

"ARI ÜRÜNLERİNİN SAĞLIK ÜZERİNE ETKİLERİ"



PROF.DR.OĞUZ ÖZTÜRK

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ (DETAE)
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

*"Bal ve Diğer Arı Ürünleri ile Sağlıklı Yaşam Platformu" projesi İstanbul Kalkınma Ajansı
2010 Mali Destek Programı, kapsamında desteklenmektedir.*

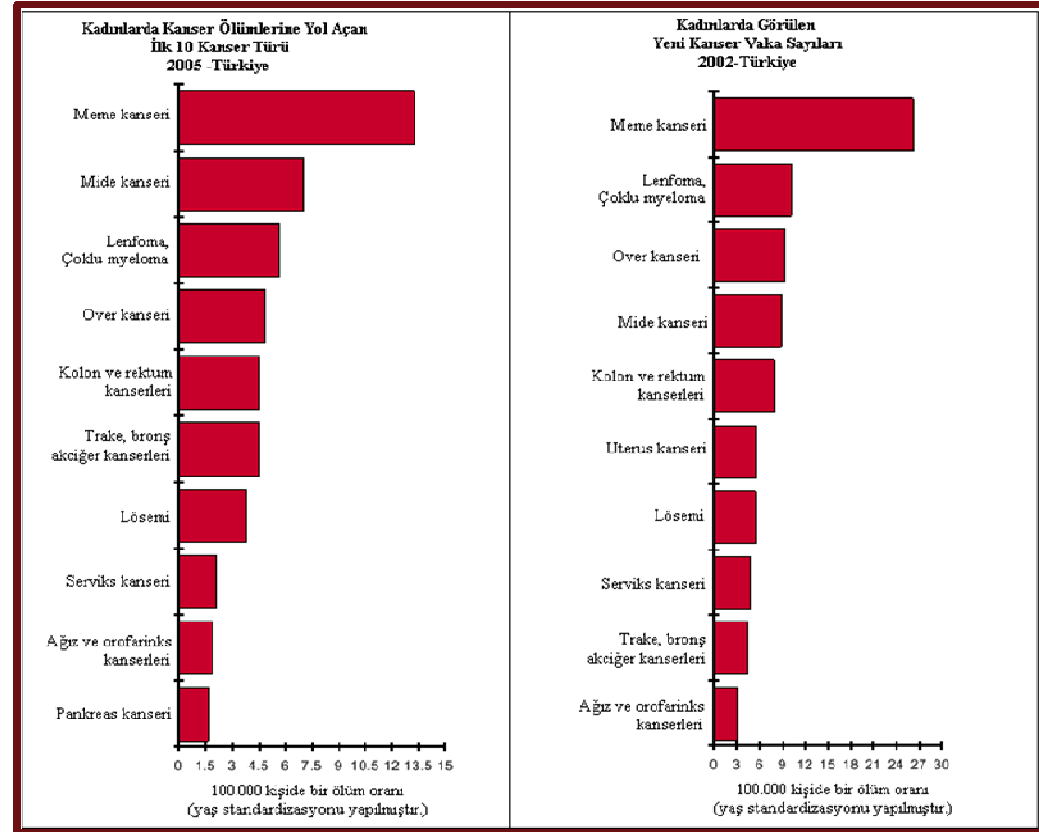
- Yurtta ve Dünyada Meme Kanseri
- Projenin Amacı
- Projede Uygulanan Yöntemler
- Bal ve Propolis Numune Seçimi
- Hücre Kültürü ve Canlılık Sonuçları
- Meme Kanseri Hücre Soylarında Bal ve Propolisin Genom Boyu Etkileri
- Projenin Getirdikleri ve Hedeflerimiz

DÜNYADA KADINLAR ARASINDA EN SIK GÖRÜLEN KANSER TİPIDİR.

Türkiye'de 2002 yılında kadınlarda en çok rastlanan kanser tipi

2005 yılında en çok ölüme sebebiyet veren kanser tipi

Doğu bölgelerimizde sıklık 20/100.000
Batı bölgelerimizde 40-50/100.000



Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2002-2005 Türkiye Raporu



Multifaktoriyel hastalık olarak bilinen **MEME KANSERİ**nde, vakaların genetik farklılığı nedeniyle prognozu değişkenlik gösterebilmektedir.

FARKLI FARMAKOGENETİK ÖZELLİKLERİ nedeniyle de kemotöröpotik ajanlara karşı her vakada toksisite ve yararlanım farklı olabilmektedir.

Son dönemlerde tedaviye ek olarak,



- Kematöropotiklerin toksik etkisini azaltmaya
- Daha etkili ve hedefe özgün tedavi mekanizmaları geliştirilmesine ve
- Hücre ölümünün (apoptoz) indüklenmesi için yeni, **POTANSİYEL DOĞAL ÜRÜNLERE** odaklanılmıştır.

BAL ve PROPOLİS

- flavonoid,
- fenolik bileşikler (kafeik ve ferulik asit),
- vitamin,
- antioksidan ve
- hidrojen peroksid içerikleri bakımından oldukça dikkat çekmektedir.



"Bal ve Diğer Arı Ürünleri ile Sağlıklı Yaşam Platformu"

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ ,DETAE MOLEKÜLER TIP ABD

En sık görülen üç farklı grup meme kanserini temsilen,

MCF-7 : ER pozitif-invaziv duktal karsinom (IDC)

SKBR3: HER2 pozitif-IDC

MDA-MB 231 : ER, PR, HER2 negatif-IDC

Kontrol hücre olarak

MCF10A: Normal meme epitel hücresi

Bu hücre soylarında laboratuvar şartlarında,
BAL ve **PROPOLİS**'in

- Sitotoksik, apoptotik etkileri yanında

Dünyada ilk olarak

- **miRNA PROFİLİ** ve **TÜM GENOM EKSPRESYON** seviyelerindeki etkilerinin incelenmesi hedeflendi.



Elde edeceğimiz deneysel kanıtlara dayalı verilerle,



Ülkemizde prevalansı artış gösteren Meme kanserinin önlenmesine veya tedavisine destek olabilecek

- o **TÜRK BAL VE PROPOLİSİNİN** potansiyel faydalarının ve mekanizmalarının gösterilmesi ile
- o Türk arı ürünlerinin sağlık amaçlı uygun ve koruyucu ürünler arasında destek maddesi olarak kullanılabilirliklerinin gösterilmesi hedeflenmiştir.



LABORATUARDA UYGULANAN YÖNTEMLER

- **WST-1 YÖNTEMİ İLE HÜCRE PROLİFERASYON VE SİTOTOKSİSİTE ANALİZİ :** Bal ve propolis ekstraktlarının MEME KANSERİ HÜCRE SOYLARI üzerinde doza ve zamana bağlı etkisi.
- **APOPTOZ TAYİNİ:** Apoptoz tarama kiti ile Flow Sitometri cihazında incelenmesi.
- **RNA İZOLASYONU:** Hücrelerden total RNA izolasyonu.
- **MICROARRAY ANALİZİ:** Elde edilen izolatlar ile miRNA profili ve genomik ekspresyon seviyesindeki değişikliklerin belirlenmesi.
- **REAL TIME PCR SİSTEMİ:** Microarray analizi sonrasında elde edilen sonuçların validasyonu.
- **BIYOİNFORMATİK (VERİLERİN ANALİZİ):** Ekspresyon sonuçlarının biyoinformatik programı (Gene Spring ve Bioconductor) ile istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

"KÖR ÇALIŞMA" olarak dizayn ettiğimiz araştırmamızda içeriklerini bilmediğimiz,

6 farklı BAL ve

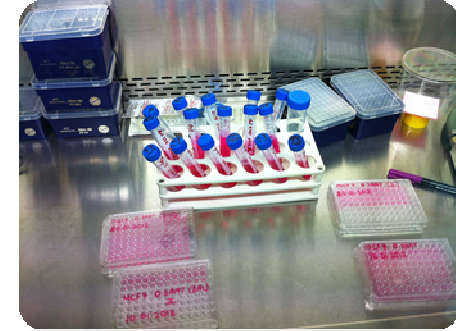
8 farklı PROPOLİS (ALKOL VE SU EKSTRAKTLARI)

- Üç farklı meme kanseri ve bir normal meme epitel hücre soyuna
 - Bal için %1, %2.5, %5, %7.5, %10 ve %25 ve
 - Propolis için 2.5, 5, 25, 50, 100, 250, 500 ve 750 ug/ml) dozlarında
- 24., 48. ve 72. saatlerde **WST-1 YÖNTEMİ** ile hücre sağkalımı üzerine etkileri ölçüldü.

WST-1 YÖNTEMİ

(Hücre Proliferasyon ve Sitotoksisite Analizi) ile

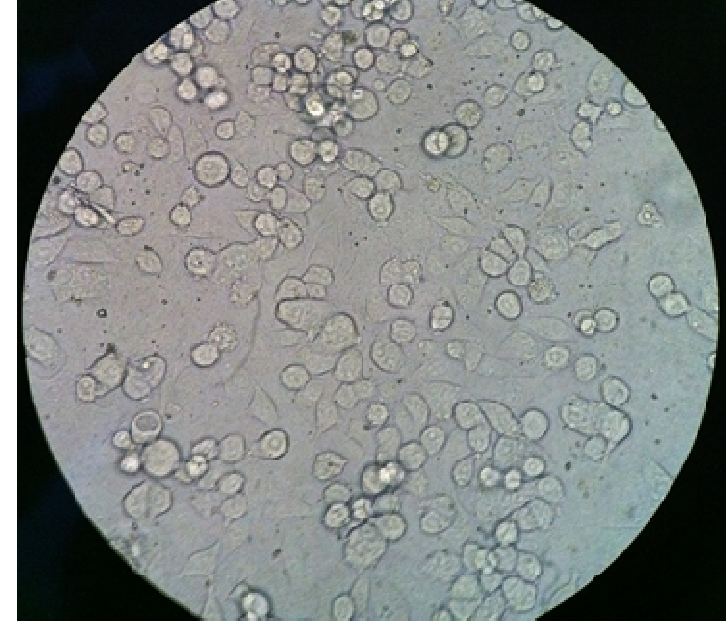
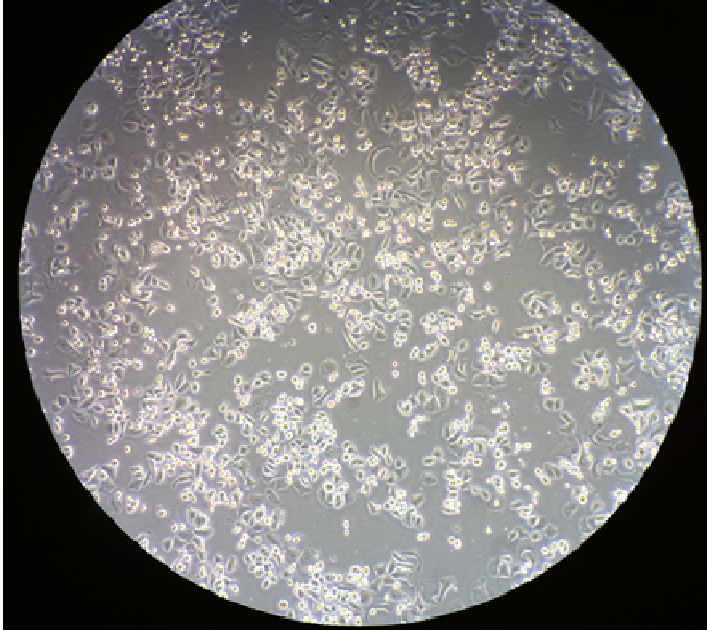
EN ETKİN BAL ve ETOH PROPOLİS belirlendi.



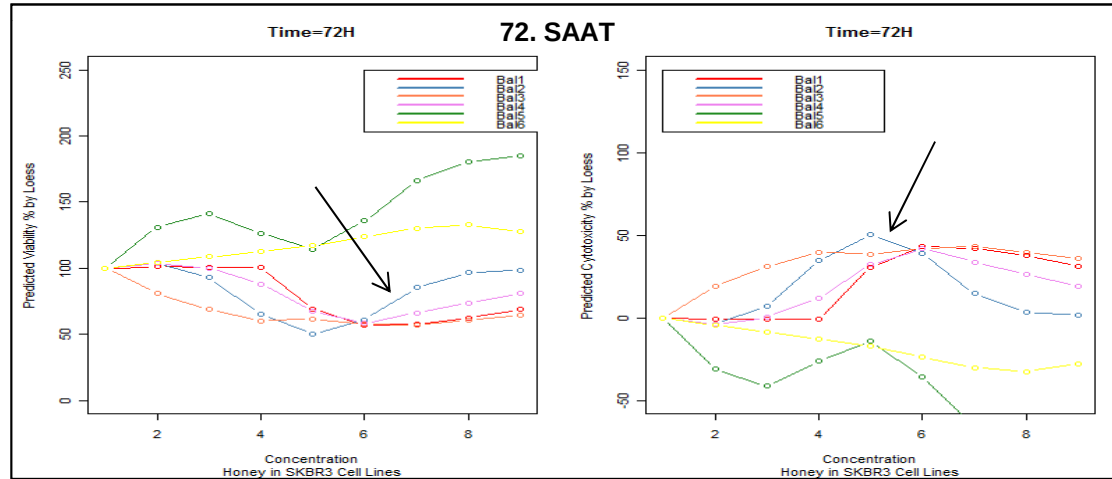
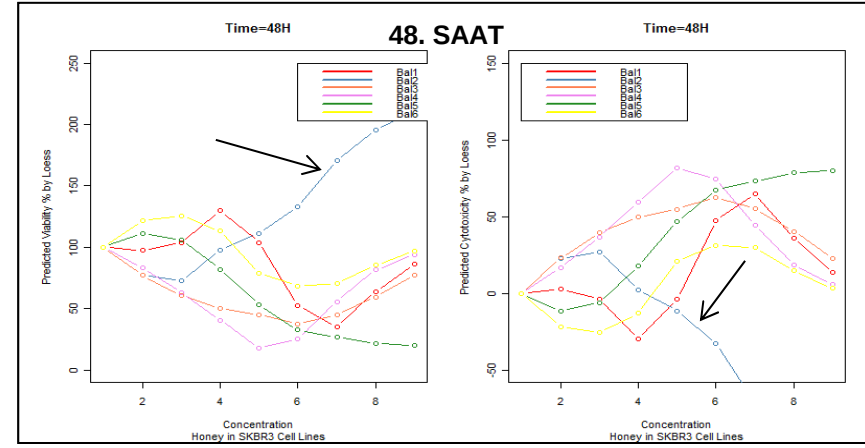
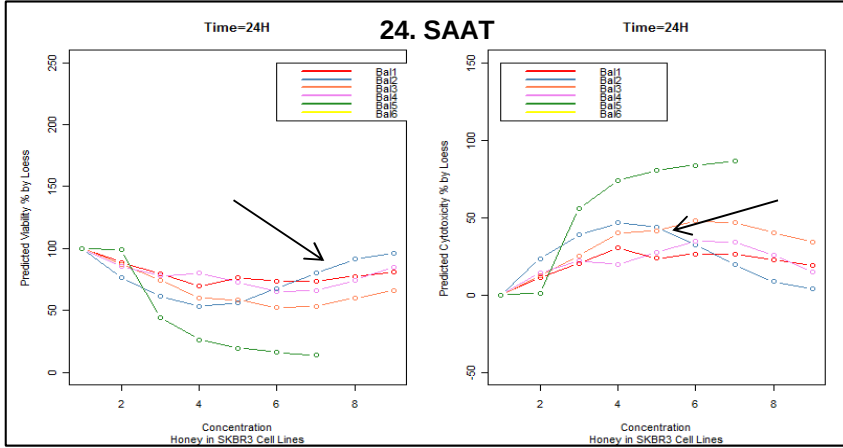
İncelenen bal numuneleri arasında **İstanbul bölgesine** ait bal numunesinde WST-1 değerleri daha anlamlı bulunduğundan bu numune ile araştırmaya devam edildi.

Propolisin Su Ekstraktı, EtOH ekstraktına göre daha az etkili gözleendiği için

Deneylere **EtOH Propolis ekstraktları** ile devam edildi.

