T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİSEL FLAVONOİD SİLİMARİN ve FENOLİK ASİT STİLBENOİD RESVERATROLÜN KARACİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDEKİ ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ELİF SIRMA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2013

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİSEL FLAVONOİD SİLİMARİN ve FENOLİK ASİT STİLBENOİD RESVERATROLÜN KARACİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDEKİ ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ELİF SIRMA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. NİL SAYDAN

GEBZE
2013

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ	YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...17/06/2013..... tarih ve ...2013/32.... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 09/10/13 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Elif SIRMA'nın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Yrd. Doç. Dr. Nil SAYDAN

ÜYE : Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Ster IRMAK

ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Son yıllarda konvansiyonel kanser terapilerine destek olarak oksidatif süreci inhibe eden, antiinflamatuar ve antikanser özellik gösteren bitkisel kökenli maddeler kullanılmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar fitokimyasalların birlikte uygulanmasının sinerjistik bir etki yaratarak etkili dozu düşürdüğü, toksisite ve yan etkileri azalttığı böylelikle terapötik cevabı arttırdığını göstermiştir. Tez çalışmasında resveratrol ve silimarin bu amaç doğrultusunda kullanılan fitokimyasallardır.

Gerek resveratrol gerekse silimarin ayrı ayrı ve kombine şekilde hepatoselüler karsinoma Huh7 hücrelerine uygulanmış ve antikanser özellikleri doza ve zamana bağlı olarak incelenmiştir. Uygulama yapılan Huh7 hücreleri hiçbir uygulama yapılmayan kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonunun antiproliferatif etki gösterdiği, apoptozu indüklediği ve hücre siklusunun çeşitli fazlarında durdurulmaya yol açtığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kanser Terapisi, Resveratrol, Silimarin, Fitokimyasal, Akan Hücre Ölçer.

SUMMARY

In recent years phytochemical substances including anticancer and antiinflamatuar property and inhibiting oxidative process are used as supportive conventional cancer therapies. The researchs in recent time demonstrated that when phytochemicals are applied together generates a synergistic effect; decrease effective dose, reduce toxicity and side effects in this way enhancing therapeutic response. Resveratrol and silymarin are phytochemicals used in thesis study regarding that purpose.

Both of resveratrol and silymarin are applied to hepatocellular carcinoma (Huh7 cell line) as combined or separately and time and dose related anticancer property was investigated. Resveratrol, silymarin and their combination applied Huh7 cell line indicated antiproliferative effect, inducing apoptosis and arrest in variable phases of cell cycle compared with unapplied Huh7 cell line.

Key words: Cancer Therapy, Resveratrol, Silymarin, Phytochemical, Flow Cytometry.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, yardım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Nil SAYDAN'a;

Çalışmalarım süresince manevi desteğini esirgemeyen bölüm başkanımız Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya;

Tez çalışmamda önemli yeri olan akan hücre ölçer analizlerini yapabilmemiz için gerekli laboratuvar koşullarını sağlayarak destek olan Yeditepe Üniversitesi İmmunoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Gülderen YANIKKAYA DEMİREL'e, cihaz kullanım ve analiz değerlendirmelerinde yardımcı olan Yeditepe Üniversitesi çalışanlarından Özgür ALBAYRAK'a;

Yardımlarını ve dostluklarını hiçbir zaman esirgemeyen çalışma arkadaşlarım; Esra KAYA, Uzman Biyolog Pelin BALÇIK ERÇİN, Arş. Gör. Metin ÇETİN, Ceyda KETENCİ, Şerif YILMAZ, Arş. Gör. Zeynep GİRGİN ERSOY, Uzman İrem YALIM CAMCI, Tuba KORKMAZ, Aybike YEDEKÇİ, Zişan ASAL KILIÇ, Bahadır AYDIN, Enis GÜNEY, Gözde GÖRGÜLÜ, Taner ŞAR, Hamit EKİNCİ, Dr. Mine GÜL ŞEKER, Arş. Gör. Onur ÇALIŞKANER ve Veysel SÜZERER'e en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

Son olarak, tüm hayatım boyunca benden maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen ve her türlü kararımda yanımda olan ailem Gülay SIRMA, Mustafa SIRMA ve Aslı SIRMA ESEN'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. KANSER NEDİR?	3
2.1. Kanser Hücrelerinin Özellikleri ve Kanser Oluşumu	3
2.2. Hepatoselüler Karsinoma	4
2.3. Hepatoselüler Karsinomada Tedavi Yöntemleri	5
2.3.1. Konvansiyonel Tedaviler	5
2.3.2. Bitkisel Kökenli Maddelerin Kanser Terapilerinde Kullanımı	6
2.3.2.1. Resveratrol	7
2.3.2.2. Silimarin	11
2.4. Kanser Terapileri Sonrası Hücre Ölüm Mekanizmaları	13
2.4.1. Nekrotik Hücre Ölümü	13
2.4.2. Otofaji	14
2.4.3. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü)	15
2.4.3.1. Apoptozis Tayininde Kullanılan Yöntemler	17
2.4.3.1.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri	17
2.4.3.1.2. Histokimyasal Yöntemler	18
2.4.3.1.3. Biyokimyasal Yöntemler	19
2.4.3.1.4. Akan Hücre Ölçer (Flow Cytometry)	19
2.5. Ökaryotik Hücre Döngüsü	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM	29
3.1. Materyal	29

3.1.1. Kimyasal Maddeler 29
3.1.2. Cihaz ve Diğer Maddeler 29
3.1.3. Kullanılan Solüsyonlar 29
3.2. Yöntem 31
3.2.1. Hücre Kültürü 31
3.2.1.1. Alt Kültürleme 31
3.2.1.2. Hücrelerin Dondurularak Saklanması ve Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi 32
3.2.1.3. Hücre Sayımı 33
3.2.2. *In vitro* Resveratrol ve Silimarin Uygulamaları 33
3.2.2.1. Resveratrol ve Silimarin Uygulamaları Sonrası Hücre Morfolojisinin İncelenmesi 34
3.2.2.2. Resveratrol ve Silimarin Uygulamaları Sonrası Hücre Canlılığının İncelenmesi 34
3.2.2.2.1. IC_{50} Değerinin Hesaplanması 35
3.2.2.3. Resveratrol ve Silimarin Uygulamaları Sonrası Hücre Siklusu Dağılımının Belirlenmesi 35
3.2.2.4. Resveratrol ve Silimarin Uygulamaları Sonrası Apoptoz Tayini 37
3.2.2.5. İstatistiksel Analiz 38
4. BULGULAR 39
4.1. Resveratrol ve Silimarin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi 39
4.1.1. Resveratrolün Hücre Canlılığına Etkisi 39
4.1.2. Silimarinin Hücre Canlılığına Etkisi 40
4.1.3. Resveratrol/Silimarin Kombinasyonunun Hücre Canlılığına Etkisi 41
4.2. Resveratrol ve Silimarin Uygulanmasının Ardından Sağ Kalım Oranları 42
4.3. Resveratrol ve Silimarin Uygulamasının Hücre Siklusu Dağılımı Üzerine Etkisi 45
4.4. Programlı Hücre Ölümü (Apoptoz) Analizleri 56
4.5. Resveratrol ve Silimarin Uygulamaları Sonrası Hücre Morfolojisinin İncelenmesi 61

5. TARTIŞMA ve SONUÇ 65

KAYNAKLAR 72
ÖZGEÇMİŞ 87

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar		**Açıklamalar**
G	:	Gram
H	:	Saat
kg	:	Kilogram
mg	:	Miligram
mm	:	Milimetre
mM	:	Milimolar
ml	:	Mililitre
µg	:	Mikrogram
µM	:	Mikromolar
µl	:	Mikrolitre
nm	:	Nanometre
w/v	:	Ağırlık/hacim
AIF	:	Apoptoz indükleyen faktör
Apaf-1	:	Apoptotik proteaz aktifleştirici faktör
APC	:	Anafaz başlatıcı kompleks
ATM	:	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	:	ATM and Rad-3 related
CAD	:	Kaspaz aktifleştirici DNaz
CDK	:	Siklin bağımlı kinaz
Chk	:	Checkpoint kinase
COX	:	Cyclo-oxygenase
CO_2	:	Karbondioksit
DISC	:	Ölüm indükleyen sinyal kompleksi
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
EDTA	:	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	:	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
FADD	:	Fas associated death domain
Fas-L	:	Fas ligand

FBS	:	Fetal bovine serum
FITC	:	Fluorescein isothiocyanate
FSC	:	İleri saçılım kanal dedektörü
G1	:	Gap 1
G2	:	Gap 2
IAP	:	Apoptoz proteinleri inhibitörü
ICAD	:	Kaspaz aktifleştiren DNaz inhibitörü
IC_{50}	:	%50 inhibisyona neden olan konsantrasyon
IGF	:	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGFR	:	İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü
M	:	Mitoz
PBS	:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PI	:	Propidyum iyodür
PI3K	:	Phosphatidylinositide 3-kinaz
PKC	:	Protein kinaz C
PTEN	:	Phosphatase and tensin homolog
PTK	:	Protein tirozin kinaz
QR	:	Quinone redüktaz
Rb	:	Retinoblastoma
RNA	:	Ribonükleik asit
S	:	Sentez
SIRT	:	Sirtuin
SSC	:	Yana saçılım kanal dedektörü
TNF	:	Tümör nekrozis faktör
TRAIL	:	TNF-related apoptosis inducing ligand

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa
2.1:	Kanser oluşum süreci.	4
2.2:	Trans- ve cis- resveratrolün kimyasal yapısı.	8
2.3:	Silibinin kimyasal yapısı.	12
2.4:	Apoptozda morfolojik özelliklerin değişim süreci.	15
2.5:	Apoptozisin moleküler mekanizması.	17
2.6:	Tipik bir akan hücre ölçer cihazının şematik görünümü.	20
2.7:	Nokta alan grafiği.	22
2.8:	Histogram grafiği.	22
2.9:	Hücre siklusu.	23
2.10:	Hücre siklusu kontrol noktaları.	24
2.11:	Hücre siklusunun düzenlenmesi.	25
2.12:	Siklin bağımlı kinazların aktivasyonu ve inhibisyonu.	26
2.13:	Hücre siklusunda G2/M geçişi.	28
3.1:	Hücre siklusu dağılımı.	36
3.2:	Dot-plot apoptoz analizi.	38
4.1:	Resveratrolün hücre canlılığına etkisi.	40
4.2:	Silimarinin hücre canlılığına etkisi.	40
4.3:	Resveratrol/Silimarin kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi.	41
4.4:	Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi.	41
4.5:	Hücrelerin resveratrolün 100 μM, 200 μM konsantrasyonu ve resveratrol/silimarin kombinasyonu ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu sağ kalım oranları.	43
4.6:	Hücrelerin silimarinin 100 μM, 200 μM konsantrasyonu ve resveratrol/silimarin kombinasyonu ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu sağ kalım oranları.	44
4.7:	FS/SS grafiğinde Huh7 hücrelerinin kapılanması.	45
4.8:	Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile 6 saat boyunca resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu uygulanan hücrelerin hücre siklusu dağılımı.	46

4.9: Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu ile 6 saat inkübe edilen hücrelerin hücre siklusu dağılımının herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile karşılaştırılması. 47
4.10: Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile 12 saat boyunca resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu uygulanan hücrelerin hücre siklusu dağılımı. 48
4.11: Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu ile 12 saat inkübe edilen hücrelerin hücre siklusu dağılımının herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile karşılaştırılması. 49
4.12: Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile 18 saat boyunca resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu uygulanan hücrelerin hücre siklusu dağılımı. 50
4.13: Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu ile 18 saat inkübe edilen hücrelerin hücre siklusu dağılımının herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile karşılaştırılması. 51
4.14: Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile 24 saat boyunca resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu uygulanan hücrelerin hücre siklusu dağılımı. 52
4.15: Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu ile 24 saat inkübe edilen hücrelerin hücre siklusu dağılımının herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile karşılaştırılması. 53
4.16: Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile 48 saat boyunca resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu uygulanan hücrelerin hücre siklusu dağılımı. 54
4.17: Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu ile 48 saat inkübe edilen hücrelerin hücre siklusu dağılımının herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile karşılaştırılması. 55
4.18: Huh7 hücreleri ile 24 saat inkübe edilen resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonunun hücre ölümüne etkisi. 58
4.19: Huh7 hücreleri ile 48 saat inkübe edilen resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonunun hücre ölümüne etkisi. 60
4.20: Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonunun 24 saatte Huh7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. 63

4.21: Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonunun 48 saatte Huh7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler. 64

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		Sayfa
4.1:	Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu uygulamasının ardından hücre sağ kalım oranları.	43
4.2:	Resveratrol, silimarin ve resveratrol silimarin kombinasyonu ile 6, 12, 18, 24 ve 48 saat inkübe edilen hücrelerin hücre siklusu dağılımı.	56
4.3:	Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu uygulamasından sonra akan hücre ölçer analizinde canlılık ve hücre ölümü yüzdeleri.	61

1. GİRİŞ

Hepatoselüler karsinoma, dünya çapında kansere bağlı ölümlerde üçüncü sırada yer alan bir kanser çeşididir [Jemal et al., 2011]. Rezeksiyon, organ nakli ve kemoterapi gibi konvansiyonel kanser tedavilerinde başarı oranının düşük olması, hastalığın çoğunlukla nüksetmesi ve çeşitli yan etkilerin ortaya çıkmasından dolayı toksik özellik göstermeyen ve etki mekanizmaları bilinen bitkisel kökenli maddeler kullanılarak destek terapi yolları aranmaktadır [Athar et al., 2007], [Venugopal and Liu, 2012], [Singh et al., 2013].

Bitkisel kökenli maddelerden resveratrol ve silimarinin antikanser özellik gösterdikleri yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır.

Polifenolik bir bileşik olan resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) doğada 70'den fazla bitki türünde bulunan bir fitokimyasaldır [Stocco et al., 2012]. Yapılan çalışmalar resveratrolün, hücre siklusu fazlarında tutuklanmaya (durdurmaya) neden olduğunu, apoptozu indüklediğini, kanser hücrelerinin çoğalımını ve ilerlemesini engellediğini bildirmiştir [Fulda and Debatin, 2004], [Hsieh et al., 2005].

Silibinin, izosilibinin, silidianin ve silichristin bileşenlerini içeren silimarin de antioksidan özellik gösteren bir polifenolik flavonoid'dir [Singh and Agarwal, 2004], [Wu et al., 2009]. Silimarinin ana bileşeni yaklaşık %60-70'ini oluşturan silibinindir [Wu et al., 2009]. Lah ve arkadaşları insan karaciğer kanseri hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada silibinin uygulanmasının, hücre siklusunda G1-S geçişinde tutuklanma ve apoptozun indüklenmesi ile karaciğer kanseri hücrelerinin büyümesinde inhibisyona neden olduğunu bildirmiştir [Lah et al., 2007].

Tez çalışması kapsamında resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonunun hepatoselüler karsinoma Huh7 hücre hattı üzerine anti-kanser etkileri araştırılmıştır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Tez çalışmasında karaciğer kanseri tedavisine destek terapi olmak üzere, bitkisel kökenli resveratrol ve silimarinin birlikte veya ayrı uygulanmasının kanser hücresi proliferasyonu ve siklusuna etkisi ile hücre ölüm mekanizmasının incelenmesi amaçlanmıştır.

