



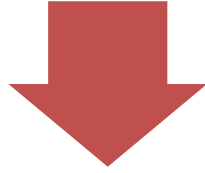
MEME VE KOLON KANSERİ HÜCRELERİ İLE OLUŞAN ANJİYOGENEZİN PROPOLİS YOLUYLA İNHİBİSYONU

PROF.DR. ÇİĞDEM YENİSEY
ADÜ TIP FAK. TIBBİ BİYOKİMYA AD

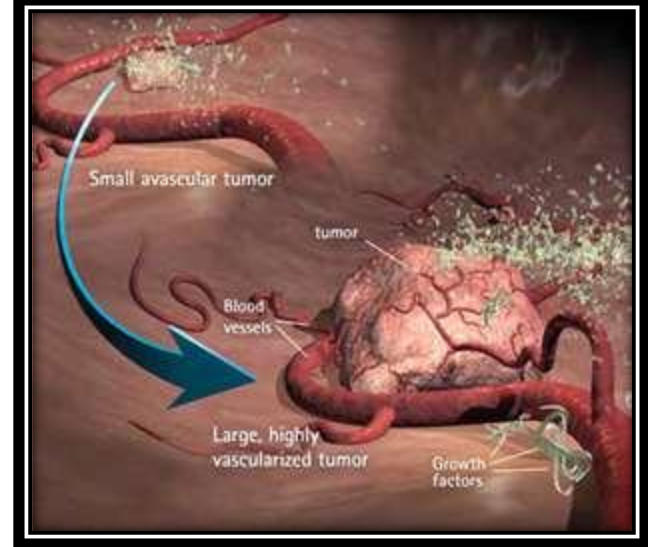
GİRİŞ



Tümörlerin yayılımının ve uzak organlara metastaz yapmasının tek yolu yeni kan damarlarının oluşumu olup, bu işlem **anjiyogenez** olarak adlandırılmaktadır.



Yeni kan damarlarının oluşumu olmadan tümörler 1-2 mm'den daha fazla büyüyememektedirler.



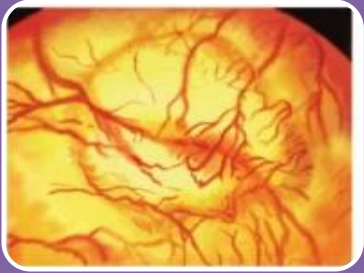
ANJİOGENEZİN KANSER TEDAVİSİNDEKİ ÖNEMİ



Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar, proliferasyona uğrayan hücreleri hızlı bir şekilde öldürmek üzere oluşturulmuşlardır.



İlaç tedavilerinin normal dokular üzerindeki toksisitesi gibi yan etkilerinden dolayı, bu ilaçların yapımında anti-tümör etkileri bazen sınırlı tutulmaktadır. Çünkü, normal hücrelerin sabit bir yenilenme hızı olup, çoğalmamaktadırlar.



Kılcal damarların büyümesinin, başka bir deyişle **anjyogenezin** kontrol edilmesi, yakın gelecekte kötü huylu tümörlerin tedavisini sağlayacaktır.

AMAÇ

Çalışmamızda, propolisin anti-tümöral ve apoptotik etkileri hücresel düzeyde incelenmiştir.

İlk olarak, propolisin MCF-7 ve Caco-2 hücre hatlarının, HUVEC hücrelerinde oluşturduğu anjiyogenezi nasıl etkilediğini gösterdik.

Ayrıca, kanserli hücrelerin yayılımında ve metastaz oluşturmasında çok önemli bir basamak olan endotel hücrelerinde MCF-7 ve Caco-2 hücrelerinin oluşturduğu proliferasyonun propolis ile inhibisyonu saptandı.

Tümör hücrelerinin canlılığının propolis ile nasıl etkilendiği saptandı.



PROPOLİS NEDİR?



Propolis aromatik hoş kokulu ve kaynağına bağlı olarak sarı-yeşilden koyu kahverengiye kadar değişen renktedir.

Soğukta sert ve kırılğan, sıcakta ise yumuşak ve yapışkan bir yapısı vardır.

Propolis 60-69 °C arasında erime noktasına sahiptir



PROPOLİS NEDİR?

Propolis kimyasal bileşimi, arıların dolaştığı her bir bölgenin bitki örtüsündeki çeşitlilikten dolayı büyük ölçüde değişken ve komplekstir.

Propolis en önemli kaynakları; kavak, kızilağaç, huş ağacı, kestane, dişbudak , çam ve söğüt türleri gibi bitkilerdir.

PROPOLİS NEDİR?



- Propolisi arılar ağaçların tomurcuklarından toplar ağızlarında sindirim enzimleri ile çiğner ve balmumu eklerler.

Propolisi iki amaç için kullanırlar;

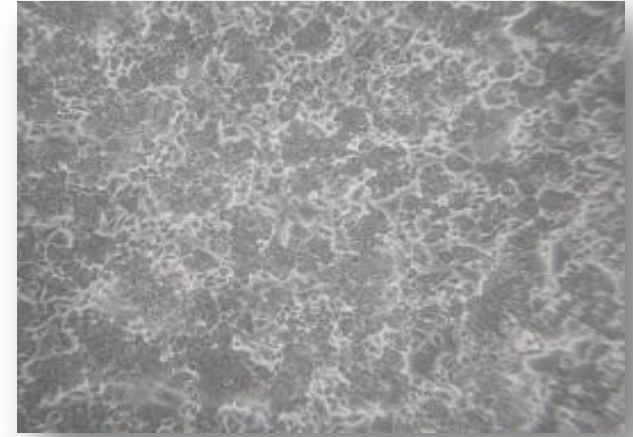
1. Kovanlarının ışık gören deliklerinin kapatılması
2. Kovanlarını böceklerden ve mikroorganizmaların saldırılarından korumak



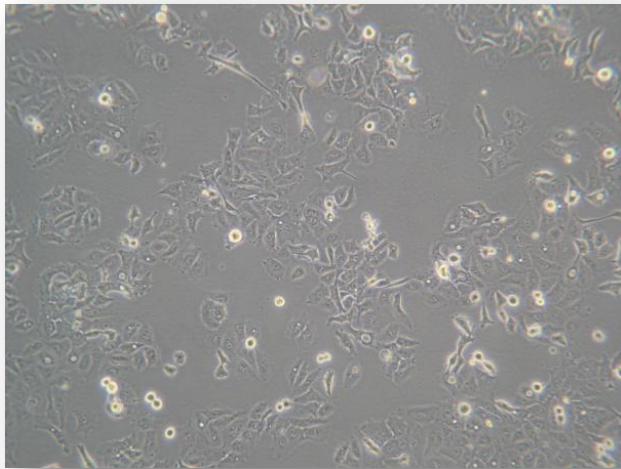


MATERYAL ve YÖNTEM

- ❑ **HUVEC** (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) Hücreleri
- ❑ **MCF-7** (meme kanseri) Hücreleri
- ❑ **Caco-2** (kolon kanseri) Hücreleri



Caco-2 hücreleri



HUVEC hücreleri



MCF-7 hücreleri



MATERYAL ve YÖNTEM

- ❑ MCF-7 ve Caco-2 hücrelerinin ortam besiyerleri hazırlandı.
- ❑ Propolisin farklı konsantrasyonları (0.063, 0.125, 0.25, 0.5 ve 1.0 mg/ml) ile MCF-7 ve Caco-2 hücrelerinin ortam besiyerleri (Conditioned Medium, CM) hazırlandı.