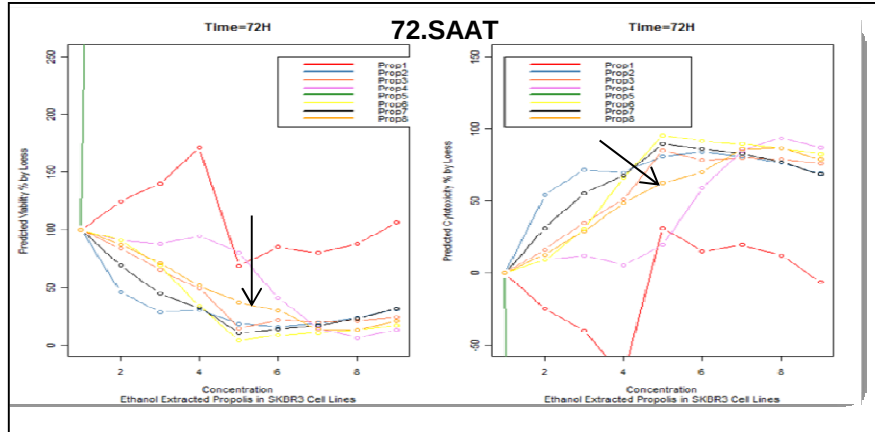
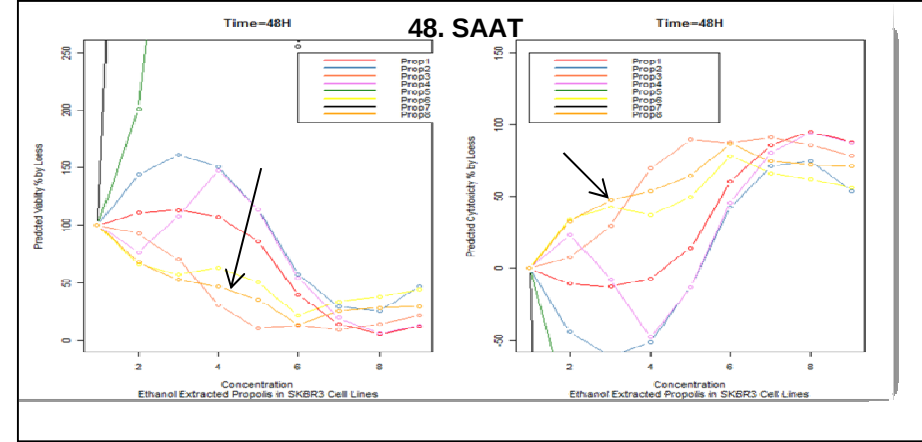
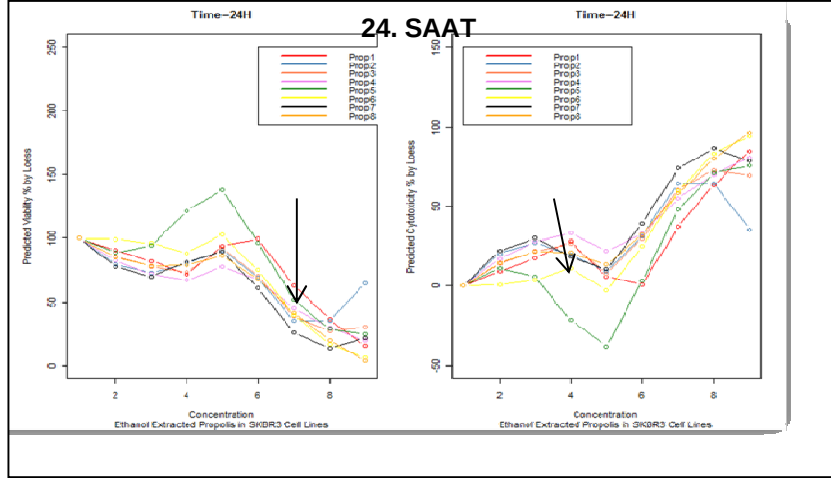


**SKBR3
HER2 + MEME KANSERİ HÜCRE SOYU
MİKROSKOP GÖRÜNTÜSÜ**



**DÜŞÜK
DOZLARDAN
İTİBAREN
ETKİLİ!!!**

Mavi: 156 nolu numune (İSTANBUL BALI)

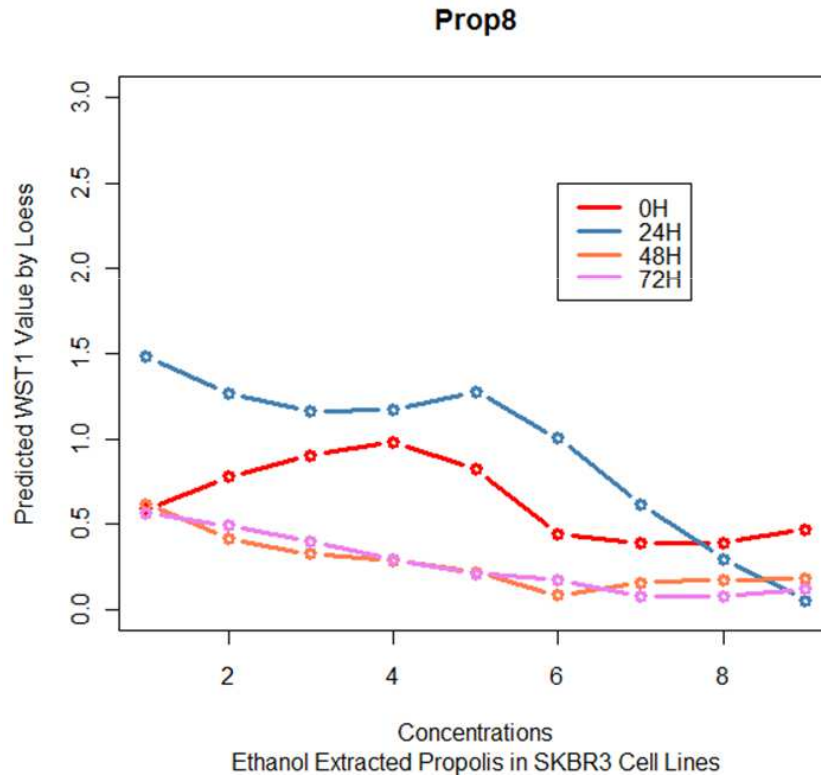


ETOH Propolis 8, diğer propolislere göre düşük dozlarda minimal etki

Doz arttıkça sitotoksik etkisinin dozla beraber arttığı ve bu durum 48. saatte de devam etmekte

Propolis-8 (turuncu): İSTANBUL PROPOLİSİ

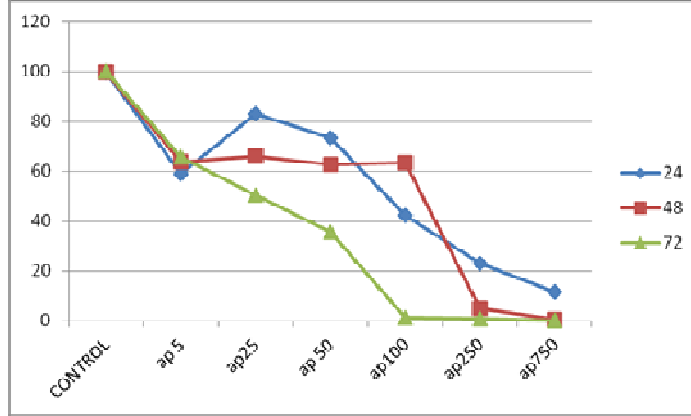
Etanol ekstrakt propolislere uygulanan dozlar;
2.5, 5, 25, 50, **100**, 250, 500 ve 750 ug/ml (8 doz)



48. ve 72. saatlerde doz etkisinin etkili olduğu,

Büyüme eğrisinin oldukça düştüğü görülmekte

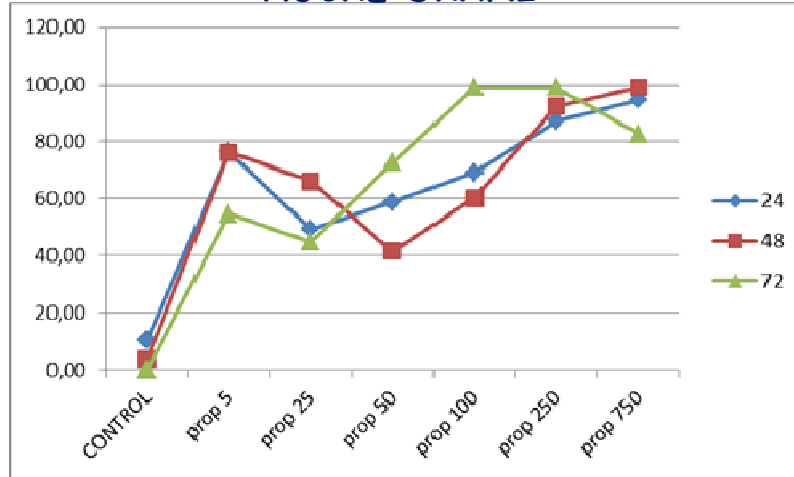
VIABILITY (%40-50 SAĞ KALIM)



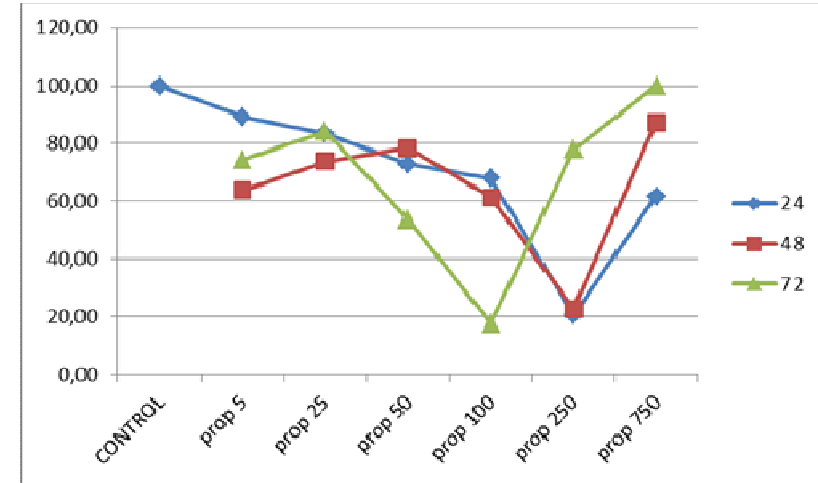
Tüm saatlerde hücrenin genel olarak geç apoptoza yönlendiği, propolisin 100-250 dozları arasında ise apoptotik sürecin arttığı gözlemlenmiştir.

En yüksek dozlarda da hücre nekrotik sürece girmiştir.

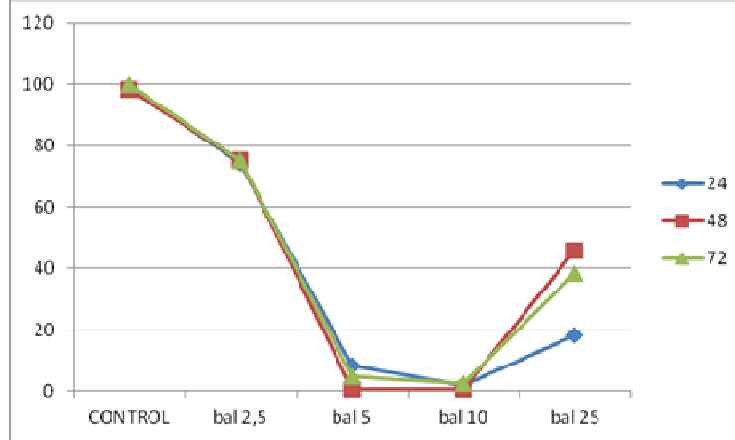
**APOPTOZ+APOPTOZ-NEKROZ/TOTAL ÖLÜ
HÜCRE ORANI**



**NEKROZ+APOPTOZ-NEKROZ/TOTAL
ÖLÜ HÜCRE ORANI**

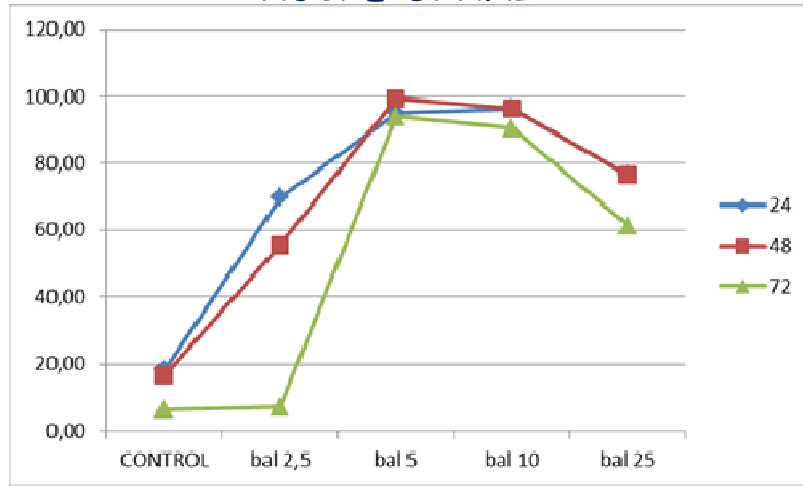


VIABILITY (%50 SAĞ KALIM)

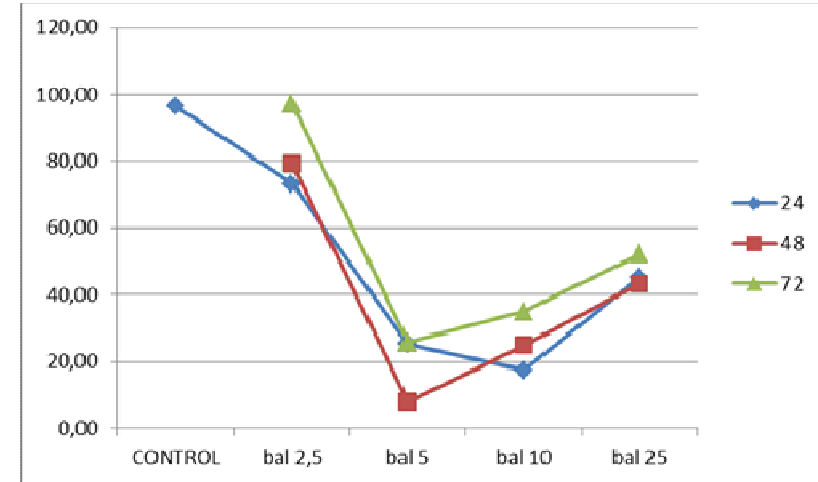


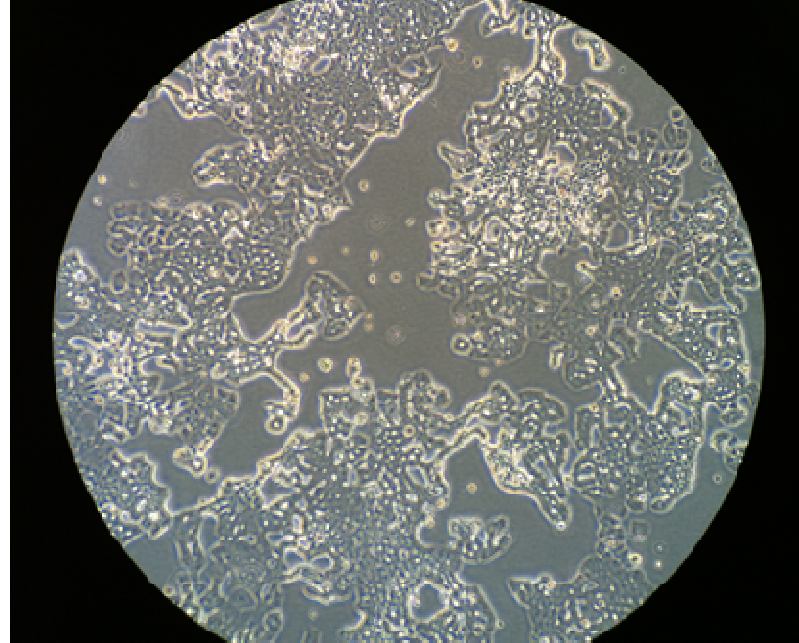
Düşük dozlarda apoptoza yönelme,
Yüksek dozlarda nekrotik sürecin başlaması

