyde kısa bir süre vortekslenerek, aligotlandı ve SELDI-TOF-MS ile analiz edilene kadar -80 C°'de saklandı.

3.2.3. SELDI-TOF-MS Cihazının Kalibrasyonu

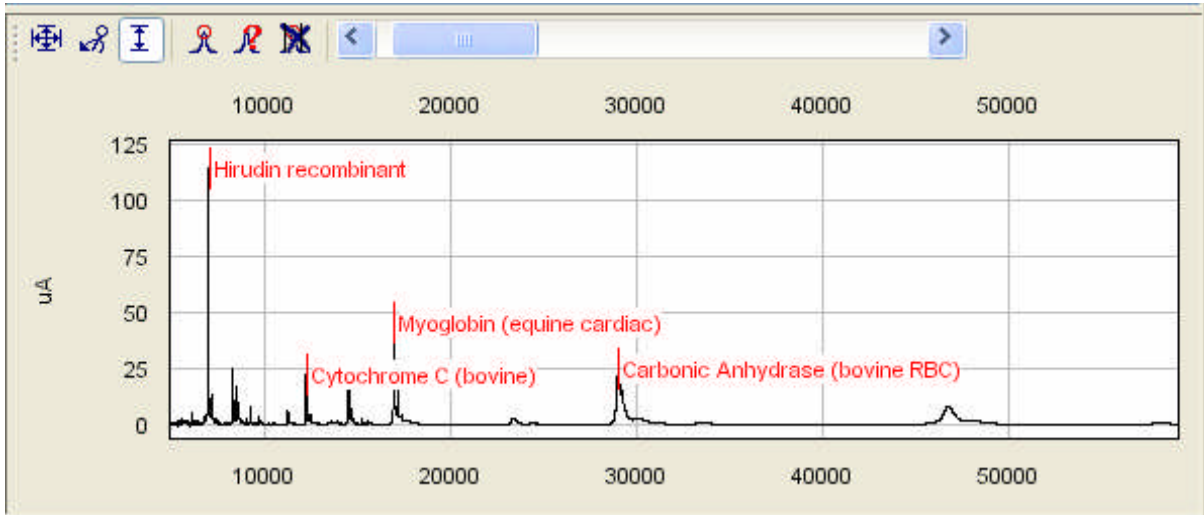
Cihazın kalibrasyonu molekül ağırlıkları bilinen proteinleri içeren 'ProteinChip All-in-One-Protein Standart II' (Bio-Rad) standartları kullanılarak yapıldı. Standart moleküler ağırlığı kesin olarak bilinen yedi protein içermektedir ve tablo 14' de gösterilmiştir (64).

Tablo 14. ProteinChip All-in-One-Protein Standart II'nin içeriği

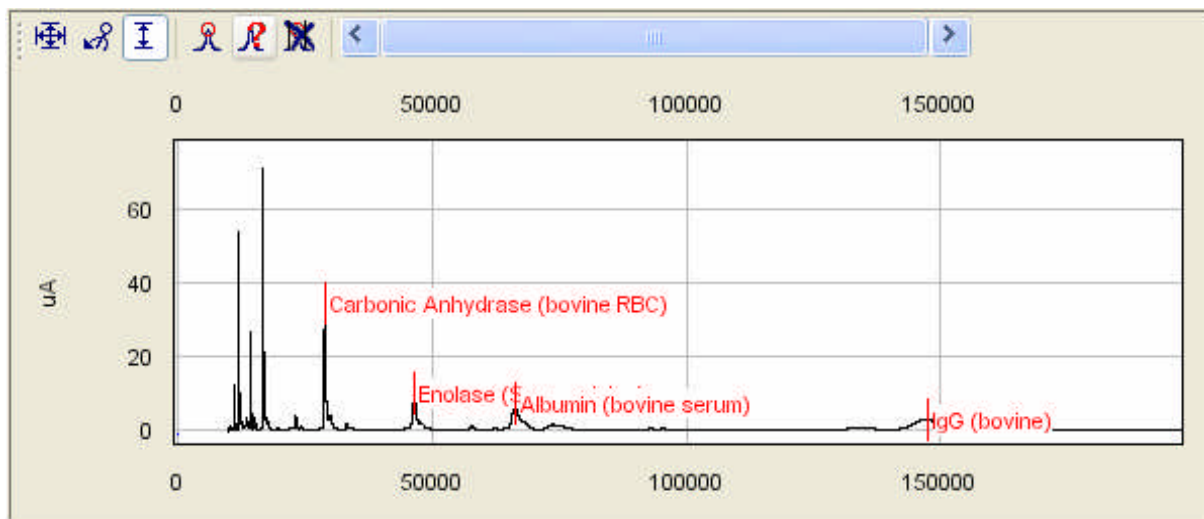
Düşük Moleküler Ağırlıklı Standartlar		Yüksek Moleküler Ağırlıklı Standartlar	
Protein	Moleküler Ağırlığı, Da	Protein	Moleküler Ağırlığı, Da
Hirudin, rekombinant	6,964	Karbonik anhidraz (bovine eritrositleri)	29,023
Sitokrom c (bovine)	12,230	Enolaz (S. Cerevisiae)	46,671
Miyoglobin (equine)	16,951	Albumin (bovine)	66,433
Karbonik anhidraz (bovine eritrositleri)	29,023	IgG (bovine)	147,300

Standartlar, SPA ile karıştırılarak NP20 çip dizinlerine firmanın önerdiği koşullarda yüklenerek, SELDI-TOF-MS cihazında (Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü, CIPHERGEN Biosystems, PCS4000 TOF-MS Personal Seri No: 5A1108P) analiz edildi. Standartların yüklü olduğu spotlara kullanılan iki protokole (Düşük lazer ve yüksek lazer protokolü) göre atış yapıldı. Çıkan piklerle kalibrasyon yapıldı ve her protokol için kendi

kalibrasyonu kullanıldı. Kalibrasyon sonrası çıkan piklerin moleküler ağırlıkları kontrol edildi. Düşük moleküler ağırlıklı Protein Standartları Şekil 13’de, yüksek moleküler ağırlıklı protein standartları Şekil 14’de gösterilmiştir.



Şekil 13. Düşük moleküler ağırlıklı protein standartları



Şekil 14. Yüksek moleküler ağırlıklı protein standartları

3.2.4. Hücre Lizatlarının SELDI Çip Dizilerine Yüklenmek Üzere Hazırlanması

Çalışma öncesinde SELDI için kullanılan IMAC30, CM10, Q10 ve H50 olmak üzere farklı kimyasal yüzeylerine sahip tüm çip dizinlerine az miktarda hücre lizati

örnekleri yüklenerek bir ön çalışma yapıldı. Bu ön çalışmaya göre, en iyi ayırt edici pikleri veren CM10 ve Q10 çip dizinleri çalışmanın devamı için seçildi ve çalışma bu çip dizinleri ile yapıldı. Bu ön çalışma sırasında hücre lizatları, DTT (ditiyoteritol)'li ve DTT'siz denaturasyon işlemine maruz bırakılarak çip dizinlerine yüklendi ve hücre lizatlarının CM10 çip dizini için DTT'li denaturasyon işlemine maruz bırakılarak; Q10 çip dizini için ise DTT'siz denaturasyon işlemine maruz bırakılarak çip dizinlerine yüklenmesine karar verildi.

3.2.4.1. Hücre Lizatlarının SELDI Çip Dizinlerine Yüklenmesi

Protein çip dizinlerindeki spotlar, belli fizikokimyasal karakterli (hidrofobik, katyonik, anyonik, metal iyonu içeren veya hidrofilik) yüzeylerden oluşur (48). Örnek, direkt olarak Protein çip spotunun yüzeyine uygulanır. Uygun bağlama tamponu içinde, proteinler, spesifik ve spesifik olmayan etkileşimler vasıtasıyla spot yüzeyine bağlanır. Spesifik olarak bağlanmayan proteinler ve tuz ve deterjan gibi kontaminantlar, uygun yıkama tamponu ile yıkama yapılarak uzaklaştırılır. Enerji absorbe edici moleküller (EAM) eklenir. Protein kütle profili, SELDI-TOF kütle spektrometresi ile belirlenir (60).

- **Hücre Lizatlarının SELDI CM10 Çip Dizinlerine Yüklenmesi**

Zayıf Katyon Değişimi özelliğindeki CM10 Protein çip dizinleri, analitin yüzeyindeki pozitif yüklerle (lizin, arginin, histidin) etkileşen zayıf anyonik karboksilat grupları içerir. Pozitif yüklü molekülleri bağlar, yüksek izoelektrik noktasına (pI) sahip proteinlerin analizi yapılır (64).

- **Kullanılan Çözeltiler**

- 1) DTT'li Denaturasyon tamponu [9 M üre, % 2 CHAPS (3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate), 2 mM DTT (ditiyoteritol) 150 mM tris-HCl pH:9] : 27,03 g üre, 1 g CHAPS, 0,154 g DTT ve 0,9 g Tris tartılarak distile su ile çözüldü,pH sı 9'a ayarlanarak hacim 50 ml'ye tamamlandı.

- 2) Bağlama ve yıkama tamponu (50 mM NH₄Ac % 0,1 Triton X-100 pH:4,0): 0,192 g amonyum asetat tartılarak çözüldü ve 50 µL Triton X-100 eklenerek pH sı 4,0 a ayarlanarak, hacmi 50 ml'ye tamamlandı.
- 3) % 1 lik TFA (Trifloroasetikası): 198 µL dd su ve 2 µL stok TFA karıştırılarak hazırlandı. Kullanım öncesi taze olarak hazırlanmalıdır.
- 4) SPA (Sinapınikasıt) Energy absorbing molecule (EAM) : 5 mg toz SPA içeren stok SPA üzerine 125 µL %1 lik TFA ve 125 µL %100 lük Asetonitril (ACN) eklendi. 5 dak vortekslenerek, toz SPA'nın iyice çözünməsi sağlandı. 10 dak oda ısısında bekletildikten sonra 10.900 g de (en yüksek devirde) 10 dak santrifüjleme yapılarak, çözünmeyen partiküllerin çökmesi sağlandı. SPA kullanım öncesi taze olarak hazırlanmalıdır.

- **Deneyin Yapılışı**

1. Örnekler, -80 °C'den çıkartıldı ve oda ısısına gelmeleri beklendi. Çok kısa bir süre vortekslendikten sonra 10.500 g de + 4°C'de 12 dak santrifüjlendi ve buz üzerine koyuldu.
2. Buz üzerinde, 15 µL hücre lizatı ve 15 µL DTT'siz denaturasyon tamponu karıştırıldı, oda ısısında 30 dak inkübe edildi. (Bu aşamada örnekler 1:2 oranında dilüe edildi)
3. Buz üzerinde 25 µL denature edilmiş hücre lizatı ve 75 µL bağlama tamponu (50 mM NH₄Ac (Amonyum Asetat) % 0,1 Triton X-100 pH:4,0) karıştırıldı. (Bu aşamada örnekler 1:2 oranında dilüe edildi Hücre lizatları net olarak 1:8 oranında dilüe edildi ve Protein çip dizinlerindeki spotlara yüklenmeye hazır hale getirildi.) Örnekler, çiplere yüklenene kadar buz üzerinde bekletildi.
4. CM10 Protein çip dizinlerindeki spotlara 120 µL 50 mM NH₄Ac (Amonyum Asetat) % 0,1 Triton X-100 pH:4,0 eklendi. Oda ısında 5 dak karıştırarak inkübe edildi ve döküldü. Bu işlem üç kez yapılarak, spot yüzeyleri aktifleştirilerek, örnek yüklemeye hazır hale getirildi.
5. Spotlara, 90 µL denature edilerek, bağlanma tamponu ile dilüe edilmiş hücre lizatı eklendi.
6. Çip dizinleri, nemli ortamda sürekli karıştırılarak 1 saat 10 dak oda ısısında inkübe edildi ve inkübasyon bitiminde döküldü.

7. Spotlara 145 µL yıkama tamponu (50 mM NH₄Ac (Amonyum Asetat) % 0,1 Triton X-100 pH:4,0) eklendi. Oda ısısında 5 dak karıştırılarak inkübe edildi ve döküldü. Bu işlem üç kez tekrarlandı.
8. Spotlar bir kez otoklavlanmış dd H₂O ile yıkandı.
9. Oda ısısında inkübasyon yapılarak spotların yüzeylerinin kuruması beklendi.
10. Spot yüzeyleri kuruduktan sonra, taze hazırlanmış 1µL SPA eklendi. İşlem iki kez yapıldı.
11. Protein çip dizinleri, bir gece karanlık ortamda ve oda ısısında kurutuldu.
12. Protein çip Dizinleri UZ-KS (TOF-MS)'de analiz edildi.

- **Hücre Lizatlarının SELDI Q10 Çip Dizinlerine Yüklenmesi**

Kuvvetli Anyon Değişimi özelliğindeki Q10 Protein çip dizini, Hedef proteinin yüzeyindeki negatif yüklerle (Aspartik veya glutamik asit) etkileşen katyonik, kuaterner amonyum grupları içerir. Negatif yüklü molekülleri bağlar. Düşük izoelektrik noktasına (pI) sahip proteinlerin analizi yapılır (64).

- **Kullanılan Çözeltiler**

1. DTT'siz Denaturasyon tamponu [9 M üre, % 2 CHAPS (3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate), 150 mM tris-HCl pH:9] : 27,03 g üre, 1 g CHAPS ve 0,9 g Tris tartılarak distile su ile çözüldü, pH sı 9'a ayarlanarak hacim 50 ml'ye tamamlandı.
2. Bağlama ve yıkama Tamponu (50 mM Tris-HCl pH: 8,0 (Tris :121,14) : 54,51 g Tris tartıldı yaklaşık 40 ml distile suda çözülerek Ph'sı HCl ile 8,0 'a ayarlanarak, hacmi 50 ml'ye tamamlandı.

- **Deneyin Yapılışı**

1. Örnekler, -80 °C'den çıkartıldı ve oda ısısına gelmeleri beklendi. Çok kısa bir süre vorteksledikten sonra 10.500 g de + 4°C'de 12 dak santrifüjlendi ve buz üzerine koyuldu.

2. Buz üzerinde 15 µL hücre lizati ve 15 µL DTT'siz denaturasyon tamponu karıştırıldı, oda ısısında 30 dak inkübe edildi. (Bu aşamada örnekler 1:2 oranında dilüe edildi)
3. Buz üzerinde 25 µL denature edilmiş hücre lizati ve 75 µL bağlama tamponu (50 mM Tris-HCl pH: 8,0) karıştırıldı. (Bu aşamada örnekler 1:2 oranında dilüe edildi Hücre lizatları net olarak 1:8 oranında dilüe edildi ve Protein çip dizinlerindeki spotlara yüklenmeye hazır hale getirildi.) Örnekler, çipe yüklenene kadar buz üzerinde bekletildi.
4. Q10 Protein çip dizinlerindeki spotlara 120 µL 50 mM Tris-HCl pH: 8,0 eklendi. Oda ısısında 5 dak karıştırılarak inkübe edildi ve döküldü. Bu işlem üç kez yapılarak, spot yüzeyleri aktifleştirilerek, örnek yüklemeye hazır hale getirildi.
5. Spotlara, 90 µL denature edilerek, bağlanma tamponu ile dilüe edilmiş hücre lizati eklendi.
6. Çip dizinleri, nemli ortamda sürekli karıştırılarak 1 saat 10 dak oda ısısında inkübe edildi ve inkübasyon bitiminde döküldü.
7. Spotlara 120 µL yıkama tamponu (50 mM Tris-HCl pH: 8,0) eklendi. Oda ısısında 5 dak karıştırılarak inkübe edildi ve döküldü. Bu işlem üç kez tekrarlandı.
8. Spotlar bir kez otoklavlanmış dd H₂O ile yıkandı.
9. Oda ısısında inkübasyon yapılarak spotların yüzeylerinin kuruması beklendi.
10. Spot yüzeyleri kuruduktan sonra, taze hazırlanmış 1µL SPA eklendi. İşlem iki kez yapıldı.
11. Protein çip dizinleri, bir gece karanlık ortamda ve oda ısısında kurutuldu.
12. Protein çip Dizinleri UZ-KS (TOF-MS)'de analiz edildi.

3.2.5. SELDI-TOF-MS ile Veri Oluşturulması

Protein çip dizinleri daha önce optimize edilen protokollerde SELDI Protein çip Sistem Kütle Spektrometrisinde (CIPHERGEN Biosystems, Fremont; CA, USA) okutulup, analiz edildi.

Hem CM10 hem de Q10 çip dizinleri için, spektralar pozitif iyon modunda elde edildi ve her spot düşük lazer enerjili protokol ve yüksek lazer enerjili protokol olmak üzere iki farklı lazer düzeyinde analiz edildi. Düşük lazer enerjili protokolde, enerji

seviyesi 7000 nj; yüksek lazer enerjili protokolde ise 9000 nj olarak ayarlandı. Her iki çip dizini için düşük moleküler ağırlıklı kütleler için, 2 kDa'dan 50 kDa'a kadar; yüksek moleküler ağırlıklı kütleler için, ise 10 kDa'dan 200 kDa'a kadar proteinler okutuldu. Ham veri bu protokollerle otomatik olarak kaydedildikten sonra veriler CIPHERGEN Express yazılımı, sürüm 3.0.1. (Ciphergen Biosystems) ile analiz edildi.