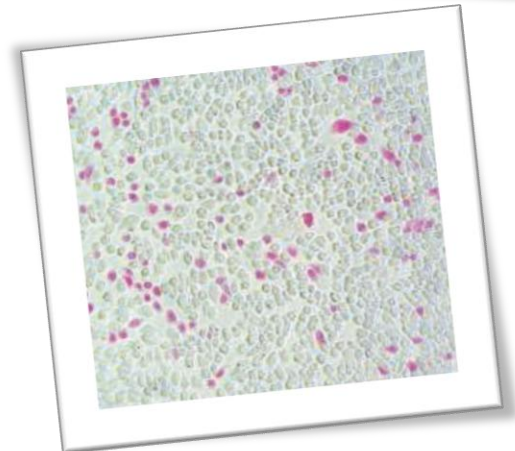
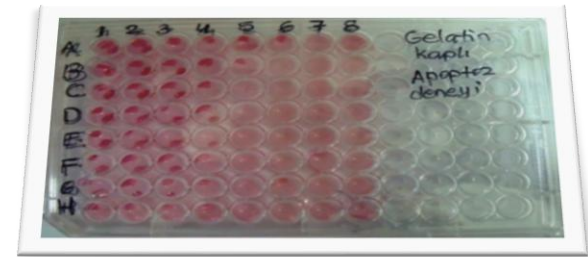




MCF-7 ve Caco-2 Hücrelerinde Propolis Yoluyla Apoptoz oluşturulması

Apoptotik hücreler boyayı sitoplazmalarına alırken, apoptoza uğramayan hücreler boyayı almamaktadır. Hücreler boyandıktan sonra, her bir kuyucuğun, farklı alanlardaki resimleri çekildi. Hücreleri saymadık, çünkü hücreler birbirlerine yapışmış ve küme oluşturmuş durumda idi. Bunun yerine, kit içinde bulunan boya salıcı madde kullanılarak, kuyucuklardaki apoptoza uğramış hücrelerin aldığı boyaların çözünmesiyle oluşan rengin absorbansı ELISA plak okuyucuda 550 nm'de ölçüldü.

Hücre hatlarında apoptozun saptanması APOPercentage Apoptosis Assay (biocolor life science assays, Biocolor Ltd, 8 Meadowbank Road, Carrickfergus, County Antrim, BT38 8YF, UK) ticari kit yöntemi ile saptanmıştır.



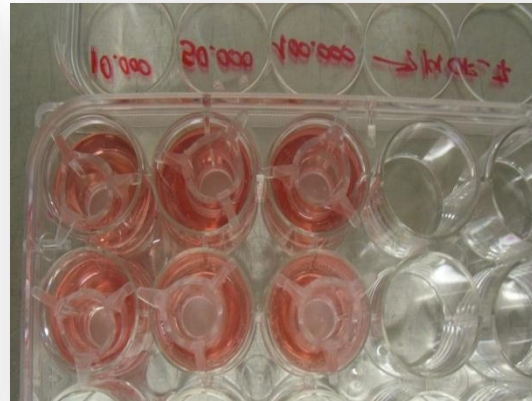


TÜBE BENZER YAPILARIN OLUŞTURULMASI

(*in vitro* anjiyogenez)

Tümör hücreleri ile indüklenen anjiyogenezin Propolis yoluyla inhibisyonunun göstermek için, hem tümör hücrelerinden elde edilen ortam besiyerleri (Conditioned Medium) hem de tümör hücrelerinin kendisinden yararlanılmıştır.

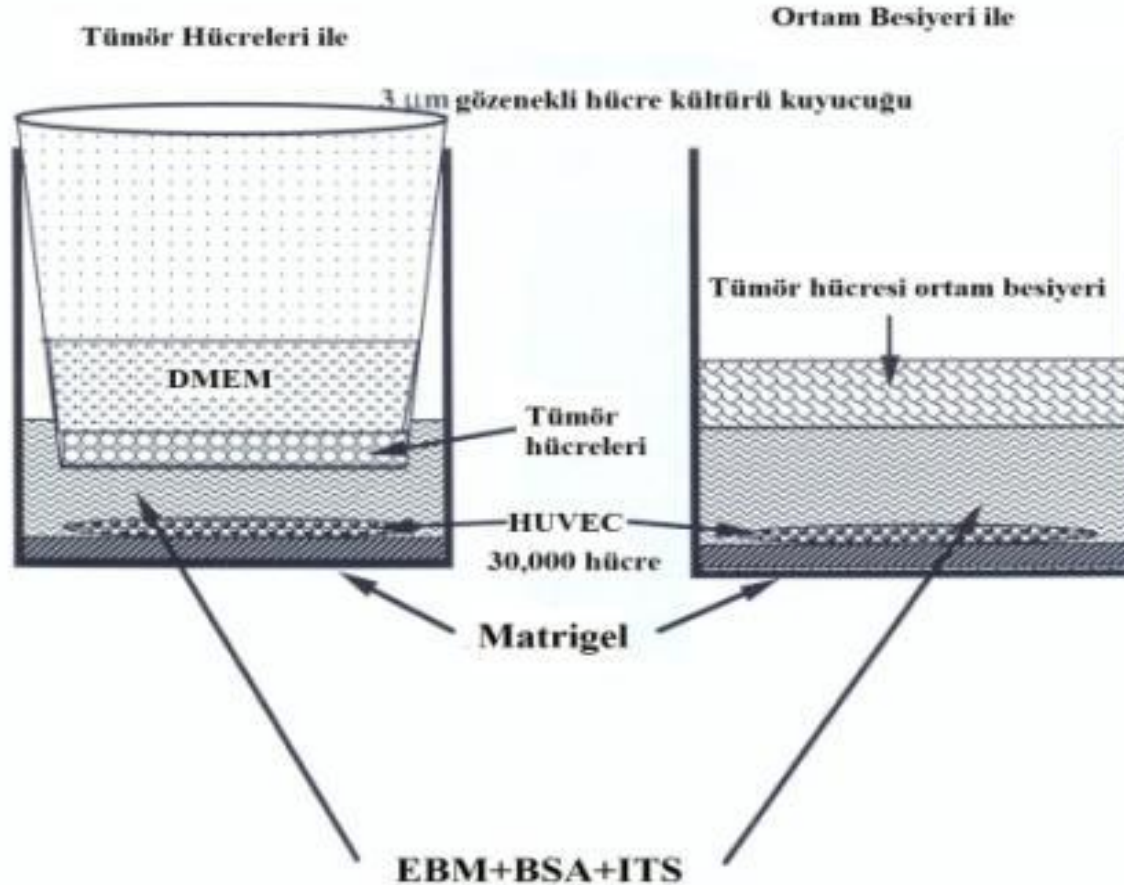
Tümör hücreleri ve tümör ortam besiyeri kullanılarak endotel hücrelerinin kapiller damarları oluşturması Grant ve ark. (2002) metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir



İN VİTRO ANJİYOGENEZ MODELİ



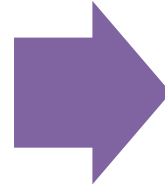
Matrigel ile Tübe Benzer Yapıların Oluşturulması Deneyi



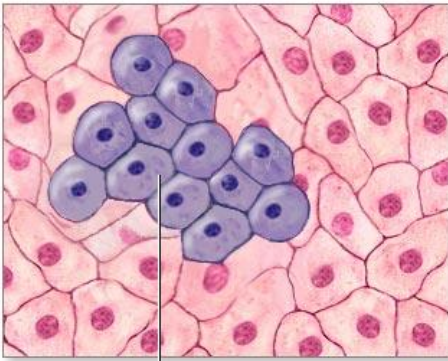


MCF-7 ve Caco-2'nin HUVEC Hücrelerinin Proliferasyonuna Etkisi ve Propolis ile İnhibisyonu

Tümör hücrelerinin ortam besiyerlerinin farklı miktarları ile HUVEC hücrelerini nasıl proliferasyona uğrattıklarını saptadık.



Ayrıca, tümör hücrelerini farklı konsantrasyonlarda propolis ile muamele edip, propolisin tümör hücreleri yoluyla HUVEC hücrelerinde oluşturduğu proliferasyona etkisi gösterildi.



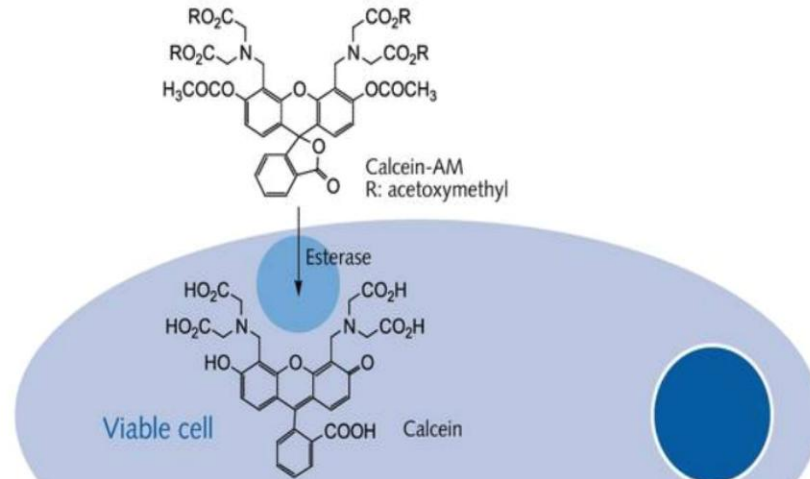
Proliferation of cancer cells

Proliferasyonun saptanabilmesi için Promega Firmasına ait ticari kit kullanılmıştır (CellQNon-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road-Madison, WI, USA).