APOPTOZ+APOPTOZ-NEKROZ/TOTAL ÖLÜ HÜCRE ORANI



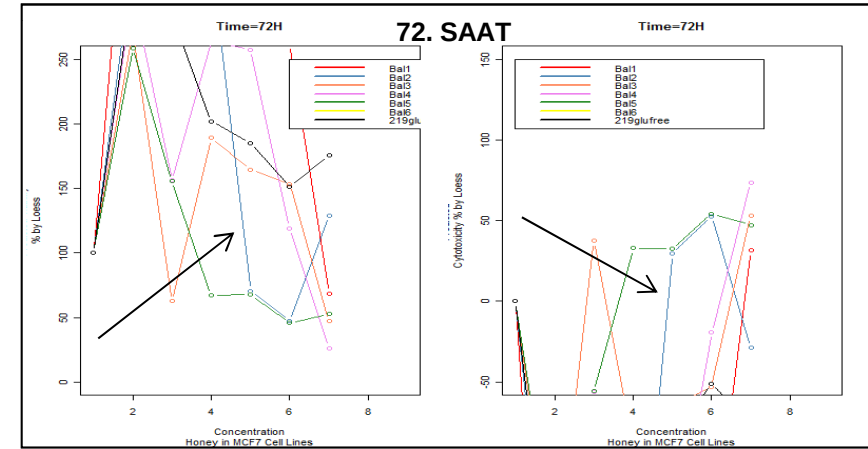
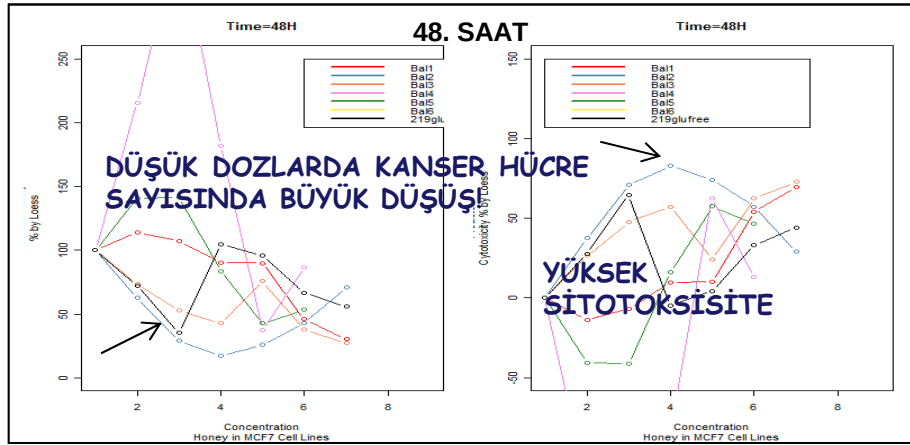
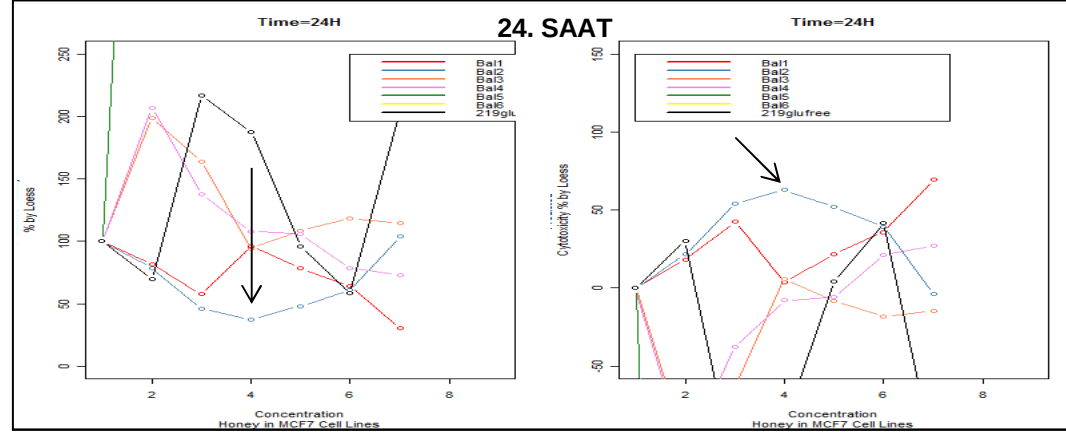
NEKROZ+APOPTOZ-NEKROZ/TOTAL ÖLÜ HÜCRE ORANI



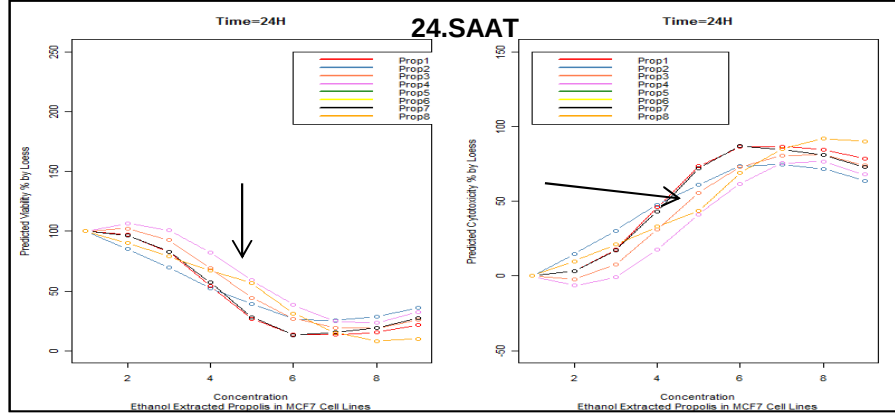


MCF7
ER+ MEME KANSERİ HÜCRE SOYU
MİKROSKOP GÖRÜNTÜSÜ

MCF7 WST-1 ANALİZİ - BAL 24, 48 ve 72.saat

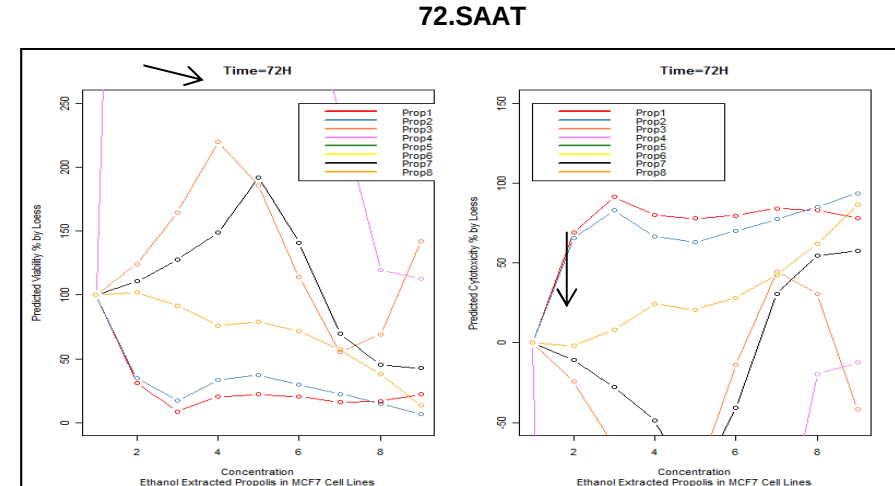
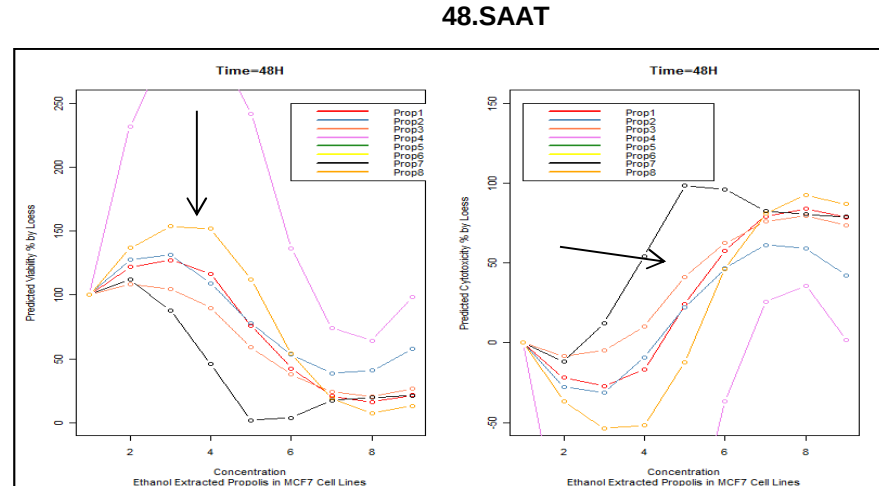


Mavi: 156 nolu numune (İSTANBUL BALI)



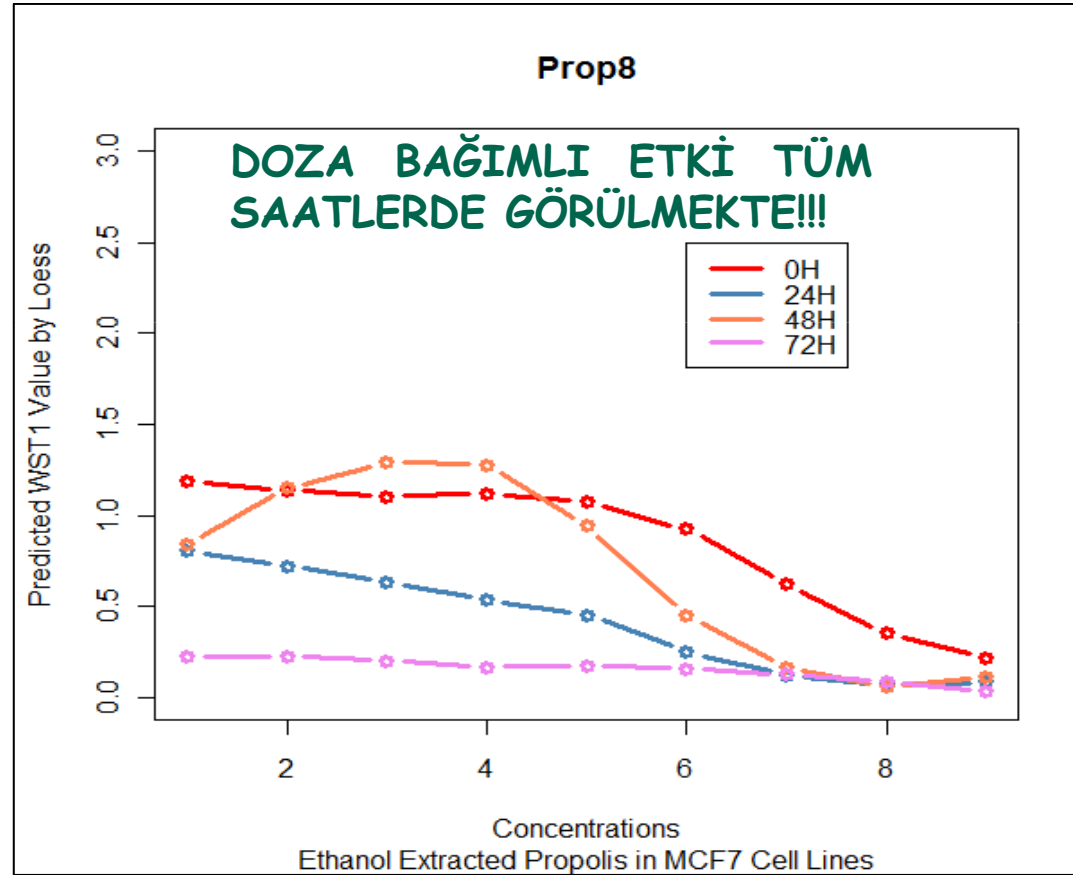
ETOH Propolis 8'de

- doza bağımlı sitotoksik etki tüm saatlerde gözlemlenmekte (Özellikle 24.saat ve 72. Saat)
- 48. saat'te
 - düşük dozlarda hücre bölünme zamanına rastladığı için hafif artış
 - yüksek dozlarda ise doz bağımlı etki

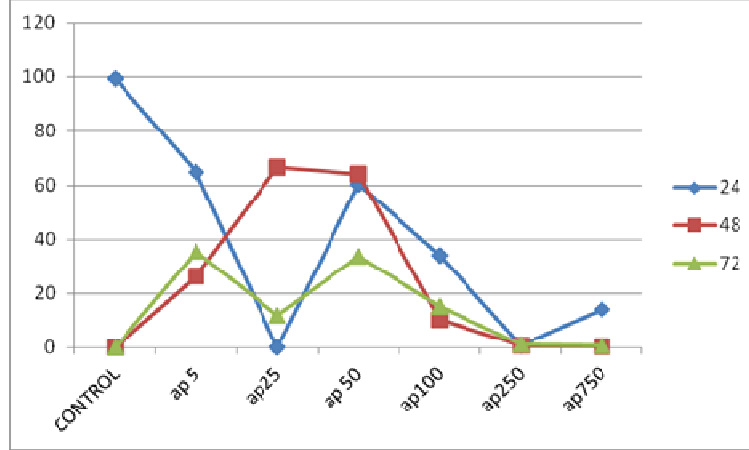


Propolis-8 (turuncu): İSTANBUL PROPOLİSİ

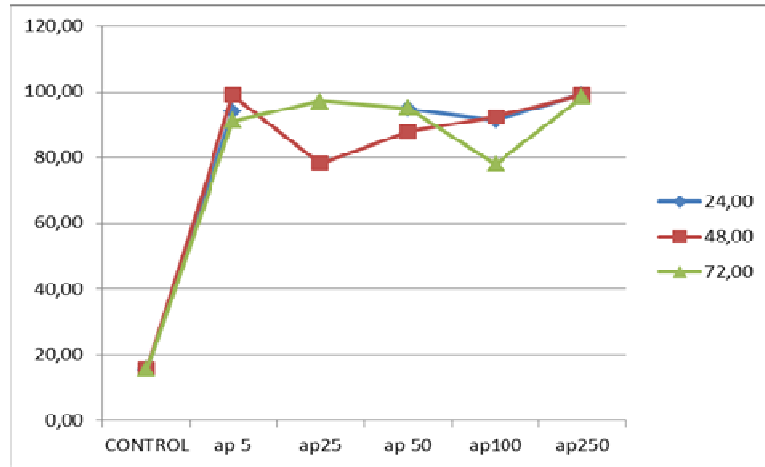
Etanol ekstrakt propolislere uygulanan dozlar;
2.5, 5,25,50,100,250,500 ve 750 ug/ml (8 doz)



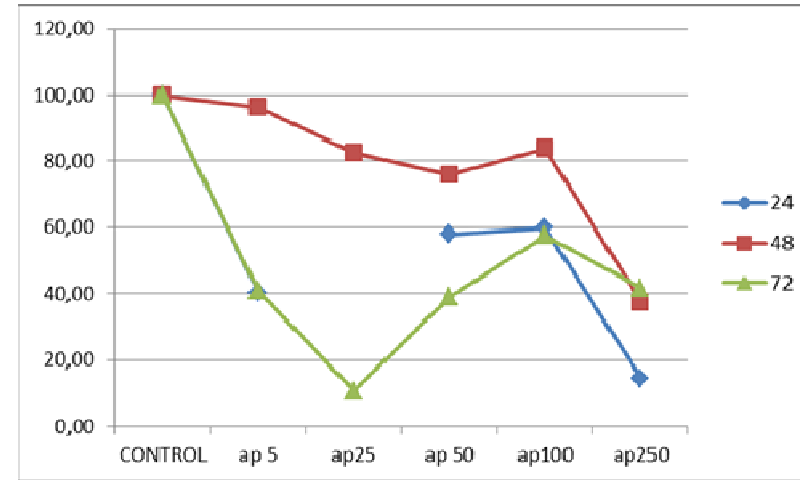
VIABILITY (%40-50 SAĞ KALIM)