Huh7 hücrelerine değişik konsantrasyonlarda uygulanan fitokimyasalların sitotoksik etkisi, terapi sonrası hücre ölüm mekanizmaları ve hücre siklusu dağılımı üzerindeki etkisi doza ve zamana bağlı olarak araştırılmıştır.

Daha önce resveratrol ve silimarin kombinasyonunun oluşturabileceği sinerjistik etki hiçbir hücre hattında araştırılmadığından çalışmamız literatür için bir ilk olmuştur.

2. KANSER NEDİR?

Yunanca *karkinos* kelimesinden köken alan kanser ilk olarak Hipokrat (M.Ö. 460-370) tarafından bazı tümörleri tanımlamak için kullanılmıştır. Kansere dair en eski bulgulara ise eski Mısır dönemindeki (M.Ö. 1600) mumyalarda rastlanmıştır. Kanser, dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüme sebebiyet veren ikinci hastalıktır. Amerika'da erkeklerin yarısında ve kadınların üçte birinde hayatlarının bir döneminde kanser gelişmektedir [Sudhakar, 2009].

Normalde hücrelerin büyümesi ve çoğalması bir düzen içerisinde gerçekleşir. Buna paralel olarak doku ve organlar da görevlerini normal olarak yapabilmektedirler. Ancak bu hücreler anormal şekil ve hızda büyümeye ve çoğalmaya başlarlarsa, tümör adı verilen kitle ya da kitlelerin oluşumuna yol açarlar. Tümörler; iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) olmak üzere iki grupta incelenir. Benign tümörlerde, hücreler kontrolsüz olarak çoğalır fakat diğer dokulara yayılmazlar [Player et al., 2004]. Malign tümörler, diğer dokulara yayılarak oradaki normal hücrelerin yaşamını bozup bir çeşit istila yani metastaz yapma eğilimindedirler. Malign hücreler, hızla çoğalma özelliklerine sahiptirler ve genetik yapıları bozulmuş olduğu için anormal proteinler üretirler. Dolayısıyla bu özellikleri sayesinde, diğer hücrelerden ayırt edilebilirler [Hanahan and Weinberg, 2000], [Naumov et al., 2006].

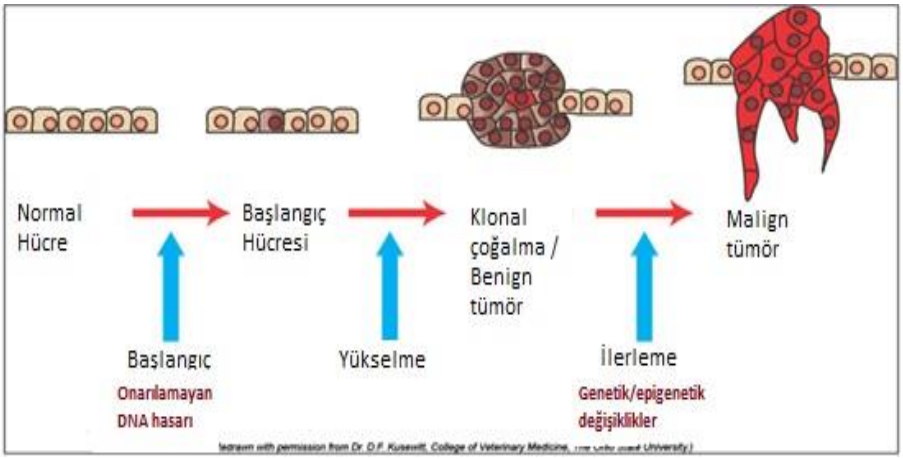
2.1. Kanser Hücrelerinin Özellikleri ve Kanser Oluşumu

Kanser, basit bir ifadeyle kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanabilir. Kontrolsüz çoğalma, esas özellik olmakla birlikte, kanser hücresinin normal hücrelerden farklı diğer önemli biyolojik karakteristikleri de vardır. Bunlar arasında kontakt inhibisyondan kaçabilme, bölünebilmek için dış uyaranlara gereksinim göstermeme, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçabilme, anjiyogenezi uyarabilme ve metastaz yapabilme sayılabilir [Weaver and Hedrick, 1997].

Hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında rolü olan proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine, tümör baskılayıcı genlerde meydana

gelen mutasyonlar ise hücre siklusunun inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olmaktadır [Vermeulen et al., 2003].

Kanserin oluşum süreci başlangıç, yükselme ve ilerleme olmak üzere üç aşamadan meydana gelir (Şekil 2.1). Başlangıç aşaması, hızlı ve geri dönüşümü olmayan bir süreçtir. Hasara uğrayan DNA'nın onarımı gerçekleşmediği takdirde klonal yayılmayla hücre çoğalmaya başlar ve yavru hücrelere hasarlı DNA aktarılır [Farber, 1984], [Oliviera et al., 2007]. Başlangıç aşamasında, sadece simetrik hücre bölünmesi gerçekleşir ve bu da farklılaşmış yavru hücrelerin aksine benzer tipte iki hücre oluşumunu uyarır. Eğer bu hücreler çevredeki hücreler tarafından baskılanırsa tümör oluşmaz. Diğer yandan çevredeki hücrelerin baskılayıcı etkisini ortadan kaldıran ajanlar tetiklenirse, farklılaşmayan başlangıç hücresi çoğalarak dokuda birikir. Bu aşamaya yükselme evresi denir [Trosko et al., 1996]. Başlangıç hücresine diğer genetik ve epigenetik değişimlerin de eklenmesiyle, başlangıç hücresi birikir ve diğer dokulara metastaz yapabilir. Bu aşama ilerleme aşaması olarak kaydedilmiştir [Pitot et al., 1981]. İlerleme aşamasında hücre proliferasyonu uyarıdan bağımsızdır ve bu aşamanın karakteristik özellikleri hızlı gelişim, invazyon, metastaz, anjiyogenez, biyokimyasal, metabolik ve morfolojik özelliklerde değişim olarak sıralanabilir [Folkman., 2002].



Şekil 2.1: Kanser oluşum süreci.

2.2. Hepatoselüler Karsinoma

Hepatoselüler karsinoma, dünyada erkekler arasında en sık görülen beşinci, kadınlar arasında ise yedinci kanser türüdür. Kansere bağlı ölümlerde ise üçüncü

sıradadır [Jemal et al., 2011]. Erkeklerin hepatoselüler karsinomaya yakalanma riski kadınlardan 2-7 kat daha fazladır [McGlynn et al., 2001], [Parkin et al., 2002]. Bunun nedenleri arasında erkeklerin daha fazla sigara ve alkol tüketmesi, kadınlarda östrojen hormonunun interlökin(IL)-6 aracılı inflamasyonu baskılayarak karaciğer hasarını azaltması ve erkeklerde testosteron hormonunun androjen reseptör sinyalini arttırarak karaciğer hücre proliferasyonunu teşvik etmesi gösterilmektedir [Yu and Chen, 1993], [Naugler at al., 2007]. Özellikle Afrika ve Asya'da yüksek oranda Hepatit B virüsü enfeksiyonları görüldüğü için ve aflatoksin B1 alımından dolayı bu bölgelerde hepatoselüler karsinoma daha sık görülmektedir [El Serag and Rudolph, 2007], [El-Serag, 2011]. Hepatoselüler karsinomanın oluşumundan sorumlu başlıca faktörler; Hepatit B ve Hepatit C virüsü enfeksiyonu, alkol ve sirozdur. Diğer risk faktörleri ise; alkol kullanımına bağlı olmayan karaciğer yağlanması, sigara kullanımı, diabetes mellitus, bazı metabolik hastalıklar (hemokromatosiz, alfa 1 antitiripsin eksikliği) ve aflatoksindir [Bosch et al., 2004].

Hepatokarsinogenezisin epigenetik ve genetik olayların birikmesi sonucu oluşan, kompleks ve çok aşamalı bir süreç olduğu düşünülmektedir [Kojiro and Roskams, 2005]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, hücre siklusu ve apoptozu düzenleyen onkogenler ve tümör baskılayıcı genler ile hepatoselüler karsinomanın gelişimi arasındaki ilişki üzerine odaklanmıştır. p53, b-Catenin, ErbB ailesi, Igf sinyal yolağı ve Hippo yolağı üzerinde yoğunlaşılan başlıca yolak ve moleküllerdir [Villanueva et al., 2007], [Aravalli et al., 2008].

2.3. Hepatoselüler Karsinomada Tedavi Yöntemleri

2.3.1. Konvansiyonel Tedaviler

Hepatoselüler karsinomada erken evrede tercih edilen ilk yöntem rezeksiyondur [Belghiti et al., 2002]. Rezeksiyon işlemi sirozu olan hastalarda yapılmamaktadır. Ayrıca portal hipertansiyonu olan, bilirübini yüksek ve birden fazla lezyon bulunması halinde hastalara işlemi tolere edemeyecekleri için rezeksiyon yapılmaz. Ancak rezeksiyon işleminin ardından kanser 5 yıl içinde %70'lere kadar nüksedebilmektedir [Imamura et al., 2003].

Barselona Karaciğer Kanseri Kliniğine göre erken evrede tanı konulan hastaların %30-40'ı tümörlü parçanın alınması (rezeksiyon), karaciğer nakli ve lokal ablasyon gibi iyileştirme potansiyeli olan yaklaşımlara uygundur [Llovet et al., 1999]. Cerrahi müdahaleye uygun olmayan hastalara perkütan alkol enjeksiyonu, radyofrekans ablasyonu, transarteriyal kemoembolizasyon ve kemoterapi gibi tedaviler uygulanmaktadır [Wörns and Galle, 2010].

Karaciğer nakli yapılacak hastaların seçiminde Milan Kriterleri uygulanmaktadır. Buna göre hastada bir bölgede tümör bulunuyorsa boyutu 5 cm'den, üç farklı bölgede tümör bulunuyorsa her birinin boyutu 3 cm'den küçük olmalıdır. Bu kriterlere uyan hastalarda karaciğer nakli başarılı sonuçlar vermekte ancak uygun donör bulmakta zorluk çekilmektedir [Mazzaferro et al., 1996], [Bishayee et al., 2009].

Perkütan alkol enjeksiyonunda deriden direkt olarak tümöre alkol verilerek koagülasyon nekrozuna (sitoplazmik proteinlerin denatürasyonu) yol açılır. Perkütan alkol enjeksiyonu, tümör boyutu 3 cm'den küçük olan hastalarda yüksek başarı gösterirken tümör boyutu arttıkça bu başarı azalmaktadır. Radyofrekans ablasyonu genellikle perkütan alkol enjeksiyonu yöntemiyle bir arada kullanılır. Tümör boyutu 5 cm'den küçük olan hastalarda olumlu sonuçlar vermektedir [Livraghi et al., 2003].

Transarteriyel kemoembolizasyon yönteminde genellikle lipiodol emülsiyonu kemoterapötik bir ajanla (doksorubisin, cisplatin gibi) birlikte kullanılır. Transarteriyel kemoembolizasyon uygulanan hastaların ancak %15-55'i tedaviye cevap vermektedir [Llovet and Bruix, 2003], [Marelli et al., 2007].

Kemoterapi genellikle metastatik ve tekrarlayan hastalıklar için kullanılmaktadır. Doksorubisin, platinum, floropirimidin ve gemsitabin gibi terapötik ajanlar tek başlarına kullanıldıklarında %10'dan az yanıt sağlayabilmektedirler. Kombine şekilde uygulandıklarında da ancak %20 civarında yanıt verilmektedir. Buna karşılık tedaviye bağlı gelişen toksisite, iyileştirme oranından çok daha fazladır [Yen et al., 2010].

2.3.2. Bitkisel Kökenli Maddelerin Kanser Terapilerinde Kullanımı

Son yıllarda, konvansiyonel kanser tedavilerinde başarı oranının düşük olması, hastalığın çoğunlukla nüksetmesi ve çeşitli yan etkilerin ortaya çıkmasından dolayı

sağlıklı bir diyetle besin terapisi uygulanarak destek terapi yolları aranmaktadır [Venugopal and Liu, 2012].

Besin maddelerinin insan sağlığı üzerindeki etkileri yapılan çalışmalarla kesin olarak belirlenmiştir. Bu maddelerin bir kısmının, oksidatif süreci inhibe ettiği, anti-inflamatuar ve anti-kanser özellikler gösterdiği yapılan *in vitro* çalışmalarla desteklenmiştir [Yadav et al., 2009]. Anti-kanser özellik gösteren, bitkilerde kendiliğinden doğal olarak oluşan kemopreventif maddeler, insanlar tarafından yaygın bir şekilde gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır. Bu maddelerden bazıları; yeşil çaydan ekstrakte edilen kateşin, likopen, soya izoflavonu, nar fenolikleri, selenyum, E vitamini, D vitamini, zerdeçal, silibinin ve resveratroldür [Athar et al., 2007].

Bitki ve sebzelerdeki antioksidan maddeler fitokimyasal olarak adlandırılmaktadır [Liu, 2004]. Meyve, sebze ve tahıllarda 5000'den fazla fitokimyasal tanımlanmıştır. Bunlar genel olarak karotenoidler, alkoloidler, fenolikler, nitrojen içeren bileşikler ve organosülfür bileşikleri olarak sınıflandırılır. Fitokimyasalların diyete eklenmesiyle kanser engellenebilir veya ilerlemesi durdurulabilir [Liu, 2004].

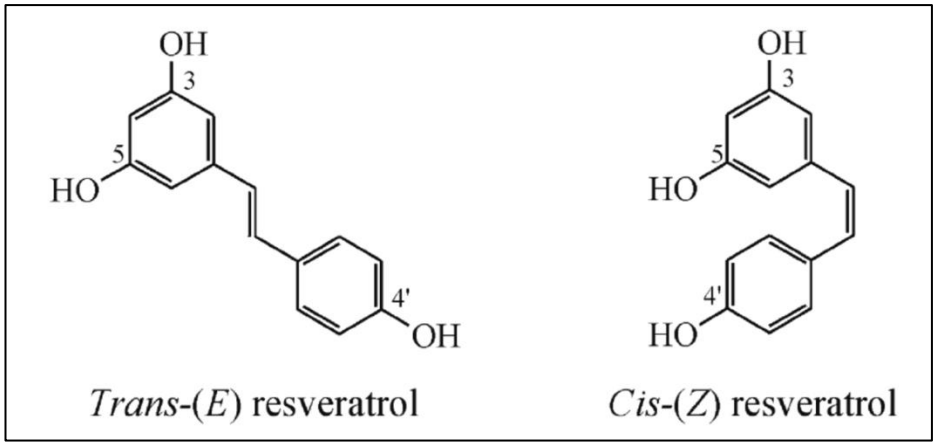
Yapılan çalışmalar fitokimyasalların, serbest radikalleri tutucu, gen ifadesini, hücre farklılaşmasını, onkogenleri, tümör baskılayıcı genleri düzenleyici, hücre siklusunda tutuklanmayı ve apoptozu indükleyici, detoksifikasyon, oksidasyon ve redüksiyonda enzim aktivitesini modüle eden, immün sistemi uyaran, hormon bağımlı karsinogenesisi düzenleyici ve antibakteriyel, antiviral etkiler gösterdiklerini bildirmektedir [Liu, 2004].

