

2,3-Dihidroksibenzoik Asidin Prostat Kanseri Hücreleri Lipid Profili Üzerine Etkisinin Shotgun Lipidomik Analizle Belirlenmesi ve Antikanser Aktivitesi

Determination of the Effect of 2,3-Dihydroxybenzoic Acid on Lipid Profile of Prostate Cancer Cells by Shotgun Lipidomic Analysis and Anticancer Activity

Serap ŞAHİN-BÖLÜKBAŞI¹

¹Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye, ORCID; 0000-0003-1057-2558

Makale bilgisi

Alındı: 08.02.2020
Revize form alındı: 06.04.2020
Kabul: 10.04.2020
Online yayım: 15.04.2020

Anahtar Kelimeler

2,3-dihidroksibenzoik asit
PC-3
MTT
DAPI
Lipidomik

Özet

Bu çalışmada, PC-3 insan prostat kanseri hücrelerinde 2,3-dihidroksibenzoik asit (2,3-DHBA)'ın antikanser aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, 2,3-DHBA'nın PC-3 insan prostat kanseri hücrelerinin lipid profili üzerindeki etkileri de shotgun lipidomik yaklaşımla incelenmiştir. Doğal olarak oluşan bir fenolik asit türü olan 2,3-DHBA'nın, PC-3 insan prostat kanseri hücrelerinde antikanser aktivitesi, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum) yöntemi ile belirlendi. 2,3-DHBA'nın apoptotik etkisi ise, DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) boyamasıyla incelenmiştir. Sonuçlarımız, 2,3-DHBA'nın PC-3 insan prostat kanseri hücrelerinde antikanser aktivitesine sahip olduğunu ve bu etkinin doza ve zamana bağlı olarak arttığını göstermiştir. Ayrıca DAPI boyaması, kromatin yoğunlaşması ve nükleer fragmentasyon gibi apoptotik özelliklerin zamana bağlı bir şekilde arttığını göstermiştir. Kansere dahil olmak üzere bazı hastalıkların, belirli lipid türlerinde spesifik değişikliklerle ilişkili olduğu bilinmektedir. Çalışmamızın son aşamasında, 2,3-DHBA'nın PC-3 insan prostat kanseri hücre lipid profili üzerindeki etkileri, shotgun lipidomik yaklaşım kullanılarak incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda, 2,3-DHBA uygulamasının PC-3 insan prostat kanseri hücre lipid türlerinde yağ asitleri, gliserolipid, gliserofosfolipid, sterol lipidler, prenol lipidler ve polipeptid lipid türlerinde değişikliklere neden olduğu görülmüştür.

Araştırma Makalesi

Article info

Received: 08.02.2020
Received in revised form: 06.04.2020
Accepted: 10.04.2020
Available online: 15.04.2020

Keywords

2,3-dihydroxybenzoic acid
PC-3
MTT
DAPI
Lipidomics

Abstract

In this study, we aimed to determine the anticancer activities of 2,3-dihydroxybenzoic acid (2,3-DHBA) against PC-3 human prostate cancer cells. In addition, the effects of 2,3-DHBA on the lipid profile of PC-3 human prostate cancer cells were also investigated by the shotgun lipidomic approach. The anticancer activity of 2,3-DHBA which is a naturally occurring type of phenolic acid on PC-3 human prostate cancer cells was determined by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) method. In addition, the apoptotic effect of 2,3-DHBA was investigated by DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) staining. Our results showed that 2,3-DHBA have an anticancer activity to PC-3 human prostate cancer cells and this effect was increased in dose and time-dependent. In addition, DAPI staining showed that apoptotic properties such as chromatin condensation and nuclear fragmentation increased in a time-dependent manner. Certain diseases, including cancer, are known to be associated with specific changes in particular lipid species. In the last step of our study, the effects of 2,3-DHBA on PC-3 human prostate cancer cell lipid profile were investigated using a shotgun lipidomic approach. As a result of the analyzes, it was observed that 2,3-DHBA application caused changes in fatty acids, glycerolipid, glycerophospholipid, sterol lipids, prenol lipids, and polyketide lipid species in PC-3 prostate cancer cell lipid species.

Research Article

GİRİŞ

Salisinin keşfi ve aspirinin sentezlenmesinden sonra bitkilerde bulunan farmakolojik aktif bileşiklerin izolasyonu ve tanımlamalarıyla ilgili büyük bir farmasötik endüstri oluşmuştur. Fenolik asitler aromatik sekonder bitki metabolitleridir¹. Çay, kırmızı şarap, meyve ve çeşitli tıbbi bitkiler yüksek oranlarda fenolik asit içermektedirler^{2,3}. Bitkilerden izole edilen gallik, klorogenik, kafeik, ellajik ve ferulik asit gibi birçok fenolik asidin farmakolojik olarak aktif bileşikler oldukları; antimitojenik, antioksidan, antikanserojen, antimikrobiyal, antiviral ve antitümör aktivitelere sahip oldukları bildirilmiştir^{2,4}. 2,3-DHBA aspirinin bir metabolitidir ve Madagascar rosy, cezayir menekşesi ve Boreava orientalis (sarı ot) gibi birkaç şifalı bitkide bulunmakla birlikte Güney ve güney-doğu asyada

genellikle konservesi yapılan batoko plum, avokado ve yaban mersini gibi birkaç meyve türünde de bulunmaktadır⁵⁻¹². İnflamasyonda önemli rol oynayan hidrojen peroksit indüklü nükleer faktör kappa B (NFkB) transkripsiyon faktörü aktivasyonunu azalttığı bildirilmiştir¹³. 2,3-DHBA, nötrofil aktivasyonu ve radikal üretiminden kaynaklanan akut akciğer hasarı tedavisinde kullanılmaktadır^{14,15}. 2,3-DHBA demire, transferrin ve laktoferrinden daha büyük bağlanma sabitine sahip olduğundan, β-talasemi hastalarında demir-denge sağlayıcı olarak değerlendirilmek amacıyla ağızdan alınan etkili demir-şelat ajanı olarak da kullanılmaktadır¹⁶⁻¹⁸.

Kanser tedavisi için günümüzde mevcut modern tıbbın çok pahalı, toksik ve bazan verimsiz olması nedeniyle, olası alternatif ve/veya ilave tıropatik ajanlar olarak geleneksel

olarak tarif edilen doğal kaynaklar yaygın olarak kullanılmaktadır. Kanser hastalarının % 80 kadarı alternatif veya destekleyici tıp kullandıklarını ifade etmektedirler ve bunların en az üçte birinin alternatif ilaçları kemoterapi tedavi ile birlikte kullandıkları bildirilmiştir¹⁹. Epidemiyolojik çalışmalar yüksek bitki türevli tüketimli yaşamın, kanser gelişim riskini düşürdüğünü ve insan besinlerinde doğal olarak var olan antikanserojen ajanların güvenli, non-toksik ve insan sağlığı üzerine uzun süreli faydalı etkileri olduğu görüşünü desteklemektedir²⁰⁻²². Prostat kanseri erkeklerde ikinci en sık teşhisi konulan ve tüm dünyada en yaygın beşinci sıradaki kanser türüdür.