Tümör Hücrelerinin Canlılığının Propolis ile İnhibisyonu



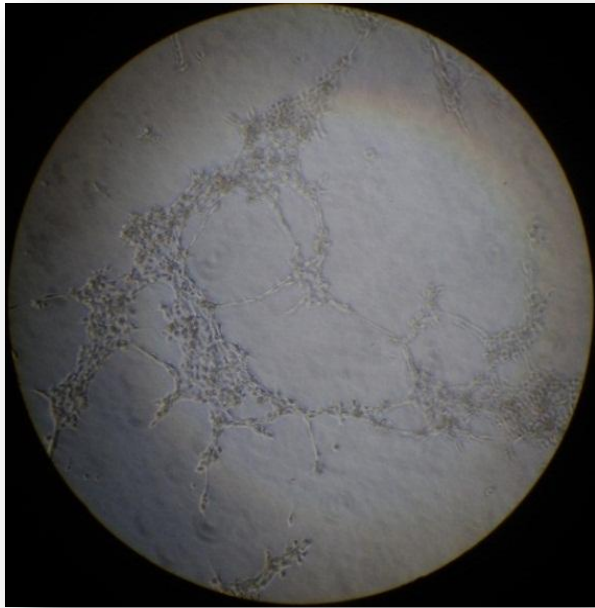
MCF-7 ve Caco-2 hücreleri Propolisin artan konsantrasyonları ile muamele edildi ve kuyucuklardaki absorbanlar fluorometre ile ölçüldü.



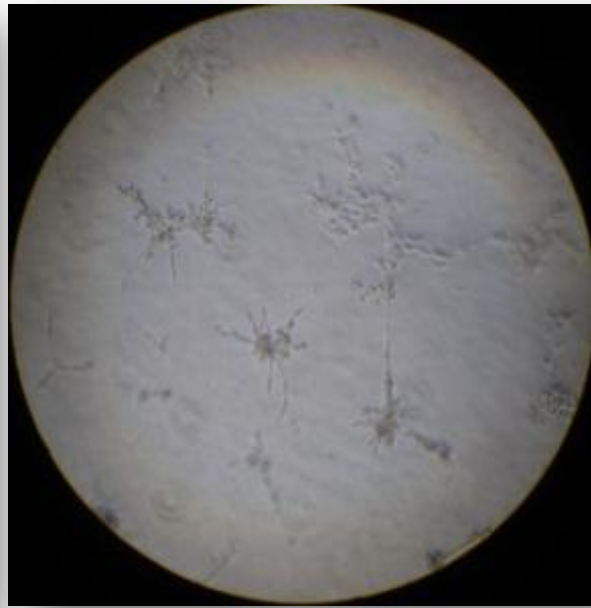
Hücre canlılığının saptanması için ticari kit kullanıldı. (Calcein AM Cell Viability Assay Kit, Biotium, Inc. 3423 Investment Blvd. Suite 8, Hayward, CA 94545, USA. Katalog Numarası 30026).

BULGULAR

(*in vitro* anjiyogenez)



HUVEC +MCF-7 (50.000 hücre/ml)



MCF-7 + 0.063 mg/ml
Propolis



MCF-7 + 1.0 mg/ml
Propolis

BULGULAR

(in vitro anjiyogenez)



HUVEC + Caco-2 (50.000 hücre/ml)



Caco-2 + 0.063 mg/ml
Propolis



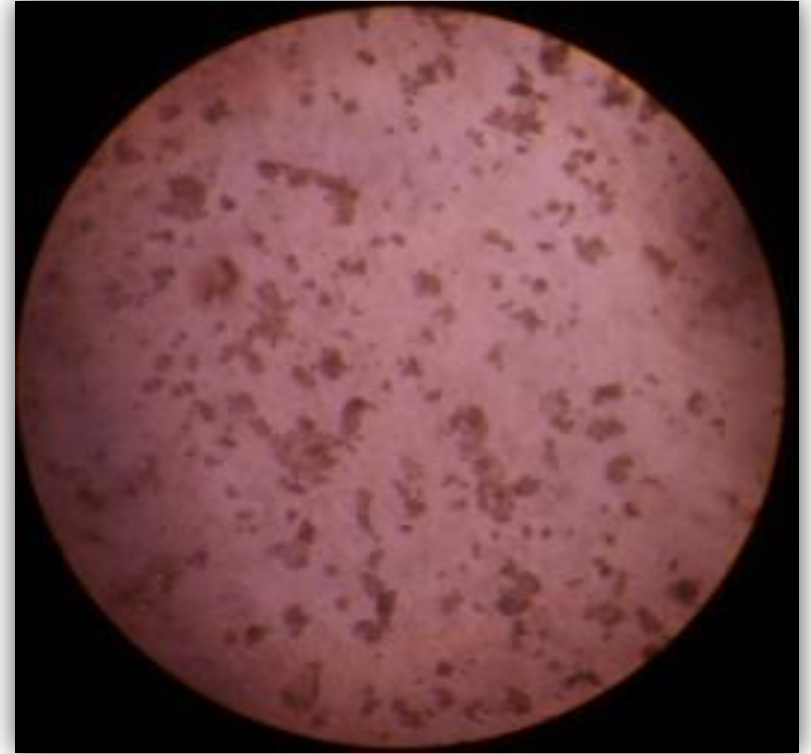
Caco-2 + 1.0 mg/ml
Propolis

BULGULAR

(MCF-7 ve Apoptoz)



Boya çözültisi bulunduğunda MCF-7 hücrelerinin bulunduğu kuyucuğun resmi.

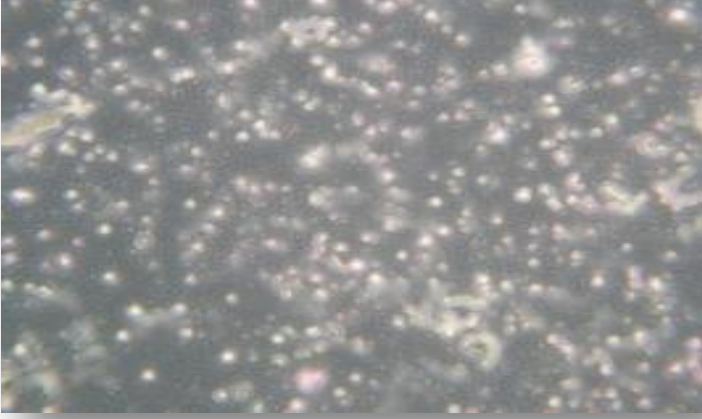


Boya çözültisi bulunduğunda 1.0 mg/ml propolis + MCF-7 hücrelerinin bulunduğu kuyucuğun resmi