Çalışılan örneklerin spot değişkenliği, normalizasyon faktörü hesaplanarak değerlendirildi. Normalizasyon, eklenen matris miktarı, proteinlerin zamanla degrades olması ve cihazdaki değişimler gibi bazı değişkenler nedeni ile meydana gelen spektra farklılıklarına karşı spektra yoğunluklarının lineer olarak ölçeklendirilmesidir. Normalizasyon faktörleri CIPHERGEN yazılımı ile hesaplanmıştır. Toplam normalizasyon faktörü ortalamasının 2 standart sapması (mean+2SD) dışında kalan spektra verileri çıkartılarak, yüksek kaliteli spektralar tekrar normalize edildi ve analize devam edildi.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Normalize edilen verilerin analizi için CIPHERGEN Express yazılımı, sürüm 3.0.1. ile 'Expression Difference Mapping' (EDM) (Ekspresyon Farklılığı Haritalandırılması) oluşturulmuştur. EDM, örnek gruplarının spektralarında bulunan aynı moleküler ağırlığına sahip piklerin gruplandırılması ve bunların ekspresyon düzeylerindeki farklılıkların istatistiksel ve görsel olarak gösterimi için gerekli algoritmaları içermektedir. Veri işleme sonrasında oluşturulan kümeleme çizelgesinde (EDM) her çipteki spektralarda bulunan pikler ve sayıları görülebilmektedir. Kümeleme oluşturulurken, pik belirleme için sinyal/gürültü (S/N) oranı 1,0, piklerin çukur derinliği (valley depth) 3,0, minimal pik eşiği tüm spektraların % 10'u ve pik genişliği 0,2 olarak seçilmiştir. Bu ayarlamalardan 'p değeri' hesaplaması yapılabilmektedir.

CIPHERGEN Express yazılımında ikili grupların istatistiksel karşılaştırması için Mann-Whitney U testi, ikiden fazla grubun karşılaştırması için Kruskal-Wallis tek-yönlü varyans analizi kullanılmaktadır.

Analiz için karşılaştırılacak olan gruplar seçildi ve yazılım ile uygun istatistiksel yöntem seçilerek, p değeri < 0,05 olan gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu yorumu yapılmıştır. İstatistiksel analiz yapılırken ayrıca duyarlılık (sensitivite) ve özgüllük (spesifite) ölçümü de yapıldı. Bu, ROC 'Receiver Operator Characteristics' hesaplaması ile değerlendirildi. ROC değeri, 1,0 veya 0,0'a ne kadar yakınsa iki grup için değerlendirilen

pikin duyarlılık/özgüllük oranı o kadar yüksektir. Bu iki ölçütün yanında pik yoğunluğunun yüksek veya düşük olması da önemli bir ölçüttür. Bu çalışmada p değeri < 0,05 ve ROC değeri > 0,8 veya < 0,2 olan pikler ayırt edici pikler olarak değerlendirildi.

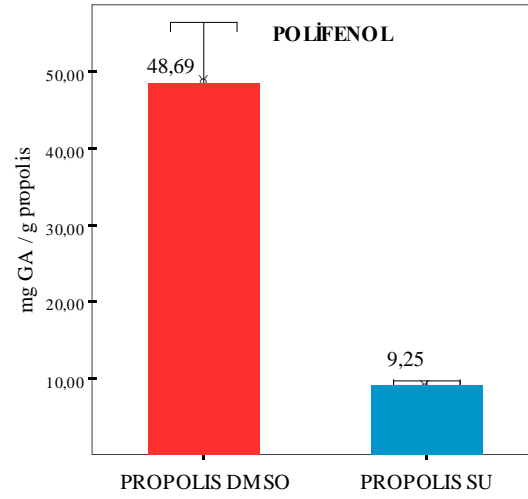
Bu çalışmada PC-3 hücre lizatı, 20 µg propolis /ml DMSO ve % 0,008 DMSO ile muamele edilen PC-3 hücre lizatı arasında ve PC-3 hücre lizatı, 20 µg propolis /ml su ile muamele edilen PC-3 hücre lizatı arasında istatistiksel karşılaştırma yapılarak, değerlendirme yapıldı.

4. BULGULAR

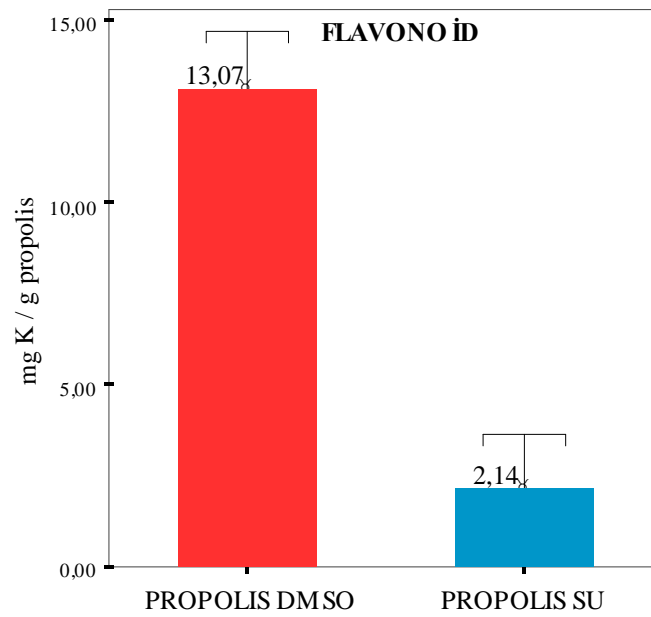
4.1. Ekstraktlarda Polifenol, Flavonoid, Demir İndirgeyici Antioksidan Potansiyel ve Total Antioksidan Kapasite Tayini Sonuçları

Propolisin DMSO'lu ekstraktındaki polifenol miktarı ($48,69 \pm 7,78$ mg GA/g propolis), propolisin sulu ekstraktındaki polifenol miktarının ($9,24 \pm 0,5$ mg GA/g propolis) yaklaşık 5 katıdır. Propolisin DMSO'lu ekstraktındaki flavonoid miktarı ($12,94 \pm 1,6$ mg K/g propolis), propolisin sulu ekstraktındaki flavonoid miktarının ($2,14 \pm 1,5$ mg K/g propolis) yaklaşık 6 katıdır. Propolisin DMSO'lu ekstraktının demir indirgeyici antioksidan potansiyeli ($59,53 \pm 17,3$ mg Tro/g propolis), propolisin sulu ekstraktındaki demir indirgeyici antioksidan potansiyelinin ($22,65 \pm 5,8$ mg Tro/g propolis) yaklaşık 2,6 katıdır. Propolisin DMSO'lu ekstraktının total antioksidan kapasitesi ($8,82 \pm 2,95$ mmol Tro / 100 g propolis), propolisin sulu ekstraktının total antioksidan kapasitesinin ($4,97 \pm 0,8$ mmol Tro/ 100 g propolis) yaklaşık 1,7 katıdır.

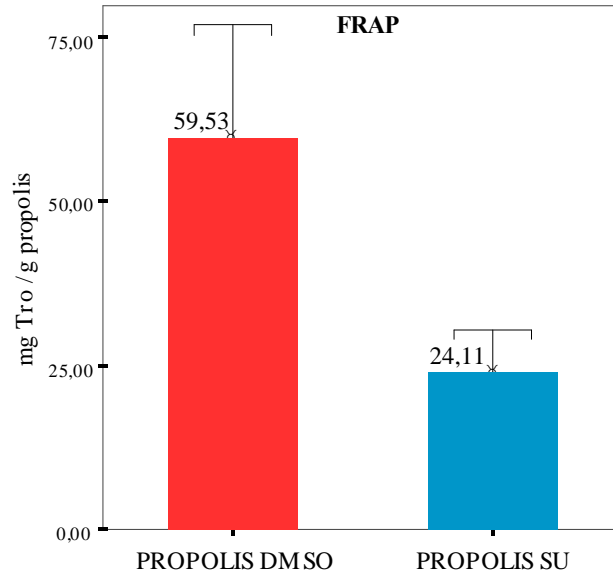
Yaptığımız çalışmalar sonucu, propolisin DMSO ekstraktının, sulu ekstraktına göre polifenol, flavonoid içeriği ve antioksidan potansiyeli açısından daha zengin olduğunu bulduk. Propolisin DMSO ekstraktı birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinen flavonoidler açısından sulu ekstrakta göre daha zengin olarak bulundu. Ekstraktların total antioksidan kapasiteleri ve demir indirgeyici antioksidan potansiyelleri, içeriklerindeki polifenol ve flavonoid miktarları ile doğru orantılıdır. Sonuçlar Şekil 15, 16, 17 ve 18'de gösterilmiştir. Grafikte verilen değerler, ortalama \pm 1 standart sapma (SD) değerleridir.



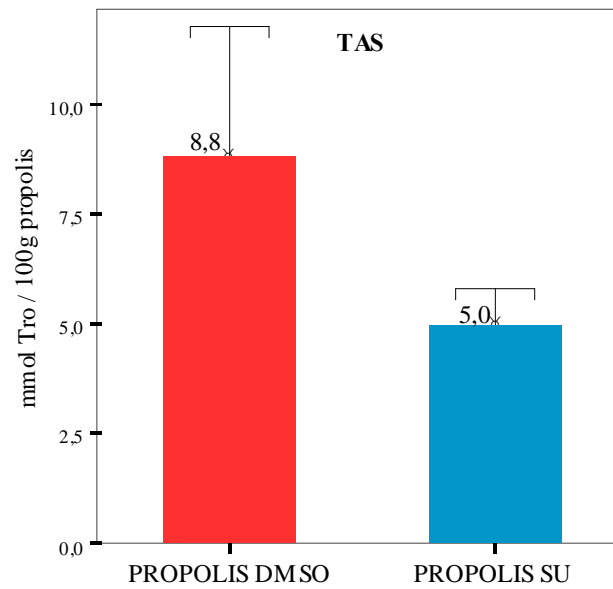
Şekil 15. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarında polifenol miktarı (Ortalama \pm 1SD mg GA /g propolis)



Şekil 16. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarında flavonoid miktarı (Ortalama \pm 1SD mg K /g propolis)



Şekil 17. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarında demir indirgeyici antioksidan potansiyel (FRAP) sonuçları (Ortalama \pm 1SD mg Tro / propolis)

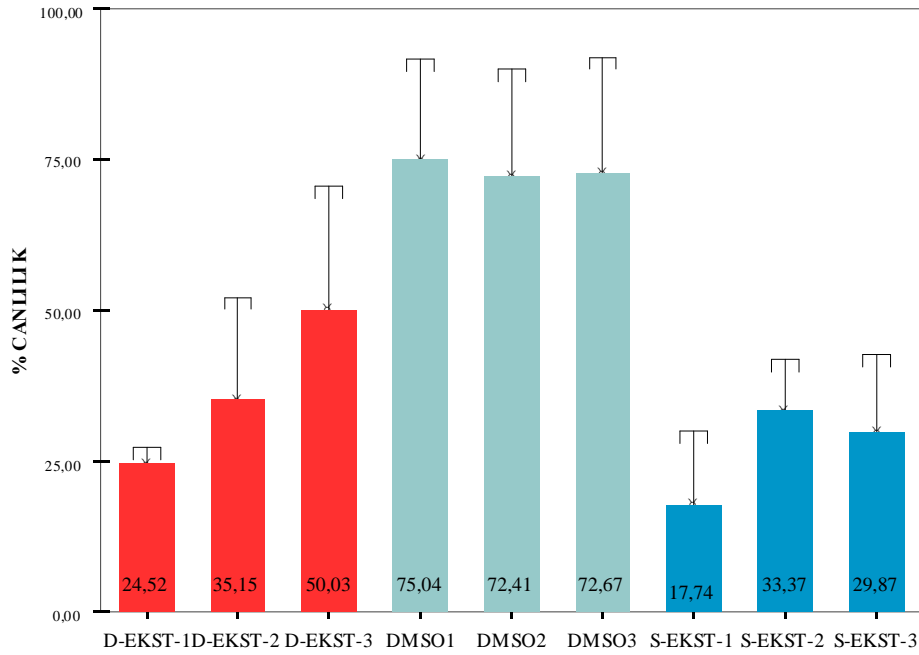


Şekil 18. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarında total antioksidan kapasite (TAS) sonuçları (Ortalama \pm 1SD mmol Tro / 100 g propolis)

4.2. Ekstraktlarla Muamele Edilen PC-3 Hücrelerinin Canlılık Testi Sonuçları

DMSO çözeltileri ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin canlılığı % 72,4 ve 75,04 arasındadır. Propolisin DMSO ekstraktları ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin canlılığı % 24,5 ve 50,0 arasındadır. DMSO tek başına hücre canlılığını çok fazla düşürmemiştir

fakat Propolisin DMSO ekstraktları hücre canlılığını % 24'e kadar düşürmüştür. Propolisin sulu ekstraktları ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin canlılığı % 17,7 ve 33,3 arasındadır. 20 µg propolis /ml DMSO ekstraktı, hücre canlılığını % 24,5'e; 20 µg propolis /ml su ekstraktı ise % 17,7'e düşürmüştür. 20 µg propolis / ml DMSO ekstraktı ile aynı yüzdedeki DMSO çözeltisi ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin canlılığı % 75,04'tür. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktları ve DMSO çözeltileri ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin % canlılıkları Şekil 19'da gösterilmiştir.



Şekil 19. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktları ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin % canlılıkları

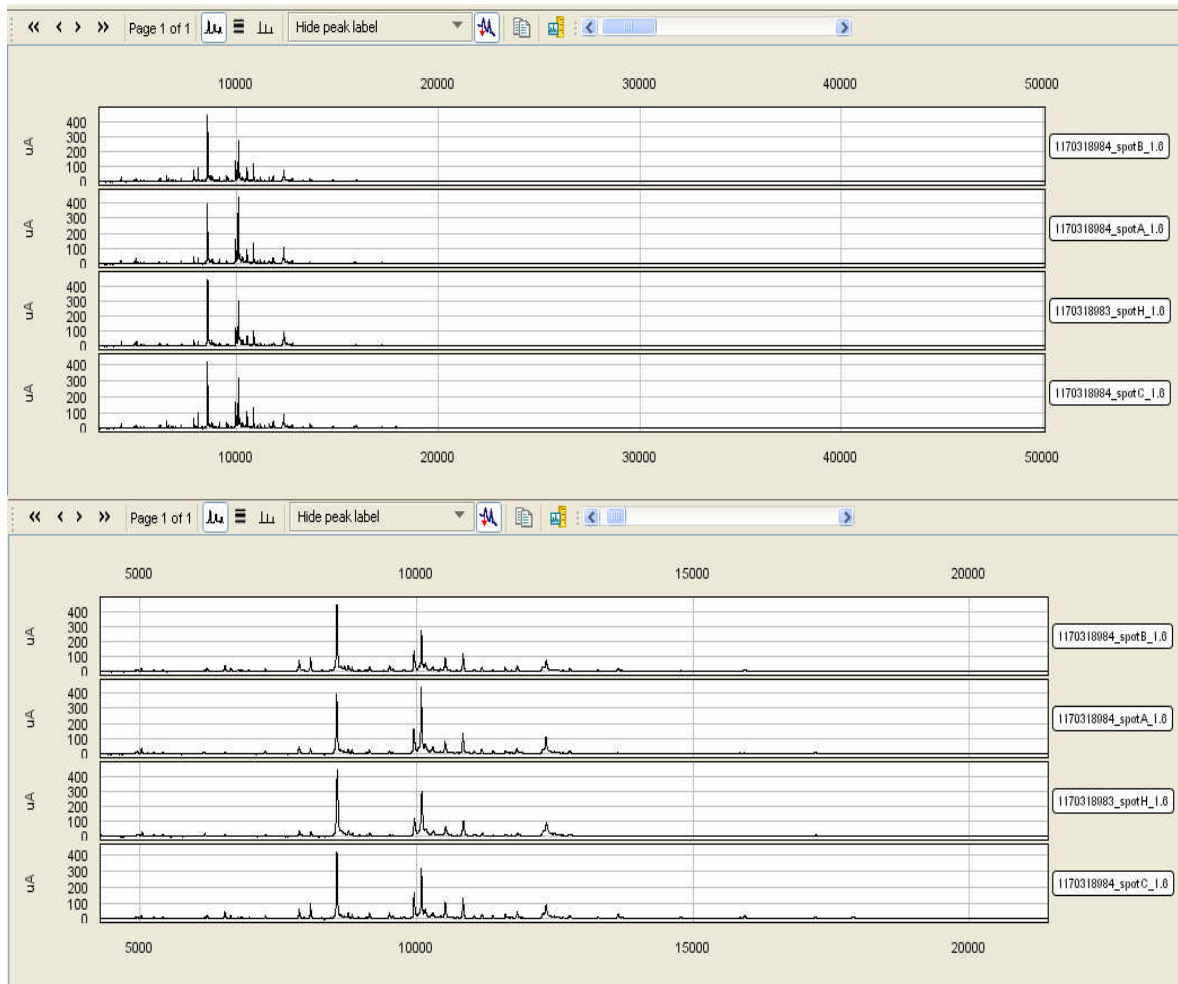
4.3. Ekstraktlarla Muamele Edilen PC-3 hücrelerinin SELDI-TOF-MS Analizi Sonuçları

Ciphergen Express yazılımı, sürüm 3.0.1. ile normalize edilen veriler için ekspresyon farklılığı haritalandırılması oluşturuldu ve veriler analiz edildi. Veri işleme sonrasında oluşturulan kümeleme çizelgesinde her çipteki spektrallarda bulunan pikler ve sayıları görüntüldü. Yoğunlukları yüksek olan ve p değeri oldukça küçük olan piklerin karşılaştırmalı pik spektrumları ve jel görüntüleri alındı. Bazı piklerin pik spektrumları ve

jel görüntüleri, yakınlarda bulunan yoğunluğu yüksek olan bir pikin onları baskılaması nedeniyle elde edilemedi.