Lipidlerin biyolojik sistemlerde; çok farklı ve önemli biyolojik rol oynadıkları bilinmektedir. Bu nedenle, lipidlerin büyük ölçeklerde toplu olarak karakterize edilmeleri sağlık araştırmalarında yüksek öneme sahiptir. Metabolomiksin bir dalı olan lipidomik alanında ilk çalışmalar Han ve Gross tarafından yapılmıştır²³. Lipidomiks, lipid türlerinin tam karakterizasyonu ve gen regülasyonunu da içeren lipid metabolizma ve fonksiyonlarına katılan protein ekspresyonlarıyla ilgili biyolojik rollerini çalışan bir bilim dalı olarak tanımlanmıştır²⁴. Birçok belirli lipid molekülü kanser ve farklı insan hastalıklarının gelişmesiyle ilişkilendirilmiştir^{25,26}.

Bu çalışmanın ilk kısmında, doğal fenolik bir bileşik olan 2,3-DHBA'nın PC-3 prostat kanser hücreleri üzerine antikanser aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında ise, birçok hastalık ile ilişkilendirilen lipid profil değişiminin incelenmesi amacıyla 2,3-DHBA uygulanan PC-3 insan prostat kanser hücrelerinin lipid profillerindeki değişimlerin araştırılması amacıyla lipidomik çalışmalar yapılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Kimyasallar

F-12K Medium (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium), Eagles Minimum Essential Medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin and streptomycin ve tripsin-EDTA (0.25% w/v) American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) firmasından,. DAPI Calbiochem (San Diego, CA) firmasından, dimetilsülfoksit (DMSO), MTT, etanol, amonyum molibdat, metanol, kloroform, fosfat standartı, hidrojen peroksit, askorbik asit ve asetonyitril Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) firmasından, lipid standartları ise Avanti Lipid firmasından temin edilmiştir.

In vitro Antikanser Aktivite Belirlenmesi

Hücre Kültürü: İnsan prostat kanser hücreleri (PC-3), 10% (v/v) fetal bovin serum (FBS), 100 Unite/ml penicilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren F-12 besi yerinde %5 CO₂ ve 37 °C koşullarındaki inkübatörde büyütüldü. Hücreler %70–80 büyüme oranına ulaştıklarında tiripsin-EDTA kullanılarak pasajlandı.

MTT ölçümü; 2,3-DHBA'nın PC-3 prostat kanser hücreleri üzerine antikanser etkisi, MTT kullanılarak belirlendi²⁷. Üstel olarak büyüyen PC-3 hücreleri pasajlanarak 1x10⁵ hücre/mL olacak şekilde 96-kuyulu plakalara ekildi. Hücrelerin plakalara tutunmaları için 24 saat beklenildikten sonra 2,3-DHBA'nın farklı derişimleri (300–20000 µM) uygulandı. Bileşik uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra herbir kuyuya MTT eklendi ve 2 saat inkübatörde beklemeye bırakıldı. İki saatin sonunda plakalar inkübatörden alındı ve hücrelere zarar vermeden plakalar içindeki besi yerleri aspire edildi. Herbir kuyuya 100 µL DMSO eklendikten sonra plakalar, 15 dk oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerine inkübe edildi ve absorbans değerleri Elisa cihazında 570 nm dalga boyunda okundu. Herbir bileşik için bu ölçümler farklı pasaj numaralarında 3 tekrarlı olarak yapıldı (n=9) ve GraphPad Prism7 kullanılarak IC₅₀ değerleri saptandı.

DAPI Boyaması

Floresan boyama yöntemi olarak kullanılan DAPI boyaması yapılarak, 2,3-DHBA'nın PC-3 hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin olup olmadığı belirlendi²⁸. Üstel olarak büyüyen PC-3 hücreleri pasajlanarak 1x10⁵ hücre/mL olacak şekilde 6-kuyulu plakalara ekildi. Hücrelerin plakalara tutunmaları için 24 saat beklenildikten sonra 2,3-DHBA için MTT deneyi sonucunda 24, 48 ve 72 saat için belirlenen IC₅₀ derişim değerleri hücrelere uygulandı. Uygulama yapıldıktan 24, 48 ve 72 saat sonrasında besi yeri aspire edilerek hücreler iki kez 1xPBS ile yıkandı ve 0.01% formaldehit çözeltisi ile 10 dakika fixe edildi. Hücreler tekrar iki kez 1xPBS ile yıkanarak, 100 µM DAPI eklendi ve 10 dk karanlıkta inkübe edildi. Son olarak hücreler tekrar iki kez 1xPBS ile yıkandıktan sonra 2 damla mounting media eklenip oda sıcaklığında 5 dk beklendi. Hücre morfolojisindeki derişimler 350/486 nm (ex/em) dalga boylarında floresan mikroskobu ile görüntülendi.

Lipidomiks Analiz

Bligh-Dyer yöntemi ile Lipid izolasyonu

2,3-DHBA'nın PC-3 prostat kanser hücre hattında MTT deneyi sonucunda 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişim değeri PC-3 prostat kanser hücre hattına uygulanarak, hücre kültürü ortamından Bligh-Dyer yöntemi ile lipid izolasyonu yapıldı²⁹. Flasklarda büyütülen PC-3 prostat kanser hücreleri 1XPBS ile yıkandıktan sonra metanol:su karışımıyla kazanarak tüplere alındı. Tüplere metanol, kloroform ve su eklenerek vortekslen-di ve santrifüjlenerek kloroform fazı ayrıldı. Tekrar kloroform eklenerek vorteksle karıştırılarak santrifüjlendi ve kloroform fazları birleştirildi. Kloroform, azot gazı altında uzaklaştırıldı. Kalan lipid metanol:kloroform karışımı ile çözülerek küçük cam tüplere alındı ve fosfor analizi yapılmak üzere -80 0C'ye kaldırıldı.

İnorganik Fosfat Tayini

Lipid ekstraktları ve sülfirik asit, 200°C de 1 saat inkübe edildikten sonra hidrojen peroksit eklenip 1.5 saat tekrar inkübe edildi. Tüpler alınıp molibdat belirteci ve 100 µL askorbik asit çözeltisi eklenip 100 °C'de 7-10 dk kaynatılacak ve 830 nm dalga boyunda absorbansları ELISA okuyucuda okundu³⁰.

Lipid Türlerinin Elektrospray İyonizasyon Kütle Spektrometresiyle (ESI-MS) ile Belirlenmesi ve miktar tayini

Lipit ekstraktlarının ESI-MS analizleri Agilent LC/MSD kütle spektrometresi kullanılarak yapıldı³¹⁻³⁴. ESI-MS, analizi Agilent technologies 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS kütle spektrometresi (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) kullanılarak; 350 °C'de azot kurutma gazının akış hızı 8 litre/dk ve 30 psi'lik nebulizatör basıncında gerçekleştirildi. Örnekler; amonyum format içeren asetonitril: metanol:su mobil faz ile pozitif ve negatif iyon modunda tarandı.