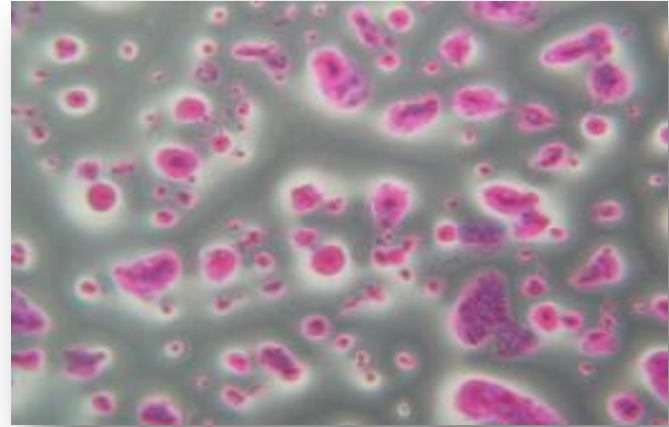


BULGULAR

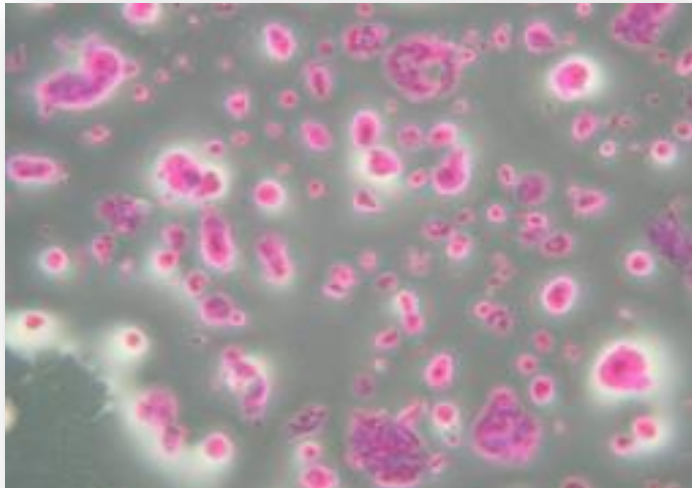
(MCF-7 ve Apoptoz)



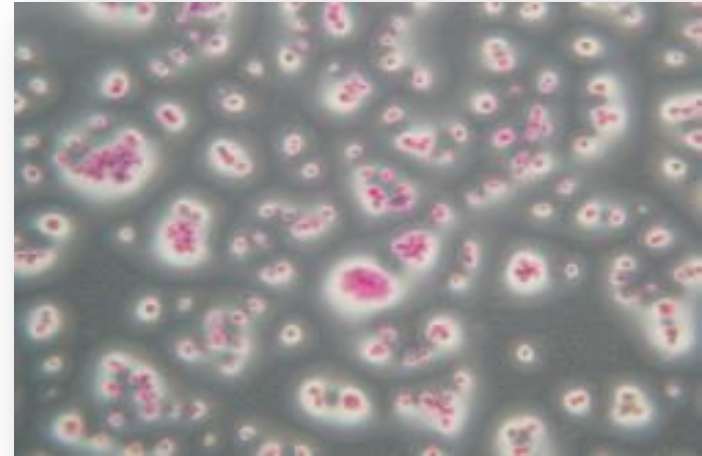
MCF-7 (Kontrol)



0.063 mg/ml Propolis uygulanmış MCF-7 hücreleri



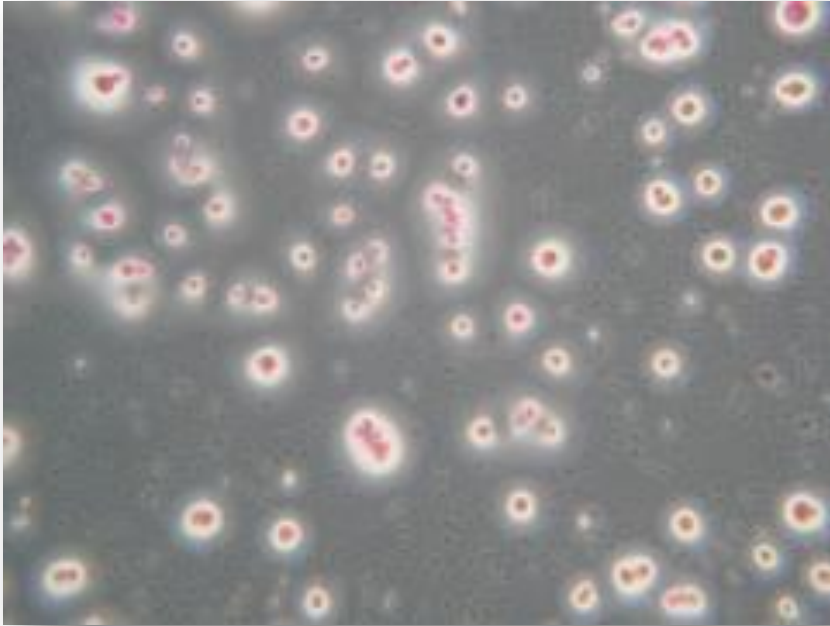
0.125 mg/ml Propolis uygulanmış MCF-7 hücreleri



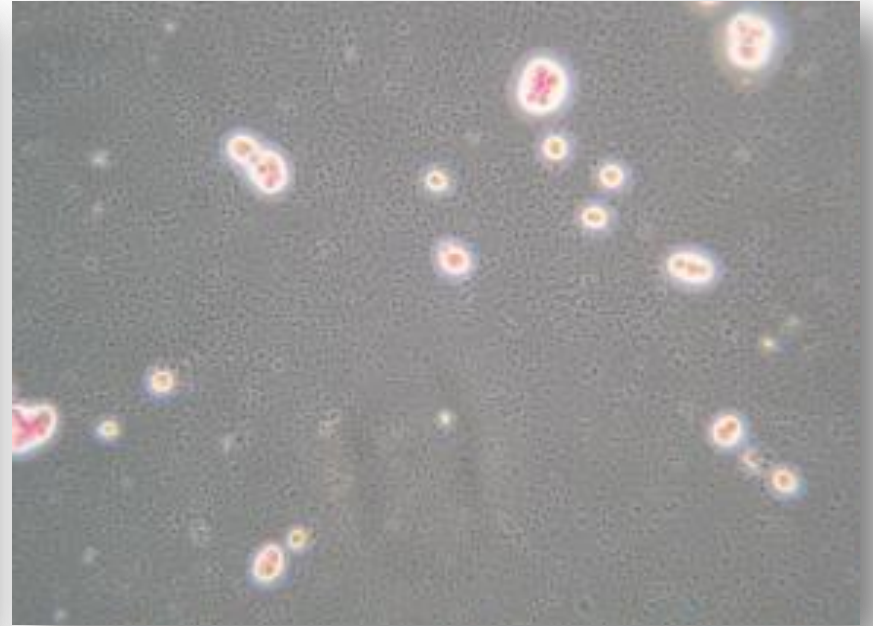
0.25 mg/ml Propolis uygulanmış MCF-7 hücreleri

BULGULAR

(MCF-7 ve Apoptoz)



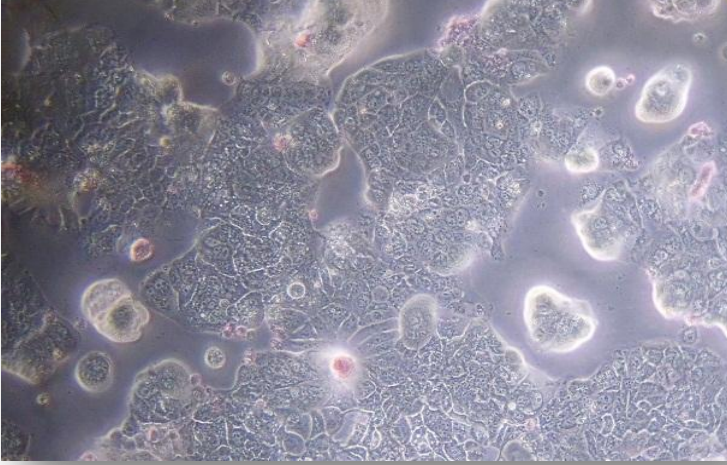
0.5 mg/ml Propolis uygulanmış
MCF-7 hücreleri



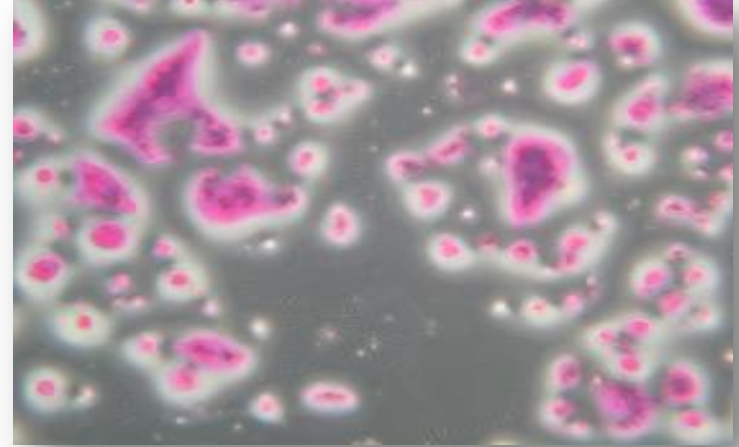
1.0 mg/ml Propolis uygulanmış
MCF-7 hücreleri