2.3.2.1. Resveratrol

İlk olarak 1940'da *Veratrum grandiflorum* bitkisinin köklerinde keşfedilen resveratrol, daha sonra 1963'te Çin ve Japonya'da ilaç olarak kullanılan yabani bir bitki olan *Polygonum cuspidatum'*dan izole edilmiştir [Chun-Fu et al., 2013]. Polifenolik bir bileşik olan resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) doğada 70'den fazla bitki türünde üretilen bir fitokimyasaldır. Üzüm, kırmızı şarap, dut, ananas ve yer fıstığı resveratrol içeren yenilebilir kaynaklardır [Stocco et al., 2012].

Bazı bitkiler, çevresel stres ve patojenik (bakteriyel, fungal) enfeksiyonlara maruz kaldığında fitoaleksin olarak resveratrol üretirler [Michels et al.,2006]. Fitoaleksinler, patojenlerin hücre duvarını yıkıp çoğalmalarını engellemek amacıyla üretilen toksik bileşiklerdir [Venugopal and Liu, 2012].

Resveratrolün, *cis* ve *trans* olmak üzere iki stereoizomerik formu vardır (Şekil 2.2). Cis ve trans resveratrol bitkilerde doğal olarak üretilmekte ve her ne kadar trans izoform aktivitesi henüz geniş çapta araştırılmamış olsa da bu iki izoformun etkilerinin benzer olduğu görülmektedir [Borriello et al., 2010].



Şekil 2.2: Trans- ve cis- resveratrolün kimyasal yapısı.

Resveratrol, çok iyi bir antioksidan aktiviteye ve anti-inflamatuar etkiye sahiptir. Hücre zarındaki lipit peroksidasyonuna ve reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu DNA hasarına karşı da koruyucudur [Leonard et al., 2003). Ayrıca yapılan çalışmalar, resveratrolün anti-kanser [Baur and Sinclair, 2006], anti-diabetik [Deng et al., 2008] ve anti-viral [Docherty et al., 2006] özellikleri olduğunu, yaşlanmayı geciktirdiğini [Labinskyy et al., 2006], ve koroner kalp hastalıklarındaki önleyici etkilerini göstermektedir [Hao and He, 2004]. Bunun yanı sıra resveratrolün hücre siklusunda tutuklanmaya neden olduğu, apoptozu indüklediği, kanser hücrelerinin çoğalımını ve ilerlemesini engellediği de bildirilmiştir [Fulda and Debatin, 2004], [Hsieh et al., 2005].

Araştırmacılar yaptıkları *in vitro* çalışmalarda resveratrol uygulamasının, insan kolon kanseri DLD1 ve HT29 hücre hatlarında hücre ölümünü indüklediğini [Trincheri et al., 2007], östrojen pozitif (MCF-7) ve östrojen negatif (MDA-MB-231) meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu gerilettiğini [Su et al., 2007], B103

nöroblastoma hücrelerinde mitokondriyal yolağı indükleyerek hücreleri apoptoza götürdüğünü [Rahman et al., 2012], MOLT-4 insan T-hücre akut lenfoblastik lösemi hücrelerinde sağ kalımı düşürdüğünü, Bax, p53, p21waf pro-apoptotik faktörleri arttırdığını ve PI3K-Akt aracılı apoptoz yolağını indüklediğini [Cecchinato et al., 2007] göstermiştir.

Diğer *in vitro* çalışmalar resveratrolün doz ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunda düşüşe, kaspaz bağımlı apoptozda artışa, G_0/G_1 fazında hücre siklusunda tutuklanmaya, kanser hücresi büyüme faktörlerinin ifadesinde azalmaya etkisi olduğunu göstermişlerdir [Benitez et al., 2007].

Resveratrolün insan kan kanseri T24 hücre hattında Bcl-2 ailesi proteinlerini düzenleyerek kaspaz 9 ve kaspaz 3'ün aktivasyonunu sağlayarak apoptozu indüklediği ayrıca p21'i aktive edip siklin D1, siklin bağımlı kinaz 4 ifadesini azaltıp retinoblastomayı fosforlayarak G1 fazında tutuklanmaya yol açtığı rapor edilmiştir [Bai et al., 2010].

Yapılan çalışmalar resveratrolün, hücrenin sağ kalımını teşvik ettiğini ve yaşam süresini arttırdığını göstermektedir. Bu etkiler resveratrolün COX-1 (cyclo-oxygenase-1), COX-2, NAD^+-bağımlı histon deasetilaz SIRT1 (sirtuin 1) ve QR2 (quinone reductase 2) gibi farklı enzimleri hedef alarak pleiotropik etkileşimler sonucu meydana gelmektedir [Calamini et al., 2010]. Resveratrolün yüksek ilgi gösterdiği QR2 ise mitomycin C'nin prodrug aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır [Jamieson et al., 2006].

Resveratrol, *Helicobacter pylori*'nin replikasyonunu inhibe ederek mide kanserine karşı korucuyu görev yapmaktadır [Mahady and Pendland, 2000].

Resveratrol uygulanan birçok hücre tipi hücre siklusunda tutulma, mitotik inhibitör p21'in birikmesi ya da tümör baskılayıcı p53 ifadesinin artması şeklinde cevap vermiştir. Prostat kanseri hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada ise resveratrol indüklü apoptozun p53 ve baskılanmış p21 proteini ifadesinden bağımsız olduğu rapor edilmiştir [Xiangming et al., 2000], [Joe et al., 2002].

Birçok çalışma resveratrolün hücresel sinyal yolağındaki etkisinin protein tirozin kinaz (PTK), PKD, PKC, Akt/PKB, Ikb kinaz ve siklin bağımlı kinaz aktivitelerini inhibe etmesiyle gerçekleştiğini göstermektedir [Slater et al., 2003]. PKC aktivitesinin inhibe edilmesi hücrede antiproliferatif etki yapmaktadır. Gastrik adenokarsinoma KATO-III hücreleri ile yapılan çalışmada resveratrol, PKC

aktivitesini inhibe ederek hücrelerde antiproliferatif ve pro-apoptotik etkilere neden olmuştur [Atten et al., 2005].

Resveratrolün tolere edilmesi konusunda nadiren de olsa mide bulantısı ve hafif baş ağrısıyla birlikte yüksek dozda kullanımında diyare rapor edilmiştir. Bu yan etkiler günlük tek doz kullanımında meydana gelmektedir. Yapılan bir çalışma bir hafta boyunca günde 2 kere 2000 mg resveratrol kullanımı istatistiksel olarak klinik bir etkiye sahip olmasa da bilirubin ve potasyum konsantrasyonunda artışa sebep olmuştur [La et al., 2010]. 4 hafta boyunca günde 1000 mg'lık doz ise bilirubin konsantrasyonunda değişikliğe sebep olmamıştır [Chow et al., 2010], [Chachay et al., 2010].

Günümüzde kanser ve insülin duyarlılığı üzerine resveratrol kullanılarak yapılan klinik çalışmalar sınırlı olsa da genel sağlık durumunun iyileştirilmesi ve kronik hastalıkların engellenmesi konusunda birçok çalışma yapılmakta ve resveratrol kullanımı uygun bulunmaktadır [Wu et al., 2013].

Güvenli ve uygun doz belirlenmesi üzerine birçok çalışma yapılmıştır. 8 sağlıklı insanda yapılan çalışmada günde 2 kere yemekle birlikte 2000 mg kapsül alımı sonucu resveratrol tolere edilebilmiş fakat 8 kişiden 6'sında diyareye sebep olmuştur [La et al., 2010]. 40 sağlıklı insanda yapılan başka bir çalışmada ise günde 6 kere 25, 50, 100 ve 150 mg'lık kapsül kullanımında tekrarlanan dozlar tolere edilebilmiş ancak resveratrol konsantrasyonu plazmada yüksek seviyeye çıkamamıştır [Almeida et al., 2009]. Yine 40 sağlıklı insan üzerinde denenen bir çalışmada 29 gün boyunca günde bir defa olmak üzere 0.5, 1.0, 2.5 ve 5.0 g'lık tabletler denenmiş ve resveratrolün IGF-1 ve IGFBP-3'ün seviyesini düşürdüğü böylelikle kimyasal maddelerin zararlarının engellenmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca resveratrolün güvenli olduğu ama yüksek dozlarda bazı gastrointestinal semptomlara neden olduğu ve plazmadaki metabolitlerin normal seviyeden fazla olduğu bildirilmiştir [Brown et al., 2010]. Bir diğer çalışmada 40 sağlıklı insana günlük tek doz olmak üzere 0.5, 1, 2.5 ve 5 g'lık kapsüller verilmiştir. Bu çalışmada 5 g'a kadar resveratrol alımının güvenli olduğu, resveratrolün 1,5 saat içinde kanda en yüksek değere ulaştığı rapor edilmiştir. Ayrıca resveratrolün vücuttan atılımının hızlı olduğu bu sebeple yüksek dozdaki resveratrolün kimyasal maddelere karşı koruyu özelliğinin yetersiz olabileceği düşünülmektedir [Boocock et al., 2007].

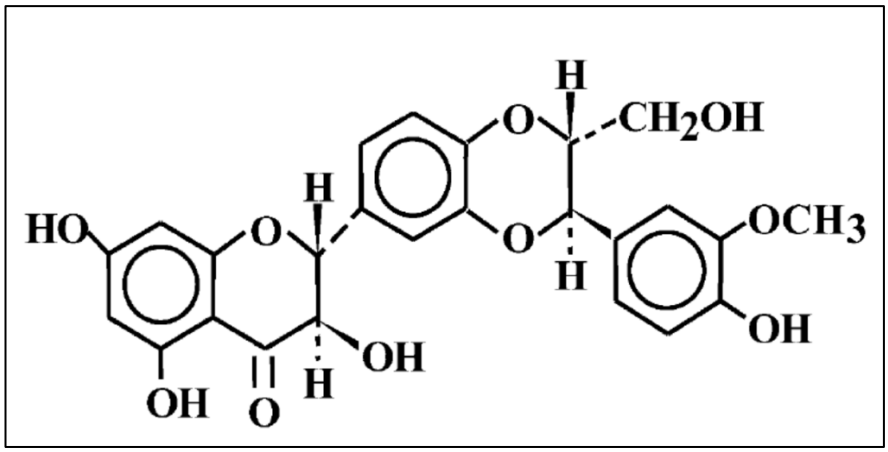
Kolon kanseri hastalarıyla yapılan bir çalışmada 80 g üzüm tozu (grape powder) suda çözülerek hastalara verilmiştir. Bu düşük dozda uygulama sonucu resveratrol diğer biyoaktif bileşiklerle birlikte hücre dışı sinyallerin hücre yüzeyindeki reseptörlere iletimini sağlayan Wnt yolağını inhibe etmiştir. [Nguyen et al., 2009]. Kolon kanseri hastalarıyla yapılan bir başka çalışmada ise hastalara 8 gün boyunca 0.5 ve 1 g'lık dozlar uygulanmış ve tümör hücrelerinin proliferasyonunun %5 gerilediği tespit edilmiştir [Patel et al., 2011].

Birey sağlığı açısından yüksek yağ içeren bir beslenmede günlük 240 ml kırmızı şarap tüketimi beslenmeye bağlı endotelyal fonksiyon bozukluğunu gidermektedir. Ayrıca yüksek miktarda resveratrol içeren kırmızı üzüm polifenol ekstraktı kalp damar hastalarının endotelyal fonksiyonunu iyileştirebilmektedir. Mor üzüm suyu tüketilmesi trombosit kümelenmesini ve süperoksit üretimini azaltmaktadır [Gresele et al., 2011].

2.3.2.2. Silimarin

Silybum marianum (Deve dikeni) bitkisinden izole edilen silimarin, antioksidan özellik gösteren bir polifenolik flavonoid'dir [Singh and Agarwal, 2004]. Deve dikeni bitkisinin tohumları 2000 yılı aşkın süredir Avrupa ve Asya'da hepatit ve siroz gibi çeşitli karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalar silimarinin anti-inflamatuar, anti-lipit, anti-karsinojenik etkilerini ortaya koymasının yanı sıra, membran stabilizasyonunu ve karaciğeri koruyucu rol oynadığını göstermiştir [Ramasamy and Agarwal, 2008].

Silimarin; silibinin, izosilibinin, silidianin ve silichristin bileşenlerini içermektedir. Silimarinin yaklaşık %60-70'ini oluşturan ana bileşeni silibinindir (Şekil 2.3), [Wu et al., 2009].



Şekil 2.3: Silibinin kimyasal yapısı.

Birçok çalışma silimarinin prostat, meme, ovaryum, kolon ve akciğer gibi farklı kanser türlerinde hücre siklusunun G1/S fazında tutukluğa yol açarak hücre proliferasyonunu baskıladığını göstermiştir [Agarwal et al., 2006], [Deep and Agarwal, 2007], [Hogan et al., 2007].

Silibininin karsinogenezisi nasıl engellediğine dair birçok mekanizma öne sürülmüştür. Bu mekanizmalar arasında tirozin kinaz reseptörü ve erbB1 sinyalinin baskılanması, kanser hücresinin büyümesini inhibe eden ve hücre siklusunun ilerlemesinde sorun yaratan [Ahmad et al., 1998], [Zi et al., 1998], kanser hücrelerinin farklılaşmasını [Zi and Agarwal, 1999] ve anti-angiogenezisi indükleyen siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin ifadelerinin artması yer almaktadır [Jiang et al., 2000]. Önemli bir diğer bulgu da silibininin birçok normal ve malignant hücrede farklılaşmayı etkileyen, apoptozu inhibe edebilen ve hücrenin sağ kalımında rol oynayan IGF (insülin-like growth factor) sistemini modüle edebildiğidir [Butt et al., 1999], [Samani et al., 2004].

Prostat kanseri (PCA) ile yapılan bir çalışmada silibinin uygulanması sonucu mitojenik sinyallerin ve hücre sağ kalım sinyallerinin inhibisyonunu da içeren birçok moleküler olayda değişiklik meydana geldiği tespit edilmiş ve hayvan çalışmalarında toksik bir etkiye rastlanmamıştır. Prostat tümörlerinde kullanılan ilaçlar EGFR-, IGFR-, ve NF-kB aracılı sinyal yolaklarını seçici olarak inhibe etmektedir. Ancak bu sinyal yolakları normal dokuların kontrollü büyümesi ve fizyolojisi için gereklidir. Bu nedenle silibinin normal prostat epitel hücrelerinde denenmiş ve bu hücrelerin büyümesini etkilemediği gösterilmiştir [Singh and Agarwal, 2004].

İnsan karaciğer kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada ise silibinin uygulanmasının, Ki-67 ifadesinde azalma, hücre siklusunda G1-S geçişinde tutuklanma ve apoptozun indüklenmesi ile karaciğer kanseri hücrelerinin büyümesinde inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir. Silibinin bu etkilerinin, PTEN (phosphatase ve tensin homolog) aktivitesini arttırıp, p-Akt üretimini azaltarak kanser gelişiminde gerekli olan PTEN/PI3K/Akt yolağında değişime neden olmasıyla sağladığı belirtilmektedir [Lah et al., 2007].