Lipidler için çok değişkenli İstatistik Analizler

Esas bileşen analizi (PCA) ve Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi (PLS-DA) gibi çok değişkenli analizler MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) kullanılarak yapıldı³⁵. Hangi m/z değerlerinin anlamlı olarak değiştiğini bulmak için, volcano plots, kat değişimi (fold change) ve t-test sonuçları MetaboAnalyst 4. kullanılarak birleştirildi. Tüm veri grupları için kat değişim eşiği 1.5 ve p-değeri 0.05 olarak alınmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı olan

m/z değerlerine karşılık gelen lipid türleri, Lipid Maps (<http://www.lipidmaps.org/>) kullanılarak belirlenmiştir³⁶.

İstatistik Analiz

Araştırma kapsamında yapılan tüm antikanser aktivite deneyleri dokuz tekrarlı (n=9) ve lipidomik deneyler altı (n=6) tekrarlı yapılp, sonuçlar standart sapmalarıyla (\pm SEM) birlikte verilmiştir. GraphPad Prism7 grafik ve istatistik programı (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak One-way anova analizi uygulanmış ve anlamlılık için *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001 seçilmiştir.

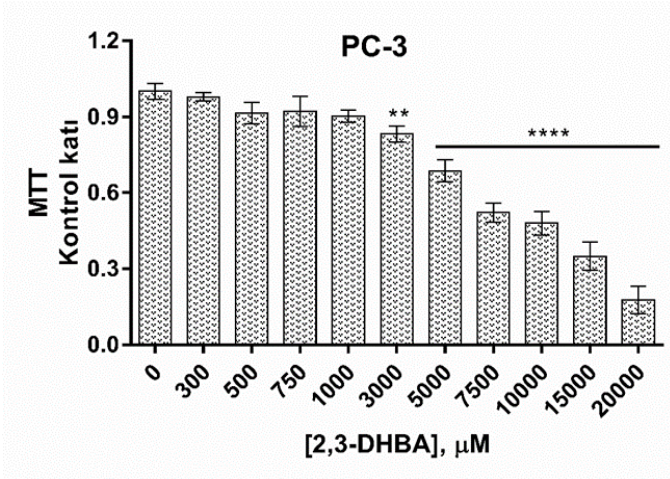
BULGULAR ve TARTIŞMA

Antikanser Aktivite Belirlenmesi

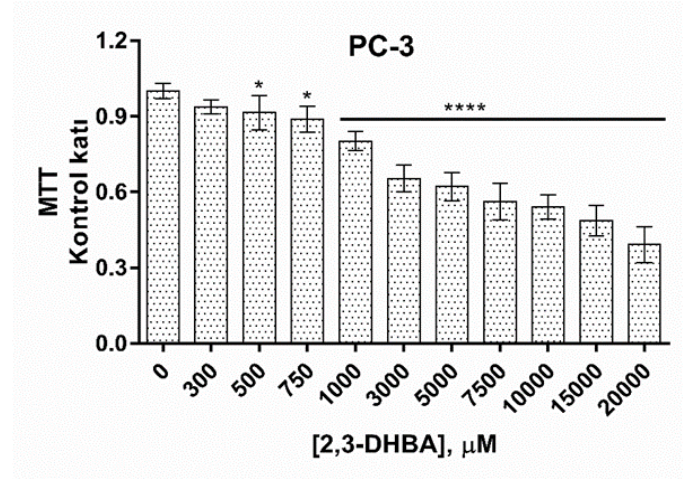
2,3-DHBA'nın PC-3 prostat kanser hücreleri üzerine antikanser aktivitesi, MTT kullanılarak belirlendi. MTT, sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden birisidir. MTT, mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin belirlenmesini sağlamaktadır. MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup çözeltisi sarımtırak renklidir. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT, çözünmeyen mor renkli formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Tetrazolium tuzunun sadece metabolik aktivitesi olan hücreler tarafından renkli formazanlara indirgenmesinden dolayı bu yöntem sadece canlı hücreleri belirlemektedir. Oluşan bu formazan izopropanol veya başka bir çözücü yardımı ile çözünür hale getirilir ve oluşan renk spektrofotometrik olarak okunup miktar tayini yapılmaktadır. Şekil 1-3'de; x eksenini 2,3-DHBA'nın derişimlerini, y eksenini ise hücrelerin kontrole göre canlılık oranlarını göstermektedir. Şekil 1-3'de; görüldüğü gibi 2,3-DHBA'nın derişimindeki artışla paralel olarak antikanser aktivitede de artış gözlenmektedir. Yani, 2,3-DHBA'nın derişiminin artmasıyla, PC-3 prostat kanser hücrelerinin ölüm oranları artış göstermektedir.

Bu grafikten yararlanılarak, 2,3-DHBA'nın PC-3 prostat kanser hücrelerinin %50'sini öldürdükleri derişim değeri (IC₅₀) belirlenmektedir. Şekil 1-3'de 2,3-DHBA'nın 24, 48 ve 72 saat uygulama zamanlarında IC₅₀ değeri sırasıyla; 6312 µM, 2502 µM ve 1781 µM olarak bulunmuştur (Şekil 4). Şekil 4'de görüldüğü gibi; 2,3-DHBA için gözlemlenen IC₅₀ değeri, yani PC-3 prostat hücrelerinin %50'sinin öldürülmesi için gerekli derişim değeri, zamanla düşmektedir. Düşük IC₅₀ değeri yüksek aktiviteye işaret etmektedir.

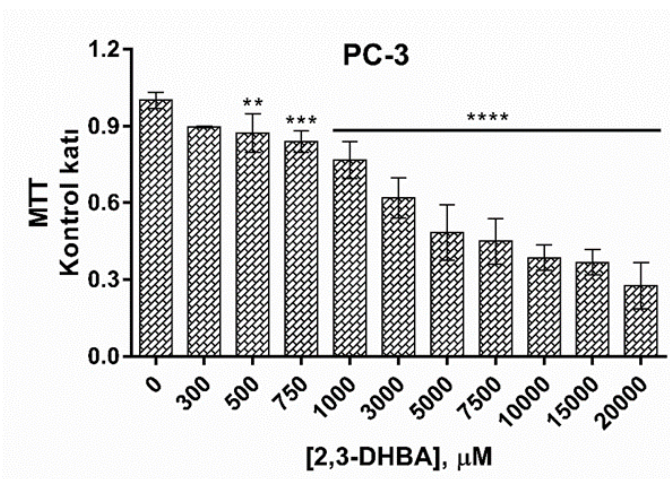
Bu nedenle 2,3-DHBA'nın antikanser aktivitesi zamana bağlı olarak artmaktadır.