BULGULAR

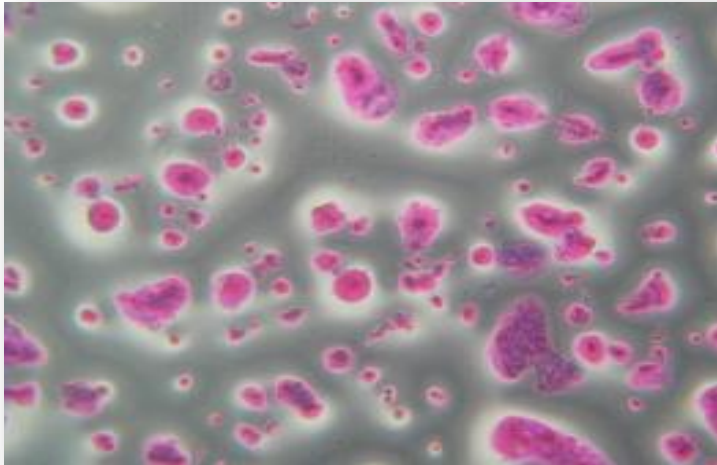
(Caco-2 ve Apoptoz)



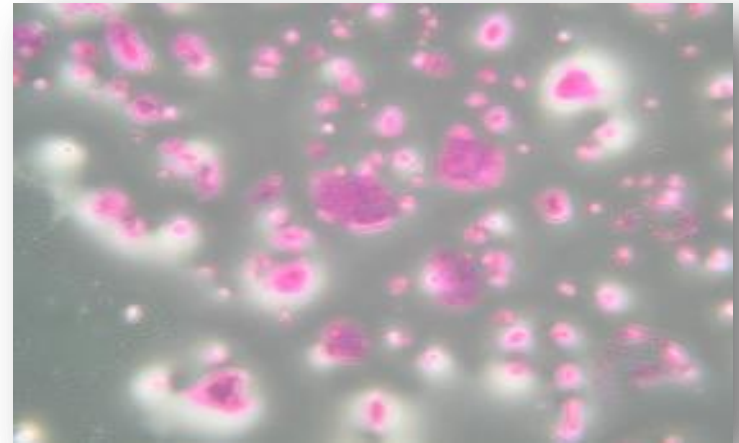
Caco-2 (Kontrol)



0.063 mg/ml Propolis uygulanmış
Caco-2 hücreleri



0.125 mg/ml Propolis uygulanmış
Caco-2 hücreleri

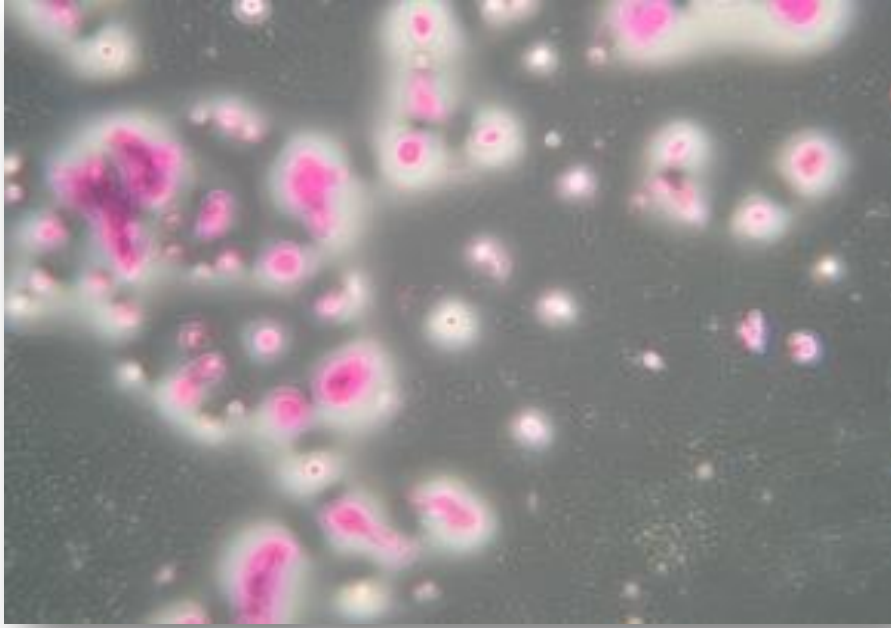


0.25 mg/ml Propolis uygulanmış
Caco-2 hücreleri

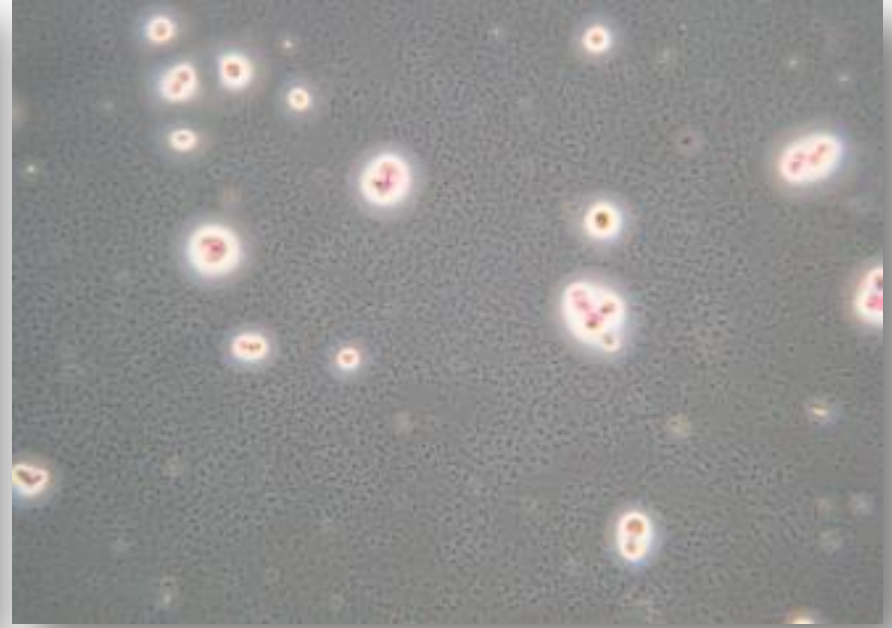


BULGULAR

(Caco-2 ve Apoptoz)