Zhang ve arkadaşları, HeLa hücre hattında silibininin hücre siklus kinazlarından CDK1 ve CDK2'nin ifadelerini azaltarak hücre siklusunda G2/M evresinde tutuklanmaya neden olduğunu ancak siklin A ve siklin B1 proteinlerinin ifadesinde hiçbir değişik gözlenmediğini önemle vurgulamışlardır. Ayrıca, silibininin Bcl-2/Bax oranını önemli ölçüde azaltarak mitokondri aracılı, Fas ve Fas-L ifadelerini arttırarak da ölüm reseptörü aracılı apoptotik yolağı indüklediğini bildirmişlerdir [Zhang et al., 2012].

Deve dikeni ekstraktı uzun yıllardan beri hamile kadınlar, çocuklar [Ladas et al., 2006] ve diğer yetişkinler tarafından güvenli bir şekilde kullanılmaktadır. Hamile kadınlarda günde 560 mg, çocuklarda mantar zehirlenmesi durumunda 20-50 mg/kg, yetişkinlerde ise günde 420 mg şeklinde kullanılan dozlarda herhangi bir toksik etki görüldüğü bildirilmemiştir [Allain et al., 1999].

2.4. Kanser Terapileri Sonrası Hücre Ölüm Mekanizmaları

2.4.1. Nekrotik Hücre Ölümü

Patolojik ve pasif bir hücre ölüm şekli olan nekrotik hücre ölümü, hipoksi, iskemi, toksik maddeler ve hücresel hasar sonucu tetiklenir [Leist and Jaattela, 2001]. Morfolojik olarak, mitokondriyal ve hücresel şişme, membran geçirgenliğinin artması ve sitoplazmik vakuollerin oluşumu nekrotik hücre ölümünün en belirgin özellikleridir [Mehendale et al., 1994], [Edinger and Thompson, 2004]. Nekrotik hücre ölümünde apoptozun aksine kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentleri oluşmaz. Nükleus şişmiştir ve bir bütün halinde bulunur [Kitanaka and Kuchino, 1999], [Los et al., 2002], [Lockshin and Zakeri, 2004]. Plazma membranı bütünlüğünü kaybeder, hücre şişer patlar ve hücre içeriği ortama salınır. Bu durum

inflamasyonun uyarılmasına sebep olur [Edinger and Thompson, 2004]. Farmakolojik kaspaz inhibitörleriyle uygulanan kemoterapi, nekrotik hücre ölümünü indükleyebilmektedir [Amaravadi and Thompson, 2007].

2.4.2. Otofaji

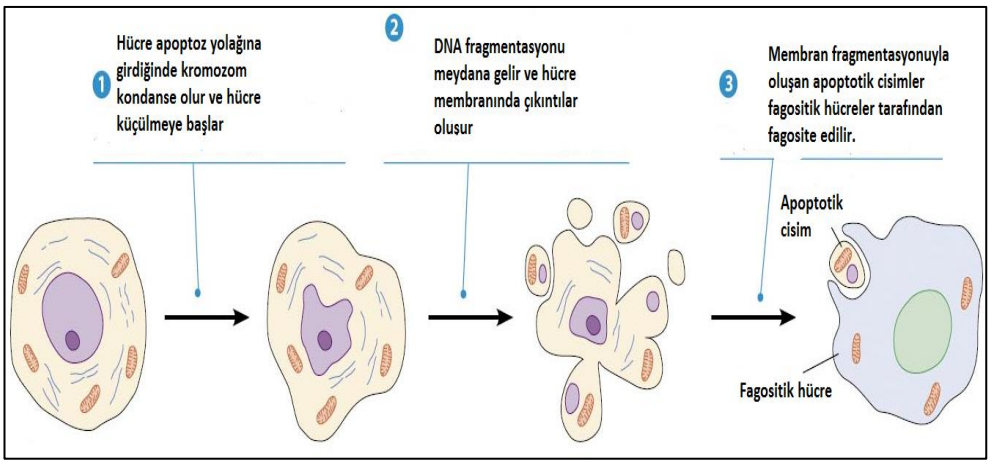
Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin çift membranlı veziküller içine alınmasının ardından bu veziküllerin lizozomlarla birleşmesi ve burada yıkıma uğratılmasıdır. Uzun ömürlü proteinler ve organeller otofaji sistemi tarafından parçalanırlar ve oluşan yapı taşları hücre kullanımı için yeniden kazandırılır [Ohsumi, 2001], [Shintani and Klionsky, 2004].

Açlık, hipoksi ve çeşitli stres koşulları otofajik aktiviteyi uyarmaktadır [Shang and Wang, 2011]. Yapılan ilk çalışmalarda otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres ortamına uyumuna yardım ettiği böylelikle hücre homeostazisinin korunmasında etkili bir yol olduğu gösterilmiştir [Ohsumi, 2001], [Shintani and Klionsky, 2004]. Son on yılda yapılan çalışmalar ise otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenezis, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili bir rol oynadığını ortaya koymuştur [Shintani and Klionsky, 2004], [Mizushima et al., 2008]. Ayrıca araştırmalar, otofaji anormalliklerinin, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının da nedenleri arasında yer aldığını göstermektedir [Yang and Klionsky, 2010].

Apoptozun mümkün olmadığı durumlarda uyarıcının türü, süresi ve miktarı gibi değişkenlere bağlı olarak otofajik hücre ölümü meydana gelir. Ölüm kaspazlara bağlı olmadığından DNA fragmetleri ya da apoptotik cisimcikler oluşmamaktadır. Ayrıca ölü hücrelerin fagosite edilmesi de apoptoza göre çok daha geç ve düzensiz bir şekilde gerçekleşir [Lockshin and Zakeri, 2007]. Klinik çalışmalarda chloroquine türevleri ile kombine edilen terapilerin otofajiyi indüklediği bildirilmiştir [Amaravadi and Thompson, 2007].

2.4.3. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü)

Apoptozis terimi (Yunanca: apo= ayrı ve ptosiz= düşen) ölmekte olan hücrelerin morfolojik özelliklerinin baz alınmasıyla oluşturulmuştur. Bu özellikler; hücresel büzülme (küçülme), kromatin kondensasyonu, DNA fragmentasyonu, hücre membranında çıkıntıların oluşması ve membran fragmentasyonu ile apoptotik cisimciklerin oluşmasıdır (Şekil 2.4), [Kerr et al., 1972], [Edinger and Thompson, 2004]. Apoptozis sırasında hücre membranı asimetrisini kaybeder ve fosfotidilserinler membranın dışına transloke olur. Fosfotidilserinlerin membran dışına çıkması makrofajlara 'beni ye' sinyalini verir. Bu şekildeki hücre ölümü inflamasyonu uyarmaz [Fadok et al., 2000].



Şekil 2.4: Apoptozda morfolojik özelliklerin değişim süreci.

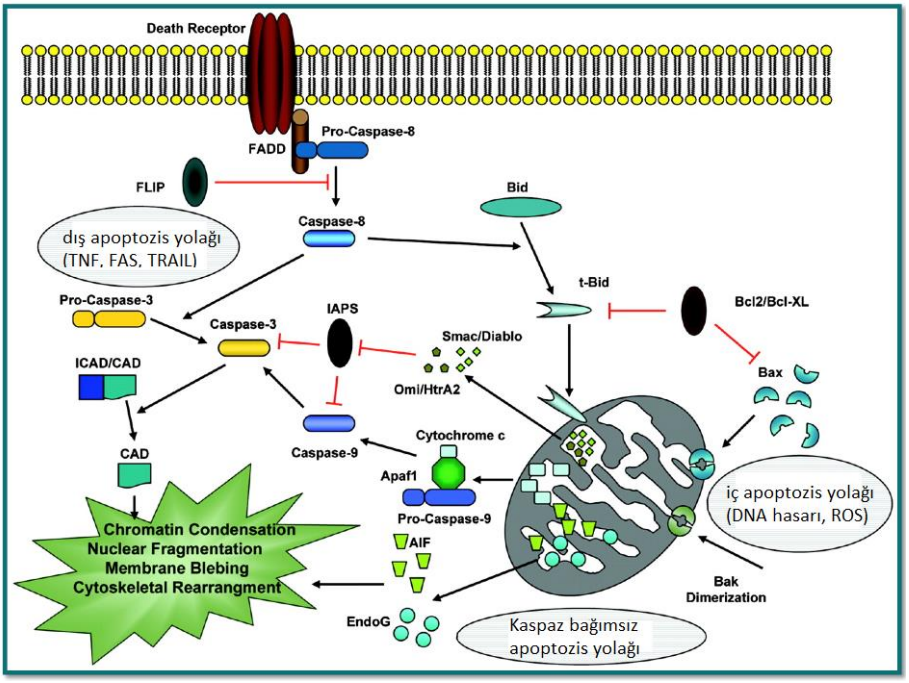
Apoptozis ATP gerektiren, programlanmış hücre ölümüdür [Edinger and Thompson, 2004]. Dışsal ve içsel apoptozis olmak üzere iki farklı yolak vardır (Şekil 2.5). Büyüme faktörü eksikliği, DNA hasarı, oksidatif stres veya onkogen aktivasyonu mitokondri zarının geçirgenliğini değiştirerek hücre içi stres sinyallerine sebep olur. Mitokondri zarının geçirgenliğinin değişmesi ile sitokrom c ve diğer pro-apoptotik proteinler ortama salınır. Sitokrom c'nin mitokondriden salınması, pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler içeren Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenir [Wei et al., 2001]. DNA hasarı veya hücresel stres durumunda tümör baskılayıcı protein p53, proapoptotik Bcl-2 proteinlerinin transkripsiyonunu aktive ederek hücreyi apoptoza teşvik eder [Vousden and Lane, 2007]. Pro-apoptotik proteinlerden Bax ve Bak mitokondride yetersiz ya da kusurlu (deficient) haldeyse

sitokrom c salınımı gerçekleşmez [Wei et al., 2001]. Bax ve Bak proteinlerinin mitokondri zarında geçirgenliğin indüklenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir [Kuwana et al., 2002]. Bax ve Bak proteinleri BH3 ailesi üyeleri (Bid, Bim, Bad, Noxa, Puma) tarafından aktive edilir. Bu aktivasyon için iki model önerilmektedir. Birincisi; birkaç peptid anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerine (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1) bağlanarak bu proteinler üzerinde inhibe edici etki göstermektedir. Diğer görüş ise BH3 proteinlerinin direkt olarak Bax ve Bak proteinlerine bağlanarak aktive ettiği yönündedir [Letai et al., 2002], [Chen et al., 2005]. Mitokondriden salınan sitokrom c, Apaf-1 ve pro-kaspaz 9'a bağlanarak apoptozom denilen yapıyı oluşturur. Pro-kaspaz 9 apoptozom içinde aktif hale gelerek efektör kaspazların aktivasyonunu sağlar [Stennicke et al., 1999], [Pop et al., 2006].

Fas, TNFα veya TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) gibi hücre dışı ligandlar, reseptörleriyle bağlandıktan sonra hücre içi ölüm bölgeleri olan FADD (Fas associated death domain) ve TRADD (TNFR-1 associated death domain) ile etkileşime girerler [Kischkel et al., 1995], [Nagata, 1997]. Bu ölüm bölgeleri prokaspaz 8 ve prokaspaz 10 ile birleşerek ölüm indükleyen sinyal kompleksinin (DISC) oluşumunu ve bu kaspazların aktivasyonunu sağlar. Kaspaz 8 aktive olduktan sonra efektör kaspazları aktive eder ve apoptotik sürecin ilerlemesinde rol oynar. Ayrıca kaspaz 8, Bid proteinini aktif tBid formuna dönüştürerek hücre içi ve hücre dışı apoptotik yolakların çakışmasını sağlar. Bcl-2 protein ailesinden olan tBid, Bax ve Bak proteinlerine bağlı olarak gelişen mitokondriyal zar geçirgenliğinin artmasını dolayısıyla sitokrom c salınımını indükler [Boatright et al., 2003], [Donepudi et al., 2003], [Bao and Shi, 2003].

Her iki apoptotik yolakta da hücrenin degredasyonunu sağlayan efektör kaspazlar; kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7'nin aktivasyonu sağlanır. Efektör kaspazların aktivitesi IAP'nin (apoptotik protein inhibitörü) durumuna bağlıdır [Roy et al., 1997], [Eckelman and Salvesen, 2006]. IAP'ler doğrudan kaspazlara bağlanabilir ve kaspazların proteaz aktivitesini inhibe edebilirler. Bu durumda mitokondriden serbest bırakılan SMAC/DIABLO proteinleri sitosolde IAP'lere bağlanarak IAP'lerin kaspazlara bağlanmasını engellerler. Yine mitokondriden salınan serin proteaz HtrA2/Omi, IAP'leri ayırarak apoptozis üzerindeki baskısını hafifletir ve apoptotik sinyali arttırır [Du et al., 2000], [Verhagen et al., 2000], [Suzuki et al., 2001]. Mitokondriden salınan proapoptotik proteinlerden AIF (apoptoz indükleyen faktör), CAD ve endonükleaz G de apoptotik sürecin

tamamlanmasında rol oynarlar. Endonükleaz G kaspaz bağımsızdır ve kromatin yoğunlaşmasına neden olur. Aynı şekilde kaspaz bağımsız olan AIF nükleusa giderek burada kromatin yoğunlaşmasına ve DNA fragmentasyonuna neden olur [Enari et al., 1998], [Susin et al., 2000]. Hücreler çoğalırken CAD, inhibitörü ile (ICAD) kompleks halindedir. Apoptotik hücrelerde aktifleşen kaspaz-3, ICAD'ı kırarak CAD'ı serbest bırakır. CAD ise kromozomal DNA'yı parçalar ve kromatin yoğunlaşmasına sebep olur [Sakahira et al., 1998].



Şekil 2.5: Apoptozisin moleküler mekanizması.

2.4.3.1. Apoptozis Tayininde Kullanılan Yöntemler

Apoptozis tayininde morfolojik görüntüleme yöntemleri, immunohistokimyasal yöntemler, biyokimyasal yöntemler, immünolojik yöntemler ve moleküler biyoloji yöntemleri kullanılmaktadır.

2.4.3.1.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

Hematoksilen ile boyama; hematoksilen ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenir. Hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. Hematoksilen boyası kromatini

boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. İyi bir boyama yapılmışsa hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanse olması ve nükleus periferinde toplanması, nükleusun küçülmesi (pyknosis) veya parçalara ayrılması gözlemlenebilir [Mountz and Zhou, 2001], [Web 1, 2012].

Giemsa ile boyama; hematoksilen ile boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler belirlenir. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte belirgin bir üstünlüğü yoktur [Yılmaz, 2005].

Floresan mikroskobu ile apoptoz tayininde, DNA'ya bağlanabilen floresan boyalar (Hoechst boyası, DAPI '4,6-diamidine-2'-phenylindole, propidyum iyodür, akridin orange, etidyum bromür, FITC 'fluorescein isothiocyanate') kullanılmaktadır. Canlı ve ölü hücre ayrımını yapabilmek için tüm hücreleri boyayabilen bir boya ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir boya birlikte kullanılır. Bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama apoptozla veya nekrozla ölüp ölmediklerinin ayrımı yine nukleus morfolojisine bakılarak yapılır [Ulukaya, 2003], [Yılmaz, 2005].

Elektron Mikroskobu ile apoptoz tayini; morfolojik değişikliklerin en doğru gözlendiği yöntemdir. Sitoplazmik küçülme, kromatin kondensasyonu ve fragmentasyonu gözlenebilirken, mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi detaylar da incelenebilir [Doonan and Cotter, 2008].