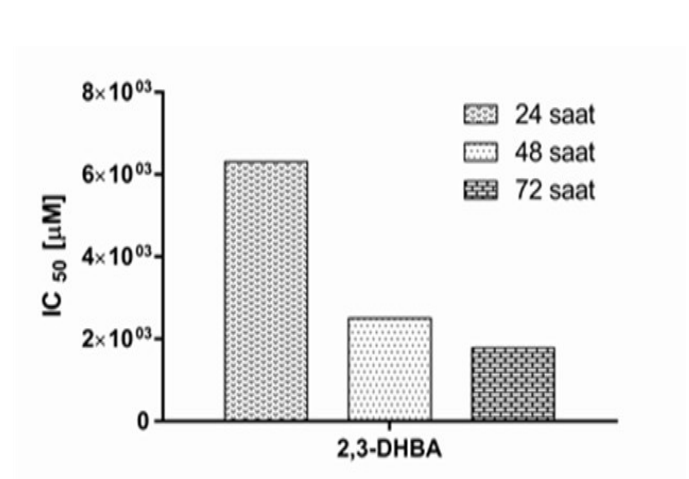
Şekil 1. 2,3-DHBA'nın PC-3 hücreleri üzerine antikanser aktivitesi, 24 saat (**p<0.005, ****p<0.0001)



Şekil 2. 2,3-DHBA'nın PC-3 hücreleri üzerine antikanser aktivitesi, 48 saat (*p<0.05, ****p<0.0001)



Şekil 3. 2,3-DHBA'nın PC-3 hücreleri üzerine antikanser aktivitesi, 72 saat (**p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001)

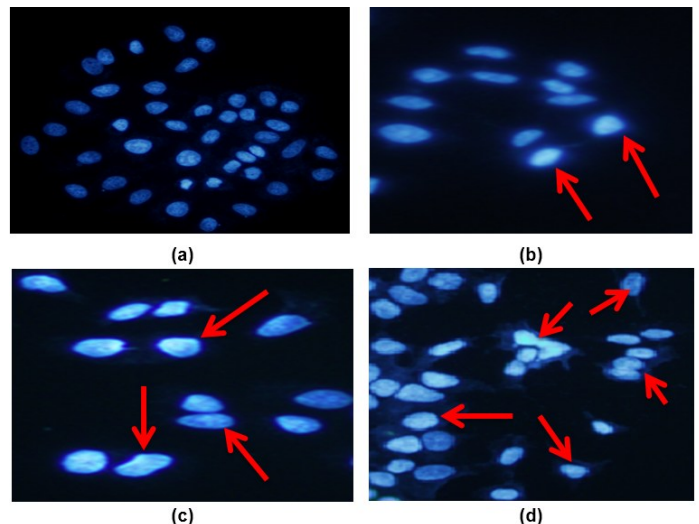


Şekil 4. 2,3-DHBA'nın zamana bağlı IC₅₀ değerleri

DAPI Boyaması

Floresan boyama yöntemleri, floresan maddelerin (örn. Hoechst boyası, DAPI, propidium iyodür) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelmektedir. DAPI, DNA'ya bağlanan floresan bir boyadır ve hücre morfolojisiyle ilgili bilgiler vermektedir. Kromatin kondensasyonu veya nükleus fragmentasyonu olan hücreler apoptotik hücreler olarak değerlendirilmektedir. Floresan boyama yöntemi olarak kullanılan DAPI boyaması yapılarak, komplekslerin PC-3 hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin olup olmadığı araştırıldı. Şekil 5'de kontrol (PC-3 prostat hücreleri) ile PC-3 prostat kanser hücrelerine 2,3-DHBA'nın IC₅₀ derişimlerinin uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra yapılan DAPI boyaması sonucunda elde edilen floresan mikroskop görüntüleri verildi. Şekil 5'de kromatin kondensasyonu veya nükleus

fragmentasyonunun var olduğu apoptotik hücrelerin varlığı ve apoptotik etkilerin zamanla daha belirgin hale geldiği gözlemlendi.



Şekil 5. 2,3-DHBA'nın IC₅₀ değerlerinde DAPI boyaması (a) Kontrol (b) 24 saat (c) 48 saat (d) 72 saat

Fenolik asitler, bitki ve yiyeceklerde yaygın biçimde bulunmaları, önemli biyolojik ve farmakolojik özellikleri sebebiyle genel ilgi odağı haline gelmişlerdir. Fenolik bileşiklerin sahip oldukları güçlü antioksidan ve anti-radikal aktiviteler aromatik halkaya bağlı hidroksil grup sayısı, bağlanma konumu ve aromatik halkadaki hidroksillerin yerleri gibi birçok faktöre bağlı olarak farklılık göstermektedir^{37, 38}. Flavonoidler ve fenolik asitleri içeren fenolik bileşikler olası diyetel antikarsinogenlerin en umut veren grubu olarak nitelendirilmektedir. Fenolik bileşiklerin antikanser aktiviteleri farklı çalışmalarda araştırılmıştır³⁹⁻⁴¹.

Lipidomiks Analiz

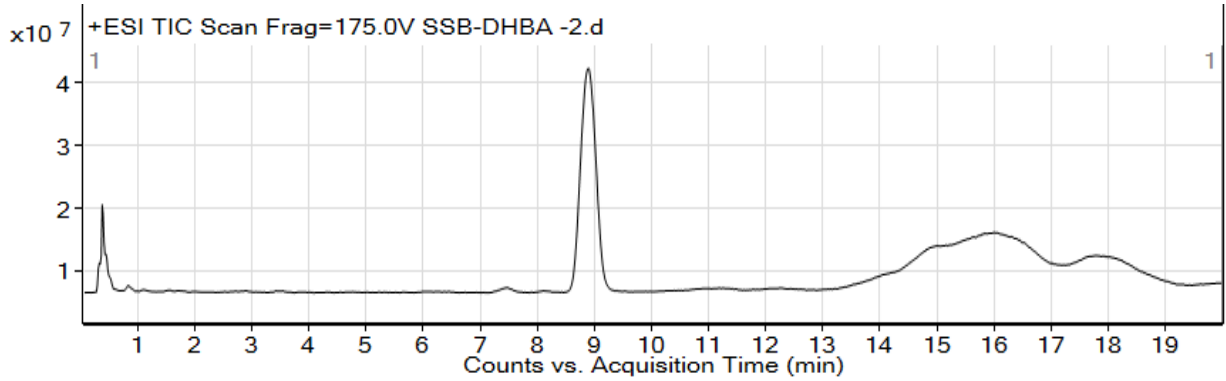
İnorganik Fosfat Tayini

2,3-DHBA'nın 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişim değerinin uygulandığı PC-3 prostat kanser hücrelerinden Bligh-Dyer

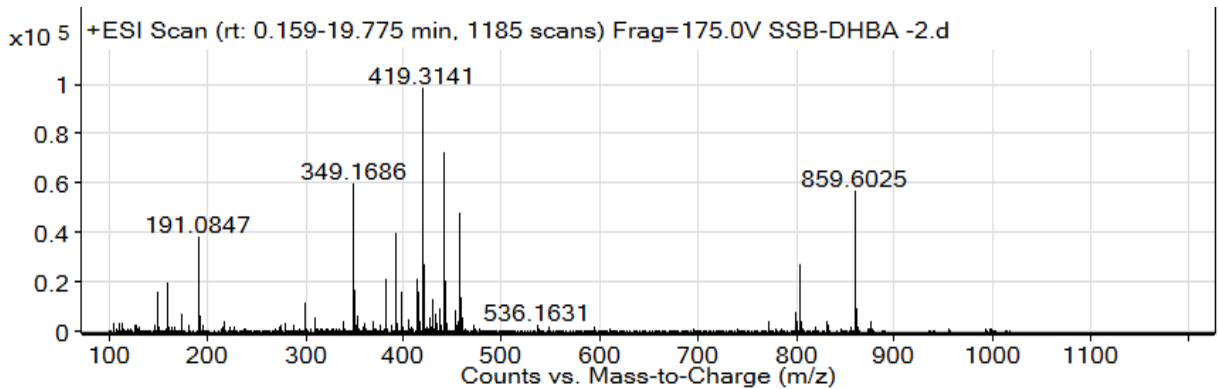
yöntemi ile yapılan lipid izolasyonundan elde edilen örneklere standart fosfor çözeltisi kullanılarak derişim normalizasyonu yapıldı ve bir sonraki adımda Q-TOF LC/MS kullanılarak ESI-MS analizleri yapıldı.