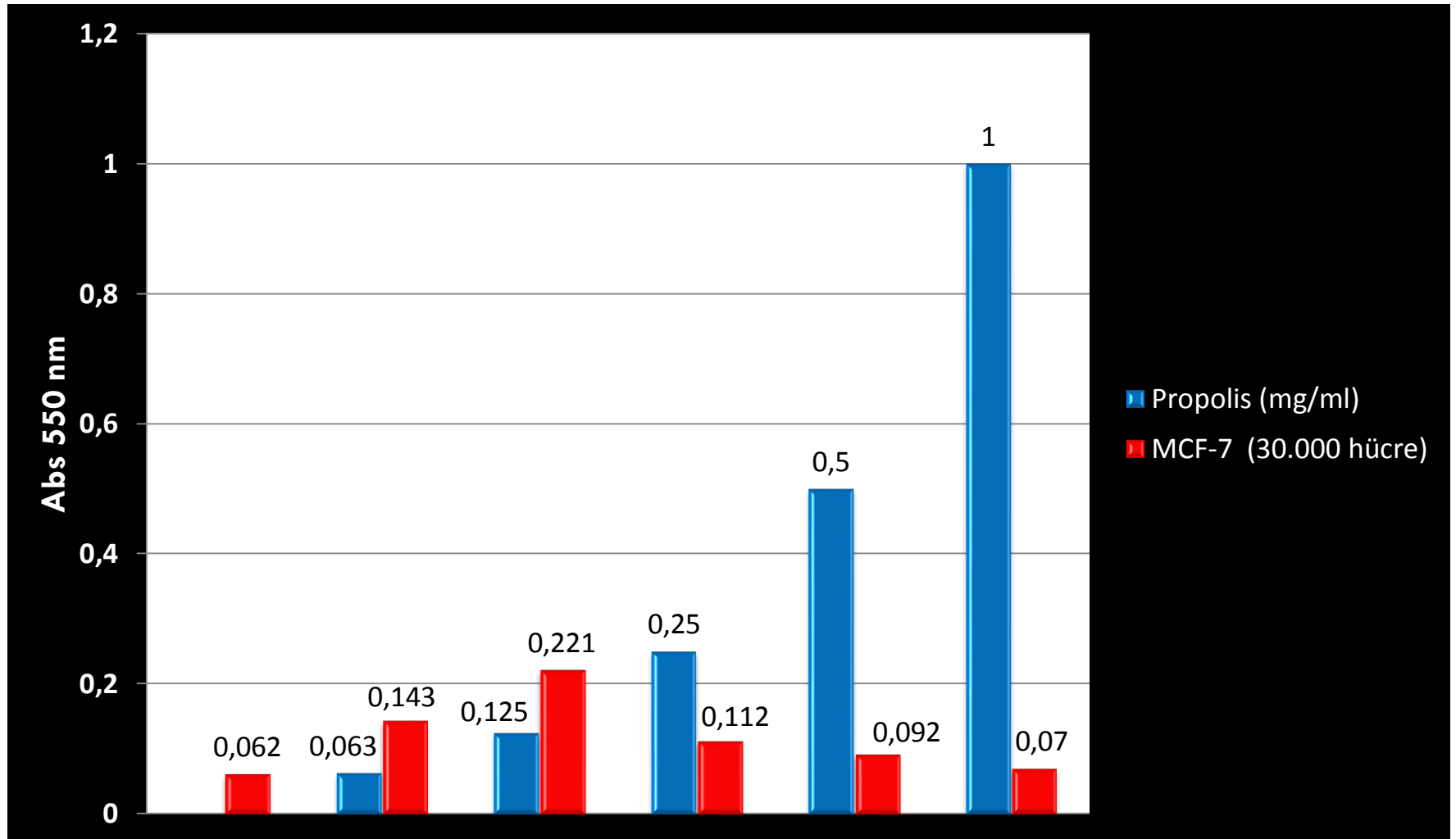


0.5 mg/ml Propolis uygulanmış
Caco-2 hücreleri

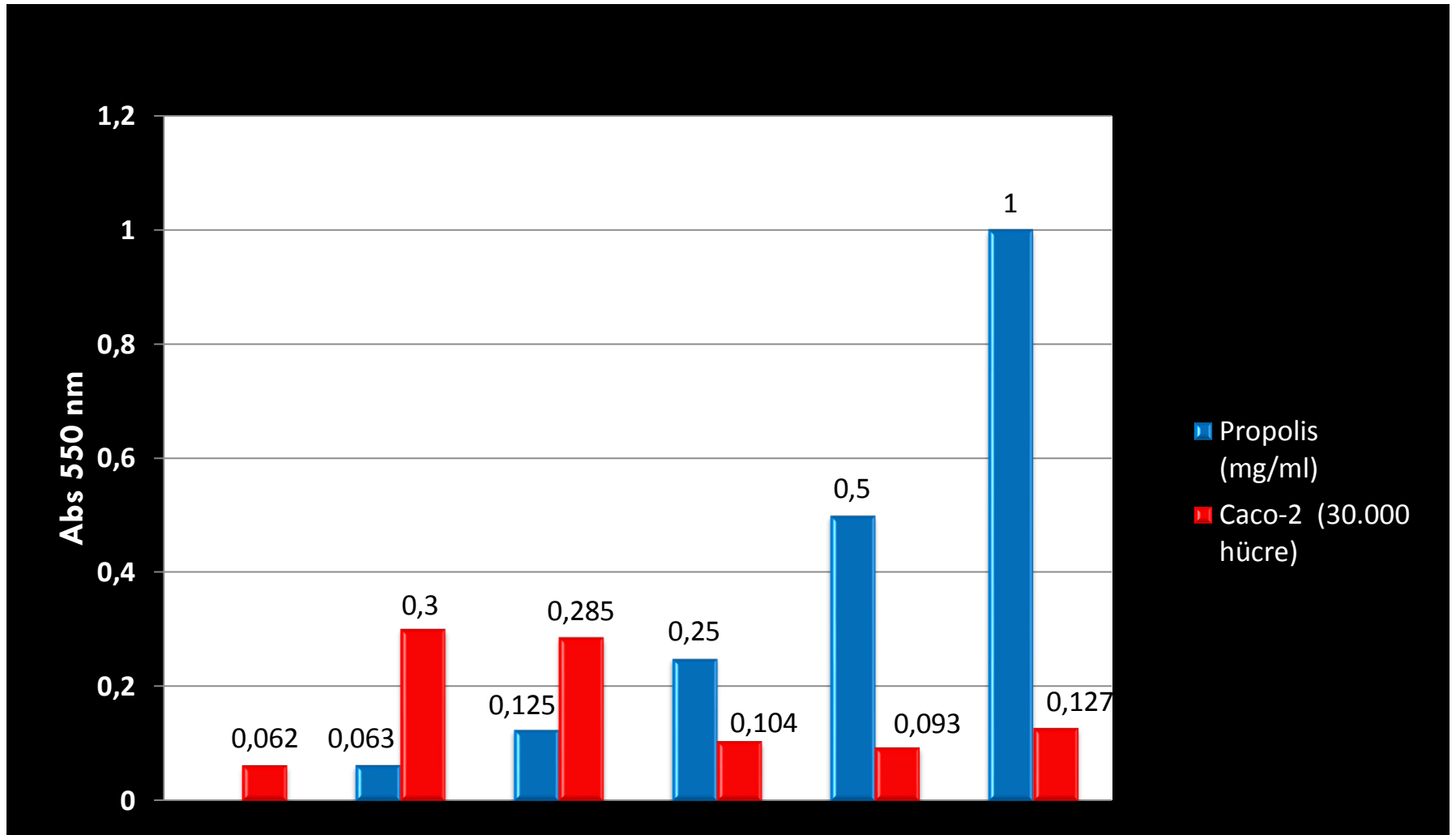


1.0 mg/ml Propolis uygulanmış
Caco-2 hücreleri

BULGULAR (MCF-7 Hücrelerinin Propolis ile Apoptozu)