4.3.1. CM10 Protein çip Dizinine Düşük Enerji Seviyesinde Uygulanan Örneklerin Sonuçları

CM10 dizinine düşük lazer enerjisinde uygulanan örneklerde CIPHERGEN Express yazılımı kullanılarak normalize edilen veriler için ekspresyon farklılığı haritalandırılması oluşturuldu ve veriler analiz edildi. 184 adet pik tespit edildi. Örneklerin genel pik spektrumları Şekil 17’de gösterilmiştir.



Şekil 20. CM10 dizinine düşük lazer enerjisinde uygulanan örneklerin pik spektrumları

% 0,008 DMSO çözeltisi, 20 µg propolis/ml DMSO ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasında, protein ekspresyonunda

m/z değerleri 14.424, 33.303, 32.800, 20.709, 27.294, 21.139 ve 5.141 Da olan yedi pikte istatistiksel olarak anlamlı değişiklik belirlendi.

Tablo 15. % 0,008 DMSO çözeltisi, 20 µg propolis/ml DMSO ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasının istatistiksel analiz sonuçları (CM10, düşük lazer enerjisi protokolü)

Pik	p-değeri	M/Z (Da)	Ortalama M/Z (Da)	Ortalama yoğunluk
1	0,0230	14.423	14.424	5,514
2	0,0263	33.358	33.303	0,129
3	0,0296	32.816	32.800	0,217
4	0,0373	20.737	20.709	0,714
5	0,0387	27.293	27.294	0,209
6	0,0488	21.138	21.139	0,763
7	0,0497	5.143	5.141	8,320

% 0,008 DMSO çözeltisi, m/z değerleri 14.424 Da, 33.303 Da, 20.709 Da, 21.139 Da ve 5.141 Da olan piklerin ekspresyonunu artırırken; m/z değerleri, 32.800 Da ve 27.294 Da olan piklerin ekspresyonunu azalttı.

20 µg propolis/ml DMSO ekstraktı, m/z değerleri 14.424 Da ve 20.709 Da olan piklerin ekspresyonunu artırırken; m/z değerleri 33.303 Da, 32.800 Da, 27.294 Da, 21.139 Da ve 5.141 Da olan piklerin ekspresyonunu azalttı.

20 µg propolis/ml su ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasında, protein ekspresyonunda m/z değerleri 6.268, 16.042, 24.664, 24.810, 32.043 Da olan beş pikte istatistiksel olarak anlamlı değişiklik belirlendi.

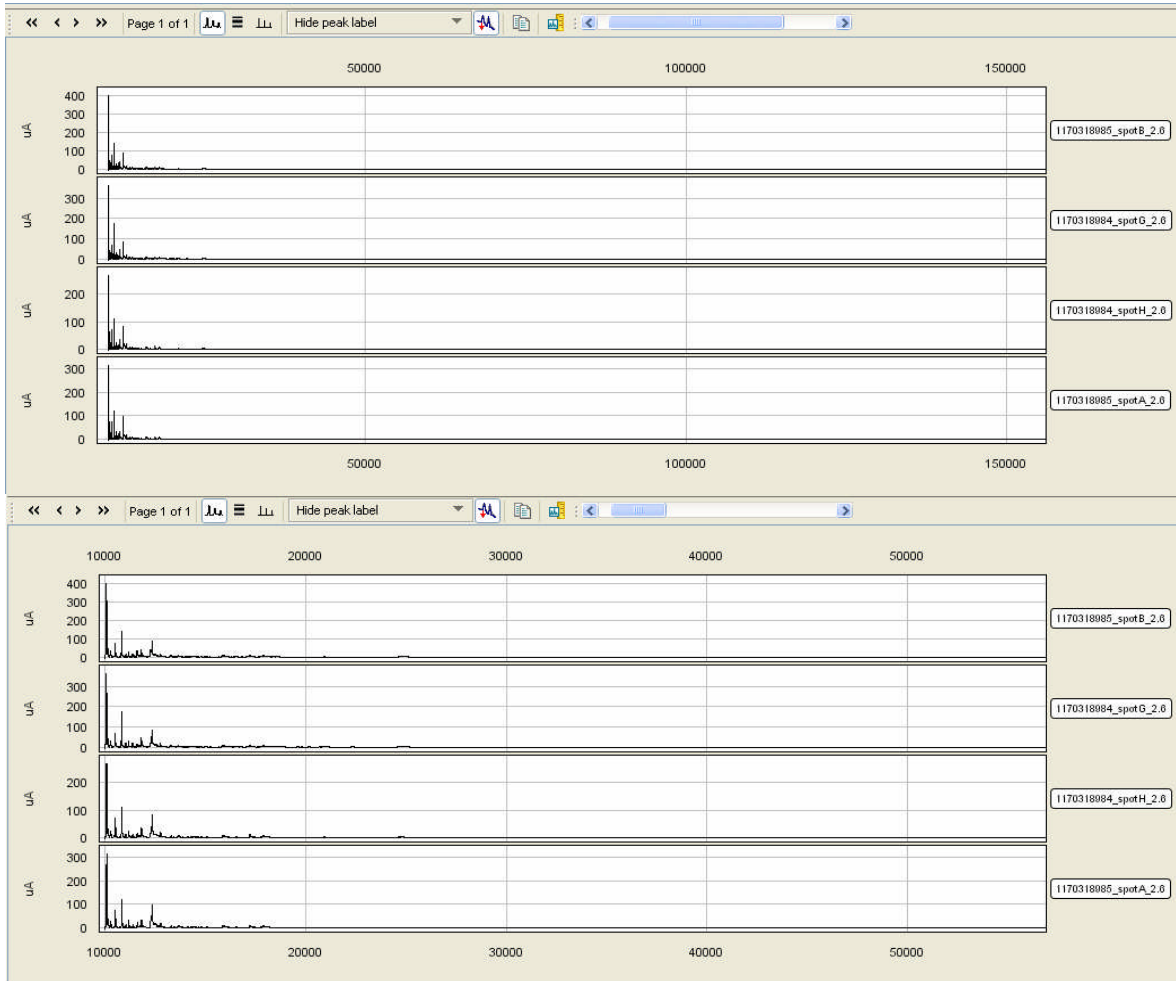
Tablo 16. 20 µg propolis/ml su ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasının istatistiksel analiz sonucu (CM10, düşük lazer enerjisi protokolü)

Pik	p-değeri	ROC area	M/Z (Da)	Ortalama M/Z (Da)	Ortalama yoğunluk
1	0,0209	1	6.266	6.268	5,523
2	0,0209	1	16.024	16.042	3,381
3	0,0209	1	24.662	24.662	1,473
4	0,0433	0,9375	24.805	24.810	1,715
5	0,0433	0,0625	32.055	32.043	0,119

20 µg propolis/ml su ekstraktı, m/z değerleri 6.268 Da, 16.042 Da, 24.664 Da ve 24.810 Da olan piklerin ekspresyonunu artırırken; m/z değeri 32.043 Da olan pikin ekspresyonunu azalttı.

4.3.2. CM10 Protein çip Dizinine Yüksek Enerji Seviyesinde Uygulanan Örneklerin Sonuçları

CM10 dizinine yüksek lazer enerjisinde uygulanan örneklerde CIPHERGEN Express yazılımı kullanılarak normalize edilen veriler için ekspresyon farklılığı haritalandırılması oluşturuldu ve veriler analiz edildi. 88 adet pik tespit edildi. Örneklerin genel pik spektrumları Şekil 20'de gösterilmiştir.



Şekil 21. CM10 dizinine yüksek lazer enerjisinde uygulanan örneklerin pik spektrumları

% 0,008 DMSO çözeltisi, 20 µg propolis/ml DMSO ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasında, protein ekspresyonunda m/z değeri 12.663 Da olan bir pikte istatistiksel olarak anlamlı değişiklik belirlendi.

Tablo 17. % 0,008 DMSO çözeltisi, 20 µg propolis/ml DMSO ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasının istatistiksel analiz sonucu (CM10, yüksek lazer enerji protokolü)

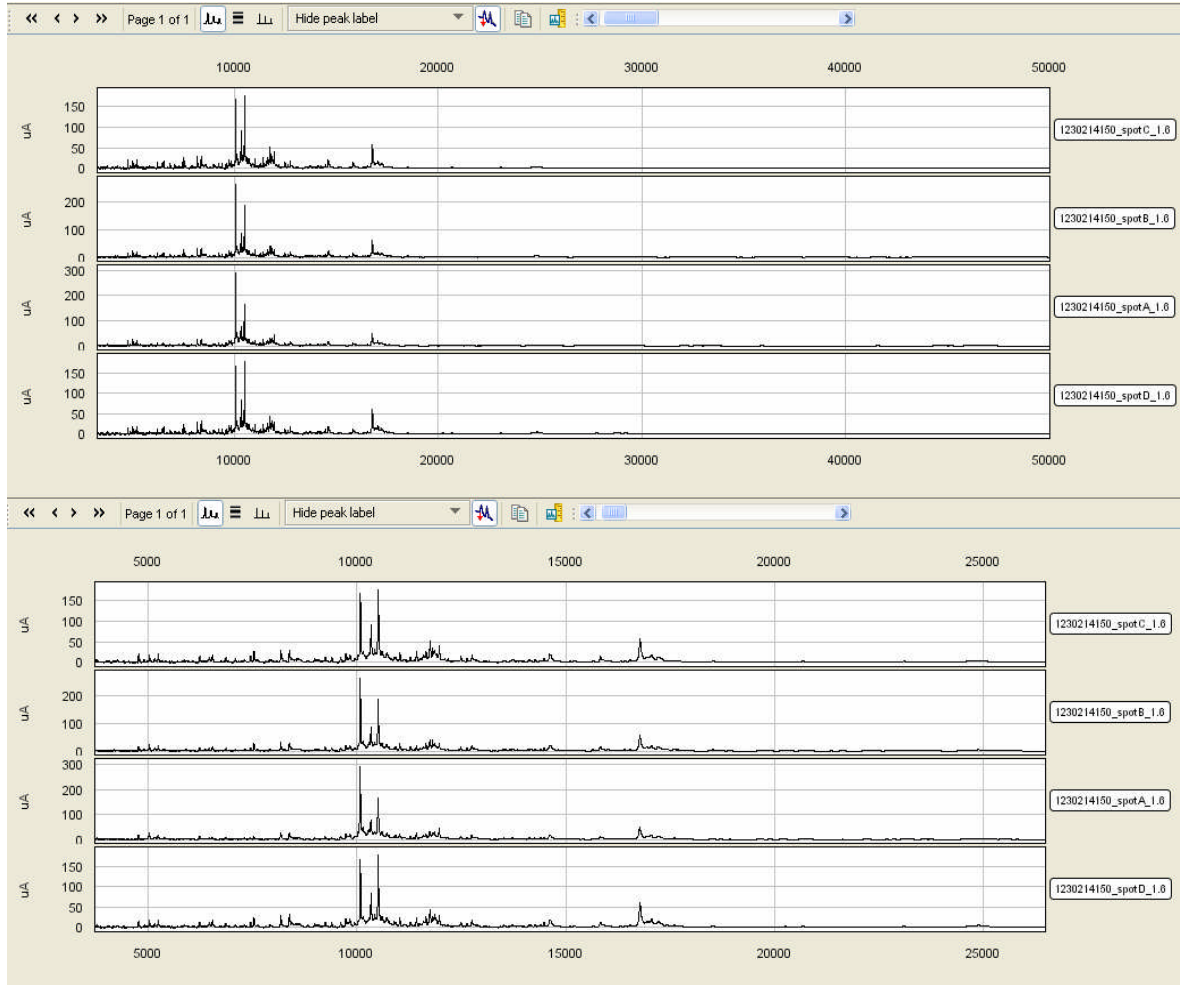
Pik	p-değeri	M/Z (Da)	Ortalama M/Z (Da)	Ortalama yoğunluk
1	0,0345	12.665	12.663	10.323

12.663 Da m/z değerine sahip olan pikin ekspresyonunu % 0,008 DMSO çözeltisi ve 20 µg propolis/ml DMSO ekstraktı artırdı.

20 µg propolis/ml su ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasında, protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı değişiklik olan bir pik belirlenmedi.

4.3.3. Q10 Protein çip Dizinine Düşük Enerji Seviyesinde Uygulanan Örneklerin Sonuçları

Q10 dizinine düşük lazer enerjisinde uygulanan örneklerde CIPHERGEN Express yazılımı kullanılarak normalize edilen veriler için ekspresyon farklılığı haritalandırılması oluşturuldu ve veriler analiz edildi. 166 adet pik tespit edildi. Örneklerin genel pik spektrumları Şekil 22'de gösterilmiştir.



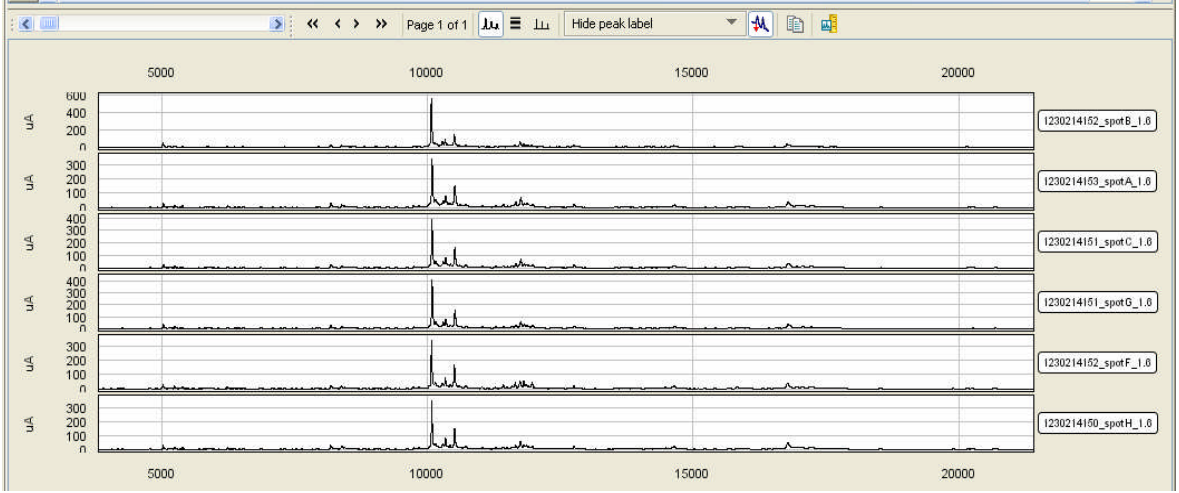
Şekil 22. Q10 dizinine düşük lazer enerjisinde uygulanan örneklerin pik spektrumları

% 0,008 DMSO çözeltisi, 20 µg propolis/ml DMSO ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasında, protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı değişiklik olan bir pik belirlenmedi.

20 µg propolis/ml su ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasında, protein ekspresyonunda m/z değerlei 10.350 ve 11.605 Da olan iki pikte istatistiksel olarak anlamlı değişiklik belirlendi.

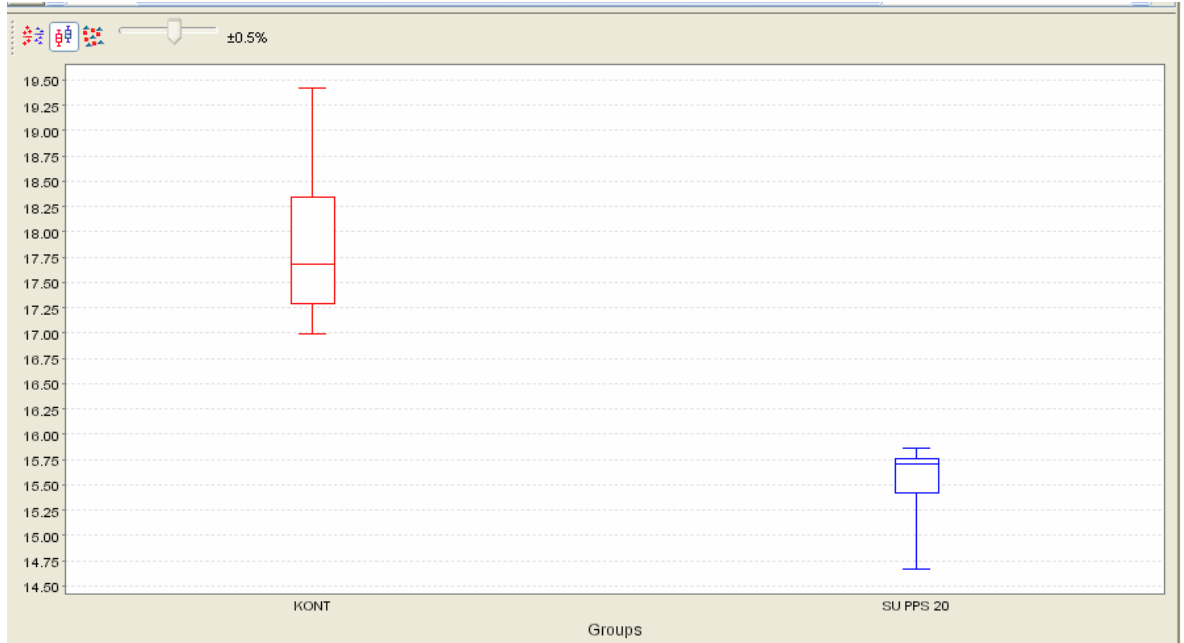
Tablo18. 20 µg propolis/ml su ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasının istatistiksel analiz sonucu (Q10, düşük lazer enerji protokolü)

Pik	p-değeri	ROC area	M/Z (Da)	Ortalama M/Z (Da)	Ortalama yoğunluk
1	0,0209	1	10.351	10.350	81,568
2	0,0209	0	11.605	11.603	16,715