ESI-MS analizi

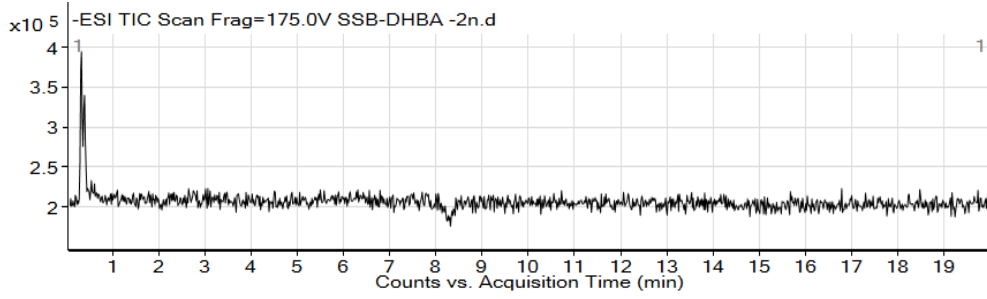
Lipit örnekleri kloroform:metanol içinde hazırlandı. ESI-MS analizi Agilent technologies 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS kütle spektrometresi kullanılarak deneysel kısımda belirtilen koşullarda pozitif ve negatif iyon modunda yapıldı. Şekil 6-9'da pozitif ve negatif iyon modlarında elde edilen kromotogramlar ve spektrumlar verildi.



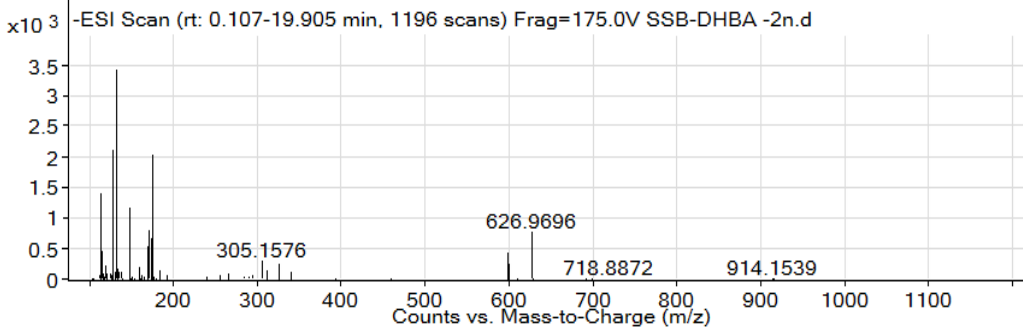
Şekil 6. 2,3-DHBA'nın 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı PC-3 prostat kanser hücrelerinin Pozitif iyon modu kromotogramı (n=6)



Şekil 7.: 2,3-DHBA'nın 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı PC-3 prostat kanser hücrelerinin Pozitif iyon modu spektrumu (n=6)



Şekil 8. 2,3-DHBA'nın 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı PC-3 prostat kanser hücrelerinin Negatif iyon modu kromotogramı (n=6)



Şekil 9.: 2,3-DHBA'nın 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı PC-3 prostat kanser hücrelerinin Negatif iyon modu spektrumu (n=6)

Lipidler İçin Çok Değişkenli İstatistik Analizler

ESI-MS analizi sonucunda elde edilen veriler, deneysel kısımda verilen parametreler kullanılarak MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) ve Lipid Maps (<http://www.lipidmaps.org/>) veri tabanları yardımıyla analiz edildi. MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) programı ile öncelikle çalışılan gruplar arasında fark olup olmadığı, Şekil 6 ve Şekil 8'deki kromotogramlardan elde edilen excel verilerine Temel bileşen analizi (PCA) (Şekil 10 a, Şekil 11 a). ve Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi (PLS-DA) gibi çok değişkenli analizler yapılarak belirlendi (Şekil 10 b, Şekil 11 b). t-testi uygulanarak gruplar arasında farklı olan lipid türlerin ayrımı sağlandı (Şekil 10 c, Şekil 11 c). Değişkenlik kat eşiği 1.5 ve p-değeri 0.05 alınarak, gruplar arasında farklı olan lipid türlerinden (t-testi ile saptanan) bu değişkenlik oranına sahip lipidler belirlendi (kat değişimi,

Tablo 1: 2,3-DHBA'nın 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı PC-3 prostat kanser hücrelerinin Pozitif iyon modu Lipid profil değişimi^a

LIPID SINIFI	DEĞİŞEN LIPID SAYISI ^B	%
Yağ asitleri	67	12,76
Gliserolipidler	100	19,05
Gliserofosfolipidler	73	13,90
Sterol Lipidler	140	26,67
Prenol Lipidler	19	3,62
Poliketitler	128	24,38

^aVolcano plot analizi ile; 48 saat süresince 2,3-DHBA uygulanan ve uygulama yapılmayan PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasıyla anlamlı olarak değişen m/z değerlerinin (p < 0.05) karşılaştırılması

^bAnlamlı olarak değişen lipid türlerinin m/z değerlerinin Lipid Maps taraması ile değerlanması

Şekil 10 d, Şekil 11 d). t-testi ile kat değişimi grafiklerinin logaritması birleştirilerek gruplar arasında değişen lipid türlerinin kütle/yük (m/z) oranlarını sayısal olarak veren Volcano Plot grafiği (Şekil 10 e, Şekil 11 e) elde edildi.

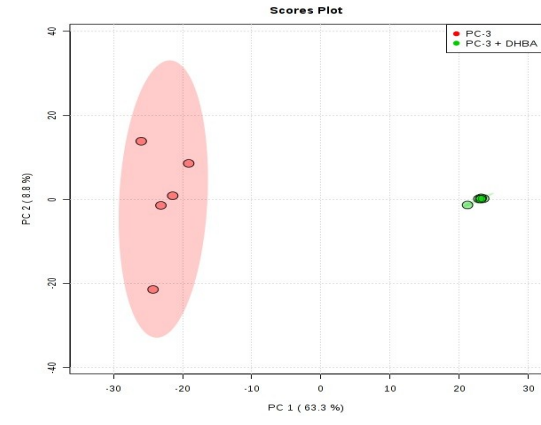
Volcano plot grafiğinden elde edilen m/z değerleri Lipid Maps programı ile analiz edilerek, bu m/z değerlerine karşılık gelen lipid türlerinin MS-MS değerlanması yapılarak yapıları ve sınıfları belirlendi (Tablo 1, Tablo 2). Yapılan analizler sonucunda 2,3-DHBA uygulamasının PC-3 prostat kanser hücre lipid türlerinde Pozitif iyon modunda yağ asitleri (% 12,8), gliserolipid (%19,0), gliserofosfolipid (%13,9), sterol lipidler (%26,7), prenol lipidler (%3,6) ve poliketit lipid (% 24.4) türlerinde değişimlere yol açarken, negatif iyon modunda ise yağ asitleri (%95,2), gliserolipid (%0,53), prenol lipidler (%2,67) ve poliketit lipid (%1,6) türlerinde değişimlere neden olmuştur (Tablo 1, Tablo 2).