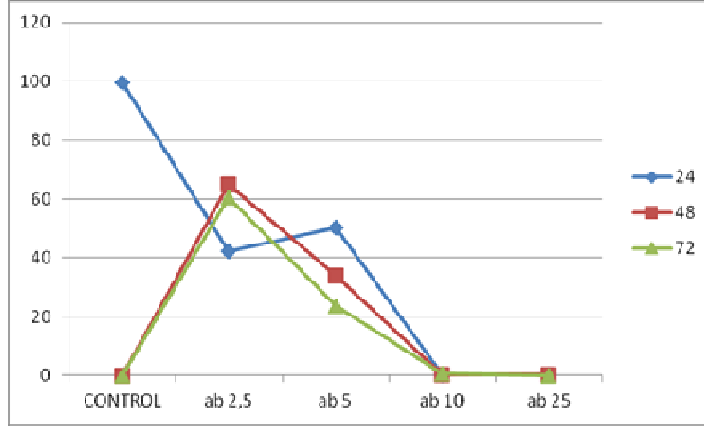
**APOPTOZ+APOPTOZ-NEKROZ/TOTAL ÖLÜ
HÜCRE ORANI**



**NEKROZ+APOPTOZ-NEKROZ/TOTAL
ÖLÜ HÜCRE ORANI**



VIABILITY (%30-40 SAĞ KALIM)

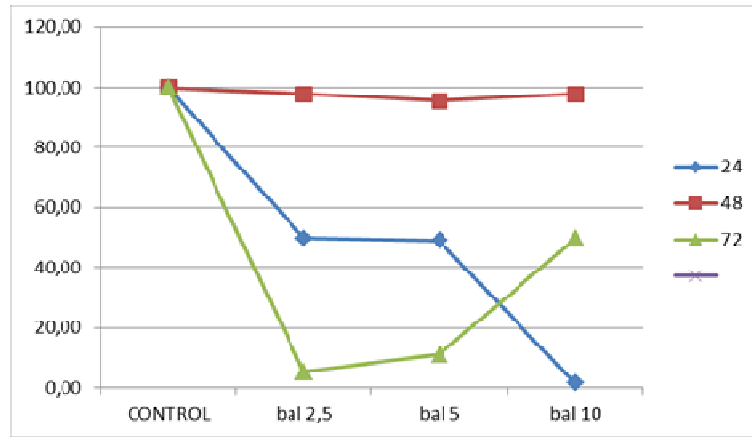


Hücrenin düşük dozlarda nekroza (sitotoksik etki) yönelmesi, yüksek dozlarda ve uzun süre maruziyette apoptoza uğraması

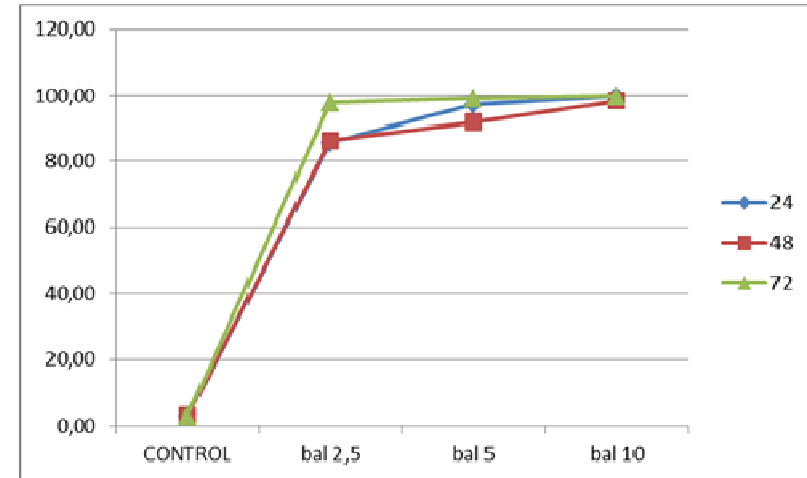
72. saatte ortamdaki balın metabolize olmasından dolayı apoptotik süreç artmış

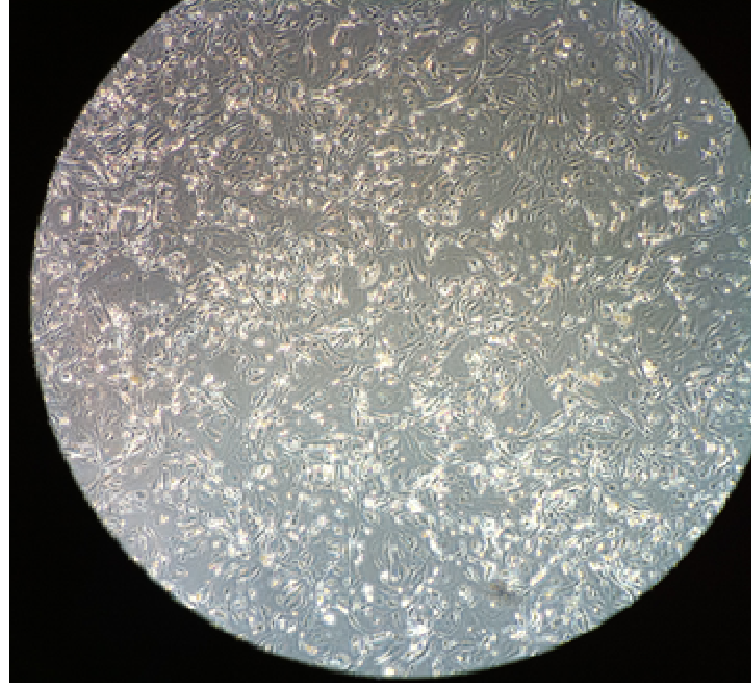
Balın yüksek şeker konsantrasyonundan dolayı nekrotik süreci etkilediğini düşündürmektedir.

**APOPTOZ+APOPTOZ-NEKROZ/TOTAL ÖLÜ
HÜCRE ORANI**

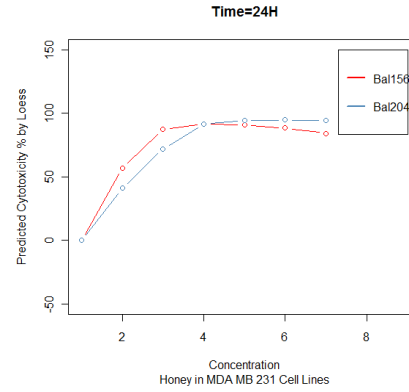
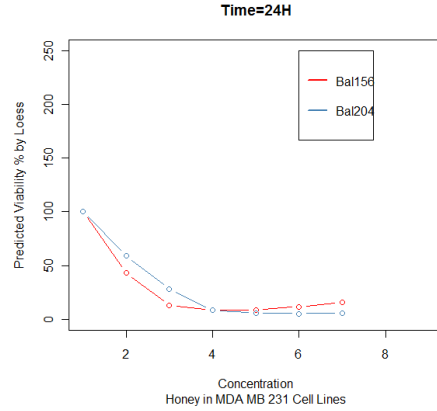


**NEKROZ+APOPTOZ-NEKROZ/TOTAL
ÖLÜ HÜCRE ORANI**





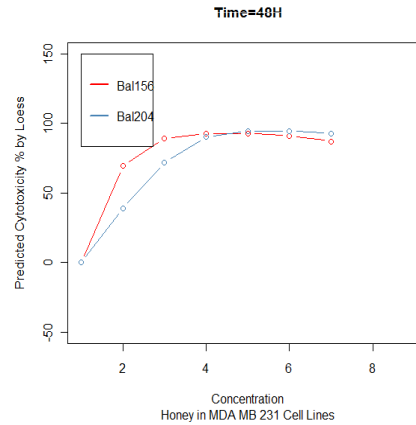
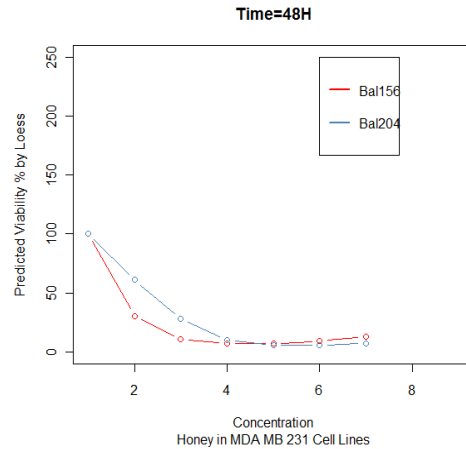
**MDAMB231
ER,PR,HER2 (-) (TRIPLE NEGATİF)
MEME KANSERİ HÜCRE SOYU
MİKROSKOP GÖRÜNTÜSÜ**



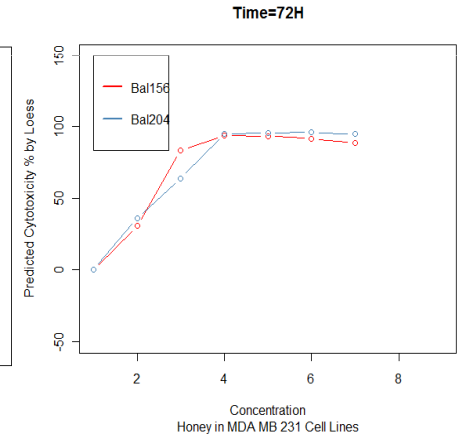
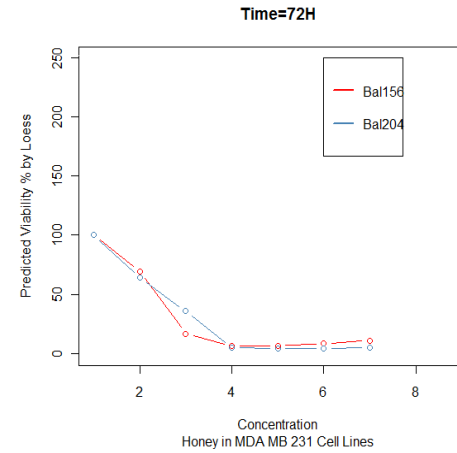
Her iki tip balın (156 ve 204) düşük dozlardan itibaren hücre ölümünü hızlandırması

Farklı zaman dilimlerinde benzer bir etkinin olması

24. SAAT

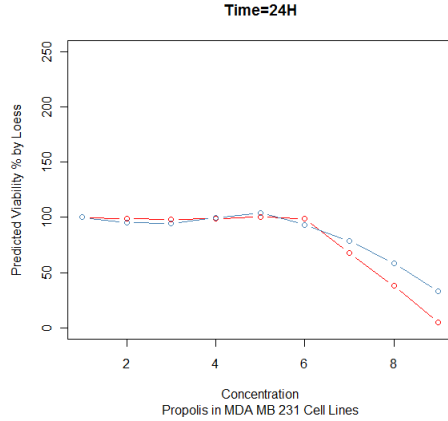


48. SAAT

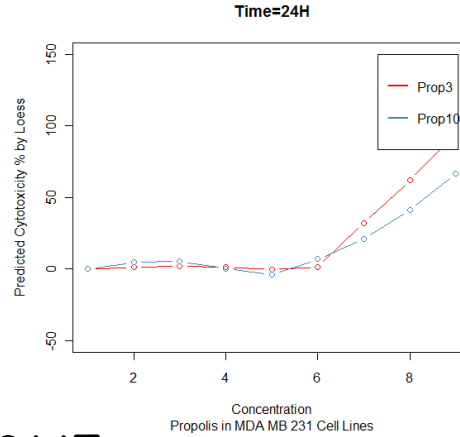


72. SAAT

Kırmızı: 156 Bal (İSTANBUL BALI)



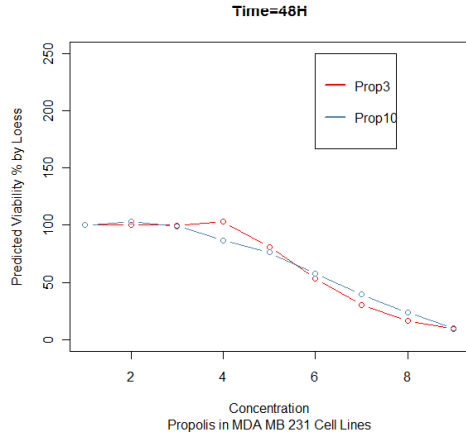
24. SAAT



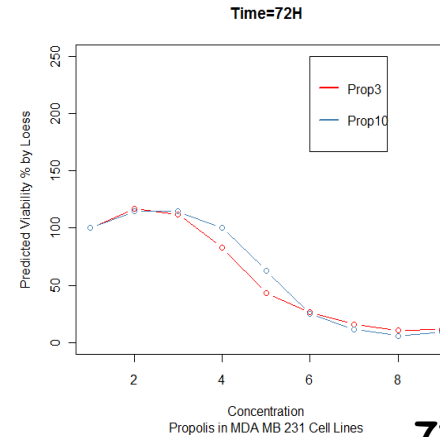
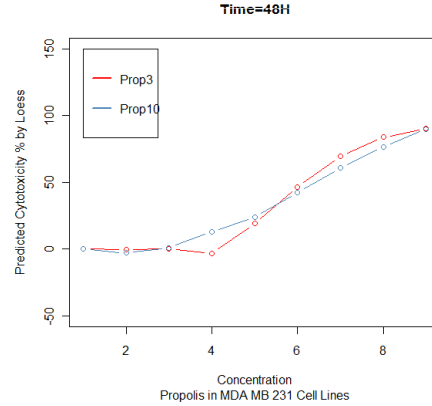
24. saatte yüksek dozlardan itibaren (250 ug/ml) hücre ölümünün başladığı,

48. saatte bu doz miktarının biraz daha düştüğü (50 ug/ml),

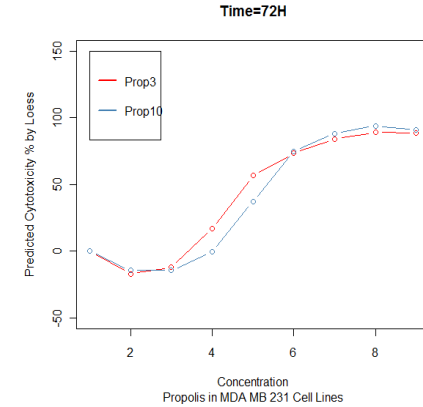
72. saatte ise bu oranın 25 ug/ml'ye kadar düştüğü gözlemlenmiştir.



48. SAAT

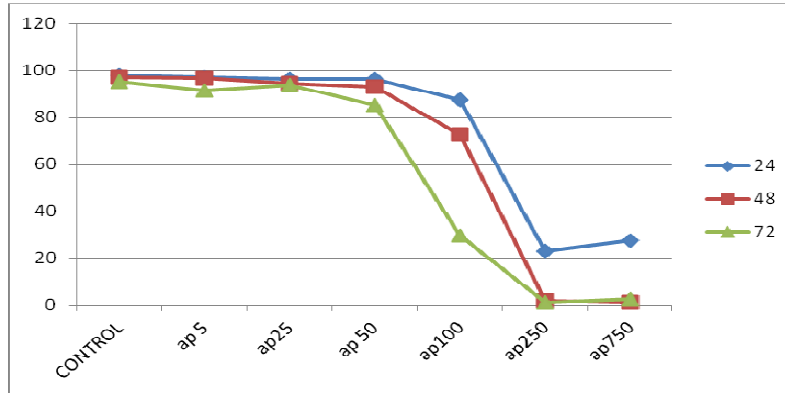


72. SAAT



İSTANBUL Propolisi (mavi)

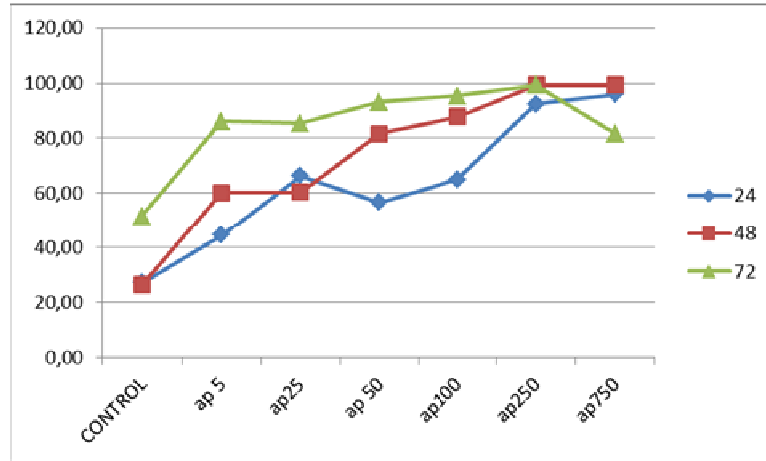
VIABILITY (DÜŞÜK DOZLARDA ETKİSİZ!!!, YÜKSEK DOZLARDAN İTİBAREN ÖLÜM BAŞLAMIS!!!)