Faz Kontrast Mikroskobu; sadece hücrelerin kültür ortamında, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Bu mikroskop ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepçikler (blebs) izlenebilir [Güleş ve Eren, 2008].

2.4.3.1.2. Histokimyasal Yöntemler

Annexin V Yöntemi, normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde bulunan membran lipitlerinden fosfotidilserinler, apoptotik sinyal alındığında hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. FITC gibi bir floresanla işaretlenen Annexin V proteini, hücre zarının dış yüzüne transfer

olan fosfotidilserinlere bağlanarak apoptotik hücrelerin tespit edilmesini sağlar [Bratton et al., 1997], [Zhang et al., 1997], [Gatti et al., 1998].

TUNEL Yöntemi, DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Apoptotik parçalanma sonucu DNA uçlarının terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretlenmesi esasına dayanır. İşaretleme ardından yapılan floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücrelerin belirlenmesini sağlar [Gavrieli et al., 1992], [Kressel and Groscurth, 1994], [Elmore, 2007].

Kaspaz-3 Yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama metoduyla belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da dokuda apoptoza yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekmektedir. Ancak, bu bilinirse apoptotik hücreler bu metodla tespit edilebilirler [Overbeeke et al., 1998].

2.4.3.1.3. Biyokimyasal Yöntemler

Agaroz Jel Elektroforezi ise DNA fragmentasyonunun gösterilebildiği bir başka yöntemdir. Apoptoziste DNA, 180-200 baz çifti ve katları şeklinde kırıldığı için merdiven görüntüsü (ladder pattern) oluşur.Bu durum apoptozun karakteristik özelliğidir ve nekrozda görülmez [Bortner et al., 1995], [Web 2, 2012].

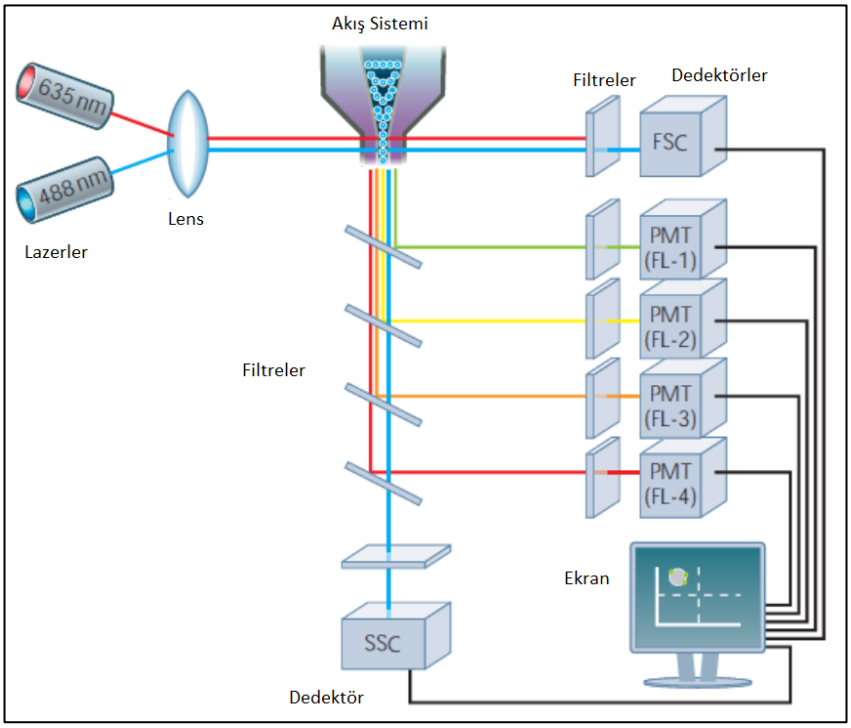
Western Blot yönteminde yönteminde ise apoptoza özgü bazı proteinlerin (Bcl-2) eksprese olup olmadıklarının ya da kırılıp kırılmadıklarının (kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom c salınımı da bu metodla belirlenebilir. Sitoplazmada sitokrom c bulunması halinde hücrelerin apoptoza gittiği anlaşılır [Güleş ve Eren, 2008].

2.4.3.1.4. Akan Hücre Ölçer (Flow Cytometry)

Akan hücre ölçerde, tek tek hücrelerden oluşan hücre süspansiyonu lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir ve geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir [Dunphy, 2004], [Web 3, 2012]. Akan hücre ölçer; hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özelliklerinin yanı sıra, hücreye bağlanan çeşitli florokromları da sinyal kaynağı olarak kullanabilir [Dunphy, 2004].

Akan hücre ölçer, ışık mikroskobu ile karşılaştırıldığında çok daha fazla hücreyi daha kısa zamanda değerlendirme fırsatı vermektedir. Akan hücre ölçer ile ortalama 10000 hücre 20 saniyede analiz edilebilmektedir [Taneli, 2007].

Akan hücre ölçer; akış sistemi, optik sistem ve elektronik sistem olmak üzere 3 ana kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2.6), [Web 6, 2013].



Şekil 2.6: Tipik bir akan hücre ölçer cihazının şematik görünümü.

Akış Sistemi, hücrelerin tek sıra halinde taşınmasını sağlayan bir kanal ve onu çevreleyen sıvıdan oluşur. Akış sistemi ile lazer ışınları tek bir hücreye düşer ve tek hücre analizi yapılır [Taneli, 2007], [Web 6, 2013].

Optik sistem, lazerlerden ve optik filtrelerden oluşmaktadır. Lazerlerin sayısı, optik filtreler ve dedektörler cihazın modeline göre değişmektedir ve cihazın analiz kapasitesini belirlemektedir [Karaboz vd., 2008], [Web 4, 2013]. Optik sistemde, saçılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayılan floresan ışığı bir araya getirilir, uygun dedektörler ve filtreler tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak sinyallere dönüştürülür. Lazer ışını ile aynı yönde yayılan ışınlar ileri saçılım kanal dedektörü (FSC: forward scatter channel) yardımıyla toplanır ve hücre büyüklüğü hakkında bilgi alınır. Eksitasyon çizgisine yaklaşık 90° açı ile yayılan ışık, yana saçılım kanal dedektörü (SSC: side scatter channel) ile toplanır. Yana saçılım

dedektörü, hücrenin granül içeriği ve iç yapısı ile ilgili bilgi verir. FSC ve SSC; kan örneğinde lenfosit, monosit ve granülositleri birbirinden ayırmak için temel analizi oluşturur [Web 6, 2013]. Hücrenin spesifik bileşenlerini boyamak için floresanla işaretlenmiş antikorlar kullanılmaktadır. Bu maddeler florokrom olarak adlandırılmaktadır. Değişik dalga boylarındaki floresan ölçümler hücre yüzey reseptörleri, sitokin ve DNA gibi moleküller hakkında bilgi verir [Deniz, 2007]. Akan hücre ölçer yardımıyla, floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzeyi proteininin saptanması mümkündür. FITC-Anneksin V, apoptotik süreçte hücre zarının dış yüzeyine transfer olan fosfotidilserinlere bağlanır ve apoptotik hücrelerin analizini sağlar [Overbeeke et al., 1998], [Web 6, 2013].

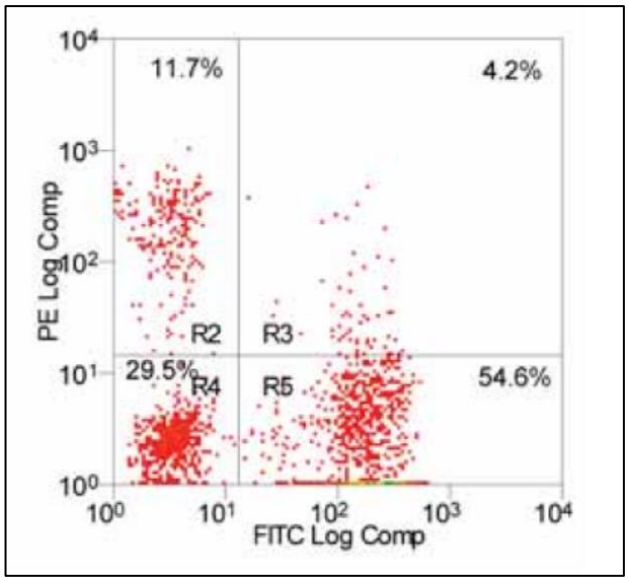
Elektronik sistemde, ışık sinyalleri dijital sinyallere çevrilir ve veriler bilgisayar sisteminde toplanarak yazılım programları ile analizi yapılır.

Akan hücre ölçerde analiz, hücre/partikül süspansiyonunun hazırlanması, hücrelerin monoklonal antikorla işaretlenmesi, cihazın kalibrasyonu, verilerin analizi ve raporlanması aşamalarını içermektedir [Web 6, 2013].

- Akan Hücre Ölçerde Verilerin Değerlendirilmesi

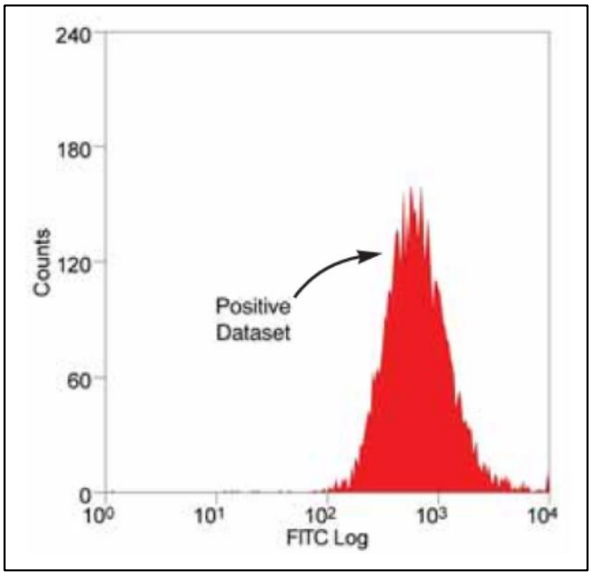
Elde edilen veriler farklı grafikler kullanılarak gösterilebilir. Bunlardan bazıları nokta alan grafikleri (dot-plot), kontur alan grafikleri, histogram, 3 boyutlu grafik, bölgeler, kapılar ve istatistik olarak sınıflandırılabilir [Web 6, 2013].

Nokta alan grafiğinde her bir nokta tek bir hücreyi göstermektedir. Bu grafikte iki farklı floresan antikoru da taşıyan hücreler belirlenir. Sağ üst kadranda her ikisinin de pozitif olduğu hücreler, sağ alt ve sol üst kadranda sadece tek bir floresan antikorunu taşıyan hücrelerin olduğu bölgeler bulunur. Sol alt kadranda her iki floresan antikoru da taşımayan hücreler vardır (Şekil 2.7), [Özdemir ve Artaç, 2013].



Şekil 2.7: Nokta alan grafiği.

Kontur alan grafikleri, benzer sayıdaki hücreleri gösteren noktaların çizgisel olarak birleştirilmesiyle oluşur. Histogramda y ekseni hücre sayısını, x ekseni analizi yapılan tek parametrenin floresan yoğunluğunu ifade etmektedir (Şekil 2.8).

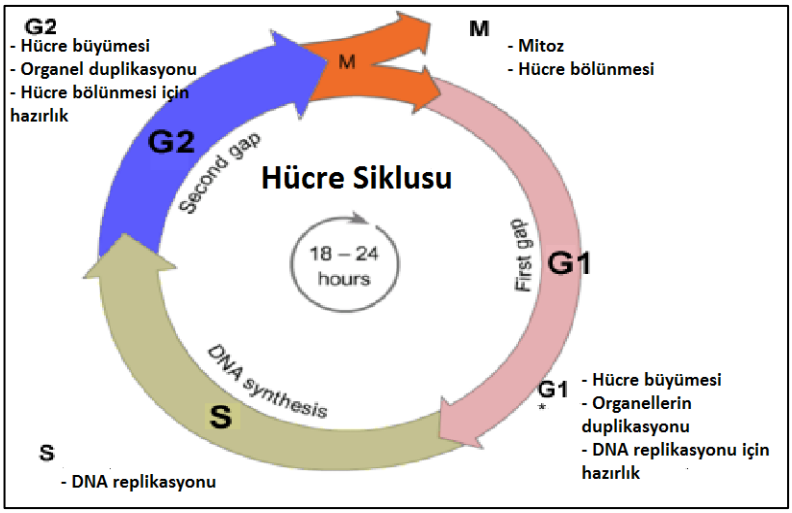


Şekil 2.8: Histogram grafiği.

Bölgeler, histogram ve nokta alanlar içinde populasyon alt gruplarının istatistiğini yapmak için kullanılırlar [Web 6, 2013]. Kapılar, FSC/SSC grafiğinde analiz edilmek istenen bölgenin seçilmesine kapılama denir [Özdemir ve Artaç, 2013].

2.5. Ökaryotik Hücre Döngüsü

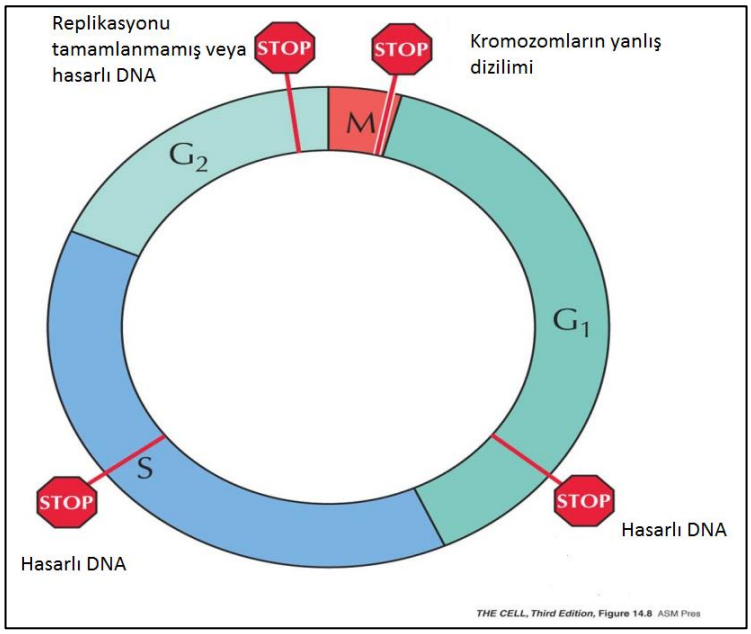
Ökaryotik hücre siklusu, çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Sürekli bölünen hücrelerde hücre siklusu mitozdan sonra G1-S-G2 ve M şeklinde tekrarlanmaktadır (Şekil 2.9). Bu süreçte hücre bölünme sinyali almakta ve büyüme meydana gelmektedir. Hücreler bölünme sinyali almadıkları sürece dinlenme evresinde (G0) durmaktadır. G1 evresinde hücreler çevrelerini kontrol etmekte, sinyalleri almakta ve büyümeyi uyarmaktadırlar. Bu evrede DNA sentezi için hazırlık yapılmakta ve RNA ile protein sentezi gerçekleşmektedir. S evresinde DNA sentezlendikten sonra G2 evresinde hücre büyümeye devam etmektedir. Aynı zamanda RNA sentezi, protein sentezi gerçekleşmekte ve hücre mitoza hazırlanmaktadır [Alarcon et al., 2004]. Mitoz evresinde ise kendini eşleyen kromozomların her birinin yavru hücreye eşit dağılımı gerçekleşmektedir [Nurse, 1994].