Tablo 2. 2,3-DHBA'nın 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı PC-3 prostat kanser hücrelerinin Negatif iyon modu Lipid profil değişimi^a

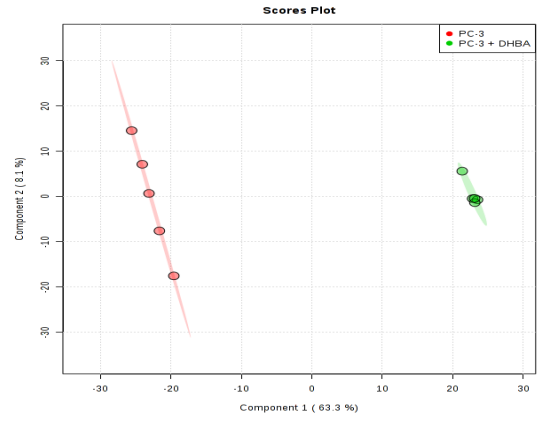
LIPID SINIFI	DEĞİŞEN LIPID SAYISI ^B	%
Yağ asitleri	356	95,19
Gliserolipidler	2	0,53
Prenol Lipidler	10	2,67
Poliketitler	6	1,60

^aVolcano plot analizi ile; 48 saat süresince 2,3-DHBA uygulanan ve uygulama yapılmayan PC-3 hücrelerinin karşılaştırılmasıyla anlamlı olarak değişen m/z değerlerinin (p < 0.05) karşılaştırılması

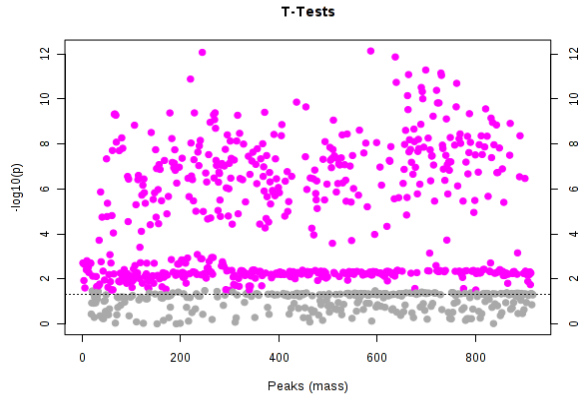
^bAnlamlı olarak değişen lipid türlerinin m/z değerlerinin Lipid Maps taraması ile değerlanması



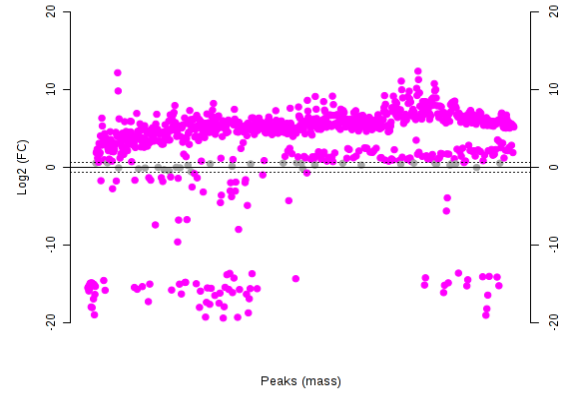
(a)



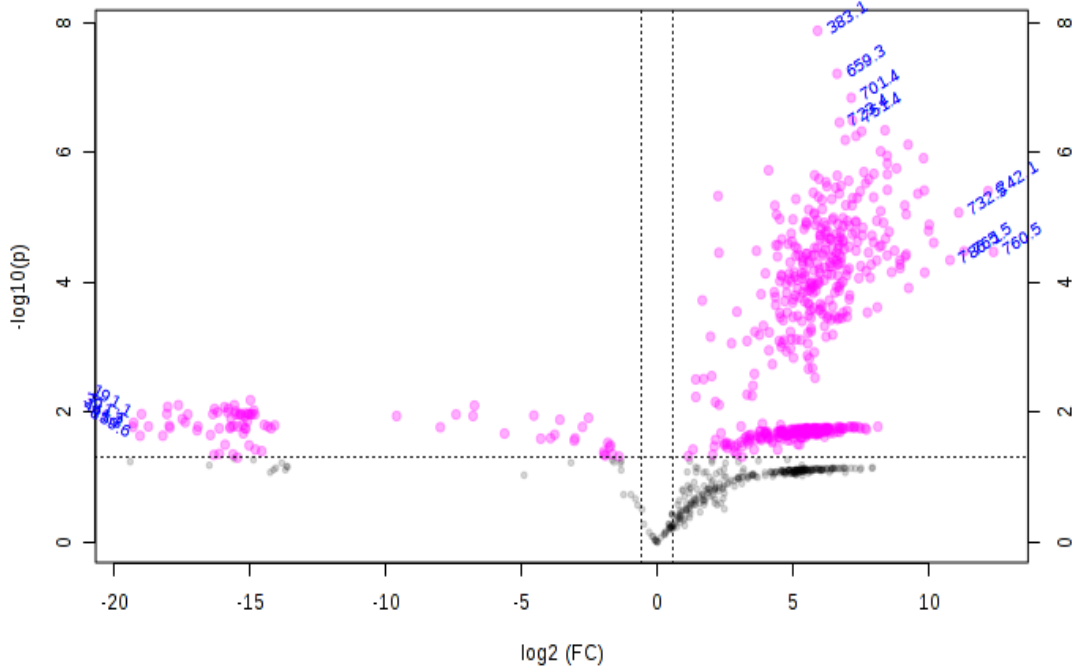
(b)



(c)

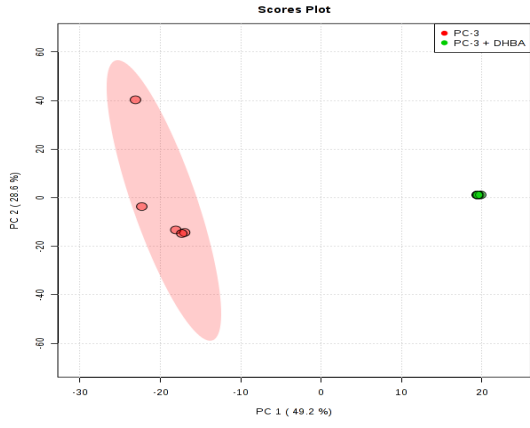


(d)