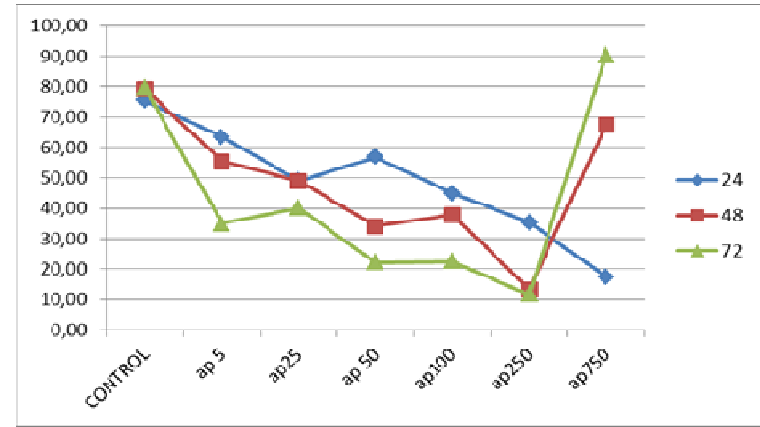
Hücrenin düşük dozlardan itibaren apoptoza yönlendiği gözlemlenmiştir.

Ancak yüksek dozlarda propolis verildikten sonra hücre sayısında azalma olduğu görülmektedir.

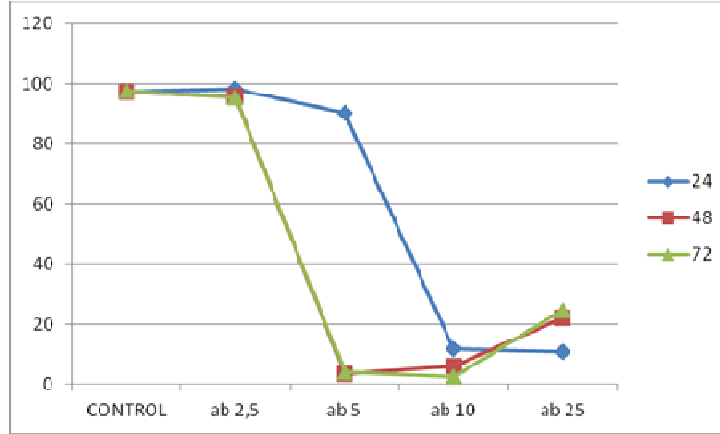
**APOPTOZ+APOPTOZ-NEKROZ/TOTAL ÖLÜ
HÜCRE ORANI**



**NEKROZ+APOPTOZ-NEKROZ/TOTAL
ÖLÜ HÜCRE ORANI**

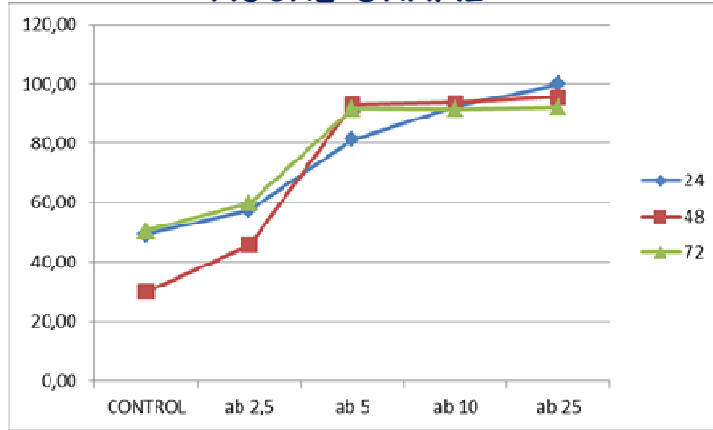


VIABILITY

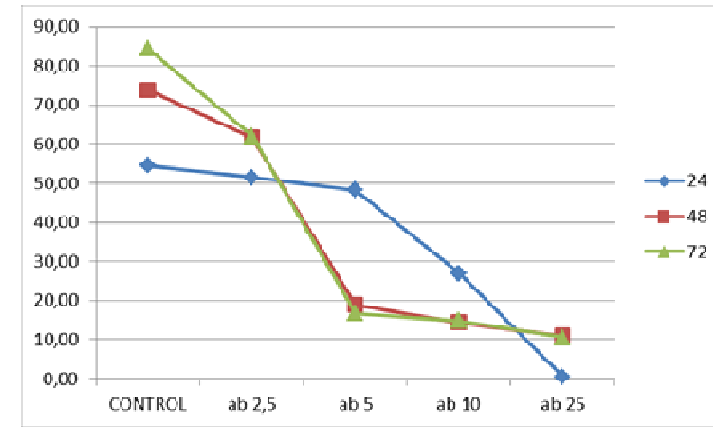


**Hücrenin düşük dozlardan itibaren
apoptoza yönelmesi**

**APOPTOZ+APOPTOZ-NEKROZ/TOTAL ÖLÜ
HÜCRE ORANI**



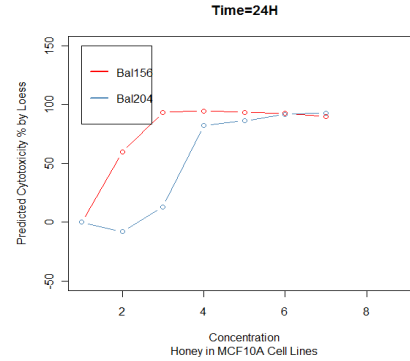
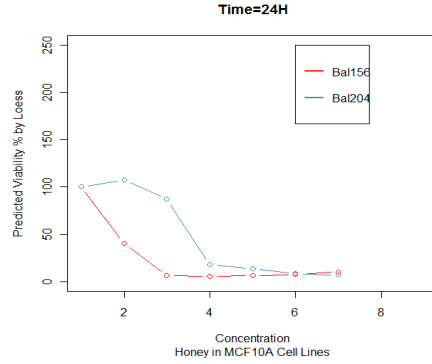
**NEKROZ+APOPTOZ-NEKROZ/TOTAL
ÖLÜ HÜCRE ORANI**





**MCF10A (KONTROL)
NORMAL MEME EPİTEL HÜCRE SOYU
MİKROSKOP GÖRÜNTÜSÜ**

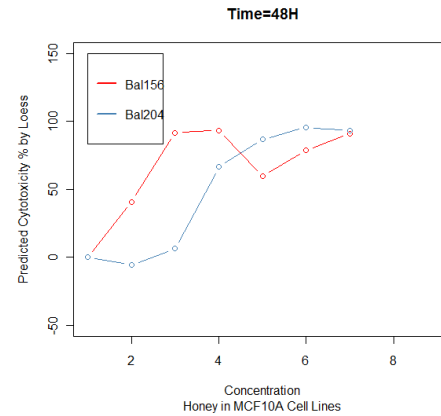
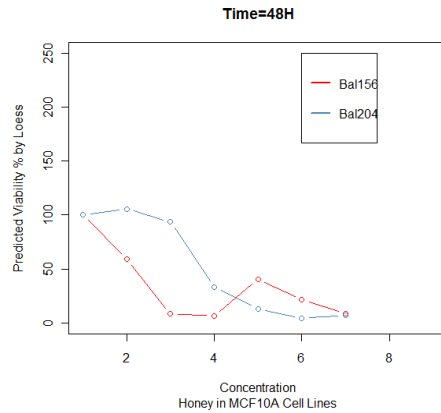
MCF10A WST-1 ANALİZİ-BAL 24, 48 ve 72.saat



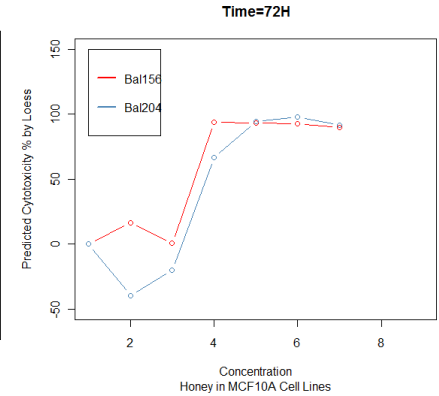
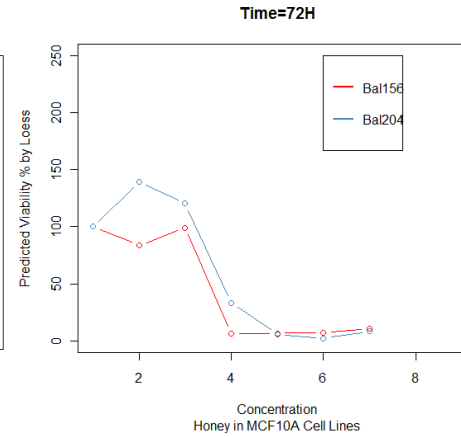
Bal 156'nin düşük dozlardan itibaren hücre ölümünü hızlandırması

Farklı zaman dilimlerinde benzer bir etki

24. SAAT

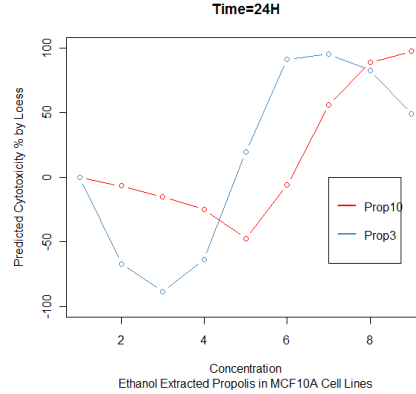
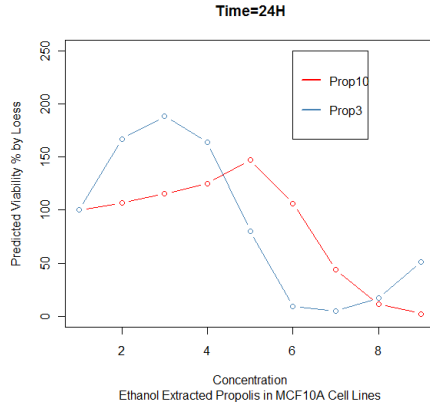


48. SAAT



72. SAAT

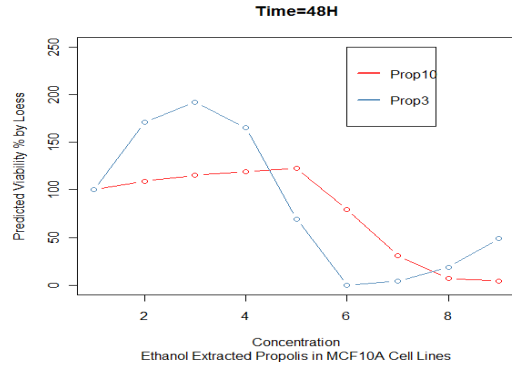
Kırmızı: 156 Bal (İSTANBUL BALI)



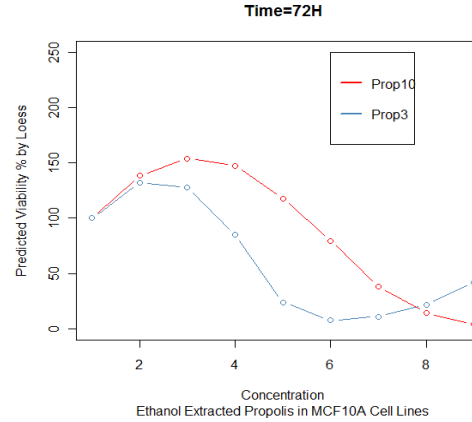
**MCF10A (kontrol) hücresi üzerinde
İstanbul Propolisi ile**

**Düşük dozlarda hücre proliferasyon
eğrisinde hafif artış,
Yüksek dozlardan itibaren hücre
sayısında azalma gözlemlenmiştir.**

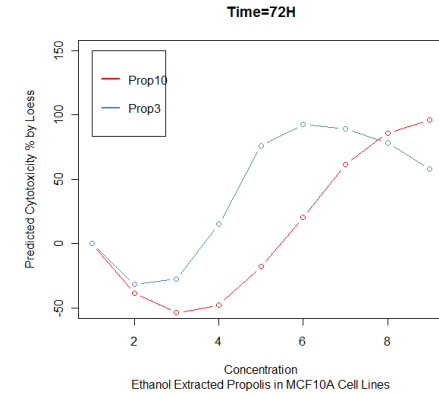
24. SAAT



48. SAAT



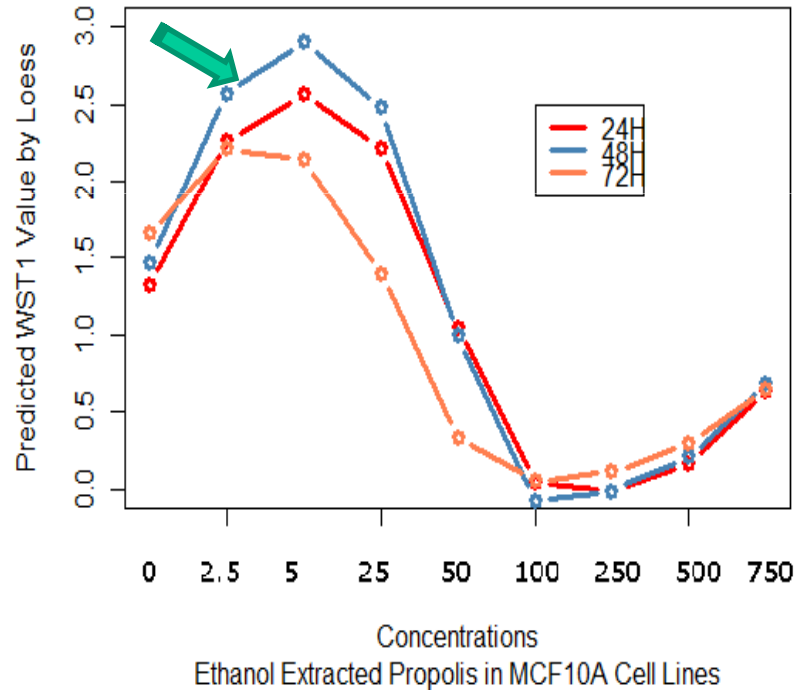
72. SAAT



İSTANBUL Propolisi (mavi)