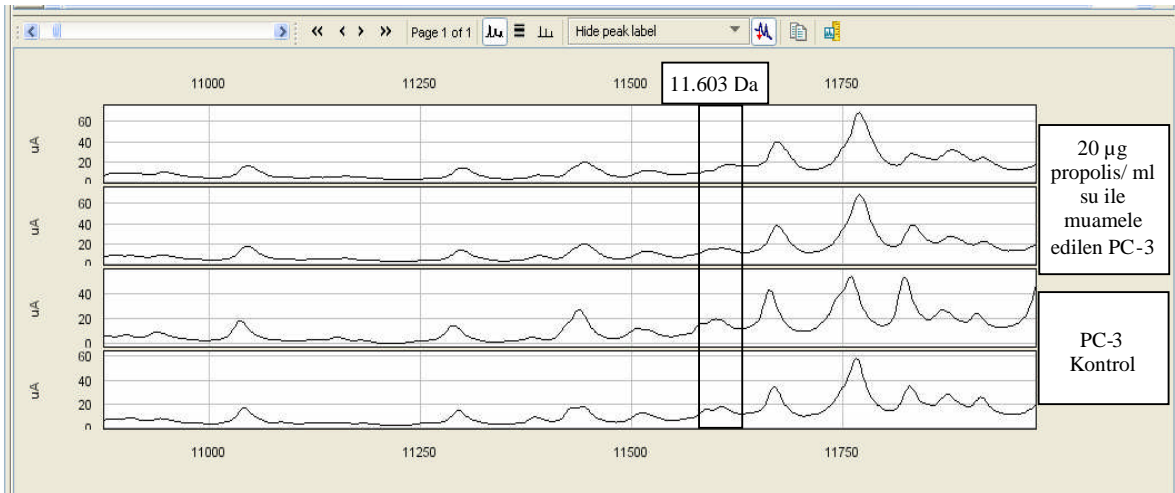


Şekil 23. Düşük lazer enerjisinde Q10 çip dizinine yüklenen örneklerde, 20 µg propolis/ml su ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin kontrol PC-3 hücrelerinin genel pik spektrumu

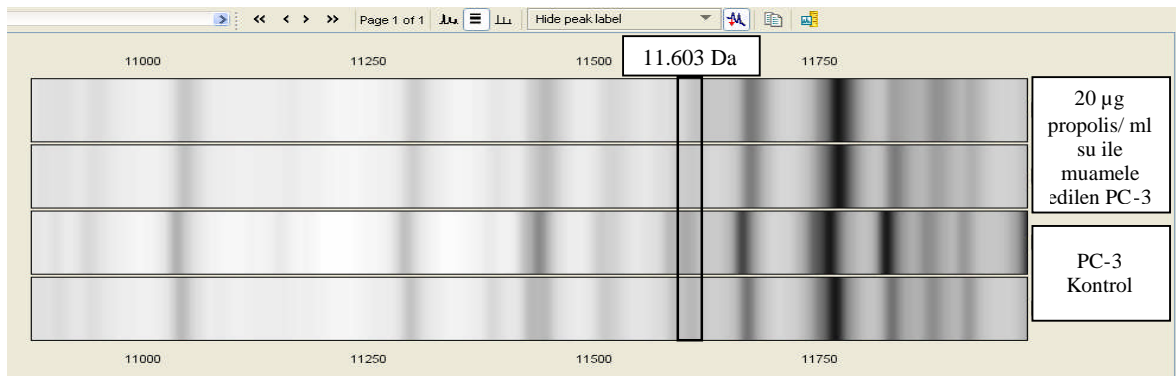
m/z değeri 11.603 Da olan pikin ekspresyonunu, 20 µg propolis/ml su ekstraktı azalttı.



Şekil 24. Q10 protein çip dizinine düşük enerjili protokolde propolisin sulu ekstraktı ile muamele edilen örneklerde m/z değeri 11.603 Da olan pikin ekspresyonundaki değişimin barlı grafiği



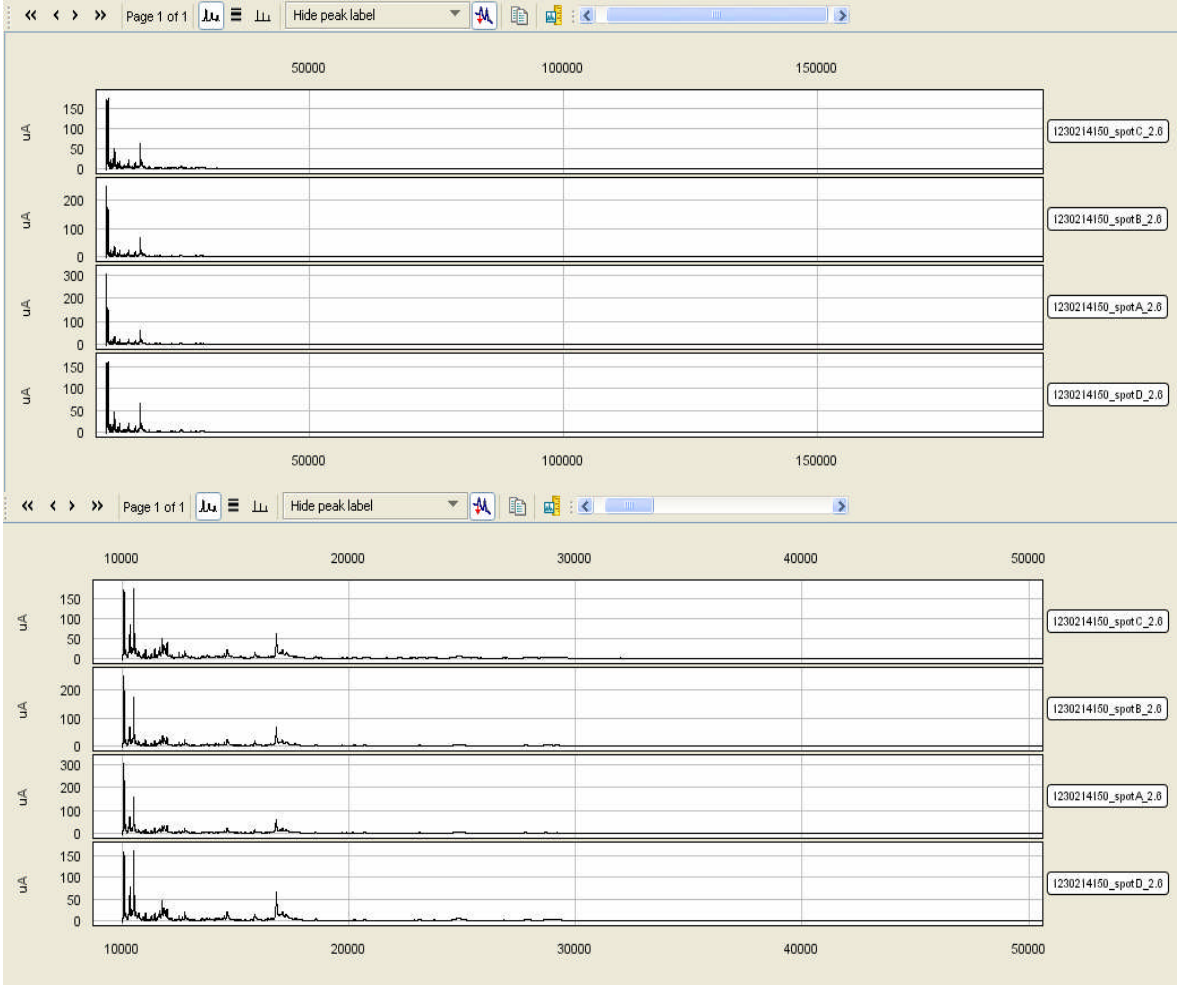
Şekil 25. Q10 Protein çip dizininde düşük enerjili protokolde propolisin sulu ekstraktı ile muamele edilen örneklerde m/z değeri 11.603 Da olan pik için pik spektrumu



Şekil 26. Q10 Protein çip dizininde düşük enerjili protokolde propolisin sulu ekstraktı ile muamele edilen örneklerde m/z değeri 11.603 Da olan pik için jel görüntüsü

4.3.4. Q10 Protein çip Dizinine Yüksek Enerji Seviyesinde Uygulanan Örneklerin Sonuçları

Q10 dizinine yüksek lazer enerjisinde uygulanan örneklerde CIPHERGEN Express yazılımı kullanılarak normalize edilen veriler için ekspresyon farklılığı haritalandırılması oluşturuldu ve veriler analiz edildi. 297 adet pik tespit edildi. Örneklerin genel pik spektrumları Şekil 28'de gösterilmiştir.



Şekil 27. Q10 dizinine yüksek lazer enerjisinde uygulanan örneklerin pik spektrumları

% 0,008 DMSO çözeltisi, 20 µg propolis/ml DMSO ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasında, protein ekspresyonunda m/z değerleri 61.257, 108.529, 144.776, 84.341 ve 85.994 Da olan beş pikte istatistiksel olarak anlamlı değişiklik belirlendi.

Tablo 19. % 0,008 DMSO çözeltisi, 20 µg propolis/ml DMSO ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasının istatistiksel analiz sonucu (Q10, yüksek lazer enerji protokolü)

Pik	p-değeri	M/Z (Da)	Ortalama M/Z (Da)	Ortalama yoğunluk
1	0,0237	61.301	61.257	0,043
2	0,0281	108.516	108.529	0,011
3	0,0404	144.802	144.776	0,017
4	0,0486	84.346	84.341	0,060
5	0,0486	85.989	85.994	0,034

20 µg propolis/ml DMSO ekstraktı, m/z değeri 14.776 Da olan pikin ekspresyonunu artırırken; m/z değerleri 61.257 Da, 108.529 Da, 84.341 Da ve 85.994 Da olan piklerin ekspresyonunu azalttı.

% 0,008 DMSO çözeltisi, m/z değerleri 61.257 Da, 108.529 Da, 144.776 Da, 84.341 Da ve 85.994 Da olan piklerin ekspresyonunu azalttı.

20 µg propolis/su ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasında, protein ekspresyonunda m/z değerleri 84.348, 87.529, 89.004, 102.007, 144.762, 10.891, 13.575, 85.989, 94.605 ve 104.407 Da olan on pikte istatistiksel olarak anlamlı değişiklik belirlendi.

Tablo 20. 20 µg propolis/su ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasının istatistiksel analiz sonucu (Q10, yüksek lazer enerjisi protokolü)

Pik	p-değeri	ROC area	M/Z (Da)	Ortalama M/Z (Da)	Ortalama yoğunluk
1	0,0209	0	84.346	84.348	0,037
2	0,0209	0	87.532	87.529	0,016
3	0,0209	0	89.042	89.004	0,021
4	0,0209	0	101.998	102.007	0,013
5	0,0209	0	144.802	144.762	0,011
6	0,0433	0,9375	10.891	10.891	3,121
7	0,0433	0,0625	13.565	13.575	5,780
8	0,0433	0,0625	85.989	85.989	0,019
9	0,0433	0,0625	94.584	94.605	0,019
10	0,0433	0,0625	104.405	104.407	0,020

20 µg propolis/su ekstraktı, m/z değerleri 84.348 Da, 87.529 Da, 89.004 Da, 102.007 Da, 144.762 Da, 13.575 Da, 85.989 Da, 94.605 Da ve 104.407 Da olan dokuz pikin ekspresyonunu azaltırken; m/z değeri 10.891 Da olan pikin ekspresyonunu artırdı.

Kontrol PC-3 hücrelerinin ve % 0,008 DMSO ve 20 µg/ml DMSO-propolis ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin CM10 ve Q10 çip dizinlerine uygulanıp, analiz edilmesi sonucu elde edilen ekspresyon değişimleri sonuçları Tablo 21’de özetlenmiştir.

Tablo 21. Kontrol PC-3 hücrelerinin ve % 0,008 DMSO ve 20 µg/ml DMSO-propolis ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin ekspresyon değişimi sonuçları

Çip türü	Protokol	m/z (Da)	% 0,008 DMSO	p	20 µg/ml DMSO-propolis	p
CM10	Düşük Enerji	14.424	↑	0,0230	↑↑	0,0230
		33.303	↑	0,0263	↓	0,0263
		32.800	↓	0,0296	↓↓	0,0296
		20.709	↑↑	0,0373	↑	0,0373
		27.294	↓	0,0387	↓↓	0,0387
	Yüksek Enerji	21.139	↑	0,0488	↓	0,0488
		5.141	↑	0,0497	↓	0,0497
		12.663	↑	0,0345	↑↑	0,0345
		Düşük Enerji	Yok	Yok		
		61.257	↓	0,0237	↓↓	0,0237
Q10	Yüksek Enerji	108.529	↓	0,0281	↓↓	0,0281
		144.776	↓	0,0404	↑	0,0404
		84.341	↓↓	0,0486	↓	0,0486
		85.994	↓↓	0,0486	↓	0,0486

Kontrol PC-3 hücrelerinin ve 20 µg/ml su-propolis ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin CM10 ve Q10 çip dizinlerine uygulanıp, analiz edilmesi sonucu elde edilen ekspresyon değişimleri Tablo 22’de özetlenmiştir.

Tablo 22. Kontrol PC-3 hücrelerinin ve % 0,008 DMSO ve 20 µg/ml DMSO-propolis ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücrelerinin ekspresyon değişimi sonuçları

Çip türü	Protokol	m/z (Da)	20 µg/ml su-propolis	p
CM10	Düşük Enerji	6.268	↑	0,0209
		16.042	↑	0,0209
		24.664	↑	0,0209
		24.810	↑	0,0433
		32.043	↓	0,0387
	Yüksek Enerji	Yok	Yok	
	Düşük enerji	10.350	↑	0,0209
		11.603	↓	0,0209
		84.348	↓	0,0209
		87.529	↓	0,0209
89.004		↓	0,0209	
Q10	Yüksek Enerji	102.007	↓	0,0209
		144.762	↓	0,0209
		10.891	↑	0,0433
		13.575	↓	0,0433
		85.989	↓	0,0433
		94.605	↓	0,0433
		104.407	↓	0,0433

5. TARTIŞMA

Son yıllarda, diyetin hastalıkları önlemek ve tedavi etmekte önemli rol oynadığı yaygın bir şekilde kabul edilmektedir (7). Diyetel faktörler insan sağlığında ve kanserin de dahil olduğu bazı kronik hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynar. Bazı yiyecekler mutajenler ve/veya karsinojenler kadar anti-tümör bileşikler de içerir. Birçok araştırmanın hedefi, kanserin önlenmesi ve/veya tedavisinde kullanılabilecek doğal ve sentetik bileşikleri keşfetmektir (83).

Beslenmenin temel kavramları önemli bir değişikliğe doğru ilerlemiş ve ‘optimum beslenme’ kavramı ortaya çıkartılmıştır. Optimum beslenme, besinleri (karbohidratlar, proteinler, yağlar, vitaminler, mineraller) her bir organik ihtiyacı giderecek yeterli miktarda sağlayan, sağlığı destekleyen ve belli hastalıkların gelişim riskini düşüren diyet olarak; bu koşulları sağlayan besinler de ‘fonksiyonel besinler’ olarak tanımlanmıştır (7).

Fonksiyonel besin doğal olabilir veya onun temel bileşenlerinin bir veya daha fazlasının elimine edilmesi veya modifiye edilmesi vasıtasıyla elde edilebilir. Bir besini fonksiyonel hale getirmek için o besine birçok bileşik eklenmektedir. Eklenen bu bileşikler arasında ω -3 yağ asitleri, vitaminler, probiyotikler, prebiyotikler, simbiyotikler, fiber, fitokimyasallar, biyoaktif peptidler yer almaktadır. Fonksiyonel besinlerin karakteristik özelliklerine sahip olan besinler arasına arı kovanlarından elde edilen bal, propolis ve arı sütü de dahil edilebilir (7).

Propolis, ya da diğer adıyla ‘bee glue’ bitkilerin tomurcuk ve terlerinden bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından toplanan ve arı enzimlerinin varlığında dönüştürülen reçinemi maddenin jenerik ismidir (1, 4). Arılar, propolisi kovanlarındaki oyukları kapatmak, kovanın iç duvarlarını sıvamak, birçok yapıyı tamir etmek, girişı davetsiz misafirlere karşı korumak ve kovan içindeki ölmüş olan istilacıların cesetlerini mumyalamak için kullanırlar (1-3, 5).

Propolisin kompozisyonu, propolisin toplandığı bölgedeki yerel bitki örtüsünde arılar tarafından kullanılan bitki türleri, toplanan bitki bileşenleri, toplama mevsimi, iklim,

arların beslenme tipi ve kraliçe arıdaki genetik çeşitlilik gibi faktörlere bağlı olarak çeşitlilik gösterir. (2, 5-9). Kimyasal analizler, propolisin kompozisyonunda en az 300 bileşenin varlığına dikkat çekmektedir. Bu organik bileşenlerin arasında, fenolik bileşikler ve esterleri, her formunda flavonoidler (flavonoller, flavonlar, flavononlar, dihidroflavonoller ve kalkonlar (chalcones)), terpenler, beta-steroidler, aromatik asitler, aromatik aldehytler ve alkoller, seskiterpenler, stilben terpenler ve kafeik asit fenil esteri (CAPE) bulunmaktadır (7, 51). Propolisin anti-bakterial (6, 10) , anti-viral (10-11), anti-fungal (9-10), anti-karyojenik (8), anti-ülser (12), immunomodülatör (13), anti-inflammatuar (14), anti-oksidan (15), hepatoprotektif (16), anestezik (1), anti-tümör (17-18), anti-kanser (19-20), radyoprotektif (21), nöroprotektif (22), anti-proliferatif (23-24) ve tümör indüklü anjiogeneze karşı koruyucu (25) gibi çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğu yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Propolis örneklerinden izole edilen bileşiklerin en büyük grubu, bitki aleminde oldukça yaygın olan flavonoid pigmentleridir (3, 15). Propolisin farmakolojik özellikleri, çoğunlukla flavonoidlerin varlığına atfedilmektedir. Flavonoidlerin, antiinflammatuar, antihepatotoksik, antikanser, antiviral ve antibakterial aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiştir. Yaygın bir görüşe göre, flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri, serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı koruyucu yeteneğe sahip olmaları ile ilişkilidir (26).