Şekil 2.9: Hücre siklusu.

Hücre siklusu G1 ve G2 evrelerinde bulunan kontrol noktaları (check points) tarafından düzenlenmektedir (Şekil 2.10). G1 kontrol noktası (restriksiyon noktası),

hücre büyüklüğü ve DNA hasarına karşı duyarlıdır. G1 tutuklanması DNA replikasyonunun yapılacağı S evresine girmeden önce hatanın onarılmasına izin verir. G2 kontrol noktası, replike olmamış ve hasarlı DNA'ya duyarlıdır. Replikasyon tamamlanmadan veya DNA tamir edilmeden mitoza geçişe izin verilmez. Kontrol noktasında hücre ya G0 evresine dönecek ya da siklusu tamamlayacaktır [Alarcon et al., 2004]. Ancak Chk1 proteininin kusurlu olduğu durumda DNA onarılmadan ya da replikasyonu tamamlanmadan mitoz evresine geçiş olabilir. Bu durum 'prematüre mitosis' olarak adlandırılmaktadır [Niida et al., 2005].

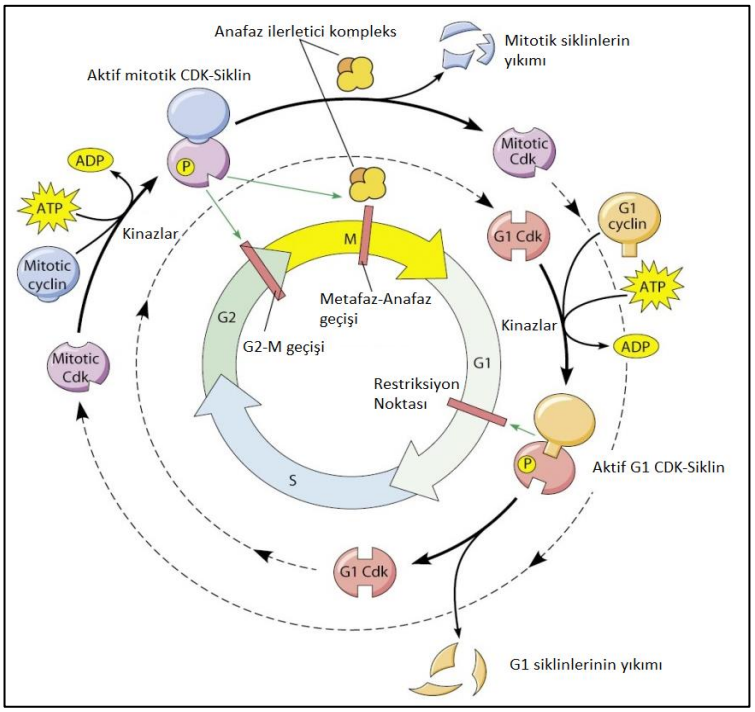


Şekil 2.10: Hücre siklusu kontrol noktaları.

Hücre siklusunda evreler arası geçiş ve siklusun tamamlanması bazı protein grupları tarafından kontrol edilir (Şekil 2.11). Bunlar, siklin proteinleri ve siklin bağımlı serin-threonin protein kinazlardır (CDK) [Morgan, 1995]. CDK'lar herhangi bir siklinle birleşmediği sürece hiçbir katalitik aktivite göstermez. CDK-siklin kompleksinin düzenleyici kısmını siklinler, katalitik kısmını ise CDK'lar oluşturur. CDK-siklin kompleksi, hücre siklusuna katılan çeşitli proteinlerin fosforilasyonuna ya da defosforilasyonuna yol açarak onların aktivitelerini düzenlerler. CDK'lar, hücre siklusu sırasında düzenli olarak fakat inaktif formda üretilmektedir. Siklinler, hücre siklusunun farklı evrelerinde sentezlenmekte ve CDK'ları aktive etmektedirler. Siklinler ve CDK'ların farklı kombinasyonları hücre siklusundaki önemli geçişlerde

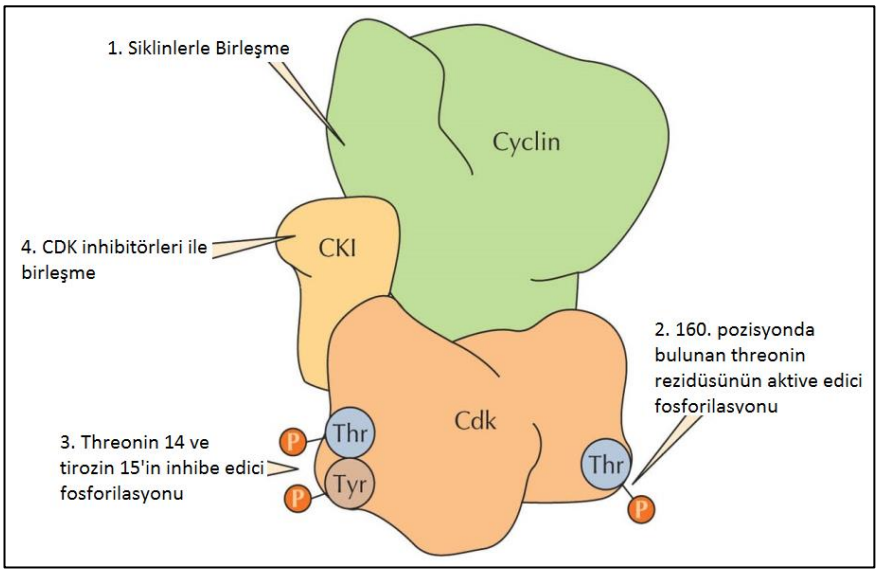
rol almaktadır [Pines, 1991]. Siklin D1, Siklin D2 ve Siklin D3 olmak üzere üç tip D siklini bulunmaktadır. Bu siklinler CDK4 ve CDK6'ya bağlanıp hücrenin G1 evresine girmesini sağlarlar [Sherr, 1994]. D siklinleri diğer siklinlerden farklı olarak sadece büyüme sinyali alındığında sentezlenen siklinlerdir [Assoian and Zhu, 1997]. Diğer bir G1 siklini olan Siklin E, CDK2 ile birleşerek G1 evresinden S evresine geçişi düzenler [Ohtsubo et al., 1995]. Oluşan SiklinD/CDK4, SiklinD/CDK6 ve SiklinE/CDK2 kompleksleri S evresine geçişte rol oynayan E2F transkripsiyon faktörüne bağlanarak inaktivasyonuna yol açan tümör baskılayıcı retinoblastoma proteinini (pRb) fosforlar ve E2F transkripsiyon faktörünün serbest kalmasıyla siklusun devam etmesi sağlanır [Harbour and Dean, 2000], [Bell and Dutta, 2002], [Cam and Dynlacht, 2003].

S evresinden G2 fazına geçiş Siklin A'nın CDK2'ye bağlanmasıyla gerçekleşmektedir [Girard et al., 1991], [Walker and Maller, 1991]. Geç G2 ve erken M evrelerinde Siklin A, CDK1 ile kompleks oluşturarak M evresine girişi teşvik eder. M evresi Siklin B ve CDK1 kompleksi tarafından düzenlenir [Arellano and Moreno, 1997].



Şekil 2.11: Hücre siklusunun düzenlenmesi.

Siklin bağlanmasına ek olarak, CDK'ların aktivasyonu korunmuş tirozin ve threonin rezidülerinin fosforilasyonu tarafından da düzenlenir. CDK1'in tamamen aktive olması için threonin 160 rezidüsünden fosforlanması gerekir (Şekil 2.12). Bu fosforlanmalar konformasyonel değişiklikleri indükleyerek siklinlerin bağlanmasını arttırıcı etki yapar [Jeffrey et al., 1995], [Paulovich and Hartwell, 1995]. Buna karşılık Wee1 ve Myt1 proteinlerinin CDK1'i tirozin15 ve threonin14 rezidülerinden fosforlaması ise CDK1'in inaktivasyonuna yol açar. CDK1'in aktive olması ve hücre siklusunun ilerlemesi için cdc25 tarafından defosforilasyonu gerekmektedir [Lew and Kornbluth, 1996].



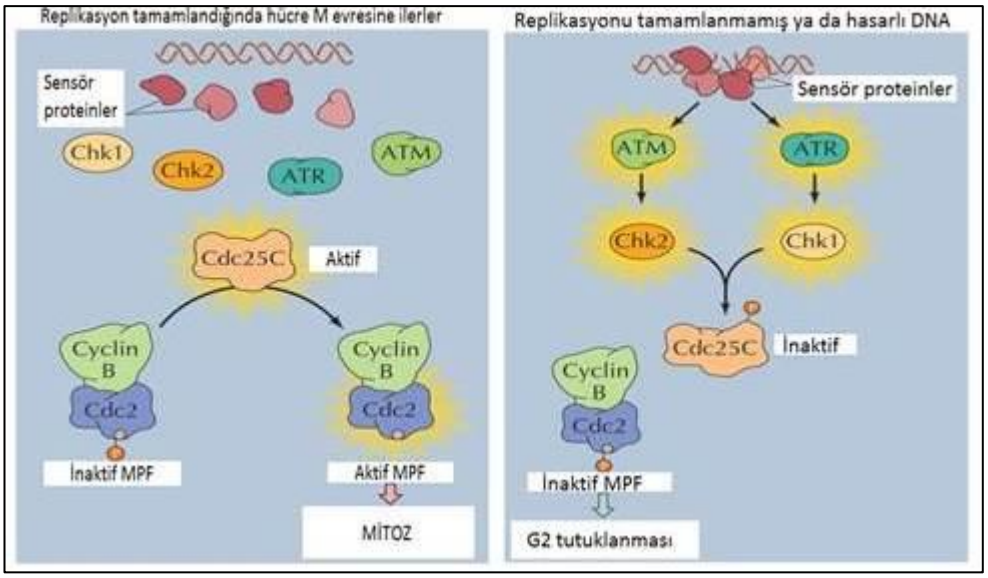
Şekil 2.12: Siklin bağımlı kinazların aktivasyonu ve inhibisyonu.

Şekil 2.12' de görüldüğü gibi CDK aktivitesi, siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin (CKI) direkt CDK'lara ya da Siklin/CDK kompleksine bağlanmasıyla da inhibe edilebilir. CDK inhibitörleri iki gruba ayrılır [Sherr and Roberts, 1995]. Birinci grup INK4 ailesidir ve p15, p16, p18 ve p19 proteinlerini içerir. Bu proteinler G1 evresinde görev alan CDK4 ve CDK6'ya bağlanarak Siklin D ile birleşmesini engellerler [Carnero and Hannon, 1998]. İkinci inhibitör grup ise Cip/Kip ailesidir ve p21, p27 ve p57 proteinlerini içerir. Bu inhibitörler CDK/Siklin komplekslerini inhibe ederler. Özellikle G1 evresindeki CDK/Siklin komplekslerini ve mitoza girişte rol oynayan CDK1/Siklin B kompleksini inhibe ederler [Hengst and Reed, 1998]. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri içerden ve dışardan gelen sinyaller tarafından düzenlenirler. Tümör baskılayıcı p53 geni p21 geninin transkripsiyonunu

düzenleyebilir. p21 geninin promotoru p53 bağlanma bölgesi içerir ve böylelikle p53, p21 geninin transkripsiyonunu aktive edebilir. p53, p21 geninin transkripsiyonunu arttırarak hücre siklusunun durdurulmasını sağlar ve hasarlı DNA'nın replike olmasını engeller [el Deiry et al., 1993].

G1/S kontrol noktasında DNA hasarı gerçekleştiğinde G1 fazında durdurulma p53 tarafından indüklenir. Genellikle p53 hücrede düşük seviyede bulunur ancak DNA hasarının gerçekleşmesi p53 aktivitesini indükler [Levine, 1997]. p53; Mdm2, p21 ve Bax genlerinin transkripsiyonlarını uyarıcı etki yapar [Agarwal et al., 1998]. p21'in indüklenmesi CDK'nın inhibisyonuna buna bağlı olarak da hücre siklusunun tutuklanmasına ve hasarlı DNA'nın replikasyonunun engellenmesini sağlar. Mdm2, p53'ün düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Mdm2, p53'e bağlanarak p53'ün übikütinasyonla proteolitik yıkımına katkıda bulunur [Oren, 1999]. Ayrıca p53, hasarlı hücrenin ölmesi için apoptotik yolakta görev alan genlerin (ör: Bax) aktivasyonunu indükler [Gottlieb and Oren, 1998]. İlaveten ATM ve ATR adı verilen protein kinazlar DNA hasarı durumunda p53'ü fosforlayarak p21 transkripsiyonunun bloklanmasına neden olurlar [Siliciano et al., 1997].

G2 evresinde DNA hasarı meydana geldiğinde p53 olsa da olmasa da hücre siklusunda tutuklanma gerçekleşir. Mitoza giriş, CDK1'in fosforlanarak inhibe edilmesi veya CDK1/Siklin B kompleksinin birbirinden ayrılmasıyla engellenir. CDK1/Siklin B kompleksi, Cdc25'i fosforlayan, DNA hasarı durumunda aktif hale gelen ATM bağımlı protein kinazlardan Chk1 ve Chk2 tarafından birbirinden ayrılır (Şekil 2.13), [Sanchez et al., 1997], [Zeng et al., 1998].



Şekil 2.13: Hücre siklusunda G2/M geçişi.

M evresi kontrol noktasında, kromozomların iğ ipliklerine tutunup tutunamadığı kontrol edilir. Mitotik tutuklanma, anafaz başlatıcı kompleks (APC) tarafından kontrol edilir. Anafaz başlatıcı kompleks, kardeş kromotidlerin metafaz sırasında biraraya gelmesini engelleyen inhibitörlerin proteolizini sağlayıp metafazdan anafaza geçişi düzenler. Eğer hatalı bir dizilim varsa Mad ve Bub proteinleri anafaz başlatıcı kompleksin alt birimi olan cdc20'yi inaktive ederek metafazdan anafaza geçişi engeller [Fang et al., 1998], [Amon, 1999].

Hücre siklusu dağılımı, akan hücre ölçer kullanılarak saptanabilmektedir. Bu yöntemde hücreler DNA'ya bağlanabilen (ör: propidyum iyodür) bir boya ile boyanmaktadır. Kullanılan boyanın yaydığı floresan akan hücre ölçer histogramında değerlendirilir ve hücrenin, siklusun G0/G1, S ve G2/M evrelerindeki DNA miktarı saptanır [Baez et al., 1996].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler

DMEM Low Glucose (HyClone), Fetal Bovin Serum (HyClone), 10X PBS Dulbecco's (PANBIOTECH), Penisilin/Streptomisin (HyClone), Tripsin-EDTA (HyClone), The CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega), FITC Annexin V Apoptosis Kit I (BD Pharmingen), Ethanol (Merck), Resveratrol (Sigma - Aldrich), Silymarin (Sigma - Aldrich), RNase A (Applichem), Triton X-100 (Fisher Chemical), Propidium Iodide (BD Pharmingen).