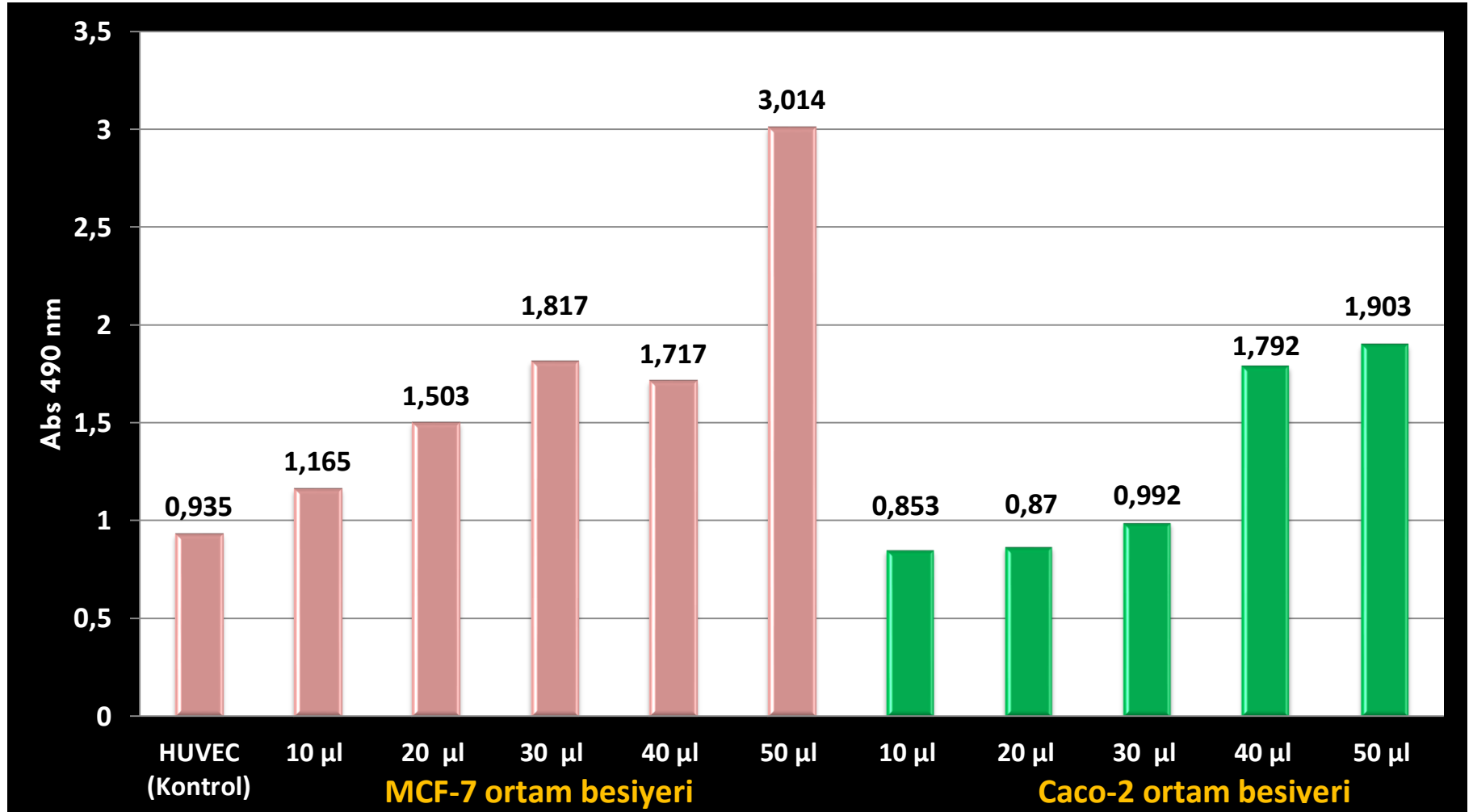


BULGULAR (Caco-2 Hücrelerinin Propolis ile Apoptozu)



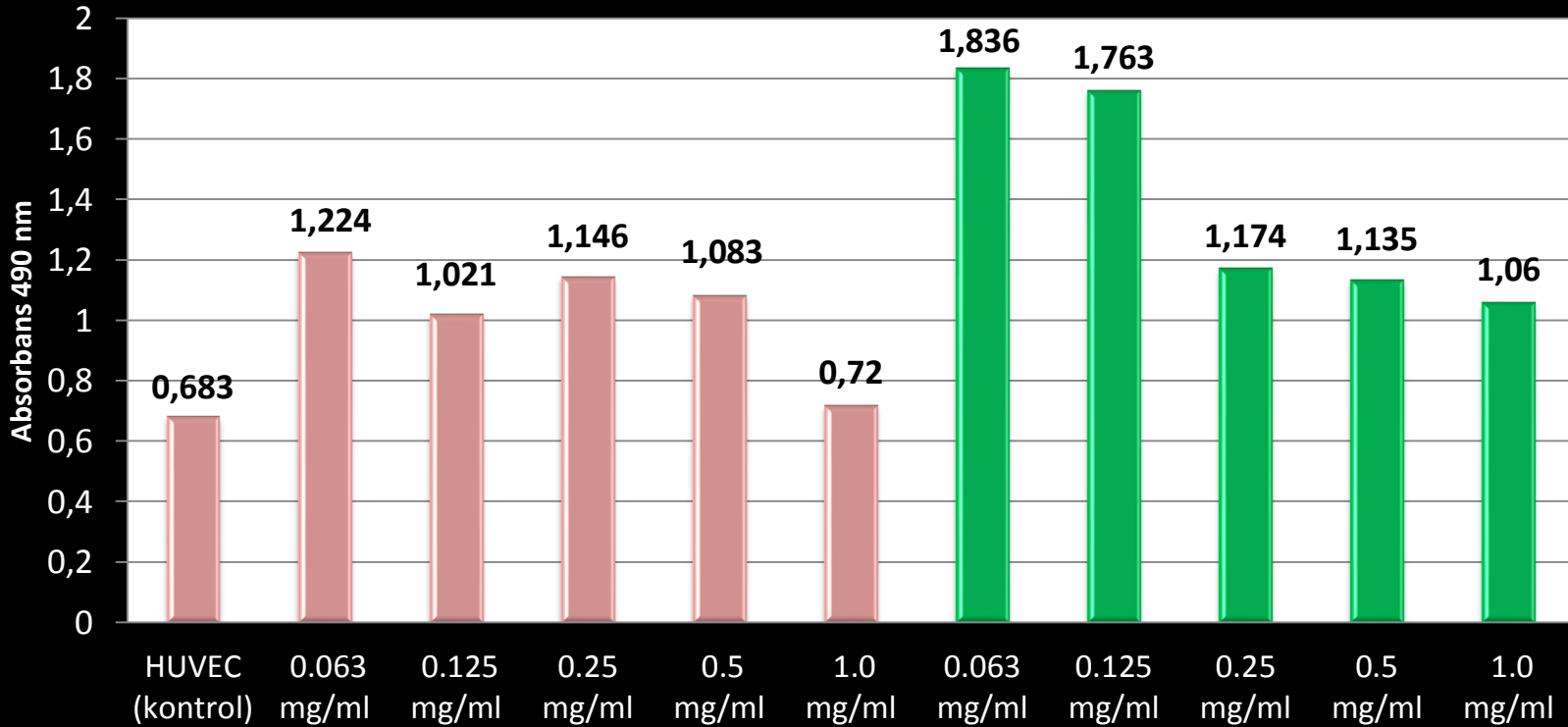


BULGULAR (Tümör Hücreleri Ortam Besiyerlerinin HUVEC Hücrelerinin Proliferasyonuna Etkisi)





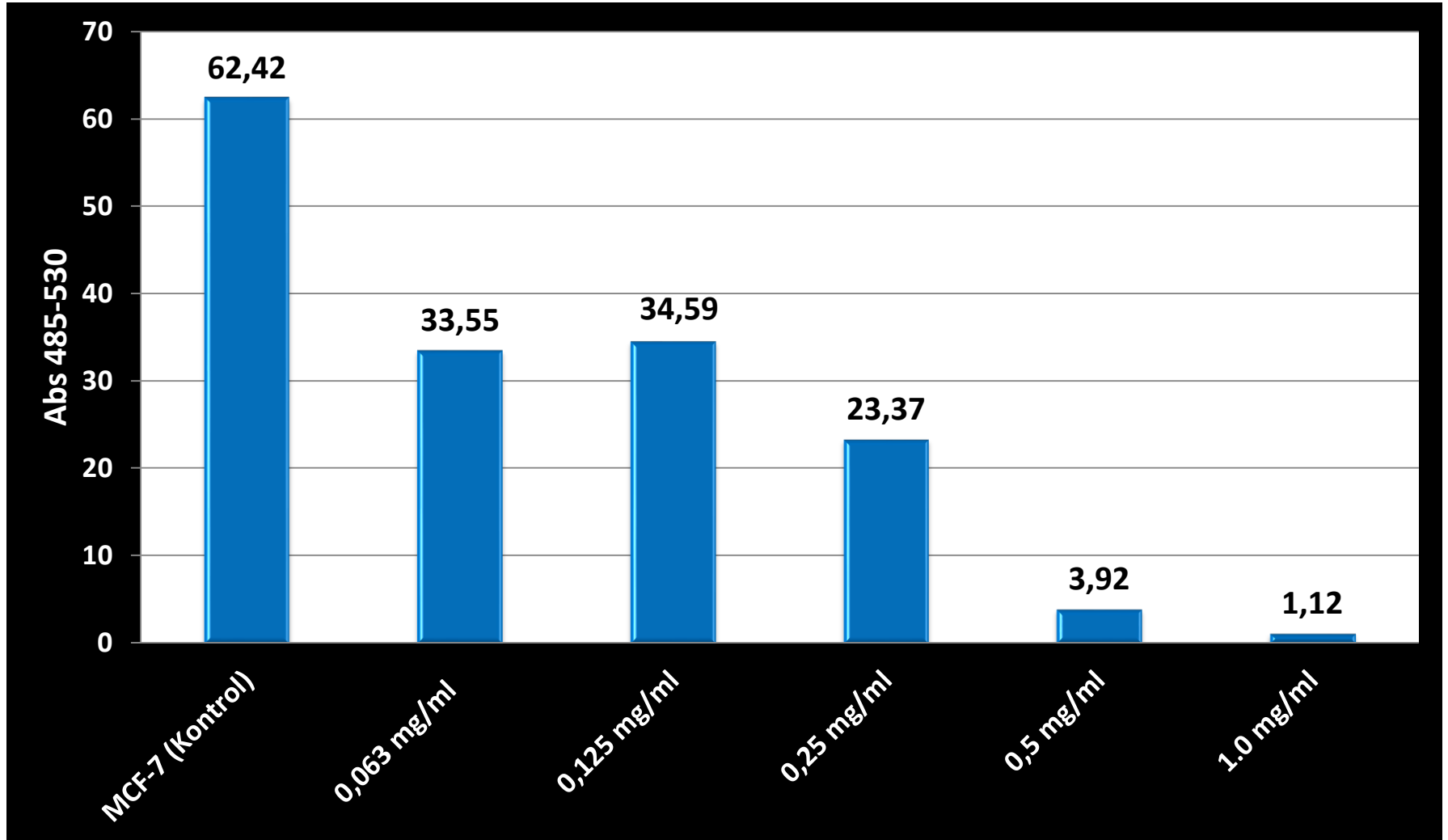
BULGULAR (Tümör Hücreleri ile İndüklenen HUVEC Hücrelerinin Proliferasyonunda Propolisin İnhibisyonunun Gösterilmesi)