Propolisin kullanımı, MÖ 300 gibi çok eski zamanlara kadar dayanmaktadır ve dünyanın birçok bölgesinde hem internal hem de eksternal olarak yöresel halk ilacı olarak kullanılmıştır (2). Son zamanlarda, propolis sağlığı geliştirmek ve hastalıkları önlemek için yiyecek ve içecekler içinde kullanılmaktadır (4) . Propolisin insan sağlığını geliştirdiği ve inflamasyon, kalp hastalığı ve hatta kanser gibi hastalıkları önlediği düşünülmektedir (23, 16).

Daha önce Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Trabzon ilinden toplanan propolis ve toplanan polen örnekleri ile bazı çalışmalar yapılmıştır. Gerigelmez ve Çolak yaptıkları çalışmada polenin sulu ve PBS'lu ve propolisin DMSO'lu ekstraktlarının HL-60 miyeloid hücre serilerinde kaspaz-3 aktivitesini farklı oranlarda artırarak kanser hücrelerini apoptoza sürüklediği flowsitometrik analizler sonucu ortaya koyuldu. Bu çalışmada 0.5-0.25 mg/ml'lik propolis DMSO ekstraktlarının HL-60 kanser hücrelerinde hem apoptoza hem differansiasyona sebep olduğu bildirilmiştir (27-28). Aliyazıcıoğlu ve arkadaşlarının KML-562 kanser hücrelerini kullanarak yaptıkları bir çalışmada ise polen ve propolisin DMSO ekstraktlarının konsantrasyona bağlı olarak

solunumsal patlamayı inhibe ettiği flowsitometrik analizlerle ortaya koyuldu ve polen ve propolis ekstraktlarının bu etkiyi antioksidan özellikleri ile gerçekleştirdiği savunulmuştur (29). Barlak tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise solunumsal patlama sonrası propolisin DMSO ekstraktlarının PMN lökositlerinden PMN elastaz salınımına etkisi incelendi. Solunumsal patlamanın uyarıldığı PMA'lı örneklerde propolis konsantrasyonu arttıkça hem PMN elastaz salınımı hem de solunumsal patlamanın azaldığı, PMA'sız örneklerde ise PMN elastaz salınımının propolis ekstraktı ilave edilmeyenlere göre bir miktar azaldığı ancak solunumsal patlamada bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Böylece propolisin anti-inflamatuar aktiviteye sahip olduğu teyit edilmiş oldu (30).

Kanser, birçok genetik ve çevresel faktörün etkileşimi sonucu oluşan multifaktoriyel bir hastalıktır (33). Prostat kanseri, ABD'de ve diğer batı ülkelerindeki erkek kanserlerinin en sık olanıdır ve ABD'de erkek kanser ölümlerine yol açan ikinci kanserdir (24, 45).

Porsuk ağacından elde edilen paclitaxel'in semi-sentetik bir türevi olan Doc, prostat, meme, gastrik, baş ve boyun ve akciğer kanserinin tedavisinde kullanılan ümit verici bir anti-kanser ilaçtır. Doc'un kullanımı ile ortaya çıkan problemlerden bir tanesi yüksek dozları ile ilişkili olan toksisitedir. Bu nedenle Doc gibi etkin bir şekilde fonksiyon gösteren fakat toksik etkiye neden olmayan yeni ajanların keşfedilmesine ihtiyaç vardır (84).

Prostat kanseri hastalarını tedavi etmek için prostatektomi, radyasyon terapisi ve hormon tedavisi kullanılmasına rağmen, prostat kanserinin tekrarlaması ve metastazı, prostat kanseri tedavisindeki başlıca problemlerdir. Bugünkü kullanılabilir tedaviler çoğunlukla idrar tutamama, erektil fonksiyon kaybı gibi yan etkilere yol açmaktadır (24).

Bu nedenle, prostat kanserinin tedavisi ve önlenmesi için yeni terapötik yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Son çalışmalar, birçok diyetsel kanser kemopreventiv ajanların prostat kanserinin insidansını düşürmek için ümit verici stratejiler sağladığını göstermiştir (45). Selenyum, E ve D vitaminleri, likopen, izoflavonoidler ve düşük yağlı diyet tüketiminin prostat kanseri riskini düşürdüğüne dair deliller vardır (46).

Propolisin içeriğinde de bol miktarda bulunan flavonoidlerin, gözlenen *in vitro* biyolojik etkileri arasında, serbest radikal yakalama, hücresel proliferasyonu inhibe etme gibi aktiviteler vardır. Flavonoidlerin kemopreventiv aktiviteleri onların yapısal özelliklerine bağlıdır (66). Doğal flavonoidlerin kullanımı kanser tedavisinin yeni

yaklaşımı, tedavinin kalitesini geliştirmek ve kanser ve anti kanser ilaçlara karşı maksimum koruma sağlamak için araştırılmaktadır (33).

Banskota ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Hollanda propolisinin metanolik ekstraktının murin kolon 26-L5 karsinoma hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite gösterdiği (EC değeri: 3.5 µg/ml) belirlendi. Bu sonuç üzerine metanolik ekstraktan izole edilen dört flavonoidin, yedi sinamik asit türevinin ve iki gliserol türevinin murin kolon 26-L5, B16-BL6 melanoma, insan HT-1080 fibrokarsinoma ve insan akciğer A549 adenokarsinoma hücre serilerine karşı antiproliferatif aktivitelerini incelediler. Benzil (EC50: 0.288 µM), fenetil (EC50: 1.76 µM) ve sinamil kafeatlarının (EC50: 0.114 µM) 26-L5 karsinoma hücrelerine karşı kuvvetli antiproliferatif aktiviteye sahip olduğunu belirlediler. Bu kafeatların DPPH (Difenilpikrilhidrazil) radikali yakalama aktivitesini ölçtüler ve yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğunu buldular. Hollanda propolisinin antiproliferatif aktivitesinin aktif bileşenlerinin kafeatlar olduğu ve bu etkiyi antioksidan aktiviteleri vasıtasıyla gösterdikleri sonucuna vardılar (23).

Russo ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ılıman bir iklime sahip olan merkez Şili'den elde edilen propolisin etanolik ekstraktının antioksidan aktivitesi ve KB (insan ağız epidermoid karsinoma hücreleri), Caco-2 (Kolon adenokarsinoma hücreleri) ve DU-145 (androjen-sensitiv prostat kanser hücreleri)'ne karşı antiproliferatif aktivitesi incelendi. Şili propolisinin etanolik ekstraktının total fenolik içeriğini % 63.88 olarak belirlediler. Ekstraktın farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 20, 40, 80 µg/ml) DPPH serbest radikal yakalama aktivitesini ölçtüler ve ekstraktın konsantrasyon-bağımlı olarak aktivite gösterdiğini belirlediler. Ayrıca ekstraktın doz-bağımlı süperoksit radikali yakalama etkisini de belirleyerek, 0.78 µg/ml ekstraktın 80 mU/ml SOD (süperoksit dismutaz) aktivitesine karşılık geldiğini buldular. 80µg/ml ekstrakt konsantrasyonunda KB, Caco-2 ve D145 hücreleri ile 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığını sırayla %9, %45 ve %23 olarak belirlediler. Yazarlar, Şili propolisinin fenolik içeriği ile korrele olarak serbest radikalleri yakalama kapasitesi ve tümör hücrelerinin büyümesini inhibe etme kapasitesine sahip olduğu sonucuna vardılar. Şili propolisinin etanolik ekstraktının intrasellüler reaktif oksijen türleri miktarlarını module ederek, antiproliferatif aktivite gösterdiğini önerdiler (85).

Carballo ve arkadaşları Küba propolisi ile çeşitli hücre serilerinde (kolon, over ve prostat karsinoma, nöroblastoma) yaptıkları çalışmada propolisin 5-23µg/ml'lik konsantrasyonlarda (IC₅₀) kanser hücrelerine sitotoksik etki yaptığını bildirdiler. Küba

propolisi PC-3 hücrelerinde 10 μ g/ml'lik konsantrasyonda, LNCap hücrelerinde 12.3 μ g/ml'lik konsantrasyonda sitotoksik etki gösterdi. Bu çalışmada kullanılan kanser hücreleri immüniteden bağımsız olduğu için Küba propolisinin anti-tümöral etkisini immünmodüle edici etkisinden ziyade direkt sitotoksik etkisiyle gerçekleştirdiği savunuldu (86).

Aso ve arkadaşları, insan histiolitik lenfoma U937 hücrelerinin büyümesi üzerine Brezilya propolisinin etanolik ekstraktının liyofilize edilmesi ile elde edilmiş olan CB propolisinin (Brezilya propolisinin kurutulmuş etanolik ekstraktı) etkisini araştırdılar. Propolisin hücrelerin büyümesini ve makromoleküler sentezi doz va zaman bağımlı olarak apopitoz ile güçlü bir şekilde inhibe ettiğini buldular. 0.015-0.5 μ l/ml konsantrasyonunda 3 gün muamele ile antitümör aktivite gösterdiğini ve IC50 değerinin 0.18 μ l/ml olduğunu belirlediler. Ayrıca CB propolisinin DNA, RNA ve protein sentezini (IC50 sırayla 0.08, 0.17 ve 4.3 μ l/ml) inhibe ettiğini de belirlediler. DNA sentezi üzerindeki inhibe edici etkinin kısmen geri dönüşümsüz olduğunu ve hücre büyümesi inhibe olan hücrelerde apoptotik kromatin kondensasyonu gözlediler. Yazarlar, propolisin anti-tümör aktivitesinin apopitozun indüksiyonu vasıtasıyla olduğunu ve propolisin kanser kemoterapötik ajan olarak kullanışlı olabileceğini önerdiler (87).

Li ve arkadaşları Brezilya'dan topladıkları 500 propolis örneğinin etanolik ekstraktı ile yaptığı çalışmada propolisleri fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre 12 gruba ayırdı ve 3. ve 12. grupların kemiğe metastatik eğilimi olan PC-3, beyine metastatik eğilimi olan DU-145 hücre serileri ile insan prostat hücrelerinden üretilen primer malignan tümörlerin (RC58T/h/SA#4) proliferasyonuna etkisini inceledi. DU-145 ve PC-3 hücrelerinin büyümesi optimal 40 μ g/ml, RC58T/h/SA#4 hücrelerinde ise 80 μ g/ml'lik propolis konsantrasyonlarında genisteine benzer şekilde baskılandığı ve metastatik insan prostat kanser hücrelerinin primer insan prostat kanser hücre serilerine göre büyümelerinin daha iyi inhibe edildiği savunuldu. Bu deneyde grup 3 propolis ekstraktlarının hücreleri G2 fazında, grup 12 propolis ekstraktlarının ise S fazında büyümelerini inhibe ettiği ve grup 3 propolis ekstraktlarının grup 12'ye göre daha güçlü bir inhibisyon gösterdiği vurgulandı. Yapılan çalışmada ayrıca, grup 12 Brezilya propolis ekstraktlarının insan prostat kanser hücre serilerinde cyclin D1, B1, cyclin bağımlı kinaz (CDK) ve p21'in protein ekspresyonunu düzenleyerek proliferasyonu inhibe ettikleri ve prostat kanserinden korunmak için kemoterapötik ajan olarak yalnız veya kombine halde kullanılabilecekleri savunuldu. Grup 3 propolisi ise sadece p21 ekspresyonunu indükledi, cyclin D1, B1, CDK

ekspresyonlarını herhangi bir şekilde baskılamadı. Li ve arkadaşlarının daha önce yaptıkları çalışmalarda propolis grupları 1, 2, 6 ve 7'nin nazofaringel karsinoma (KB), grup 6 ve 7'nin ileocecal adenokarsinoma (HCT-8), renal karsinoma (CAKE-1) ve meme karsinoma (MCF-7) hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini rapor etti. (24).

Bizim çalışmamızda polifenol miktarı $48.69 \pm 7,78$ mg GA/g propolis, flavonoid miktarı $12,9 \pm 1,6$ mg K/g propolis olan propolisin DMSO ekstraktı ile yapılan MTT testi sonucu, propolisin DMSO ekstraktı, 20 μ g/ml konsantrasyonda hücre canlılığını %24,5'e düşürmüştür. Polifenol miktarı $9,24 \pm 0,5$ mg GA/g propolis, flavonoid miktarı $2.14 \pm 1,5$ mg K/g propolis olan propolisin sulu ekstraktı ile yapılan canlılık testi sonucu, propolisin sulu ekstraktı 20 μ g/ml konsantrasyonda hücre canlılığını % 17,7'e düşürmüştür.

Propolisin DMSO'lu ekstraktının total antioksidan kapasitesi ($8,82 \pm 2,9$ mmol Tro / 100 g propolis) ve demir indirgeyici antioksidan potansiyeli ($59,5 \pm 17,3$ mg Tro /g propolis), propolisin sulu ekstraktının total antioksidan kapasitesi ($4,9 \pm 0,8$ mmol Tro / 100 g propolis) ve demir indirgeyici antioksidan kapasitesinden ($22,6 \pm 5,8$ mmol Tro / 100 g propolis) daha fazladır. Antioksidan potansiyeli daha yüksek olan propolisin DMSO ekstraktı, hücre canlılığını % 24,5 ve 50 arasında düşürürken; antioksidan potansiyeli daha düşük olan sulu ekstraktı, hücre canlılığını, % 17,7 ve 33,3 arasında düşürdü. Kısacası antioksidan potansiyeli daha düşük olan sulu ekstraktın, daha fazla sitotoksik aktivite gösterdiği görüldü. Ekstraktların sitotoksik aktivitesi antioksidan potansiyelleri ile orantılı değildir. Dolayısıyla bu ekstraktların, antioksidan potansiyelleri beraberinde başka mekanizmalar (hücreyi ölüme götürecek protein veya proteinlerin ekspresyonunu artırmak veya aktivitesini artırmak gibi) vasıtasıyla da sitotoksik aktivite gösterebileceği ileri sürülebilir.

Wu ve Lou tarafından yapılan bir çalışmada, *Brassica campestris* arı poleninini kloroform ekstraktının dokuz insan kanser hücre serisinin (PC-3, LNCaP, MCF-7, HeLa, BEL-7402, BCG-823, KB, A549 ve HO8910) canlılığı üzerine etkisi incelendi. Bu steroid fraksiyonunun en güçlü sitotoksik aktiviteyi insan prostat kanser PC-3 hücrelerine karşı gösterdiğini belirlediler. Flow sitometrik analizler ve floresans mikroskop vasıtasıyla ölüm modunun apoptoz olduğunu, fraksiyon ile muamele edilen hücrelerde kaspaz-3 aktivitesinin arttığını belirlediler. Ayrıca, western blotlama analizleri ile anti-apoptotik protein Bcl-2'nin ekspresyonunda zamana bağlı olarak azalma tespit ettiler. Steroid fraksiyonunun apoptozu tetikleyerek, prostat kanseri PC-3 hücrelerinde sitotoksiteyi

indükleyebileceğini ve bu fraksiyonun prostat kanseri tedavisi için bir aday olabileceğini önerdiler (88).

Tsiapara ve arkadaşları, Yunan bal ekstraktlarının (kekik, çam ve köknar balları) kimyasal kompozisyonu ve meme (MCF-7), endometrial (Ishikawa) ve prostat (PC-3) kanser hücrelerinin hücre canlılığı ve östrojenik aktivitesi üzerine etkisini araştırdı. Bütün balların, fenolikleri, fenolikasitleri ve hidroksimetil furfurali içerdiğini ve kekik balının en fazla içerdiğini belirlediler. Ballardarda şeker ve uçucu bileşikler belirlenmiş ama yağ asidi belirlenmemiştir. Kekik, çam ve köknar ballarının, MCF-7 hücrelerinde sırayla düşük ve yüksek konsantrasyonda, hem anti-östrojenik hem de zayıf östrojenik aktivite gösterdiğini buldular. Köknar balının MCF-7 hücrelerinin canlılığını stimüle ederken, kekik balının, Ishikawa ve PC-3 hücrelerinin canlılığını düşürdüğünü belirleyerek, yunan ballarının fenolik bileşikler açısından zengin olduğu ve östrojenik aktiviteyi module ettiği sonucuna vardılar. Yazarlar, Kekik balı ile zenginleştirilmiş diyetin, meme, prostat ve endometrial kanser hücrelerinin kanser ile ilişkili mekanizmalarını önleyebileceğini önerdiler (80).

Bandyopadhyay ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada, kaempferol ve kuersetinin (her ikisi de propolisin önemli bileşenleridir) prostat kanser hücrelerinde dentritik hücrelerin tümör bölgesine toplanması ile sonuçlanacak olan GM-CSF(granülosit-makrofaj koloni-stimule edici faktör) üretimini stimüle ederek immün cevabı aktive ettiğini belirlediler (89).