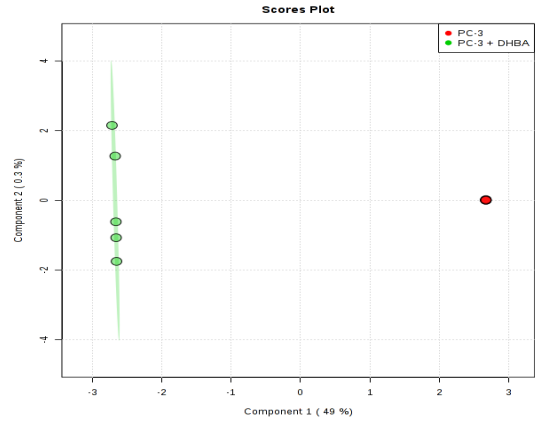


(e)

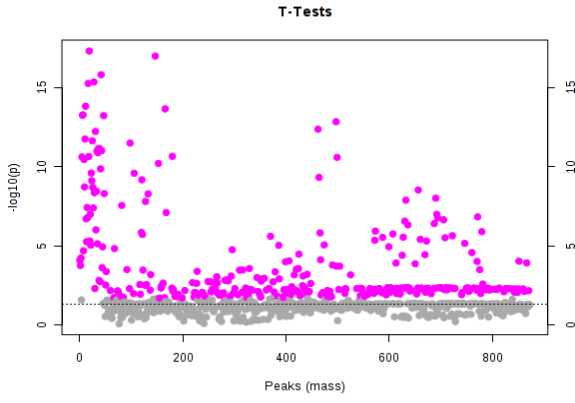
Şekil 10. PC-3 prostat kanser hücreleri ve 2,3-DHBA'nın 48 saat için belirlenen IC_{50} derişiminin uygulandığı PC-3 prostat kanser hücrelerinin Pozitif iyon modu (a) Temel bileşen analizi (2D-PCA) ve (b) Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi (2D-PLS-DA) (c) t-testi ve (d) Kat değişim (Fold change, FC), (e) Volcano Plot (VC) grafikleri



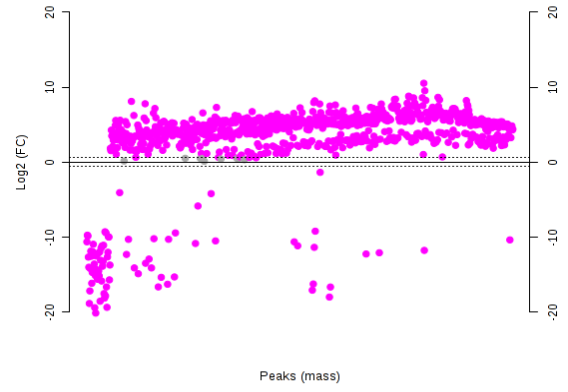
(a)



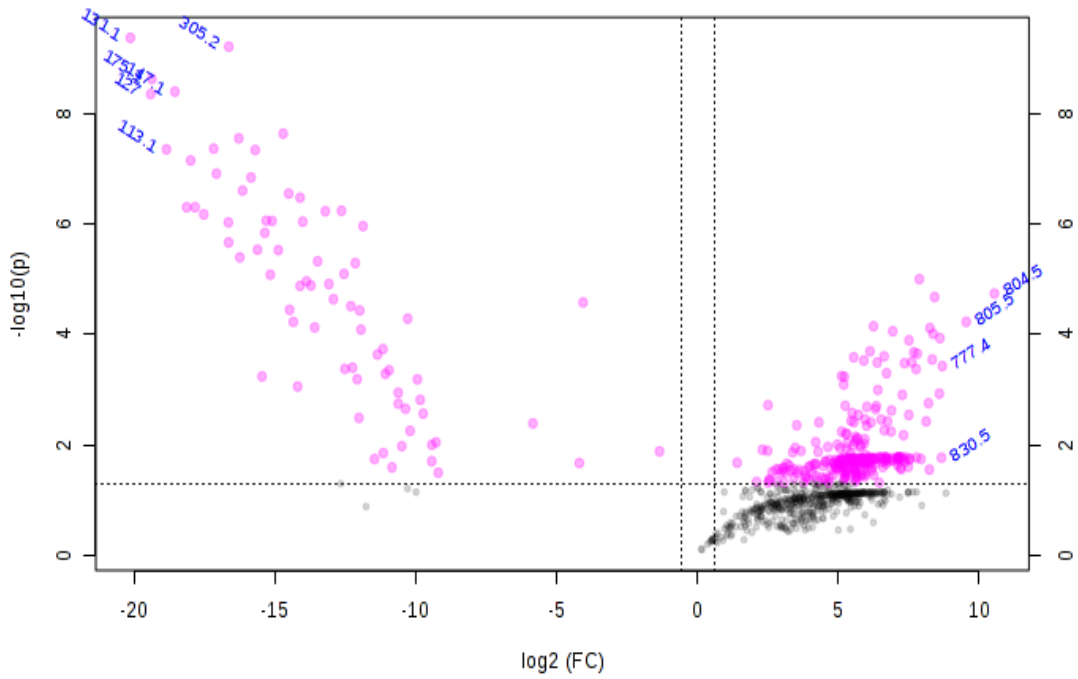
(b)



(c)



(d)



(e)

Şekil 11. PC-3 prostat kanser hücreleri ve 2,3-DHBA'nın 48 saat için belirlenen IC₅₀ derişiminin uygulandığı PC-3 prostat kanser hücrelerinin Negatif iyon modu (a) Temel bileşen analizi (2D-PCA) ve (b) Kısmi En Küçük Kareler Diskriminant Analizi (2D-PLS-DA) (c) t-testi ve (d) Kat değişim (Fold change, FC), (e) Volcano Plot (VC) grafikleri