3.1.2. Cihaz ve Diğer Malzemeler

CO_2 inkübatörü (Thermo Forma), Işık mikroskobu (Optech Inverted Microscope), Sıcak su banyosu (Nüve), 2-200 µl Mikropipetör ve uçları (Gilson), 200µl Multi pipetör (Gilson), Elisa Reader (Thermo Varioskan Flash), Santrifüj (Beckman Coulter microfuge 18, Nüve NF 800), Laminar kabin (Herasafe), Otoklav (Hirayama, Hiclive, HVE-50), Akan Hücre Ölçer (Beckman Coulter Cytomics FC 500), Buzdolabı (+4°C, -20°C ve -80°C derin dondurucu), Sıvı azot tankı (Union Carbide), Manyetik karıştırıcı (Isolab),Vorteks (VWR), Pipet tabancası, ELISA plakları (Tpp), Kültür kapları, 15ml ve 50ml santrifüj tüpleri, Dondurma tüpleri, 0.22 µm'lik şırınga filtresi, Enjektör (5-20cc), Petri kapları, Thoma lamı (Burker-Turk), Cam pipet ve pastör pipetleri (Iso-Lab), 0.22 µm'lik 150 ml hacimli vakum filtresi (Nalgene), V-şekilli hücre solüsyonu küvetleri, 1.5-2 ml'lik ependorf tüpleri (VWR).

3.1.3. Kullanılan Solüsyonlar

- DMEM Besiyeri

%10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 Penisilin/Streptomisin eklenip pH 7.2 - 7.4'e ayarlanmıştır. Besiyeri 4°C'de saklanmıştır.

- 1X PBS (Phosphate Buffered Saline)

10X PBS, 0,22µm por çaplı filtreden geçirilen steril distile su ile %10 seyreltilmiştir. 1X PBS, 4°C'de saklanmıştır.

- 1X Tripsin-EDTA Solüsyonu

10X Tripsin-EDTA, 1X PBS ile %10 seyreltilmiştir. Tripsin-EDTA, -20°C'de saklanmıştır.

- Ethanol (%70'lik)

%99'luk stoktan alınan 70ml ethanole 30ml distile su eklenerek -20°C'de saklanmıştır.

- Ethanol (%0,25'lik)

5µl ethanol besiyeri ile 2ml'ye tamamlanmıştır.

- Triton X-100 (% 0,1)

30µl Triton X-100, 1X PBS ile 30ml'ye tamamlanmıştır.

- Resveratrol (Mw: 228,24g/mol)

5mg resveratrol tartılarak 273µl ethanol ile konsantrasyonu 80mM'a ayarlanmıştır.

- Resveratrol (200µM)

80mM'lık resveratrol solüsyonundan 5µl alınıp besiyeri ile 2ml'ye tamamlanmıştır.

- Resveratrol (100 µM)

80mM'lık resveratrol solüsyonundan 10µl alınıp 10µl etanol ile seyreltilmiştir. Hazırlanan solüsyondan 5µl alınıp besiyeri ile 2ml'ye tamamlanmıştır.

- Silimarin (Mw: 482,44g/mol) Stok

5mg silymarin tartılarak 129µl ethanol ile konsantrasyonu 80mM'a ayarlanmıştır.

- Silimarin (200 µM)

80mM'lık silymarin solüsyonundan 5µl alınıp besiyeri ile 2ml'ye tamamlanmıştır.

- Silimarin (100 µM)

80mM'lık silymarin solüsyonundan 10µl alınıp 10µl etanol ile seyreltilmiştir. Hazırlanan solüsyondan 5µl alınıp besiyeri ile 2ml'ye tamamlanmıştır.

- Resveratrol (100 µM)+Silymarin (100 µM)

80mM'lık resveratrol ve silymarin solüsyonlarından 2,5µl alınıp besiyeri ile 2ml'ye tamamlanmıştır.

- 1X Bağlanma Tamponu (Binding Buffer)

10X bağlanma tamponundan 1 ml alınarak toplam hacim steril distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

3.2. Yöntem

Bu bölümde Huh7 hücrelerinin kültüründe kullanılan protokoller, alt kültürleme, hücrelerin dondurularak saklanması, dondurulmuş hücrelerin çözülmesindeki protokoller, *in vitro* resveratrol ve silimarin uygulamaları ile bu uygulamaların sitotoksik etkisi, hücre ölüm mekanizmaları ve hücre siklusu dağılımının belirlenmesinde kullanılan yöntemler anlatılmıştır.

3.2.1. Hücre Kültürü

Resveratrol ve silimarinin *in vitro* koşullarda etkisini incelemek için karaciğer kanseri hücre hattı Huh7 kullanılmıştır. Huh7 hücre hattı, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Prof. Dr. Tamer YAĞCI aracılığıyla sağlanmıştır.

3.2.1.1. Alt Kültürleme

Deneylerimizde kullandığımız Huh7 hücreleri cam ya da plastik yüzeye

yapışarak büyüyen immortal (ölümsüz) hücrelerdir. Devamlı hücre hatları, kültürdeki substratın tamamını tükettiğinde alt kültürleme yapılması gerekir. Kültür flaskına yapışan hücreler ile substratın arasındaki kollajen bağı tripsin, kollajenaz gibi enzimler aracılığıyla kırılarak hücre, nazik bir şekilde pipetlenerek kültür flaskından kaldırılır. Hücre süspansiyonu daha sonra uygun seyreltme yapılarak başka bir kültür flaskına aktarılır.

Huh7 hücre hattı için yapılan alt kültürlemede izlenen protokol şu şekildedir:

- Kültürdeki besiyeri uzaklaştırılır.
- 1X PBS ile yıkama yapılır.
- PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücre yüzeyini kaplayacak kadar 1X Tripsin-EDTA eklenir ve enzimin aktivite göstermesi için hücreler 37°C'de, %5 CO_2 inkübatöründe 5dakika inkübe edilir.
- Taze besiyeri kullanılarak enzimatik reaksiyon durdurulur ve hücre süspansiyonu santrifüj tüplerine alınır.
- 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant uzaklaştırılır, pellet besiyeri ile süspanse edilir ve hücre sayımı yapılır.
- Taze besiyeri içeren kültür flasklarına, $1x10^5$ hücre/ml olacak şekilde hücre ekimi yapılır ve hücreler %5 CO2, %95 hava içeriğine sahip, nemli CO_2 inkübatöründe, 37°C'de büyütülür.
- Pasajlama 96 saatte bir tekrarlanır.

3.2.1.2. Hücrelerin Dondurularak Saklanması ve Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

Alt kültürleme kısmında bahsedildiği gibi hücreler tripsinle kaldırılıp santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılır. Pellet, %10 DMSO içeren FBS ile 10^6 hücre/ml olacak şekilde süspanse edilir. Hücre süspansiyonundan 1'er ml alınıp 2ml'lik dondurma tüplerine koyulur. Hücreler 24 saat boyunca -80°C'de inkübe edildikten sonra ileride çözülerek kullanılmak üzere -196°C'deki sıvı azot tanklarında depolanmıştır.

Dondurulmuş hücreleri çözme işlemi hücreler bekletilmeden hızlı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Hücreler, üzerlerine sıcaklığı 37°C'ye getirilmiş taze besiyeri

ilave edilerek çözülüp santrifüj tübüne alınmıştır. 1000rpm'de 5 dakika santrifüj edilip DMSO'nun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Taze besiyeri ile süspanse edilen hücreler 25cm^2'lik kültür flaskına ekilmiştir. Daha sonra kültür flaskı %5 CO_2, %95 hava içeriğine sahip, nemli CO_2 inkübatöründe, 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücreler flask yüzeyine yapıştıktan sonra besiyeri değiştirilerek hücrelerin konfluent (yüzeyi yaklaşık %90 kaplaması) hale gelene kadar 96 saat aralıkla besiyeri değiştirilmiştir.

3.2.1.3. Hücre Sayımı

Çalışma boyunca canlı hücrelerin sayısını belirlemek için hasat ve santrifüj işlemleri ardından elde edilen pellet, besiyerinde süspanse edildikten sonra süspansiyondan 20 µl alınarak hücre sayım lamına (Thoma lamı) aktarılmıştır. Thoma lamında 16 büyük kare, her bir karede ise 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 adet küçük kare bulunmaktadır. Sayım bu karelerde yapılır. Bir küçük kare olarak belirtilen kare prizmanın hacmi 0,00025 mm^3'tür. Toplam sayım alanının hacmi ise 0,1 mm^3'tür. Thoma lamında sayım, 16 büyük karede sayılan hücre adedi ile seyreltme faktörünün (SF) çarpılmasıyla hesaplanır. 0,1 mm^3'deki sayım sonucu 10000 ile çarpılarak 1 ml'deki sayıya dönüştürülür ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir. Thoma lamında büyük kare sınırları ara çizgi olarak adlandırılan ve her 4 küçük kareyi ortasından bölen bir çizgi ile belirlenir. Ara çizgi ile 25 küçük kareden oluşan büyük kare alanı belirlenmesi zor olursa pratik olarak ara çizgiler arasında kalan 16 küçük kare bir büyük kare olarak nitelendirilebilir. Ancak bu şekilde toplam 400 küçük kare yerine 256 küçük karede sayım yapıldığı için yukarıdaki anlatıldığı şekilde bulunan sonuç 1,5625 ile çarpılarak 1 ml'deki sayı bulunur [Web 5, 2013].

3.2.2. *In vitro* Resveratrol ve Silimarin Uygulamaları

Çalışmamızda ticari olarak satın alınan resveratrol ve silimarin tek başına ya da kombinasyon şeklinde Huh7 hücrelerine uygulanmış, 24 saat ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin ardından sitotoksik etkiyi belirlemek üzere MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) boya indirgeme yöntemi kullanılmıştır. Hücrelerin hangi yolla öldüğünü

ve hücre siklus fazlarındaki dağılımını saptamak için ise Akan hücre ölçer (Flow Cytometry) cihazı kullanılarak uygulama yapılan hücreler analiz edilmiştir.

Tez çalışmasında 96 kuyulu plaklara, plağın bir kuyusunda $5x10^3$ hücre/100 µl olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler lag fazına geldiğinde çeşitli konsantrasyonlarda *in vitro* resveratrol ve silimarin ile kombinasyonları uygulanmıştır. Resveratrol ve silimarin konsantrasyonları 100 µM ve 200 µM olmak üzere altılı tekrarlar halinde hücrelere tek başına ve 100 µM resveratrol+100 µM silimarin olmak üzere ikili kombinasyon halinde uygulanmıştır. Ayrıca resveratrol ve silimarini çözmekte kullanılan %0,25'lik etanol çözeltisi de sitotoksisitesi belirlenmek üzere hücrelere uygulanmıştır.

Hücrelere madde uygulamasından sonra, 96 kuyulu plaklar 24 saat ve 48 saat %5 CO_2, %95 hava içeriğine sahip, nemli CO_2 inkübatöründe, 37°C'de inkübe edilmiştir.

3.2.2.1. Resveratrol ve Silimarin Uygulamaları Sonrası Hücre Morfolojisinin İncelenmesi

Resveratrol ve silimarin ile kombinasyonlarının Huh7 hücre hattındaki etkisini saptamak için 96 kuyulu plaklara $5x10^3$ hücre ekilmiş 24 saat sonra madde uygulanmıştır. Hücrelere 100 µM ve 200 µM konsantrasyonlarında resveratrol ve silimarin ile 100 µM resveratrol+100 µM silimarin kombinasyonu uygulanmış 24 saat ve 48 saat sonunda mikroskop altında 40X'lik büyütmede hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.2.2. Resveratrol ve Silimarin Uygulamaları Sonrası Hücre Canlılığının İncelenmesi

Canlı hücrelerin sayısını belirlemede kullanılan, renge dayalı bir yöntem olan hücre proliferasyon analizi, Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) protokolü uygulanarak belirlenmiştir. Bu yöntem tetrazolyum bileşiğini (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTS) ve elektron taşıyıcı olarak enzimatik reaksiyonlarda görev alan PMS (phenazine methosulfate) belirtecini içerir. MTS, metabolik olarak aktif hücrelerde bulunan dehidrogenaz enzimi tarafından

besiyerinde çözünebilen formazan ürününe dönüştürülür. Oluşan formazan ürününün miktarı 490 nm'de ölçülür.

96 kuyulu plağın her bir kuyusuna 20 µl MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) eklenmiş ve plaklar 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu deneyde canlı ve aktif hücreler tarafından tetrazolium bileşiği metabolize edilir ve renkli bir ürün olan formazan oluşur. Bu renk değişimi 2 saat sonra Elisa okuyucusunda, 490 nm dalga boyunda absorbans ile belirlenmiştir.

Tez çalışmasında, her bir resveratrol ve silimarin uygulaması altılı tekrarlardan oluşan ve birbirinden bağımsız üçer kez tekrarlanan deneyleri içermektedir. Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu konsantrasyonlarına bağlı absorbans değişimi grafikleri, 490 nm'de okunan absorbans değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanarak oluşturulmuştur. Hücre canlılığında azalmanın yüzde olarak ifade edildiği grafiklerde ise sağ kalım, resveratrol ve silimarin uygulanmış hücrelerin absorbans değerleri ortalamalarının, resveratrol ve silimarin uygulanmamış kontrol hücrelerinin absorbans değerleri ortalamasına bölünmesi ile elde edilmiştir.

3.2.2.2.1. IC_{50} Değerinin Hesaplanması

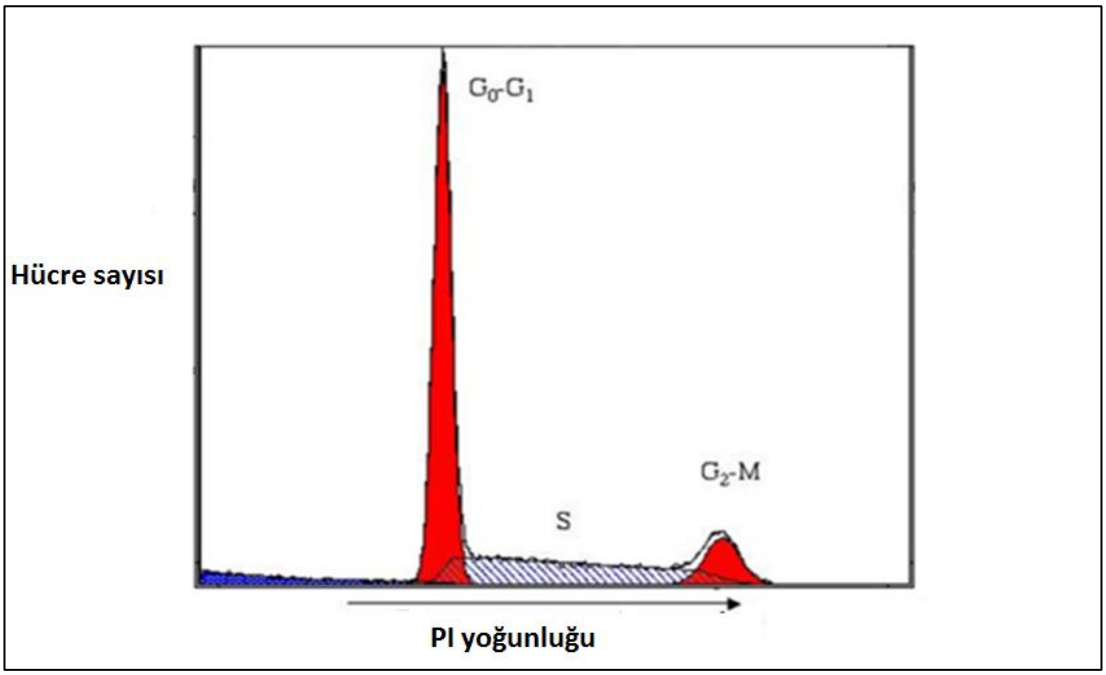
Belirli konsantrasyonlarda resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu uygulandığında hücrelerin % 50'sinin proliferasyonunu inhibe eden IC_{50} değeri % sağ kalım grafiklerinden faydalanılarak hesaplanmıştır.