Mokhtari ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada boğa dikeninde bulunan bir flavonoid olan silibinin çeşitli konsantrasyonları ile PC-3 hücrelerini farklı zamanlarda inkübe ettiler. Sırayla MTT, sellematriks adhezyon ve hücre migrasyon ölçümleri kullanılarak hücre sitotoksitesi, hücre adezyonu ve hücre göçü üzerine silibinin etkisini incelediler. Silibinin yüksek derecede metastatik olan PC-3 hücrelerinde canlılık, göç ve adezyonu doz- ve zamana bağlı olarak inhibe ettiğini buldular. Silibinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarında LC₅₀ değerleri sırayla 143,4, 74,7 ve 21,1 µg/ml olarak buldular. Silibininin prostat kanserinde metastazı inhibe edebileceği sonucuna vardılar (90).

Wang ve arkadaşları, PC hücrelerinin büyümesi üzerine izoflavonun ile curcuminin beraber mi yoksa izoflavonun tek başına mı daha büyük inhibe edici etkisi olduğunu araştırdı ve etkinin moleküler mekanizmasını aydınlatmaya çalıştı. Kombinasyon grubundaki hücre büyümesinin inhibisyonunun ve apoptozun indüksiyonunun, her iki ajanın da tek başına kullanıldığında elde edilenden anlamlı derecede daha fazla olduğunu buldular. Bu değişikliklerin Notch-1 ekspresyonunda azalma ve NF-κB nin DNA bağlama

aktivitesinde ve onun Cyclin D1, Bcl-2 ve Bcl-xL gibi hedef genlerinin ekspresyonunda azalma ile ilişkili olduğunu belirlediler. Bundan başka, dört doğal ajanın düşük konsantrasyonlarda kombinasyonunun daha fazla etkili olduğunu buldular ve çok sayıda doğal ürün içeren diyetin, PC nin önlenmesi ve/veya tedavisi için tek bir ajana tercih edilebileceğini önerdiler (91).

Propolisin antimikrobiale aktivitesinin mekanizmasının kompleks olduğu ve reçinedeki fenolik ve diğer bileşenlerin arasındaki sinerjistik etkiye atfedilebileceği rapor edilmiştir (57). Tek bir propolis bileşeninin total ekstraktından daha büyük bir aktiviteye sahip olmadığı bu nedenle propolisin genel biyolojik özelliklerinin kendi bileşenlerinin doğal karışımından dolayı olduğu ileri sürülmektedir (2). Bu nedenle çalışmamızda, kullandığımız ekstraktların bileşenlerini tek tek izole edip her birinin ayrı ayrı etkisini incelemek yerine, total ekstraktı kullanmayı tercih ettik.

Proteom, hücrenin intrinsik genetik programı ve kendi yakın çevrelerindeki etkilerin her ikisini de yansıtan proteinlerin dinamik bir koleksiyonudur (32). Proteomiks, tanımlanmış sistem (hücre veya organizma) içindeki proteinlerin kimliğini, miktarını ve fonksiyonunu dikkate alarak proteinlerin sistematik analizi olarak açıklanabilir (31, 35).

Klinik proteomik, proteomik tekniklerinin veya stratejilerinin tıp alanına uygulanmasıdır (35). Klinik proteomik, mevcut teknolojiyi kullanarak, farklılaşan fizyolojik ve hastalık durumları arasındaki proteom profillerini karşılaştırarak teşhis, prognoz ve tedavi etkinliği için biyomarkır gibi tedavi ve tedavi uygulamalarında yeni hedeflerin belirlenmesi için umut verici kanıtlar sağlayan hızla büyüyen bir alandır (31).

Sağlıklı bir hücrenin neoplastik bir hücreye (tümör veya kanser gibi kontrolsüz bir şekilde çoğalan hücrelerdir) dönüşümü sırasında, protein seviyesinde, belirgin değişiklikler meydana gelir. Bunlar, değişmiş ekspresyon, farklı protein modifikasyonu, spesifik aktivitedeki değişiklik, anormal lokalizasyondur ve hepsi hücre fonksiyonunu etkiler. Kanser proteomiksinin temeli, bu değişiklikleri tanımlamak ve anlamaktır (34).

Yüzey ile geliştirilmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon kütle spektrometrisi [surface enhanced laser desorption ionization (SELDI) MS], MALDI-MS'in bir varyasyonudur. SELDI'de, MALDI'nin yüzeyi, daha kompleks karışımlarda kullanılmak için kromatografik kolonu taklit ederek modifiye edilmiştir ve lazer desorpsiyonuna dayanan bir metoda imkan verir. Bu teknik, kanser proteomiksinde yaygın olarak kullanılmaktadır (31). Bu teknik ilk kez erken dönemdeki over kanserinde kullanılmıştır ve bazı ayırt edici proteinler belirlenmiştir (36). Bu ilk kullanımdan beri kanser (37-40) ve diğer hastalıklarda

SELDI-TOF uygulamaları birçok raporda açıklanmıştır. SELDI-TOF, bir dokudan veya bir hücre serisinden hücre lizatlarının analizi (41-43) için kullanışlı olduğu halde, klinik uygulamada, serum gibi kolay elde edilebilen vücut sıvılarına uygulanması daha çok beklenmektedir (32).

SELDI, mevcut diğer teknolojilere göre birçok avantaja sahiptir. SELDI, hızlıdır, kullanımı kolaydır, tekrarlanabilir, yüksek derecede hassastır (ölçüm limiti, femtomolar seviyededir) ve diagnostik formata kolaylıkla adapte edilebilir (34). SELDI'nin en belirgin olan avantajlarından biri, diğer analitik yöntemlerde problemlere neden olan tuzların ve deterjanların, analiz öncesi uzaklaştırılmasıdır. Bundan başka, diğer bütün spesifik olmayan bileşenler uzaklaştırıldığı için, Protein çip okuyucusunda sadece spot yüzeyi ile aktif bir şekilde etkileşen proteinler analiz edilir. Bu, düşük konsantrasyonlarda bulunan biyomarkırların belirlenmesinin artmış olasılığı ile sonuçlanır (60).

Protein piklerindeki değişiklikler veya spektralarındaki m/z oranları, patofizyolojik olayların altında yatabilecek protein değişikliklerini belirlemek için kullanılabilir. Alternatif olarak, SELDI-TOF peptid kütle parmakizi (PKP) oluşturmak için de kullanılabilir. Oluşturulan bu PKPler, sonradan veritabanında yer alan proteinlerin teorik PKPleri veya DNA-dizi-türevli PKPler ile karşılaştırılabilir (35).

Çalışmamızda PC-3 hücre serilerini çeşitli konsantrasyondaki DMSO çözeltisi (%0.002, 0.004 ve 0.008), propolisin DMSO'lu ekstraktı (0, 5, 10 ve 20 µg/ml) ve propolisin sulu ekstraktı (0, 5, 10 ve 20 µg/ml) ile muamele ederek, MTT testi ile % canlılıkları belirlendi. Ekstraktların PC-3 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi ölçüldü. % canlılık DMSO çözeltisi ile sırayla % 72, 72 ve 75; propolisin DMSO ekstraktları ile % 50, 35 ve 24; propolisin sulu ekstraktları ile % 29, 33 ve 17 olarak bulundu. Propolisin sulu ve DMSO'lu ekstraktları ile hücre canlılığının % 50'nin altında olduğu en yüksek konsantrasyon olan 20 µg/ml konsantrasyonda, DMSO çözeltisi ile canlılığın %50'nin üstünde olduğu 20 µg/ml DMSO ekstraktı ile aynı yüzdede DMSO içeren %0.008 konsantrasyonda PC-3 hücrelerinin ekstrakt ile muamele edilmesine karar verildi. Herhangi bir ekstrakt ile muamele edilmeyen PC-3 hücreleri ise kontrol hücreleri olarak kullanıldı. PC-3 hücreleri ekstraktlarla 24 saat inkübe edildikten sonra, hücrelerin proteinlerini ekstrakte etmek için HNTG liziz prosedürü ile parçalandı. Elde edilen hücre ekstraktları, protein ekspresyonu profillerindeki değişimi incelemek için CM10 ve Q10 protein çip dizinlerine yüklenerek; düşük ve yüksek lazer enerjisi protokollerinde SELDI-TOF-MS ile analiz edildi.

Genel olarak, CM10 çip dizinine yüklenen örneklerde, 20 µg/ml DMSO-propolis ekstraktı, 14.424 Da, 20.709 Da ve 12, 663 Da m/z değerine sahip olan piklerin ekspresyonunda artışa; 33.303 Da, 32.800 Da, 27.294 Da, 21.139 Da ve 5.141 Da m/z değerine sahip olan piklerin ekspresyonunda ise azalmaya neden oldu. % 0,008 DMSO çözeltisi, 14.424 Da, 33.303 Da, 20.709 Da, 21.139 Da, 5.141 Da ve 12.663 Da m/z değerine sahip olan piklerin ekspresyonunda artışa; 32.800 Da ve 27.294 Da m/z değerine sahip olan piklerin ekspresyonunda ise azalmaya neden oldu. 20 µg/ml su-propolis ekstraktı, 6.268 Da, 16.042 Da, 24.664 Da ve 24.810 Da m/z değerine sahip olan piklerin ekspresyonunda artışa; 32.043 Da m/z değerine sahip olan pikin ekspresyonunda ise azalmaya neden oldu.

Q10 çip dizinine yüklenen örneklerde, 20 µg/ml DMSO propolis ekstraktı, m/z değeri 144.776 Da olan pikin ekspresyonda artışa; m/z değerleri 61.257 Da, 108.529 Da, 84.341 Da ve 85.994 Da olan piklerin ekspresyonunda azalmaya neden oldu. % 0,008 DMSO çözeltisi, m/z değerleri 61.257 Da, 108.529 Da, 144.776 Da, 84.341 Da ve 85.994 Da olan piklerin ekspresyonunda azalmaya neden oldu. 20 µg propolis/su ekstraktı, m/z değerleri 84.348 Da, 87.529 Da, 89.004 Da, 102.007 Da, 144.762 Da, 13.575 Da, 85.989 Da, 94.605 Da, 104.407 Da ve 11.603 Da olan piklerin ekspresyonunda azalmaya; m/z değerleri 10.891 Da ve 10.350 Da olan piklerin ekspresyonunda artmaya neden oldu.

Bu proteinlerin, PC-3 kanserinin teşhisi ve/veya tedavisi için biyomarkır olarak kullanılabilmesi ileri sürülebilir.

Farklı çözücüler farklı maddeleri ekstrakte ettiği için propolisin sulu ve DMSO'lu ekstraktların kantitatif ve/veya kalitatif içerikleri farklıdır. DMSO [(CH₃)₂SO] amfipatik bir moleküldür ve hem sulu hem de organik ortamda çözünebilir. Bu fizikokimyasal özelliklerinden dolayı DMSO, suda çözünmeyen bileşikler için oldukça etkili bir çözücüdür (92). Çalışmamızda, propolisin sulu ve DMSO'lu ekstraktları aynı proteinin ekspresyonu üzerinde benzer ya da ters etki göstermiş veya etki göstermemiştir. Ekstraktların protein ekspresyonu üzerine etkisindeki bu farklılıklar, ekstraktların içeriğindeki farklılıktan kaynaklanabilir.

Literatürde propolis ekstraktlarının PC-3 kanser hücrelerinin veya diğer kanser hücre serilerinin proteomuna etkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmadığı için, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar direkt olarak herhangi bir literatür ile karşılaştırılmadı.

Literatürde yaptığımız çalışmaya en yakın çalışma, Cheng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada şifalı bir bitki olan Rhizoma Paridis'in anti-tümör etkilerinden sorumlu olan başlıca bileşeni olarak belirlenmiş Rhizoma Paridis total saponin (RPTS) HepG2 ile muamele edilerek, MALDI-TOF-MS ile proteomik analizini yaptılar. Kontrol olarak % 0.01 DMSO kullanılarak, Hep G2 hücrelerini RPTS (IC50 değeri ortalama olarak 10 µg/ml) ile 48 saat inkübe ettiler ve iki boyutlu jel elektroforezine kontrol ve RPTS-ile muamele edilmiş grup arasında 2 kat yoğunluk farkı olan 15 protein spotunu MALDI-TOF-MS ile analiz ettiler. MALDI-TOF-MS ile peptid parmakizi kullanılarak, oniki protein belirlediler. HepG2 hücrelerinde, RPTS muamelesi sonucu altı proteinin (dUTPaz, hnRNP K, GMP sentaz vs.) ekspresyonunun azaldığını; altı proteinin (DNAaz gamma, Nükleosid difosfat kinaz A, Centrin-2 vs.) ekspresyonunun arttığını buldular. Belirlenen proteinlerin çoğu tümör başlangıcı, ilerlemesi ve gelişimi ile ilişkilidir. Bu bulguların, HepG2 hücrelerinde RPTS muamelesi ile meydana gelen anti-tümör etkinin mekanizmasının anlaşılmasında faydalı olabileceğini ileri sürdüler (93).

Bottoni ve arkadaşları tarafından yapılmış olan benzer bir çalışmada, PPAR- γ (peroksizom proliferator ile aktive olan reseptör gamma) ligandı olan ciglitazon ile muamele edilen insan hepatokarsinoma hücresindeki farklılaşmanın altında yatan moleküler mekanizmalar analiz edilmiştir. İnsan hepatokarsinoma HepG2 hücrelerinin Ciglitazon ile indüklenen farklılaşmasını, 2-DE ve MALDI-TOF-MS vasıtasıyla hücre protein profillerinin izlenmesi ile belirlediler. Ciglitazonun HepG2 hücre serisi için güçlü bir farklılaştırıcı ajan olduğu sonucuna vardılar. Bu mekanizmanın hücre antioksidan sistemi, hücre devri sistemi, sinyal iletim mekanizmaları, hücre stres ve yayılma ile ilişkili proteinlerin ekspresyonlarının modifikasyonlarını içerdiğini bulmuşlardır. Stathmin 1 (oncoprotein18), DJ-1 protein (Parkinson disease protein 7), Peroksiredoksin 2 (tiyoredoksin peroksidaz 1) (doğal öldürücü hücre geliştirici faktör B), Nükleosid difosfat kinaz A (nm 23-H1), HSP 70 (GRP 75, PBP74, Mortalin), Protein disülfid-izomeraz A3 öncülü (ERP 60, GRP 58), Protein disülfid-izomeraz A3 öncülü, Alfa-enolaz (fosfopirüvat hidrataz) (c-mycpromoter-bağlayıcı protein), Alfa-enolaz, fosfatidil etanol amin bağlayıcı protein 1 (PEBP-1), Raf kinaz inhibitör protein (RKIP), Peptidil-prolil cis-trans izomeraz A, Peptidil-prolil cis-trans izomeraz A (cyclophilin A), Ras-ile ilişkili protein Rab-1A ve Ras-ile ilişkili protein Rab-14 dir (94).

Shiwa ve arkadaşları, yeni bir proteomik teknolojisi olan Protein çip teknolojisini kullanarak dokuz farklı dokudan elde edilen otuz dokuz kanser hücre serisinin ekspresyon

farklılığı haritalandırmasının kullanılabilirliğini göstermek için bir çalışma yaptılar. Bu çalışma sonucu Kolon kanseri hücrelerinde moleküler ağırlığı 12 kDa olan bir proteini biyomarkır adayı olarak buldular. Retensiyon kromatografisi kütle spektrometrisinden yararlanarak, bu protein için uygun saflaştırma koşullarını optimize ettiler. Optimize edilmiş yöntem çip üzerinde geliştirildi ve biyomarkırı saflaştırmak için direkt olarak konvansiyonel kromatografiye transfer edildi ve protimosin- α olarak belirlendi. Aynı protein çip platformu üzerinde, kolon kanseri hücreleri ve normal kolon mukozal hücreler arasında protimosin- α 'nın ekspresyon seviyesi ölçerek, bu proteinin ekspresyonunun kolon kanseri hücrelerinde normal kolon hücrelerine göre daha yüksek olduğunu buldular. protimosin- α 'nın kolon kanseri için potansiyel bir biyomarkır olabileceği sonucuna vardılar (43).

Kumar ve arkadaşları, SELDI-TOF-MS'i kullanarak, CHO hücrelerinden sekrete edilen proteomdaki değişikliği büyüme devrinin farklı evrelerinde incelediler. Altı günlük büyüme döneminde her gün CHO-K1 hücrelerinin büyüdüğü düşük serumlu besiyeri alındı. Örnekleri, farklı kromatografik yüzeyli birkaç Protein çip üzerine uyguladılar. Q10 (anyonik) ve (IMAC30 (metal affinite) kromatografik yüzeyli protein çip yüzeylerine uygulanan örneklerde, CHO-K1 hücrelerinin büyüme devrinin farklı evrelerinde, farklı oranlarda regüle olan 24 protein belirlediler (42).

Oh, Choi ve arkadaşları, insan endometrial stromal (ES) hücrelerinde 8-bromosiklik-adenozin monofosfat (8-Br-cAMP) ile indüklenen desidualizasyonda yeni markır proteinler belirlemek için SELDI-TOF-MS'i kullandılar. Araştırmacılar, örnekleri üç gruba böldüler: kontrol insan ES hücreleri, 8-Br-cAMP ile muamele edilen ES hücreleri (3, 6, 9 veya 12 gün) ve 6 gün boyunca 8-Br-cAMP ile muamele edilen hücrelerden 3 veya 6 gün boyunca muamelenin kaldırıldığı ES hücreleri. Desidual olmayan kontrol hücreleri ve 8-Br-cAMP indüklü desidual hücreler arasında, H4 protein çipi ile 9787.058 Da, 10115.45 Da ve 24031.25 Da piklerinde; CM10 protein çipi ile 10833.08 Da, 22440.88 Da ve 32777.38 Da piklerinde farklı ekspresyon gözlediler (95).