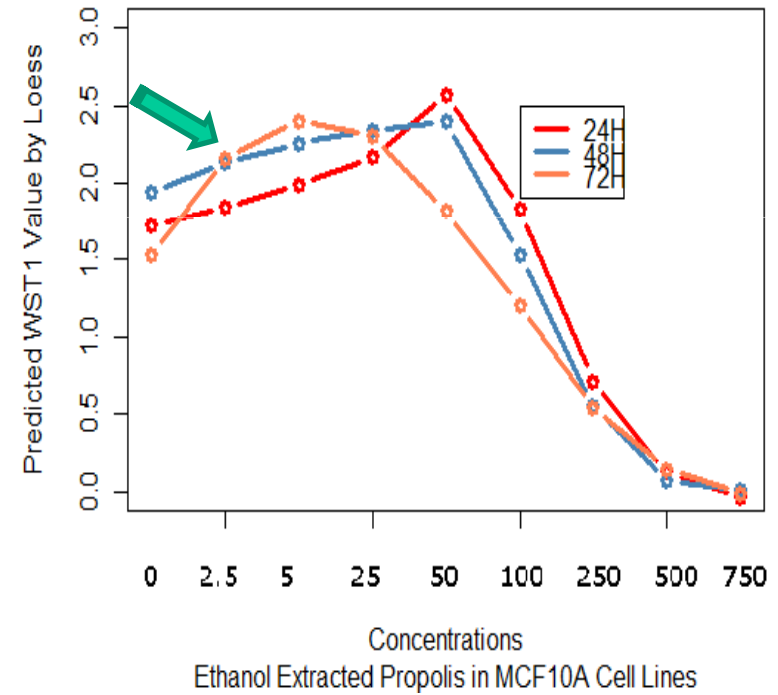
İTHAL PROPOLİS

Prop3

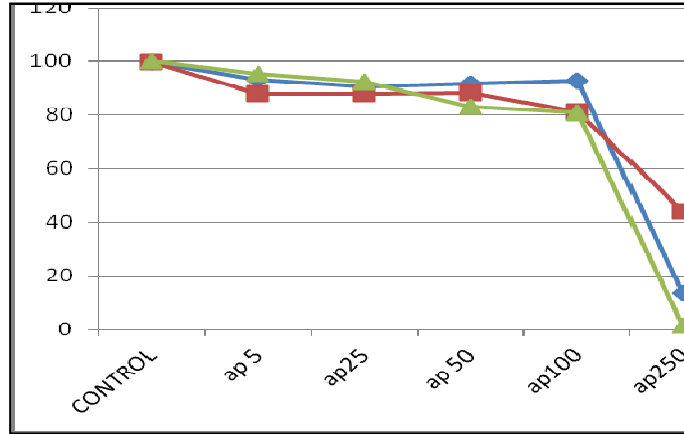


İSTANBUL PROPOLİSİ

Prop8



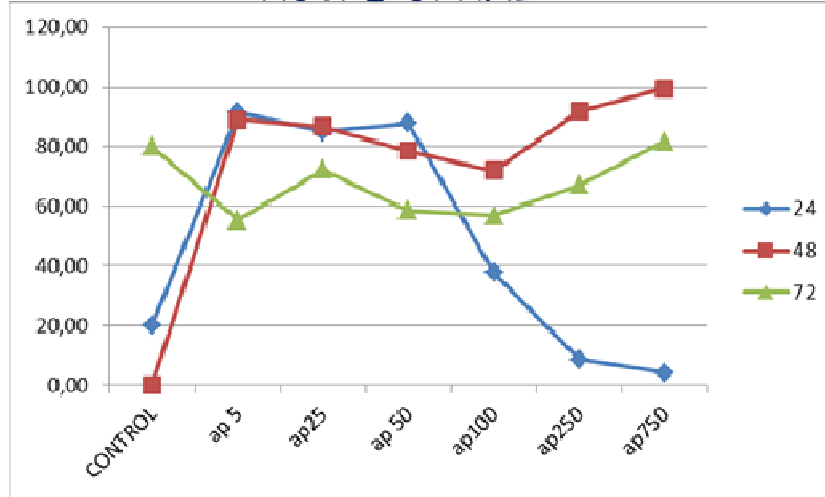
VIABILITY (%90 SAĞ KALIM)



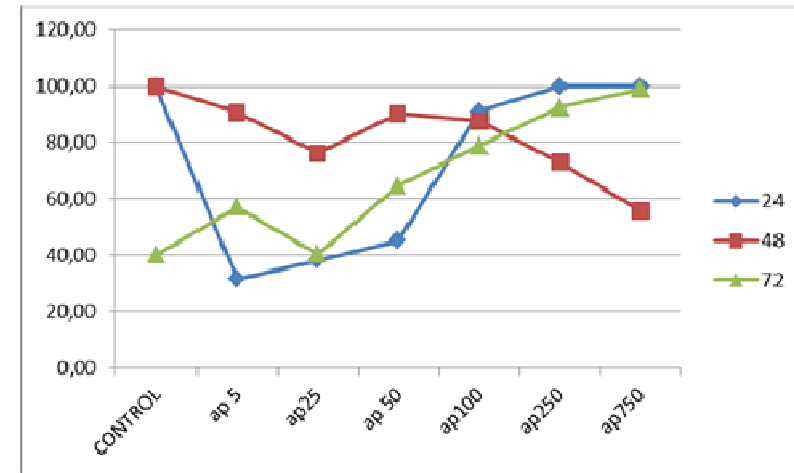
Hücrelerin yaklaşık **% 90** 'nının yaşamakta olduğu belirlenmiştir.

Yüksek dozlardan itibaren ölüm başlamıştır.

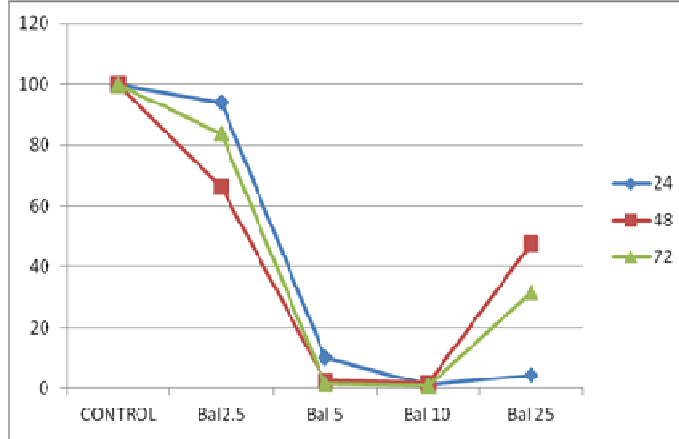
**APOPTOZ+APOPTOZ-NEKROZ/TOTAL ÖLÜ
HÜCRE ORANI**



**NEKROZ+APOPTOZ-NEKROZ/TOTAL
ÖLÜ HÜCRE ORANI**



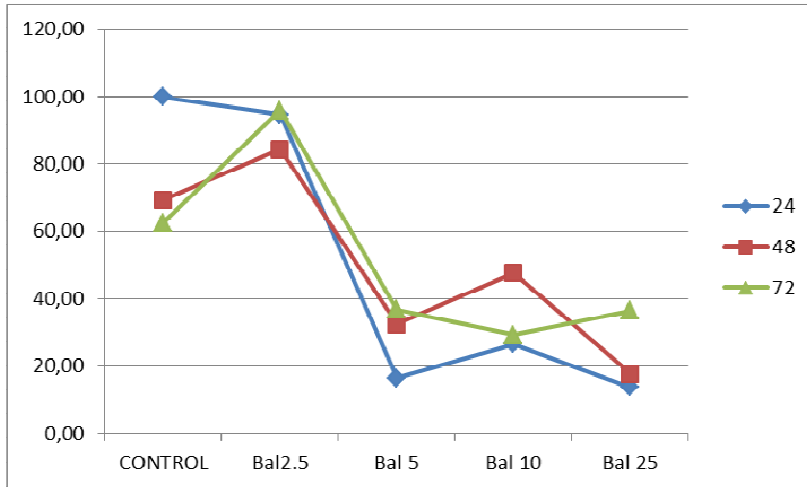
VIABILITY (%80 SAĞ KALIM)



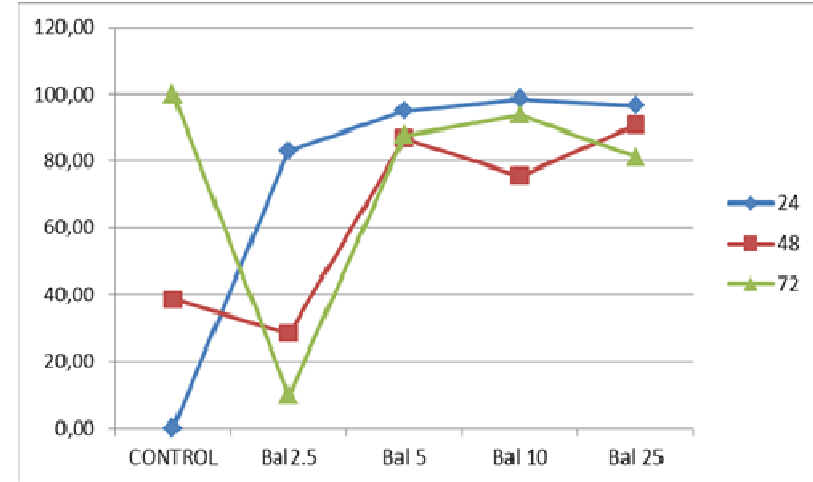
Hücrelerin yaklaşık % 80 'ninin yaşamakta olduğu belirlenmiştir.

48. saatte nekrotik süreçle birlikte bu oran %60 'larda düşüşe geçse de 72. saatte sağ kalım oranı artmıştır.

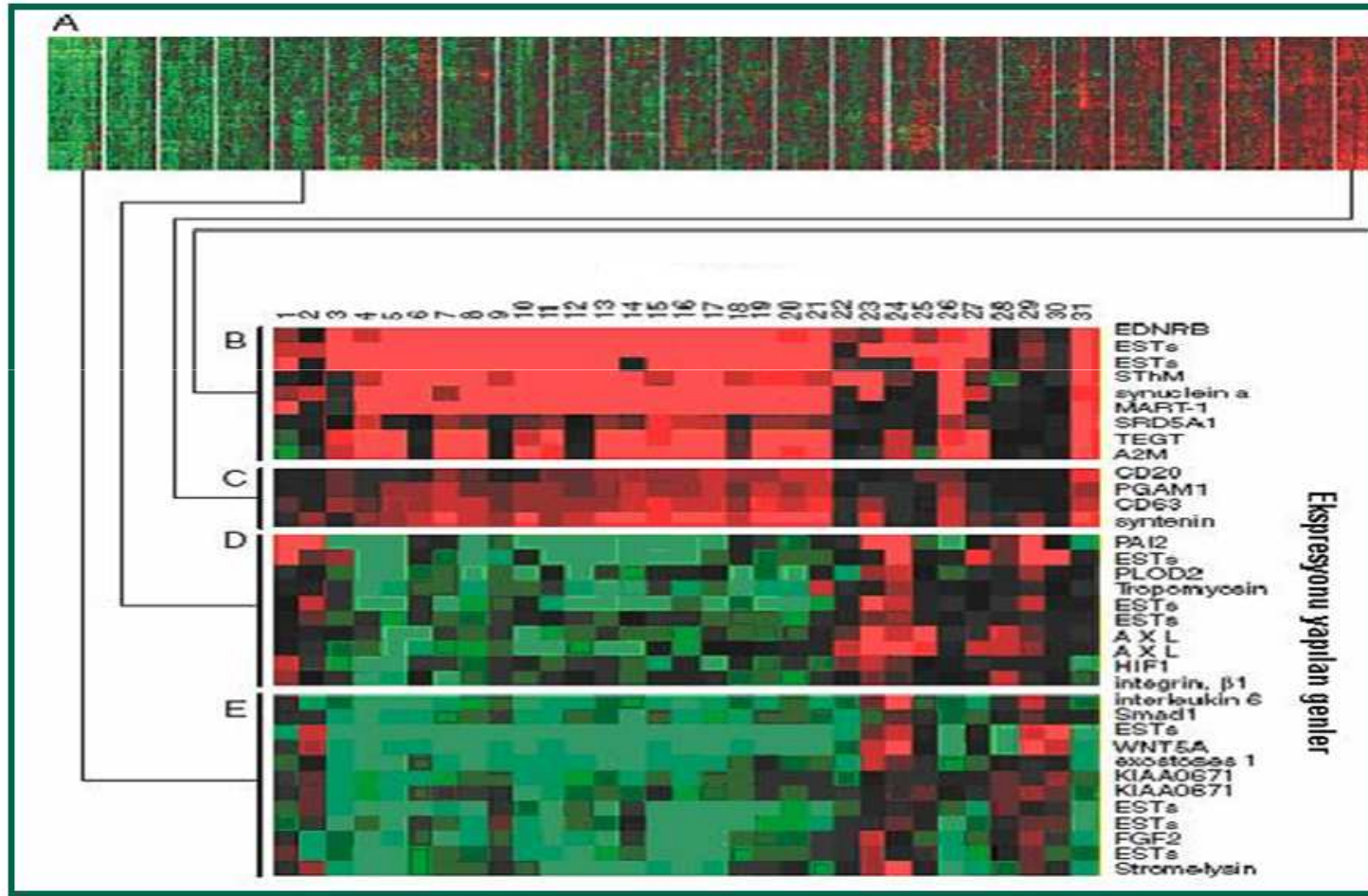
**APOPTOZ+APOPTOZ-NEKROZ/TOTAL ÖLÜ
HÜCRE ORAN**



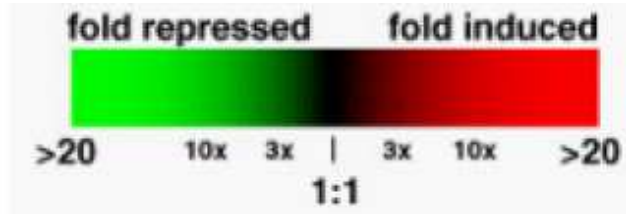
**NEKROZ+APOPTOZ-NEKROZ/TOTAL
ÖLÜ HÜCRE ORANI**



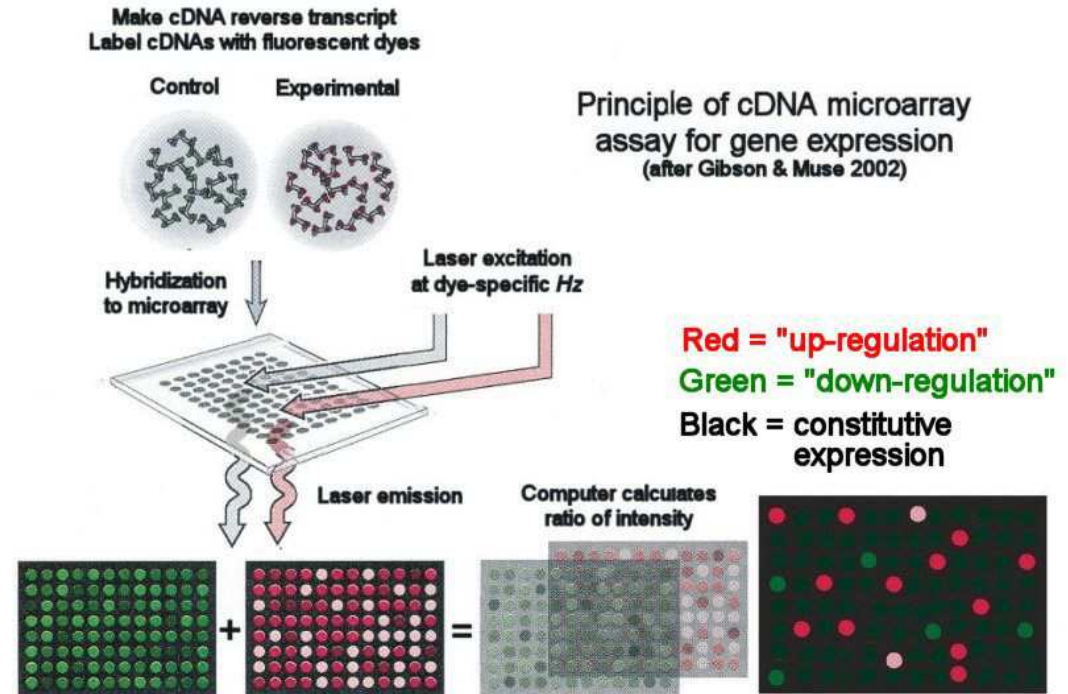
MICROARRAY ANALİZİ



MICROARRAY, gen ekspresyon profillerindeki değişikliklerin incelenmesinde kullanılan yeni ve güçlü bir teknolojidir.



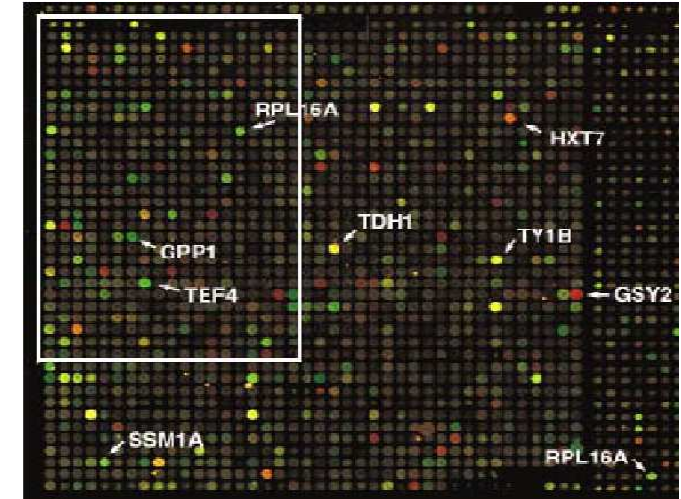
Microarray yöntemi yüksek hassasiyette bir yöntem olduğu için başlangıç materyalinin optimizasyonu önem taşımaktadır.