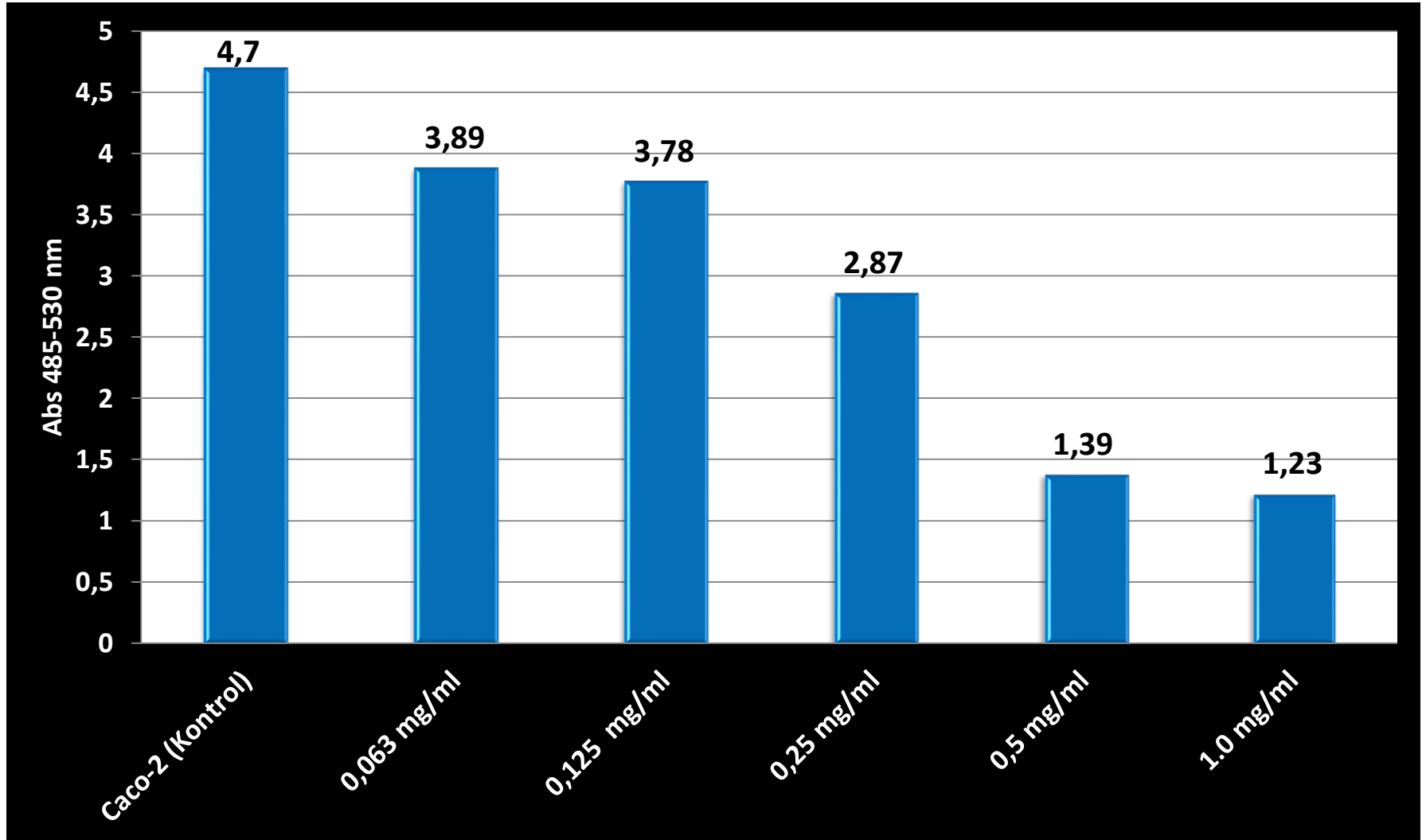
MCF-7 hücreleri

Caco-2 hücreleri

BULGULAR (MCF-7 Hücrelerinin Canlılığına Propolisin Etkisi)



BULGULAR (Caco-2 Hücrelerinin Canlılığına Propolisin Etkisi)





SONUÇLAR

Sonuç olarak;

Semt pazarlarında satılmaya başlanan ve halk arasında da kullanımı gittikçe yaygınlaşan **propolisin**, **sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanserli hücreler üzerindeki rolünün gösterilmiş olmasının çok önemli olduğunu**, tedavi edici rolünün daha fazla kanser hücrelerinde denenerek saptanması ve kanser hücreleri üzerindeki bu inhibe edici özelliğin mekanizmasının aydınlatılmasının gerekli olduğu düşüncesindeyiz.



ÖNERİLERİMİZ

1. Propolis yoluyla, apoptozun, proliferasyonun, tüpe benzer yapıların oluşmasının engellenmesi ve hücre canlılığının inhibisyonu ile ilgili olarak **propolis bileşiğinin çeşitli kanser hücrelerinde tedavi edici en düşük dozunun kullanılması ile ilgili çalışmaların yapılmasının zorunlu olduğu düşünülmektedir.**

2. Tümör hücrelerinden ve onların propolis ile muamele edilmesinden elde edilen ortam besiyerlerinde apoptozun gerçekleşmesinde etkili olan **kaspazların aktiviteleri saptanarak apoptozun mekanizmasının moleküler düzeyde anlaşılabilmesi mümkün olacaktır.**



ÖNERİLERİMİZ

3. Farklı kanser türlerinde aynı mekanizmalar kullanılarak yeni kan damarları oluşumunda en önemli basamaklardan biri olan **HUVEC hücrelerinin invazyonunun propolis yolu ile incelenmesi, yeni kan damarları oluşumunun mekanizmasının aydınlatılmasında önemli olabileceğini düşünmekteyiz.**



SABRINIZ İÇİN TEŞEKKÜR EDERİM

ÇALIŞMA EKİBİMİZ

Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY (ADÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya AD)

Prof.Dr. Orhan DEĞER (KTÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya AD)

Araş. Gör.Dr. Naciye KILIÇARSLAN (ADÜ Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya AD)

Araş.Gör.Dr. Tuba Çakıroğlu (KTÜ Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji AD)

ÖNERİLERİMİZ



Araştırmalarımıza ışığında, in vivo çalışmaların da yapılması ve propolisin kanseri önleyici ve/veya tedavi edici bir bileşik olarak kullanılması mümkün olabilecektir. Propolisin bu tür anti-anjiyogenik ve apoptotik özelliklerinin daha ileri düzeyde incelenmesi gerekli olup, yakın gelecekte kanserlerin tıbbi olarak önlenmesi ve tedavi edilmesinde ilerleme kaydedileceğini ummaktayız.