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Çolak tarafından yapılan bir çalışmada ise polen ve propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarının PC-3 prostat kanseri hücre serilerinde VGSC Na_v 1.5 ve Na_v 1.7 á izoformlarının mRNA ekspresyonlarını değişik oranlarda baskıladığı ve anti-metastatik aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. Bu çalışmada, en yüksek baskılanmanın 150 µg/ml'lik polen DMSO

ekstraktları ile (%55.98 ve %53.31 oranında), en düşük baskılanmanın ise 20µg/ml'lik propolis sulu ekstraktları ile (%18.01 ve %22.58 oranında) olduğu saptandı (96).

Nair ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada birçok meyve sebze bulunan bir flavonoid olan kuersetinin prostat kanser hücre serilerinin invitro ortamda koloni oluşturma yetenekleri üzerine etkisi incelendi. Hücre devri ve tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin ekspresyonu gibi bu etkinin altında yatan moleküler mekanizmaları da spesifik olarak araştırdılar. 25 ve 50 µM konsantrasyonlarda, yüksek derecede agresif olan PC-3 prostat kanseri hücre serilerinin ve orta derecede agresif olan DU-145 prostat kanseri hücre serilerinin büyümesini anlamlı derecede inhibe ettiğini, fakat zayıf derecede agresif olan LNCaP prostat kanseri hücre serilerinin büyümesini veya normal fibroblast hücre serisinin BG-9 koloni oluşturmalarını etkilemediğini gözlediler. Gen array metodlarının kullanılması ile kuersetinin spesifik onkogenlerin ve hücre devrinin G1, S, G2 ve M fazlarını kontrol eden genlerin ekspresyonunu anlamlı derecede inhibe ettiğini, birkaç tümör baskılayıcı genin ekspresyonunu up-regüle ettiğini belirlediler. Kuersetinin antitümör etkisinin prostat kanseri hücrelerinin agresiv olma potansiyeli ile korrele olduğu ve kuersetin-aracılıklı antitümör etkinin, tümör baskılayıcı genlerin up-regülasyonunu ve onkogenlerin ve hücre devri genlerinin down-regülasyonunu içerdiği sonucuna vardılar. Flavonoidlerin kanser kemopreventasyonunda fonksiyonel bir besin olarak kullanılabileceğini önerdiler (97).

Lee ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, balırsı propolisinden türetilen kemopreventiv bir fitokimyasal olan kafeikasit fenil esteri (CAPE)'nin insan hepatosellüler karsinoma hücrelerin invasiv fenotipi olan SK-Hep1 üzerine etkisi araştırıldı. Bu çalışmada CAPE'nin SK-Hep1 hücre invazyonunu doz-bağımlı olarak baskıladığı bulundu. SK-Hep1 hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9'un ekspresyonunun, 12.5 µM CAPE muamelesiyle neredeyse tamamen durdu. CAPE'nin bu hücrelerinde nükleer faktör kappa B (NF-κB)'nin DNA-bağlama aktivitesini de anlamlı bir şekilde inhibe ettiğini belirlediler. Yazarlar, CAPE'nin MMP-2 ve MMP-9'un ekspresyonunun inhibisyonu vasıtasıyla, muhtemelen NF-κB'yi hedefleyerek, hepatosellüler karsinoma hücrelerinde antimetastatik aktivite gösterdiği sonucuna vardı (98).

Sonuç olarak propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarının antioksidan aktivite beraberinde PC-3 hücrelerinin proteomunda değişikliğe sebep olarak, prostat kanseri hücre serileri üzerinde sitotoksik ve anti-proliferatif aktiviteye sahip olduğu kanaatine varıldı.

Çalışmanın Sınırlamaları

1. Çalışmanın başlangıcında diğer kanser hücre serileri (özellikle Meme Ca) ile de planlama yapıldı. Fakat tez çalışması sonuna kadar bu hücreler başarılı bir şekilde çoğaltılamadığından, meme Ca hücreleri ile çalışma gerçekleştirilemedi. Dolayısıyla diğer kanser hücre serilerindeki proteomik değişimler ile prostat Ca serisindeki değişiklikler karşılaştırılmadı.

2. SELDI Çip kitinin yeterli sayıda olmaması nedeni ile PC-3 hücreleri, farklı konsantrasyonlardaki ekstraktlarla ve farklı inkübasyon sürelerinde muamele edilemediği için, ekstraktların PC-3 hücrelerinin proteomiği üzerine etkisi ekstrakt konsantrasyonuna ve inkübasyon zamanına bağlı olarak değerlendirilemedi.

3. SELDI-TOF-MS ile elde edilen farklı ekspresyona sahip protein piklerinin identifikasyonu ve karakterizasyonu daha ileri teknikler gerektiğinden yapılamadı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

1. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarında polifenol, flavonoid, demir indirgeyici antioksidan potansiyel ve total antioksidan kapasite tayini yapıldı. Propolisin DMSO'lu ekstraktı, sulu ekstraktına göre polifenol, flavonoid içeriği ve antioksidan potansiyeli açısından daha zengin olarak bulundu. Ekstraktların antioksidan potansiyeli, polifenol ve flavonoid içerikleri ile orantılı olarak bulundu.
2. Metastatik kabiliyeti yüksek olan PC-3 prostat kanseri hücre serileri üretildi ve yapılan canlılık testi (MTT) sonuçlarına göre PC-3 kanser hücre serilerinin 20 µg/ml konsantrasyondaki propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktları ve % 0,008 DMSO ile inkübe edilmesine karar verildi. Bu konsantrasyonlarda, hücre canlılığı yüzdesi sırayla $24,5 \pm 2,8$, $17,7 \pm 12,2$ ve $75,04 \pm 16,6$ olarak bulundu.
3. PC-3 prostat kanseri hücreleri, seçilen konsantrasyonlardaki propolis ekstraktları ve DMSO çözeltisi ile 24 saat inkübe edildi. Hiçbir ekstrakt ile muamele edilmeyen PC-3 hücre serisi çalışmamızda kontrol olarak kullanıldı. Ekstraktlar ile muamele edilen PC-3 hücreleri parçalandı ve hücre lizatları CM10 ve Q10 Protein çip dizinlerine yüklenerek, SELDI-TOF-MS ile analiz edildi. CM10 Protein çip dizinine düşük enerji seviyesinde uygulanan örneklerin analizi sonucu 184 adet pik tespit edildi. % 0,008 DMSO çözeltisi, 20 µg propolis/DMSO ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasında, protein ekspresyonunda m/z değerleri 14.424, 33.303, 32.800, 20.709, 27.294, 21.139 ve 5.141 Da olan yedi pikte istatistiksel olarak anlamlı değişiklik belirlendi. 20 µg propolis/ml su ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasında, protein ekspresyonunda m/z değerleri 6.268, 16.042,

24.664, 24.810, 32.043 Da olan beş pikte istatistiksel olarak anlamlı değişiklik belirlendi.

4. CM10 Protein çip dizinine yüksek enerji seviyesinde uygulanan örneklerin analizi sonucu 88 adet pik tespit edildi. % 0,008 DMSO çözeltisi, 20 µg propolis/DMSO ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasında, protein ekspresyonunda m/z değeri 12.663 Da bir pikte pikte istatistiksel olarak anlamlı değişiklik belirlendi. 20 µg propolis/su ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasında protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı değişiklik olan bir pik belirlenmedi.
5. Q10 Protein çip dizinine düşük enerji seviyesinde uygulanan örneklerin analizi sonucu 166 adet pik tespit edildi. % 0,008 DMSO çözeltisi, 20 µg propolis/DMSO ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasında, protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı değişiklik olan bir pik belirlenmedi. 20 µg propolis/ml su ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasında, protein ekspresyonunda m/z değerlei 10.350 ve 11.603 Da olan iki pikte istatistiksel olarak anlamlı değişiklik belirlendi.
6. Q10 Protein çip dizinine yüksek enerji seviyesinde uygulanan örneklerin analizi sonucu 297 adet pik tespit edildi. % 0,008 DMSO çözeltisi, 20 µg propolis/DMSO ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasında, protein ekspresyonunda m/z değerleri, 61.257, 108.529, 144.776, 84.341 ve 85.994 Da olan beş pikte istatistiksel olarak anlamlı değişiklik belirlendi. 20 µg propolis/su ekstraktı ile muamele edilen PC-3 hücreleri ile kontrol PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasında, protein ekspresyonunda m/z değerleri 84.348, 87.529, 89.004, 102.007, 144.762, 10.891, 13.575, 85.989, 94.605 ve 104.407 Da olan on pikte istatistiksel olarak anlamlı değişiklik belirlendi.
7. CM10 çip dizinine düşük ve yüksek lazer enerjisi protokolünde yüklenen örneklerde, 20 µg/ml DMSO-propolis ekstraktı, 14.424 Da, 20.709 Da ve 12, 663 Da m/z değerine sahip olan piklerin ekspresyonunda artışa; 33.303 Da, 32.800 Da, 27.294 Da, 21.139 Da ve 5.141 Da m/z değerine sahip olan piklerin ekspresyonunda ise azalmaya neden oldu.

8. CM10 ip dizinine düşük ve yüksek lazer enerjisi protokolünde yüklenen örneklerde, % 0,008 DMSO özeltisi, 14.424 Da, 33.303 Da, 20.709 Da, 21.139 Da, 5.141 Da ve 12.663 Da m/z değerine sahip olan piklerin ekspresyonunda artışa; 32.800 Da ve 27.294 Da m/z değerine sahip olan piklerin ekspresyonunda ise azalmaya neden oldu.
9. CM10 ip dizinine düşük ve yüksek lazer enerjisi protokolünde yüklenen örneklerde 20 µg/ml su-propolis ekstraktı, 6.268 Da, 16.042 Da, 24.664 Da ve 24.810 Da m/z değerine sahip olan piklerin ekspresyonunda artışa; 32.043 Da m/z değerine sahip olan pikin ekspresyonunda ise azalmaya neden oldu.
10. Q10 ip dizinine düşük ve yüksek lazer enerjisi protokolünde yüklenen örneklerde, 20 µg/ml DMSO propolis ekstraktı, m/z değeri 144.776 Da olan pikin ekspresyonda artışa; m/z değerleri 61.257 Da, 108.529 Da, 84.341 Da ve 85.994 Da olan piklerin ekspresyonunda azalmaya neden oldu.
11. Q10 ip dizinine düşük ve yüksek lazer enerjisi protokolünde yüklenen örneklerde,% 0,008 DMSO özeltisi, m/z değerleri 61.257 Da, 108.529 Da, 144.776 Da, 84.341 Da ve 85.994 Da olan piklerin ekspresyonunda azalmaya neden oldu.
12. Q10 ip dizinine düşük ve yüksek lazer enerjisi protokolünde yüklenen örneklerde,20 µg propolis/su ekstraktı, m/z değerleri 84.348 Da, 87.529 Da, 89.004 Da, 102.007 Da, 144.762 Da, 13.575 Da, 85.989 Da, 94.605, 104.407 Da ve 11.603 Da olan piklerin ekspresyonunda azalmaya; m/z değerleri 10.891 Da ve 10.350 Da olan piklerin ekspresyonunda artmaya neden oldu.
13. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarının PC-3 kanser hücrelerinde çeşitli proteinlerin ekspresyonunu azaltarak veya artırarak, PC-3 hücrelerinin proteomunda değişikliğe sebep olduğu ve anti-proliferatif etki gösterdiğini sonucuna varıldı.

6.2. Öneriler

1. Bu alışma propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarının daha yüksek konsantrasyonları kullanılarak ve inkübasyon süresi artırılarak PC-3 hücreleri beraberinde farklı kanser hücre serilerinde de yapılabilir.

2. Propolisin farklı çözücüler ile elde edilen ekstraktları ile inkübasyon süresi artılarak çeşitli kanser hücre serilerinde bu çalışma yapılabilir.
3. Bu çalışma, prostat kanseri tedavisinde kullanılan ilaç veya ilaçlarla tek başına veya propolis ekstraktı ile kombine olarak yapıp, propolis ekstraktı ile anti-kanser ajanın etkisi karşılaştırılabilir.
4. Propolisi ekstrakte etmek için kullanılan farklı çözücüler, farklı molekülleri ekstrakte edeceği için, kullanılan ekstraktın kalitatif ve kantitatif içeriği HPLC, GC-MS ile belirlenebilir.
5. Ekstrakt ile muamele edilen hücrelerde, ekspresyonunda farklılık olan proteinlerin hangi protein olduğu ileri çalışmalarla belirlenmelidir. Böylece ekstrakt bileşenlerinin hangi mekanizmalar vasıtasıyla etki gösterdiği aydınlatılabilir.
6. Propolis, prostat kanserinin kemoterapisinde tek başına veya antikanser ajanlarla beraber kullanılabilir.
7. Propolisin toksik olmayan çözücülerle (su gibi) elde edilen ekstraktları, kanser hastalarında *in vivo* çalışmalarda kullanılarak, propolisin serum proteomu üzerine *in vivo* etkisi araştırılabilir.

7. ÖZET

Propolis, flavonoid ve fenolik bileşikler açısından zengin olan bir arı ürünüdür. Çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olan propolisin kompozisyonu, toplandığı bölgedeki yerel bitki örtüsüne, mevsim ve iklime bağlı olarak çeşitlilik gösterir. Propolisin farmakolojik aktivitesi, çoğunlukla flavonoidlerin varlığına atfedilmektedir. Proteom, hücrenin intrinsik genetik programı ve kendi yakın çevrelerindeki etkilerin her ikisini de yansıtan proteinlerin dinamik bir koleksiyonudur. Yüzeyle geliştirilmiş lazer desopsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi (SELDI-TOF-MS), kanser proteomik çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir proteomik yaklaşımdır. Bu çalışmada, Türk propolisinin DMSO ve sulu ekstraktlarının canlılık testi sonucu belirlenen 20µg/ml'lik konsantrasyonlarının PC-3 prostat kanser hücre serilerinin proteomiği üzerine etkisi SELDI-TOF-MS ile incelendi. PC-3 kanser hücre serileri, propolis ekstraktları ile 24 saat inkübe edildi. Elde edilen hücre lizatları CM10 ve Q10 Protein çip dizinlerine yüklenerek, SELDI-TOF-MS'de analiz edildi. Kontrol hücreleri ile % 0,008 DMSO çözeltisi ve propolisin DMSO ekstraktı ile inkübe edilen hücreler arasında CM10 protein çipi ile 14.424, 33.303, 32.800, 20.709, 27.294, 21.139, 5.141 ve 12.663 Da piklerinde; Q10 protein çipi ile 61.257, 108.529, 144.776, 84.341 ve 85.994 Da piklerinde farklı ekspresyon gözlemlendi. Kontrol hücreleri ve sulu ekstrakt ile inkübe edilen hücreler arasında CM10 protein çipi ile 6.268, 16.042, 24.664, 24.810 ve 32.043 Da piklerinde; Q10 protein çipi ile 10.350, 11.603, 84.348, 87.529, 89.004, 102.007, 144.762, 13.575, 85.989, 94.605, 104.407 ve 10.891 Da piklerinde farklı ekspresyon gözlemlendi. Propolisin DMSO'lu ve sulu ekstraktlarının PC-3 kanser hücre serilerinde protein ekspresyon profilini değiştirerek anti-proliferatif aktiviteye sahip olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Propolis, PC-3 prostat kanser hücre serileri, proteom, SELDI-TOF-MS

8. SUMMARY

The Effect of Turkish Propolis Extracts on proteome of prostate cancer cell lines

Propolis is a bee product which is rich in flavonoids and phenolic compounds. The composition of propolis which has several pharmacological activities varies depending on the local vegetation, season and climate of the area from where it was collected. The pharmacological activity of propolis is mainly attributed to the presence of flavonoids. Proteome is a dynamic collection of proteins that reflects both the intrinsic genetic programme of the cell and the impact of its immediate environment. Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) is a proteomic approach which has been widely used in cancer proteomics studies. In this study, 20 µg/ml concentrations of DMSO and water extracts of Turkish propolis which were chosen according to the viability experiments were used to determine their effects on the proteome of prostate cancer cell lines PC-3 by SELDI-TOF-MS. PC-3 cancer cell lines were incubated with extracts of propolis for 24 hours. Obtained cell lysates were loaded to CM10 and Q10 ProteinChip arrays and analysed by SELDI-TOF-MS. Differential expressions between control cells and 0.008% DMSO- and DMSO extract of propolis-incubated cells were observed in the peaks of 14.424, 33.303, 32.800, 20.709, 27.294, 21.139, 5.141 and 12.663 Da, detected by CM10 ProteinChip, and in the peaks of 61.257, 108.529, 144.776, 84.341 ve 85.994 Da, detected by Q10 ProteinChip. Differential expressions between control cells and water extract-incubated cells were observed in the peaks of 6.268, 16.042, 24.664, 24.810 and 32.043 Da, detected by CM10 ProteinChip, and in the peaks of 10.350, 11.603, 84.348, 87.529, 89.004, 102.007, 144.762, 13.575, 85.989, 94.605, 104.407 and 10.891 Da, detected by Q10 ProteinChip. It was concluded that DMSO and water extracts of propolis may have anti-proliferative activity through differentiating protein expression profile in PC-3 prostate cancer cell lines.