Elde edilmiş total RNA ve miRNA örnekleri ön kalite kontrol aşaması olarak **BIOANALYZER** ile RNA entegrasyon kalitesi (RIN) ve içindeki miRNA miktarı tayin edilmiştir.

Microarray sonrası elde edilen ekspresyon sonuçları biyoinformatik programı (**GENE SPRING VE BIOCONDUCTOR**) ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

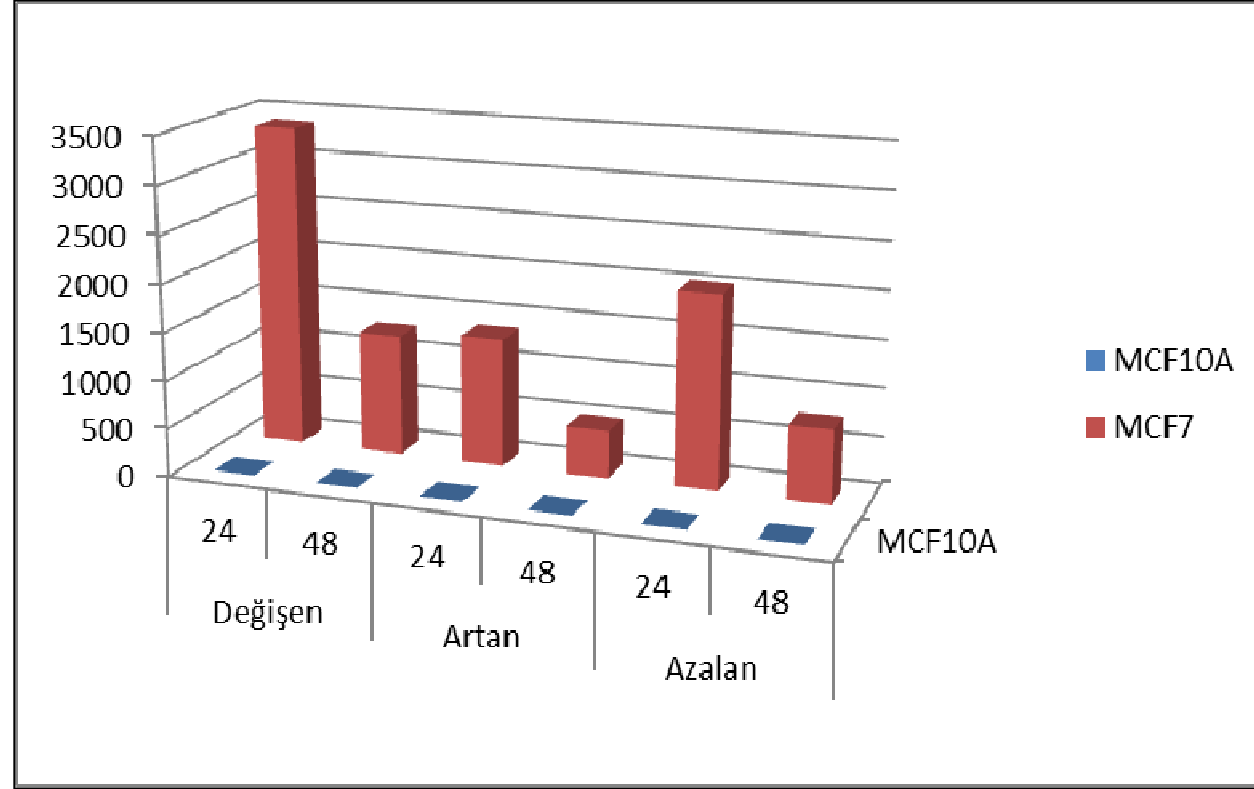


DÜNYADA MEME KANSERİ HÜCRE SOYLARINDA
GEN İFADESİNİN DÜZENLENMESİNDE KRİTİK
ROL OYNAYAN miRNA VE TÜM GENOM PROFİLİ
ÜZERİNDE **BAL** VE **PROPOLİSİN** ETKİSİNİ
ARAŞTIRAN VE MICROARRAY ANALİZ
YÖNTEMİ İLE **YAPILAN İLK ÇALIŞMADIR.**

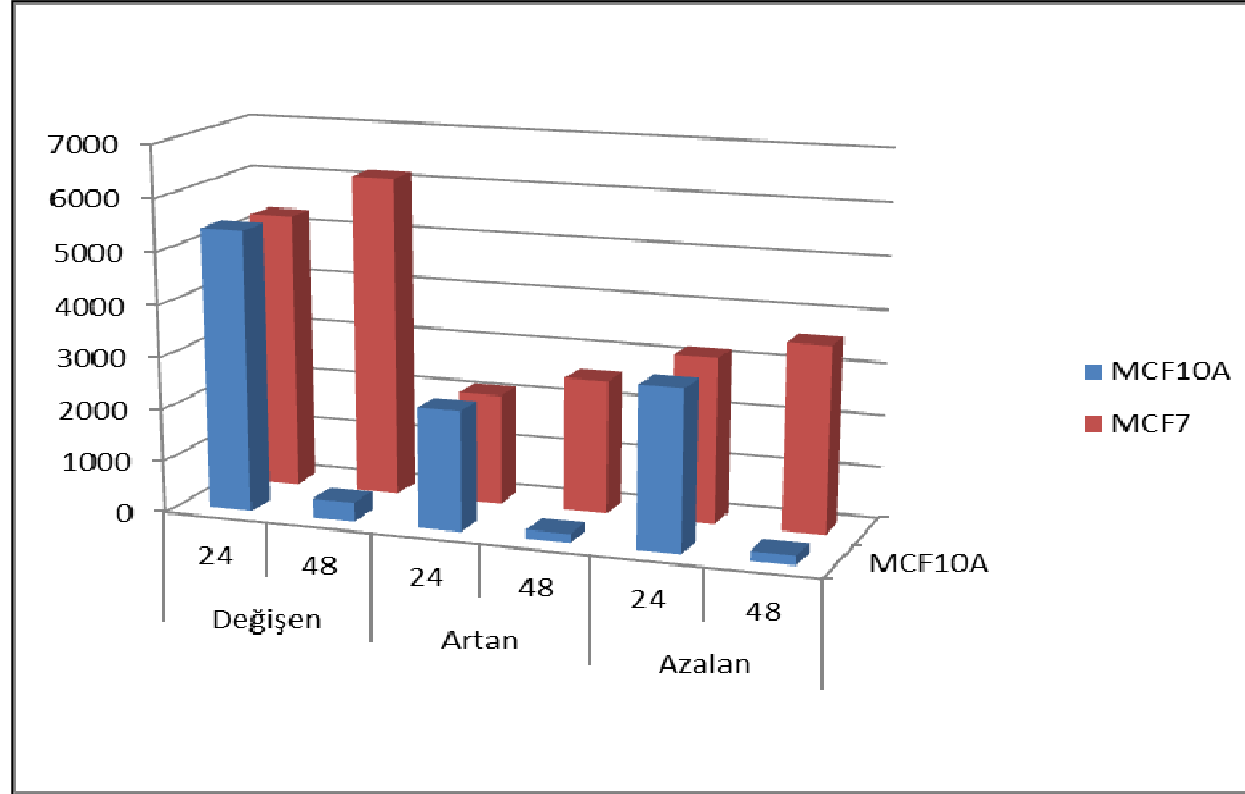
TÜM GENOM PROFİL MICROARRAY SONUÇLARI

MCF7 (ER+ MEME KANSERİ HÜCRESİ)

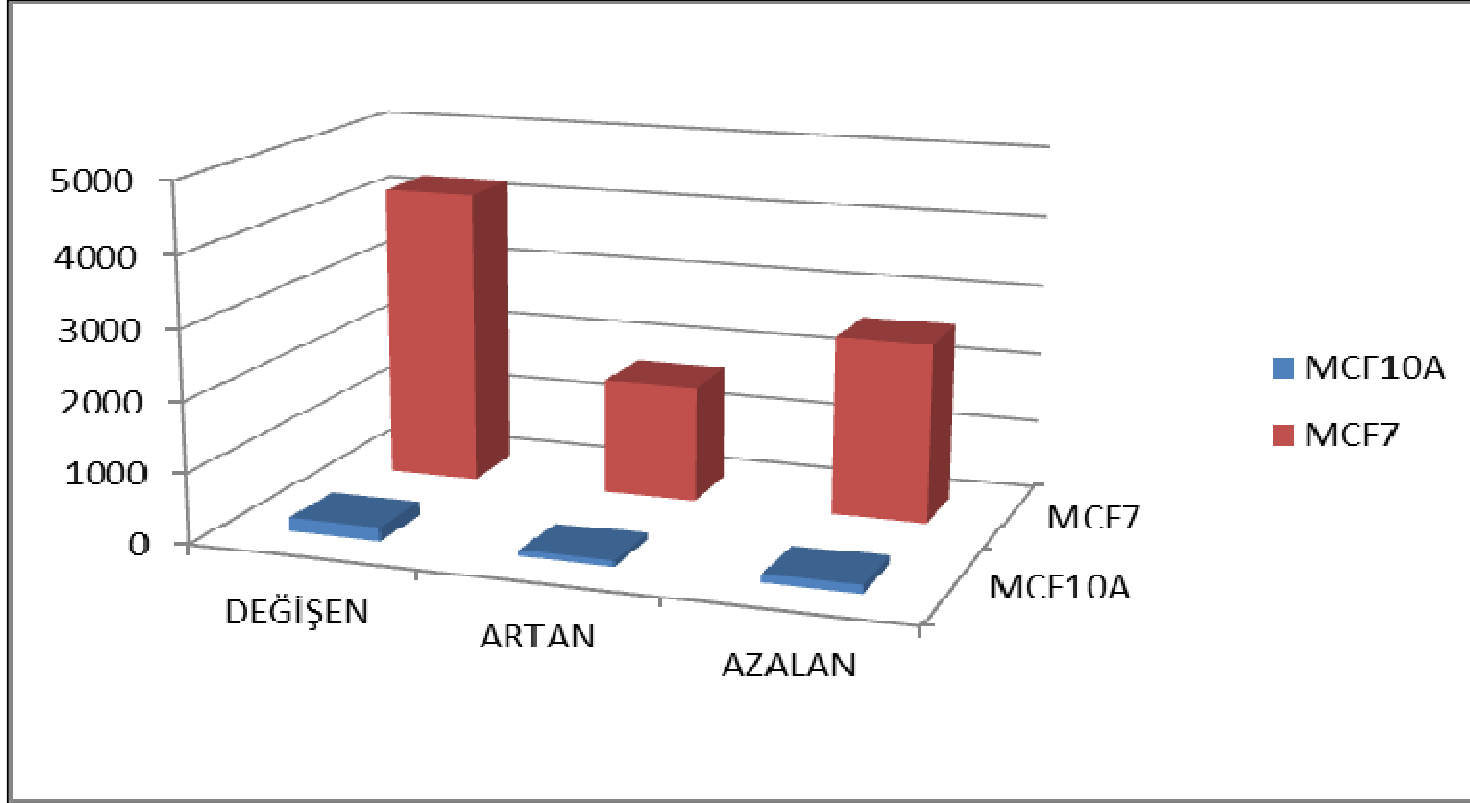
MCF10A (NORMAL MEME EPİTEL HÜCRESİ)



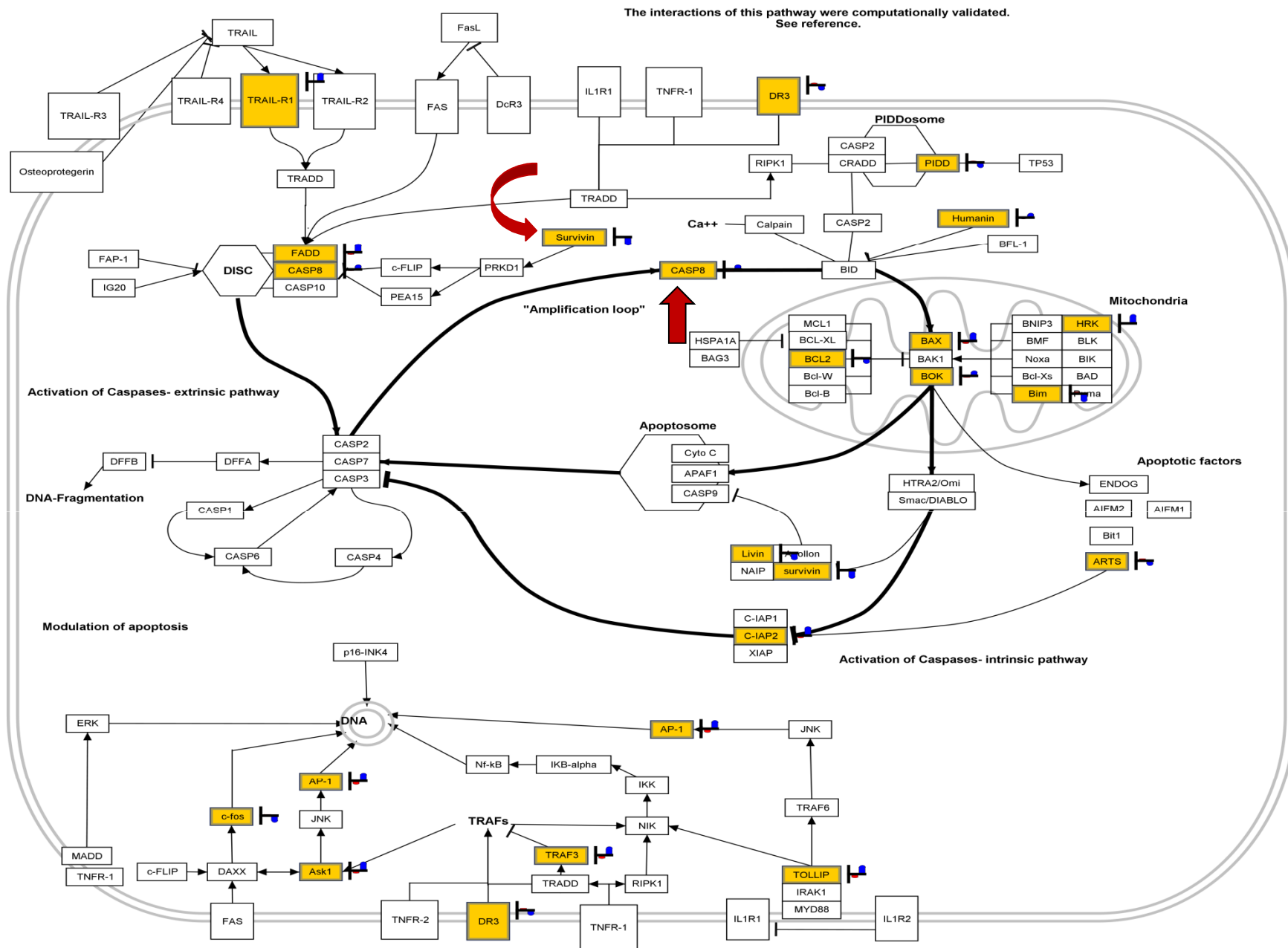
MCF7 MEME KANSERİ hücrelerinde Propolis 5, **24. saatte 3370** ve **48. saatte 1269 gende değişime** neden olurken, **MCF10A NORMAL MEME** epitel hücrelerinde propolis 5'in tüm genom üzerindeki değişimine dair anlamlı sonuç elde edilememiştir.