SONUÇ

Yiyeceklerde doğal olarak bulunan bir fenolik asit türü olan 2,3-DHBA'nın PC-3 insan prostat kanser hücreleri üzerine antikanser aktivite gösterdiği ve bu etkinin doz ve zaman bağımlı olarak arttığı saptandı. Ayrıca DAPI boyaması ile, kromatin yoğunlaşması ve nükleer fragmentasyona gibi apoptotik özelliklerin zaman bağımlı olarak artış gösterdiği belirlendi. Hedeflenmemiş lipidomik yaklaşım kullanılarak 2,3-DHBA uygulamasının, PC-3 insan prostat kanser hücre lipid profili üzerine etkisi araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda 2,3-DHBA uygulamasının PC-3 prostat kanser hücre lipid türlerinde yağ asitleri, gliserolipid, gliserofosfolipid, sterol lipidler, prenol lipidler ve poliketit lipid türlerinde değişimlere neden olduğu gözlemlendi. Uygulama sonucunda değişen lipid türlerinin tanımlanması, kanserdeki lipid profil değişikliklerin araştırılması için yeni araçlar olabilmekte, yeni biyobelirteçler ve yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi için bir temel sağlayabilmektedir. Yaptığımız çalışma; 2,3-DHBA uygulaması sonucunda gözlenen antikanser aktivite ile değişen lipid türlerinden yola çıkılarak yapılacak olan, hedefli lipidomik çalışmaların yanısıra, proteomik ve genomik çalışmalara da temel oluşturarak, 2,3-DHBA uygulamasına bağlı olarak prostat kanseri tedavisinde lipidomik temelli tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda yol gösterici olacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) tarafından ECZ-022 proje numarası ile B-tipi bireysel araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Robbins RJ. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem.* 2003;51(10):2866-2887.
2. Stamatis H, Sereti V, Kolisis FN. Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *J Mol Catal B Enzym.* 2001;11(4):323-328.
3. Sabally, K. 2006. Lipase-Catalyzed Synthesis of Selected Phenolic Lipids in Organic Solvent Media. PhD Thesis, Department of Food Science & Agricultural Chemistry, McGill University, Montreal, Canada.
4. Bacon JR, Rhodes MJ. Binding Affinity of Hydrolysable Tannins to Parotid Saliva and to Praline-Rich Proteins Derived from It. *J Agric Food Chem.* 2000;48:838-843.
5. Grootveld M, Halliwell B. 2,3-Dihydroxybenzoic acid is a product of human aspirin metabolism. *Biochem Pharmacol.* 1988;37:271-280.
6. Paterson JR, Blacklock C, Campbell G, Wiles D, Lawrence JR. The identification of salicylates as normal constituents of serum: a link between diet and health? *J Clin Pathol.* 1998;51:502-505.
7. Muljono RA, Darsono FL, Scheffer JJ, Verpoorte R. Assay of 2,3-dihydroxybenzoic acid and related compounds in plant materials by highperformance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2001;927:39-45.
8. Sakushima A, Coskun M, Maoka T. Hydroxybenzoic acids from *Boreava orientalis*. *Phytochemistry* 1995;40:257-261.
9. Shibumon G, Benny PJ, Kuriakose S, Cincy G. Antibiotic activity of 2,3-dihydroxybenzoic acid isolated from *Flacourtia inermis* fruit against multidrug resistant bacteria. *Asian J Pharm Clin Res.* 2011;4:126-130.
10. Torres AM, Maulastovicka T, Rezaaiyan R. Total Phenolics and high-performance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. *J Agr Food Chem.* 1987;35:921-925.
11. Zhang K, Zuo Y. GC-MS determination of flavonoids and phenolic and benzoic acids in human plasma after consumption of cranberry juice. *J Agric Food Chem.* 2004;52:222-227.
12. Zuo Y, Wang C, Zhang J. Separation, Characterization, and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS. *J Agr Food Chem.* 2002;50:3789-3794.
13. Sappey C1, Boelaert JR, Legrand-Poels S, Grady RW, Piette J. NF-kappa B transcription factor activation by hydrogen peroxide can be decreased by 2,3-dihydroxybenzoic acid and its ethyl ester derivative. *Arch Biochem Biophys.* 1995;321:263-270
14. Baldwin SR, Simon RH, Boxer LA, Till GO, Kunkel RG. Attenuation by 2,3-dihydroxybenzoic acid of acute lung injury induced by cobra venom factor in the rat. *Am Rev Respir Dis.* 1985;132:1288-1293
15. Graziano JH, Miller DR, Grady RW, Cerami A. Inhibition of membrane peroxidation in thalassaemic erythrocytes by 2,3-dihydroxybenzoic acid. *Br J Haematol.* 1976;32:351-356.
16. Neilands JB. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol. Chem.* 1995;270:26723-26726.
17. Graziano JH, Miller DR, Grady RW, Cerami A. Inhibition of membrane peroxidation in thalassaemic erythrocytes by 2,3-dihydroxybenzoic acid. *Br. J. Haematol.* 1976;32:351-356.
18. Blatt J, Taylor SR, Kontoghiorghes GJ. Comparison of activity of deferoxamine with that of oral iron chelators against human neuroblastoma cell lines. *Cancer Res.* 1989;49:2925-2927.
19. Boon H, Brown JB, Gavin A, Kennard MA, Stewart M. Breast cancer survivors' perceptions of complementary/alternative medicine (CAM): making the decision to use or not to use. *Qual Health Res.* 1999;9:639-653.
20. Riboli E, Slimani N, Kaaks R. Identifiability of food components for cancer chemoprevention. *IARC Sci Publ.* 1996;(139):23-31.
21. Murillo G, Mehta, RG. Cruciferous vegetables and cancer prevention. *Nutr. Cancer.* 2001;41(1-2):17-28.
22. van't Veer P, Jansen MC, Klerk M, Kok FJ. Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. *Public Health Nutr.* 200; 3:103-107.
23. Spener F, Lagarde M, Gélouën A, Record M. What is lipidomics? *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2003;105:481-482.
24. Navas-Iglesias N, Carrasco-Pancorbo A, Cuadros-Rodríguez L, From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics *Trend Anal Chem.* 2009;28 (4):393-403.

25. Zhang Y, Wang Y, Guo S, Guo Y, Liu H, Li Z. Ammonia-treated N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride as a novel matrix for rapid quantitative and qualitative determination of serum free fatty acids by matrix-assisted laser desorption/ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2013;794:82–9.
26. Zhou X, Mao J, He Z, Henegar J. Lipidomics in identifying lipid biomarkers of prostate cancer. *FASEB J*. 2010;24:354,6
27. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82(13):1107-1112.
28. Cummings BS, Schnellmann RG. Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;302:8-17
29. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-917.
30. Robin, L., Davis, S. An organic phosphorus assay which avoids the use of hazardous perchloric acid. *Clin Chem Acta*. 1982;121:111-116.
31. Taguchi R, Hayakawa J, Takeuchi Y, Ishida M. Two-dimensional analysis of phospholipids by capillary liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2000;35:953-966.
32. Zhang L, Peterson BL, Cummings BS. The effect of inhibition of Ca²⁺- independent phospholipase A2 on chemotherapeutic-induced death and phospholipid profiles in renal cells. *Biochem. Pharmacol*. 2005;70:1697-1706.
33. Kinsey GR, Blum JL, Covington MD, Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG. Decreased iPLA₂ expression induces lipid peroxidation, cell death, and sensitizes cells to oxidant-induced apoptosis. *J Lipid Res*. 2008;49(7):1477-1487.
34. Peterson B, Stovall K, Monian P, Franklin JL, Cummings BS. Alterations in phospholipid and fatty acid lipid profiles in primary neocortical cells during oxidant induced cell injury. *Chem. Biol. Interact*. 2008;174:163-176.
35. MetaboAnalyst <http://www.metaboanalyst.ca/> Son erişim tarihi: 31 Mart 2020.
36. LIPID MAPS Databases: LIPID MAPS Lipidomics Gateway <http://www.lipidmaps.org/> Son erişim tarihi: 31 Mart 2020.
37. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20:933–956.
38. Joyeux M, Lobstein A, Anton R, Mortier F. Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. *Planta Med*. 1995;61:126–129.
39. Neergheen VS, Baharun T, Taylor EW, Jen LS, Aruoma OI. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology*. 2010;278(2):229–241.
40. Fresco P, Borges F, Marques MP, Diniz C. The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. *Curr Pharm Des*. 2010;16(1):114–134.
41. Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer*. 2010;62(1):1–20.