Key Words: Propolis, PC-3 Prostate Cancer Cell Lines, Proteome, SELDI-TOF-MS

9. KAYNAKLAR

1. Castaldoa, S. and Capasso, F.: Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73: S1-S6, 2002.
2. Sforcin, J.M.: Propolis and the immune system a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113: 1-14, 2007.
3. Burdock, G.A.: Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36: 347-363, 1998.
4. Park, Y.K., Alencar, S.M., Aguiar, C.L.: Botanical origin and chemical composition of brazilian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50: 2502-2506, 2002.
5. Santos, F.A., Bastos, E. M. A. F., Maia¹, A. B. R. A., Uzeda, M., Carvalho, M. A. R. Farias, L. M., Moreira, E. S. A.: Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytotherapy research*, 17: 285–289, 2003.
6. Seidel, V., Peyfoon, E., Watson, D.G., Fearnley, J.: Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytotherapy research*, 22: 1256–1263, 2008.
7. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fern´andez-L´opez, J., P´erez-´Alvarez, J.A.: Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of food science*, 9(73): R117-R124, 2008.
8. Santos, F.A., Bastos, E.M.A., Uzeda, M., Carvalho, M.A.R.: Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 80: 1-7, 2002.
9. Fernandes, F.F., Dias, A.L.T., Ramos, C. L., Ikegaki, M., Siqueira A.M., Franco, M.C.: The “in vitro”antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. *evista do Instituto de Medicina Tropical de So Paulo*, 49(2):93-95, 2007.
10. Kujungiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Yu., Bankova, V., Christov, R., Popov, S.: Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 235–240, 1999.

11. Gekker, G., Hu, S., Spivak, M., Lokensgard, J.R., Peterson, P.K.: Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology*, 102: 158–163, 2005.
12. Barros, M.P., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., Andrade, S.F.: Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 110: 567–571, 2007.
13. Orsolich, N. and Basic, I.: Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis a factor of antitumor reactivity. *Journal of Ethnopharmacology*, 84: 265-273, 2003.
14. Rodriguez, S., Ancheta, O., Ramos, M.E., Ramirez, D., Rojas, E., Gonzalez, R.: Effects of Cuban red propolis on galactosamine-induced hepatitis in rats. *Pharmacological Research*, 1 (35):1-4, 1997.
15. Ivona Jasprica, I., Mornar, A., Debeljak, Z., Smolcic-Bubalo, A., Medic-Saric, M., Mayer, L., Romic, Z., Bucan, K., Balog, T., Sobocanec, S., Sverko, V.: In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 110: 548–554, 2007.
16. Banskota, A.H., Tezuka, Y., Kadota, S.: Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy research*, 15: 561–571, 2001.
17. Orsolich, N. and Basic, I.: Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 59: 561–570, 2005.
18. Orsolich, N. and Basic, I., Basic, I.: Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumour. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 28(4): 694-700, 2005.
19. El-khawagaa, O.Y., Salem, T.A., Elshal, M.F.: Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. *Clinica Chimica Acta, international journal of clinical chemistry*, 338: 11-16, 2003.
20. Bazo, A.P., Rodrigues, M.A.M., Sforcin, J.M., Camargo, J.L.V., Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F.: Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 22: 183–194, 2002.
21. Benkovic, V., Orsolich, N., Knezevic, A.H., Ramic, S., Dikic, D., Basic, I., Kopjar, N.: Evaluation of the radioprotective effects of propolis and flavonoids in gamma-irradiated mice: the alkaline comet assay study. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 31(1): 167—172 2008.
22. Nakajima, Y., Shimazawa, M., Mishima, S.: Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life Sciences*, 80: 370–377, 2007.

23. Banskota, A.H., Nagaoka, T., Sumioka, L.Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S.: Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 80: 67-73 (58), 2002.
24. Li, H., Kapur, A., Yang, J.X., Srivastava, S., Mcleod, D.G., Guzman, J.F.P., Dausch, A., Park, Y.K., Rhim J.S.: Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *International Journal of Oncology*, 31: 601-606, 2007.
25. Ahn, M.R., Kunimasa, K., Ohta, T., Kumazawa, S., Kamihira, M., Kaji, K., Uto, Y., Hori, H., Nagasawa, H., Nakayama, T.: Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Letters*, 252: 235–243, 2007.
26. Russo, A., Longo, R., Vanella, A.: Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, 73: S21–S29, 2002.
27. Gerigelmez, A.Y.: Miyeloid kanser hücre serilerinde polen ekstraktlarının kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkileri, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2003.
28. Çolak, M.: Miyeloid kanser hücre serilerinde propolis ekstraktlarının kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2003.
29. Aliyazıcıoğlu, Y., Deger, O., Ovalı, E., Barlak, Y., Hosver, I., Tekelioglu, Y., Karahan, S.C.: Effects of turkish pollen and propolis extracts on respiratory burst for K-562 cell lines. *International Immunopharmacology*, 5: 1652-1657, 2005.
30. Barlak, Y.: Türk propolisi ekstraktlarının solunumsal patlama sonrası PMN lökositlerden PMN elastaz salınımına etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2003.
31. Clarke, W., Zhang, Z., Chan, D.W.: The application of clinical proteomics to cancer and other diseases. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 41(12):1562–1570, 2003.
32. Engwegen, J.Y.M.N., Gast, M.C.W., Schellens, J.H.M., Beijnen, J.H.: Clinical proteomics searching for better tumour markers with SELDI-TOF mass spectrometry. *Trends in pharmacological sciences*, 5 (27): 251-259, 2006.
33. Padmavathi, R., Senthilnathan, P., Sakthisekaran, D.: Therapeutic effect of propolis and paclitaxel on hepatic phase I and II breast enzymes and marker enzymes in dimethylbenz(a)anthracene-induced cancer in female rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143: 349-354, 2006.
34. Srinivas, P.R., Verma, M., Zhao, Y., Srivastava, S.: Proteomics for cancer biomarker discovery. *Clinical chemistry*, 48 (8): 1160–1169, 2002.

35. Colantonio, D.A. and Chan, D. W.: The Clinical Application of Proteomics. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 357: 151-158, 2005.
36. Zhang, H., Kong, B., Qu, X., Jia, L., Deng, B., Yang, Q.: Biomarker discovery for ovarian cancer using SELDI-TOF-MS. *Gynecologic Oncology*, 102: 61-66, 2006.
37. Streckfus, C. F., Bigler, L.R., Zwick, M: The Use of Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry to Detect Putative breast Cancer Markers in saliva: a Feasibility Study. *Journal of oral pathology & medicine*, 35: 292-300, 2006.
38. McLerran, D., Grizzle, W.E., Feng, Z., Thompson, I.M., Bigbee, W.L., Cazares, L.H., Chan, D.W., Dahlgren, J., Diaz, J., Kagan, J., Lin, D.W., Malik, G., Oelschlager, D., Partin, A., Randolph, T.W., Sokoll, L., Srivastava, S., Srivastava, S., Thornquist, M., Troyer, D., Wright, G.L., Zhang, Z., Zhu, L., Semmes, O.J.: SELDI-TOF MS whole serum proteomic profiling with IMAC surface does not reliably detect prostate cancer. *Clinical Chemistry*, 54 (1): 53-60, 2008.
39. Akashi, T., Nishimura, Y., Wakatabe, R., Shiwa, M., Yamori, T.: Proteomics-based identification of biomarkers for predicting sensitivity to a PI3-kinase inhibitor in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352: 514–521, 2007.
40. De Petris, L., Orre, L.M., Kanter, L., Pernemalm, M., Koyi, H., Lewensohn, R., Lehtiö, J.: Tumor expression of S100A6 correlates with survival of patients with stage I non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 63: 410–417, 2009.
41. Woolley, J.F. and Al-Rubeai M.: The application of SELDI-TOF mass spectrometry to mammalian cell culture *Biotechnology Advances*, 2 (27): 177-184, 2009.
42. Kumar, N., Maurya, P., Gammell, P., Dowling, P., Clynes, M., Meleady, P.: Proteomic profiling of secreted proteins from CHO cells using surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biotechnology progress* , 24: 273-278, 2008.
43. Shiwa, M., Nishimura, Y., Wakatabe, R., Fukawa, A., Arikuni, H., Ota, H., Kato, Y., Yamori, T.: Rapid discovery and identification of a tissue-specific tumor biomarker from 39 human cancer cell lines using the SELDI ProteinChip platform. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309: 18-25, 2003.
44. Syed, D.N., Khan, N., Afaq, F., Mukhtar, H.: Chemoprevention of prostate cancer through dietary agents progress and promise. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 16 (11): 2193-2203, 2007.
45. Kim, J.H., Xu, C., Keum, Y.S., Reddy, B., Conney, A., Kong, A.T.: Inhibition of EGFR signaling in human prostate cancer PC-3 cells by combination treatment with β -phenylethyl isothiocyanate and curcumin. *Carcinogenesis*, 3 (27): 475–482, 2006.
46. Syed, D.N., Suh, Y., Afaq, F., Mukhtar, H.: Dietary agents for chemoprevention of prostate cancer. *Cancer Letters*, 265:167-176, 2008.

47. Schmidt, J.O.: Bee Products Chemical Composition and Application in Mizrahi, A., Lensky, Y.(Eds), Bee Products Properties, Applications, and Apitherapy, Plenum Press, New York, 1997, pp. 15-26.
48. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/72/Propolis_taruvaik.jpg; 25/10/2009.
49. Scazzocchio, F., D'Auria, F.D., Alessandrinia, D., Pantanella, F.: Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research*, 161: 327-333, 2006.
50. Szczêsna, T.: Concentration of selected elements in honeybee-collected pollen. *Journal of Apicultural Science*, 1(51): 5-13, 2007.
51. Szczêsna, T.: Protein content and amino acids composition of bee-collected pollen originating from Poland, South Korea and China. *Journal of Apicultural Science*, 2 (50), 91-99, 2006.
52. Carpes, S.T., Beghini, R., Alencar, S. M., Masson, M.L.: Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciência e agrotecnologia*, Lavras, 6(31), 1818-1825, 2007.
53. Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Bakmaz, M., Knezevic, S.V.: Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*, 55: 423-430, 2005.
54. Orhan, H., Marol, S., Hepşen, İ.F., Şahin, G.: Effects of some probable antioxidants on selenite-induced cataract formation and oxidative stress-related parameters in rats. *Toxicology*, 139: 219-232, 1999.
55. Koru, Ö., Toksoy, F., Açikel, C.H., Tunca, Y.M.: In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens *Anaerobe*, 13: 140-145, 2007.
56. Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M.A., Meseguer, J.: In vivo effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 18: 71-80, 2005.
57. Marcucci, M.C., Ferreres, F., García-Viguera, C., Bankova, V.S., De Castro S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H.M., Paulino, N.: Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74: 105-112, 2001.
58. Rodland, K.D.: Proteomics and cancer diagnosis the potential of mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, 37: 579-583, 2004.
59. <http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/proteome/method/2DE.gif>; 22/10/2009.

60. Seiberta, V., Wiesner, A., Buschmanna, T., Meuer, J.: Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI TOF-MS) and ProteinChip technology in proteomics research. *Pathology-Research and Practice*, 200: 83-94, 2004.
61. http://www.pharmatech.co.kr/htm/main/goods_view.php?page_no=11&no=262&title1=7&title2=50&title3=0; 22/10/2009.
62. Petricoin, E.F. and Liotta L.A.: SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer. *Current Opinion in Biotechnology*, 15:24-30, 2004.
63. http://www.proteomicsnijmegen.nl/Seldi_pages/selditof.htm; 25/10/2009.
64. ProteinChip® Arrays and Reagents katalogu, Bio-Rad Laboratories, Inc., 2006.
65. <http://media.wiley.com/CurrentProtocols/PS/ps2203/ps2203-fig-0004-1-full.gif>; 22/10/2009.
66. Rajesh L. Thangapazham, R.L., Anuj Sharma, A., Maheshwari, R.K.: Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *The AAPS Journal*, 8 (3): E443-E449, 2006.
67. Tripathi, Y.B., Tripathi, P., Arjmandi, A.H.: Nutraceuticals and cancer management. *Frontiers in Bioscience*, 10: 1607-1618, 2005.
68. Orsolice, N., Terzic, S., Mihaljevic, Z., Sver, L., Basic, I.: Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 28 (10): 1928-1933, 2005.
69. Ramsey, M.R. and Sharpless, N.E.: ROS as a tumour suppressor. *Nature cell biology*, 11 (8): 1213-1215, 2006.
70. Lopez-Otin, C. and Diamandis, E.P.: Breast and Prostate Cancer: An Analysis of Common Epidemiological, Genetic, and Biochemical Features. *Endocrine Reviews*, 19(4): 365-396, 1998.
71. Yörükoğlu, K.: Prostat Kanseri Tanı ve Tedavi, Prostat Kanseri Patolojisi, Üroonkoloji Derneği Yayınları-2, İstanbul, 2004, pp. 7-34.
72. Dunja Horzic, D., Komes, D., Belscak, A., Ganic, K.K., Ivekovic, D., Karlovic, D.: The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, 115: 441-448, 2009.
73. Wojdyło, A., Oszmianski, J., Czemerys, R.: Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105: 940-949, 2007.
74. Lotito, S.B. and Frei, B.: Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Radical Biology & Medicine*, 2 (36): 201-211, 2004.

75. Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C.: Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 3 (10): 178-182, 2002.
76. Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A.: Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71: 109–114, 2000.
77. Mohammadzadeh, S., Sharriatpanahi, M., Hamed, M., Amanzadeh, Y., Ebrahimi, S.E.S., Ostad, S.N.: Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chemistry*, 103: 729-733, 2007.
78. Singh, R., Singh, S., Kumar, S., Arora, S.: Studies on antioxidant potential of methanol extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. *Food Chemistry*, 103: 505-511, 2007.
79. Erel, Ö.: A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*. 37: 277-285, 2004.
80. Tsiapara, A.V., Jaakkola, M., Chinou, I., Graikou, K., Tolonen, T., Virtanen, V., Moutsatsou, P.: Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells profile analysis of extracts. *Food Chemistry*, 116: 702-708, 2009.
81. Lee, K.S., Lee, H.J., Ahn, K.S., Kim, S.H., Nam, D., Kim, D.K., Choi, D.Y., Ahn, K.S., Lu, J., Kim, S.H.: Cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 pathway mediates icarisside II induced apoptosis in human PC-3 prostate cancer cells. *Cancer Letters*, 280: 93-100, 2009.
82. Nayler, O., Schnorrer, F., Stamm, S., Ullrich, A.: The cellular localization of the murine serine/arginine-rich protein kinase CLK2 is regulated by serine 141 autophosphorylation. *The journal of biological chemistry*. 51 (273): 34341-34348, 1998.
83. Orsolic, N. and Basic, I.: Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 102: 37-45, 2005.
84. Reiner, T., Pozas, A., Gomez, L.A., Stable, C.P.: Low dose combinations of 2-methoxyestradiol and docetaxel block prostate cancer cells in mitosis and increase apoptosis. *Cancer Letters*, 276: 21-31, 2009.
85. Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Troncoso, N., Vanella, A., Garbarino, J.A.: Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences*, 76: 545-558, 2004.
86. Carballo, D.D., Malak, S., Bardenheuer, W., Freistuehler, M., Reusch, H.P.: The contribution of plukenetione A to the anti-tumoral activity of Cuban propolis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16 (22): 9635-9643, 2008.

87. Aso, K., Kanno, S.I., Tadano, T., Satoh, S., Ishikawa, M.: Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 27(5): 727-730, 2004.
88. Wu, Y.D., and Lou, Y.J.: A steroid fraction of chloroform extract from bee pollen of *Brassica Campestris* induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Phytotherapy research*, 21: 1087-1091, 2007.
89. Bandyopadhyay, S., Romero, J.R., Chattopadhyay, N.: Kaempferol and quercetin stimulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion in human prostate cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 287: 57-64, 2008.
90. Mokhtari, M.J., Motamed, N., Shokrgozar, M.A.: Evaluation of silibinin on the viability, migration and adhesion of the human prostate adenocarcinoma (PC-3) cell line. *Cell Biology International*, 32: 888-892, 2008.
91. Wang, Z., Desmoulin, S., Banerjee, S., Kong, D., Li, Y., Deraniyagala, R.L., Abbruzzese, J., Sarkar, F.H.: Synergistic effects of multiple natural products in pancreatic cancer cells. *Life Sciences*, 83: 293-300, 2008.
92. Santos, N.C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., Saldanha, C.: Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*, 65: 1035–1041, 2003.
93. Cheng, Z.X., Liu, B.R., Qian, X.P., Ding, Y.T., Hu, W.J., Sun, J., Yu, L.X.: Proteomic analysis of anti-tumor effects by *Rhizoma Paridis* total saponin treatment in HepG2 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 120: 129-137, 2008.
94. Bottoni, P, Giardina, B., Vitali, A., Boninsegna, A., Scatena, R.: A proteomic approach to characterizing ciglitazone-induced cancer cell differentiation in Hep-G2 cell line. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794: 615-626, 2009.
95. Oh, K.J., Choi, H.J., Yoon, M.S., Hwang, J.H., Chang, S.Y., Kim, Y.S.: Rapid analysis of proteomic biomarkers expressed in human endometrial stromal cells during decidualization. *Archives of pharmacal research*, 10(31): 1247-1255, 2008.
96. Çolak, M.: Arı poleni ve propolisinin metastatik insan prostat kanseri hücre serilerinde voltaj kapılı sodyum kanalları ekspresyonu üzerine etkisi, K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon, 2009.
97. Nair, H.K., Rao, K.V.K., Aalinkeel, R., Mahajan, S., Chawda, R., Schwartz, S.A.: Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 1(11): 63–69, 2004.
98. Lee, K.W., Kang, N.J., Kim, J.H., Lee, K.M., Lee, D.E., Hur, H.J., Lee, H.J.: Caffeic acid phenethyl ester inhibits invasion and expression of matrix metalloproteinase in SK-Hep1 human hepatocellular carcinoma cells by targeting nuclear factor kappa B. *Genes & nutrition*, 2:319-322, 2008.

ÖZGEÇMİŞ

Yaşam BARLAK, 1978'de Ankara'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 2001 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Amasya Eğitim Fakültesi Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü Kimya öğretmenliği programından mezun oldu. 2001 yılında K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı ve 2003 yılında mezun oldu. Aynı yıl K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda hala sürdürmekte olduğu doktora başladı.