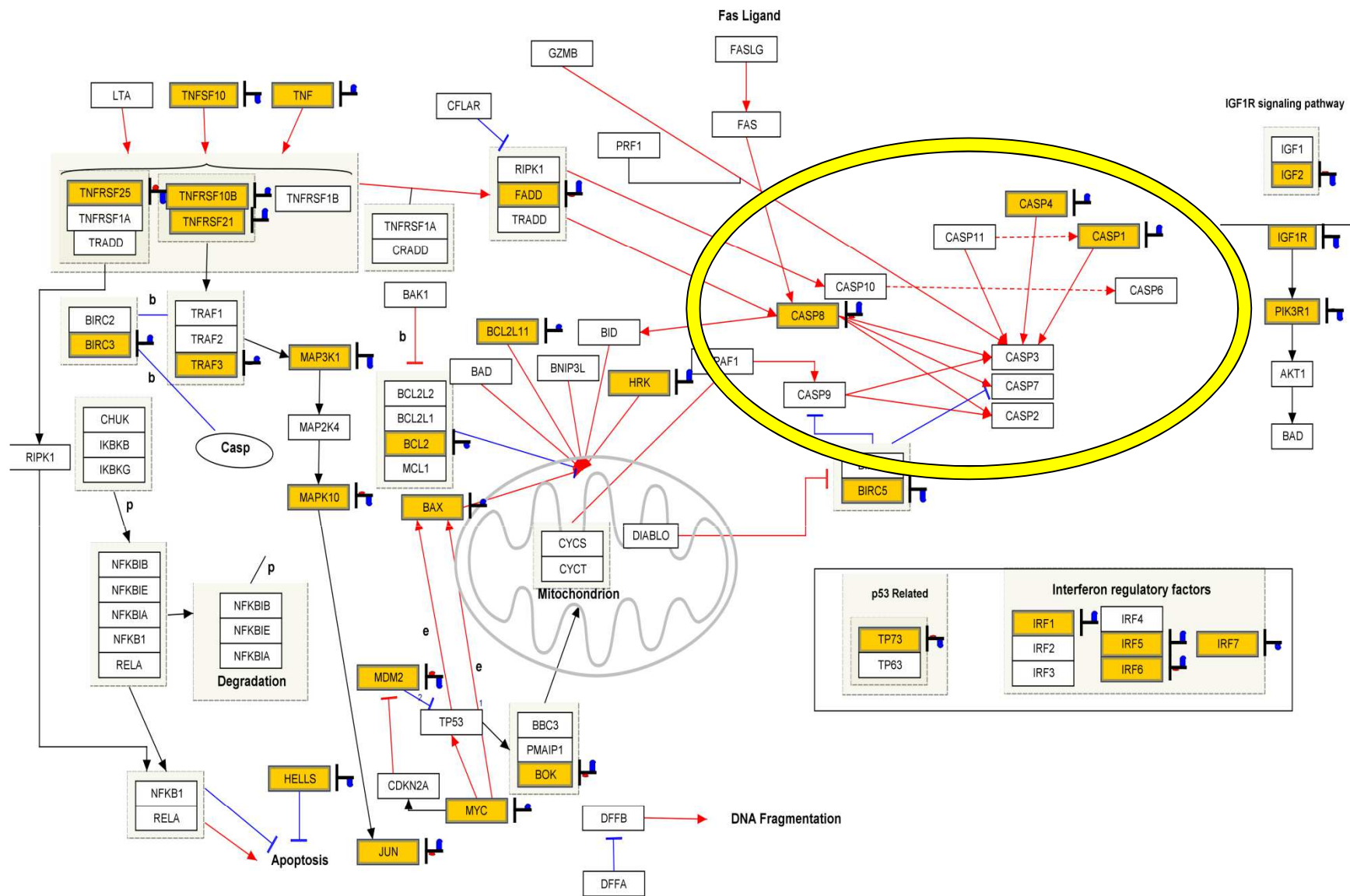
MCF7 MEME KANSERİ hücrelerinde Propolis 50, 24. saatte 5310 ve 48. saatte 6156 gende değişime neden olurken, **MCF10A NORMAL MEME** epitel hücrelerinde propolis 50, 24. saatte 5394 gende değişime neden olurken 48. saatte bu oran 367'e düşmüştür.



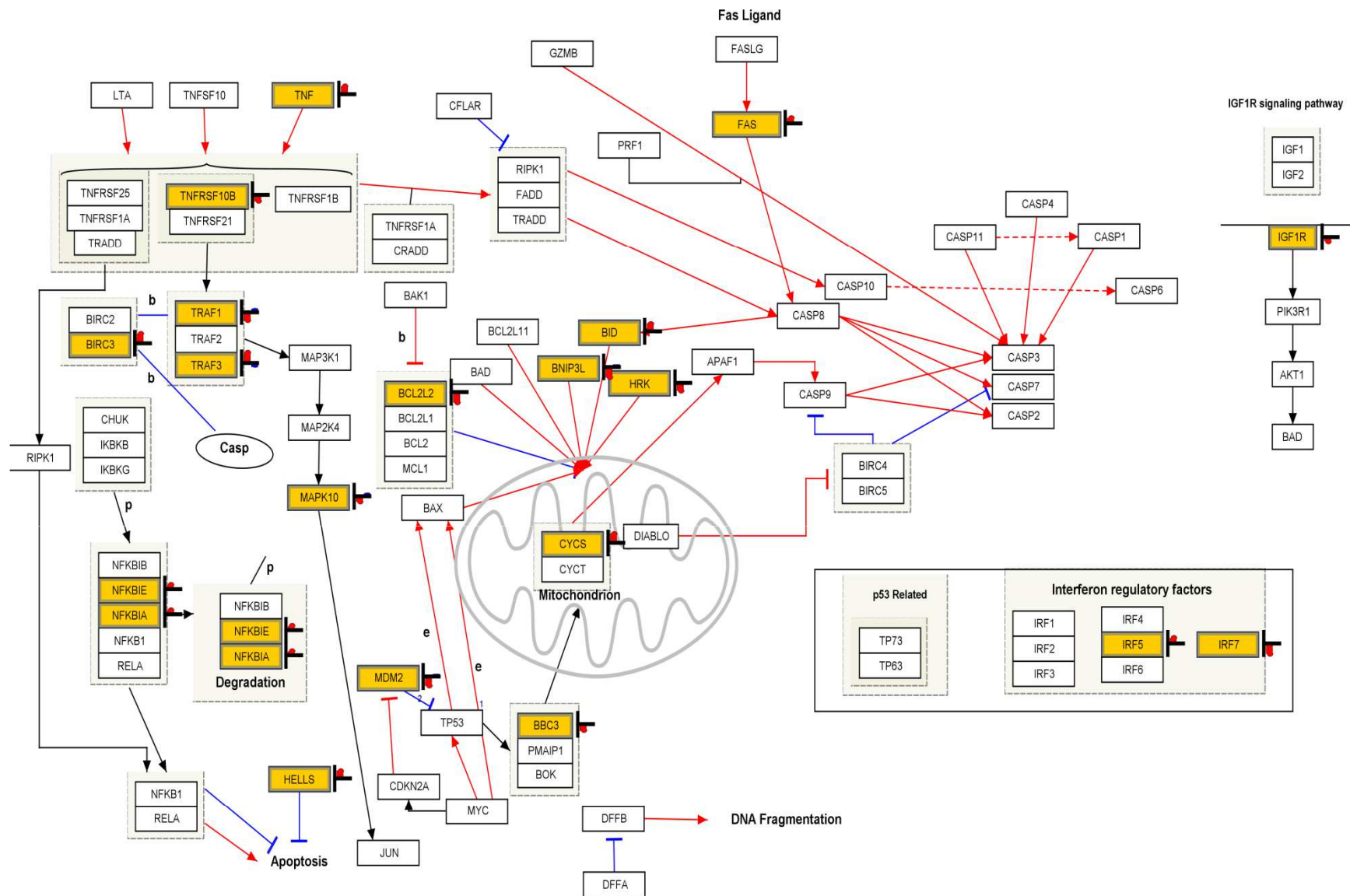
MCF7 MEME KANSERİ hücrelerinde Propolis 100, 7626 gende **değişime** neden olurken,
MCF10A NORMAL MEME epitel hücrelerinde propolis 100' ün tüm genom üzerindeki değişimine dair anlamlı sonuç elde edilememiştir.



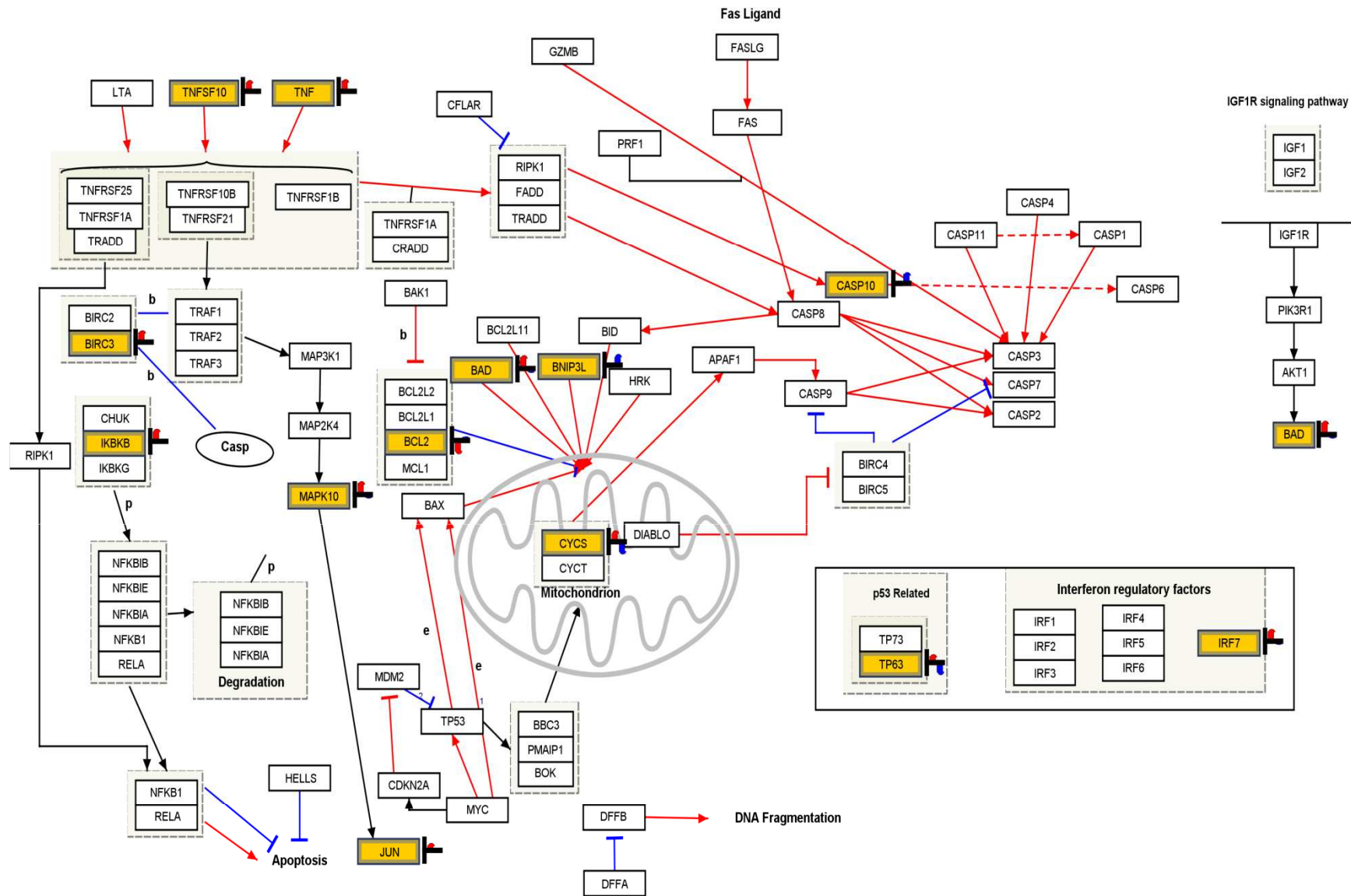
MCF7 PROPOLIS 50 24.SAAT - APOPTOSIS MODULATION



MCF7 PROPOLIS 50 48.SAAT-APOPTOSIS PATHWAY



MCF7 BAL % 2.5 - 24. SAAT



Activator of Cell Death ————
Inhibitor of Cell Death ————

MCF10A PROPOLIS 50 24.SAAT-APOPTOSIS PATHWAY

miRNA PROFİL MICROARRAY SONUÇLARI

MCF7 (ER+ MEME KANSERİ HÜCRESİ)

MCF10A (NORMAL MEME EPİTEL HÜCRESİ)

MCF7 (Meme Kanseri Hücresi)	GEN SAYISI	24.Saat	48.Saat
Propolis 5	Değişen	n	5
	Artan	n	5
	Azalan	n	0
Propolis 50	Değişen	10	5
	Artan	3	5
	Azalan	7	0
Propolis 100	Değişen	0	1
	Artan	0	1
	Azalan	0	0
Bal 2,5	Değişen	35	55
	Artan	33	46
	Azalan	2	9

MCF10A (Kontrol)	GEN SAYISI	24.Saat	48. Saat
Propolis 5	Değişen	0	10
	Artan	0	4
	Azalan	0	6
Propolis 50	Değişen	1	1
	Artan	0	0
	Azalan	0	0
Propolis 100	Değişen	0	1
	Artan	0	1
	Azalan	0	0
Bal 2,5	Değişen	5	6
	Artan	3	5
	Azalan	2	1

PROPOLİSİN, normal hücrelere belirli doz aralıklarında toksik olmadığını fakat bu dozlarda kanser hücrelerini intihara sürüklediğini tespit ettik.

Karakterizasyon yöntemleri dışında microarray analizi ile

1. Apoptoz (programlanmış hücre ölümü) ilişkili genler
2. Hücre siklusu genleri
3. Angiogenesis ilişkili genler
4. MAPK kaskad ilişkili genler ...

ekspresyon değişiminin olduğunu belirledik.

- ❑ Bu sonuçlarla uzun vadede insan çalışmaları ve kısa zaman içerisinde de hayvan deneyleri ile toksisite ve etkinlik çalışmaları planlanmaktadır.



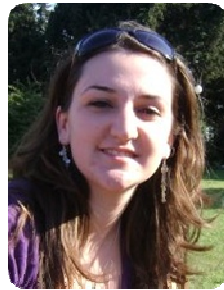
- ❑ Bal ve propolis etkisini **Deney Hayvan Modelleri ve İnsan** çalışmaları üzerinde gerçekleştirerek kanser hücrelerine karşı **TEDAVİLERE** katkıda bulunma **DESTEK** hedefindeyiz.



Prof. Dr. Oğuz Öztürk
Prof. Dr. Hülya Yılmaz Aydoğan
Uzm. Dr. Tülin Öztürk



Msc. Halil İbrahim Kısakesen
Uzm. Özlem Timirci Kahraman
Mol. Bio. Neslihan Saygılı



Bio. Eren Yılmaz
Mol. Bio. Allison Pınar Eronat

İletişim: dr.oguzozturk@gmail.com

ARI VARSA HAYAT VAR

www.ariplatformu.org

Arı Platformu

Arı Ürünleri Araştırma
Farkındalık, Bilgi ve
İletişim Noktası

Bal ve Diğer Arı Ürünleri ile Sağlıklı Yaşam Platformu Olarak;

Misyonumuz.

Arı ürünlerinin sağlığa, bölgesel kalkınmaya, topluma, çevreye ve kültürel mirasa olan katkılarını ve gerçek değerini ortaya koyan yeni bilgiler üretmek, bu ürünler için toplum ve sektörde farkındalığı, bilginin üretim ve tüketimi artıracak faaliyetlerde bulunmak.

Vizyonumuz.

Arı ürünleri konusunda ihtiyaç duyulan uygulamalı ve bilimsel bilgiyi sürdürülebilir şekilde üretken ve toplumla paylaşan dünyada lider bir platform olmaktır.

"Bal ve Diğer Arı Ürünleri ile Sağlıklı Yaşam Platformu" Projesi İstanbul Kalkınma Ajansı 2010 Mali Destek Programı kapsamında, İstanbul Kalkınma Ajansı tarafından desteklenmektedir.

Ortak ve İştirakçiler alfabetik olarak sıralanmıştır.



İSTANBUL
KALKINMA
AJANSI



Ortaklar



İştirakçiler