3.2.2.3. Resveratrol ve Silimarin Uygulamaları Sonrası Hücre Siklusu Dağılımının Belirlenmesi

Tez çalışmasında resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonunun hücre siklusu dağılımı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Hücre siklusu dağılımı, Beckman Coulter Cytomics FC 500 Akan hücre ölçer cihazı ile belirlenmiştir.

Huh7 hücreleri 6 kuyulu plaklara ikişer tekrar halinde her kuyuda 10^5 hücre/ml olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 ve 48 saat boyunca plaklar %5 CO_2, %95 hava içeriğine sahip, nemli CO_2 inkübatöründe, 37°C'de hücrelerin lag fazına gelmeleri

beklendikten sonra resveratrol ve silimarin konsantrasyonu 100 µM ve 200 µM, resveratrol/silymarin kombinasyonu ise 100 µM resveratrol+100 µM silimarin olacak şekilde uygulanarak aynı şartlarda tekrar inkübasyona bırakılmıştır. 24 ve 48 saatlik inkübasyonların ardından plaklardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. 37°C su banyosunda ısıtılan 1 ml 1X PBS ile hücreler yıkandıktan sonra her kuyuya 250 µl Tripsin-EDTA eklenmiştir. 37°C'de 5 dakika inkübe edilerek hücrelerin yüzeyden kalkması sağlanmış, 37°C su banyosunda ısıtılan 1 ml besiyeri (DMEM) ile toplanan hücreler ayrı tüplere alınarak 1400 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücrelere 2ml %70'lik soğuk etanol eklenip nazikçe süspanse edilmiştir. Fikse edilen hücreler 4°C'de saklanmıştır. Akan hücre ölçer analizi için fikse edilen hücreler 1400rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve etanol uzaklaştırılmıştır. Çalışmada akan hücre ölçerde hücre siklusu dağılımının belirlenmesi için DNA bazlarına interkalasyon yapan Propidyum İyodür (BD Pharmingen), hücre membranının bütünlüğünü bozmak için Triton X-100 ve propidyum iyodürün RNA'ya bağlanmasını önlemek için RNase kullanılmıştır. Hücreler, %0,1 Triton X-100, RNase ve 5µl Propidyum İyodür ile hazırlanan solüsyonla karanlıkta 37°C'de 1,5 saat inkübe edildikten sonra akan hücre ölçer cihazına yerleştirilip okuma yapılmıştır.

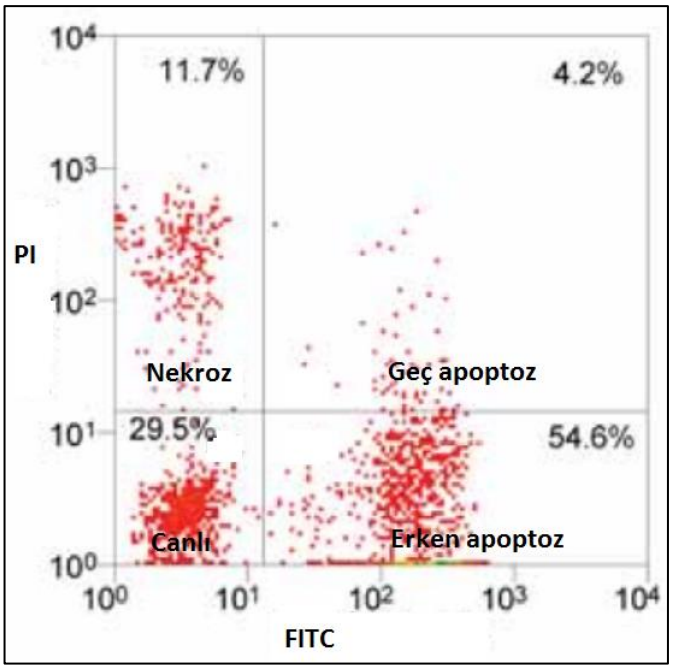


Şekil 3.1: Hücre siklusu dağılımı.

3.2.2.4. Resveratrol ve Silimarin Uygulamaları Sonrası Apoptoz Tayini

Tez çalışmasında, hücre canlılığı deneylerinde resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonunun gösterdiği sitotoksik etkinin apoptozisi indükleme potansiyelleri incelenmiştir. Apoptozis tayininde Beckman Coulter Cytomics FC 500 Akan hücre ölçer cihazı kullanılmıştır.

Apoptozise giden hücrelerde membranın iç kısmında bulunan fosfotidilserinler membranın dış kısmına transfer olmaktadır. FITC-Anneksin V, membranın dış kısmına göç eden fosfotidilserinlere bağlanarak apoptozis ile ölen hücrelerin yüzdesini saptar. Çalışmada akan hücre ölçerde apoptoz analizi için "FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen)" kullanılmış ve önerilen protokol uygulanmıştır. Huh7 hücreleri 6 kuyulu plaklara ikişer tekrar halinde her kuyuda 10^5 hücre/ml olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 ve 48 saat boyunca plaklar %5 CO_2, %95 hava içeriğine sahip, nemli CO_2 inkübatöründe, 37°C'de hücrelerin lag fazına gelmeleri beklendikten sonra resveratrol ve silimarin konsantrasyonu 100 µM ve 200 µM, resveratrol/silymarin kombinasyonu ise 100 µM resveratrol+100 µM silimarin olacak şekilde uygulanarak aynı şartlarda tekrar inkübasyona bırakılmıştır. 24 ve 48 saatlik inkübasyonların ardından plaklardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. 37°C su banyosunda ısıtılan 1 ml 1X PBS ile hücreler yıkandıktan sonra her kuyuya 250 µl Tripsin-EDTA eklenmiştir. 37°C'de 5 dakika inkübe edilerek hücrelerin yüzeyden kalkması sağlanmış, 37°C su banyosunda ısıtılan 1 ml besiyeri (DMEM) ile toplanan hücreler ayrı tüplere alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pellete 1 ml soğuk 1X PBS eklenerek nazikçe süspanse edilmiştir. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülmüş ve pellete 100 µl 1X bağlanma tamponu (binding buffer) eklenmiştir. Hafifçe sallanarak süspanse olması sağlanmış, bütün tüplere sırayla 5 µl Annexin V ve 5 µl PI (Propidium Iodide) eklenmiş ve hafifçe sallanmıştır. 15 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra bütün tüplere 400'er µl 1X bağlanma tamponu eklenerek 10 dakika bekledikten sonra Beckman Coulter Akan hücre ölçer cihazına yerleştirilmiş ve okuma yapılmıştır.



Şekil 3.2: Dot-plot apoptoz analizi.

3.2.2.5. İstatistiksel Analiz

Varyans analizi (ANOVA) istatistik bilim dalında, grup ortalamaları ve gruplar içi ve gruplar arası varyasyon gibi bunlara bağlı olan işlemleri analiz etmek için kullanılan bir istatistiksel modeller koleksiyonudur. Tez çalışmasında resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu uygulamalarına ait deneysel verilerin istatistiksel analizi "ANOVA" çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel analizlerde güvenilirlik derecesi $p \leq 0.05$ olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Bu bölümde, resveratrol ve silimarinin çeşitli konsantrasyonlarda ayrı ayrı ve birlikte Huh7 hücrelerine uygulanarak hücre canlılığına etkisi, apoptoz-nekroz analizi ve hücre siklusu dağılımı ile ilgili elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

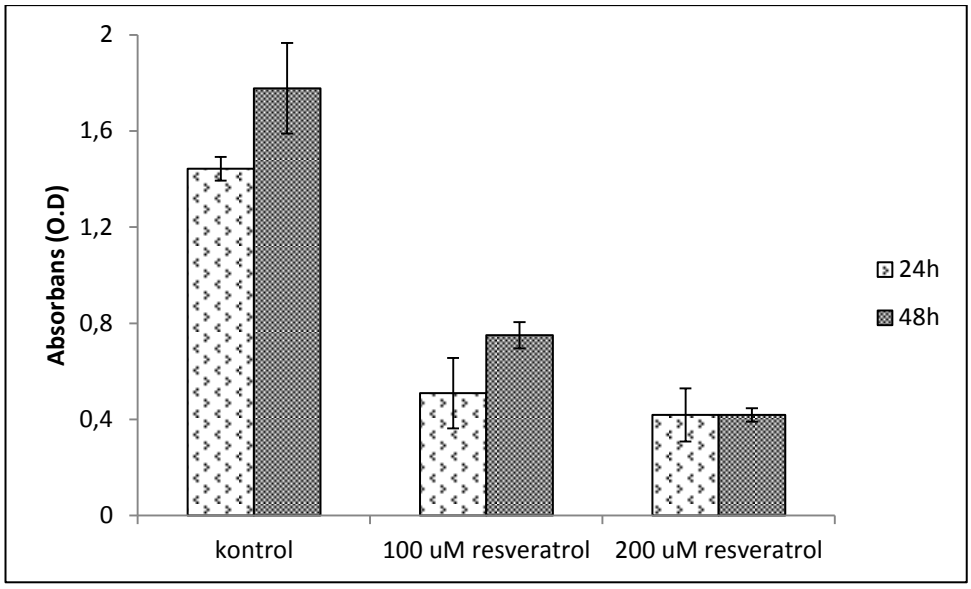
4.1. Resveratrol ve Silimarin Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi

In vitro deneylerimizde kullandığımız resveratrol ve silimarin hücrede toksik etki gösteren etanolde çözünmektedir. Çalışmamızda MTS yöntemiyle etanolün hücrede toksik etki göstermeyen konsantrasyon %0,25 (w/v) olarak belirlenmiştir.

Materyal ve yöntem kısmında detaylı şekilde bahsedildiği gibi, resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin uygulamasının hücrelere olan sitotoksik etkisi, MTS yöntemiyle saptanmış ve elde edilen grafikler bu bölümde detaylıca açıklanmıştır.

4.1.1. Resveratrolün Hücre Canlılığına Etkisi

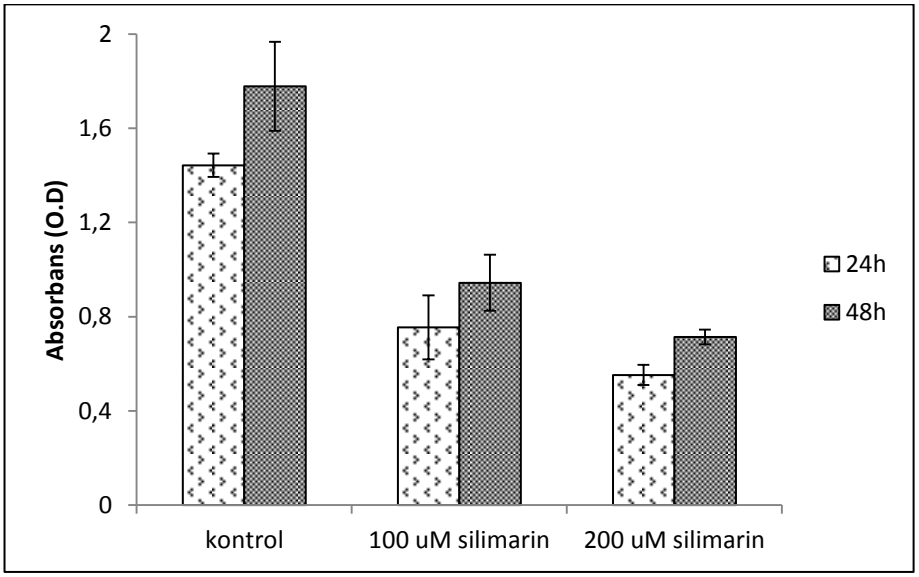
Şekil 4.1' de görüldüğü gibi 100 μM resveratrolün Huh7 hücreleriyle 24 saat ve 48 saat inkübasyonu sonucu absorbans değeri hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubuna göre sırasıyla 1.44'ten 0.5'e ve 1.77'den 0.75'ye düşmüştür. Resveratrolün 200 μM konsantrasyonu ise Huh7 hücrelerinde 24 ve 48 saat inkübasyon sonucu absorbans değerini sırasıyla 1.44'ten 0.41'e ve 1.77'den 0.41'e düşürmüştür. Resveratrolün 100 μM ve 200 μM konsantrasyonlarında 24 ve 48 saat inkübe edilen Huh7 hücrelerinin proliferasyonunda düşüş görülmektedir ($p \leq 0,05$).



Şekil 4.1: Resveratrolün hücre canlılığına etkisi.

4.1.2. Silimarinin Hücre Canlılığına Etkisi

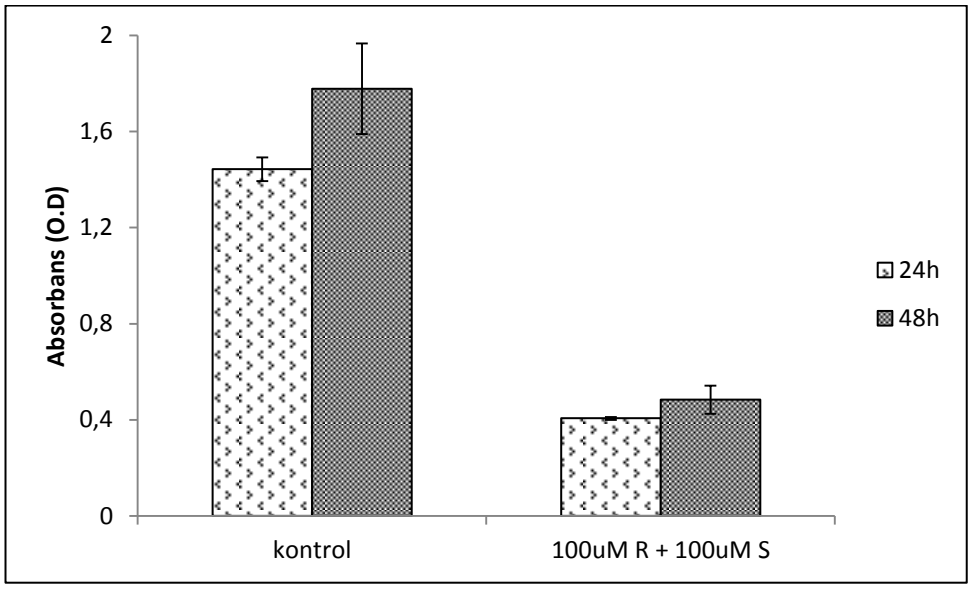
Silimarin uygulanarak 24 ve 48 saat inkübe edilen Huh7 hücrelerinin proliferasyonunda belirgin bir düşüş vardır. 100 μM silimarin, Huh7 hücrelerinin absorbans değerini 24 saatte 1.44'ten 0.75'e, 48 saatte 1.77'den 0.94'e düşürmüştür. 200 μM silimarin ise Huh7 hücrelerinin absorbans değerini 24 saatte 1.44'ten 0.55'e, 48 saatte 1.77'den 0.71'e düşürmüştür ($p \leq 0,05$), (Şekil 4.2).



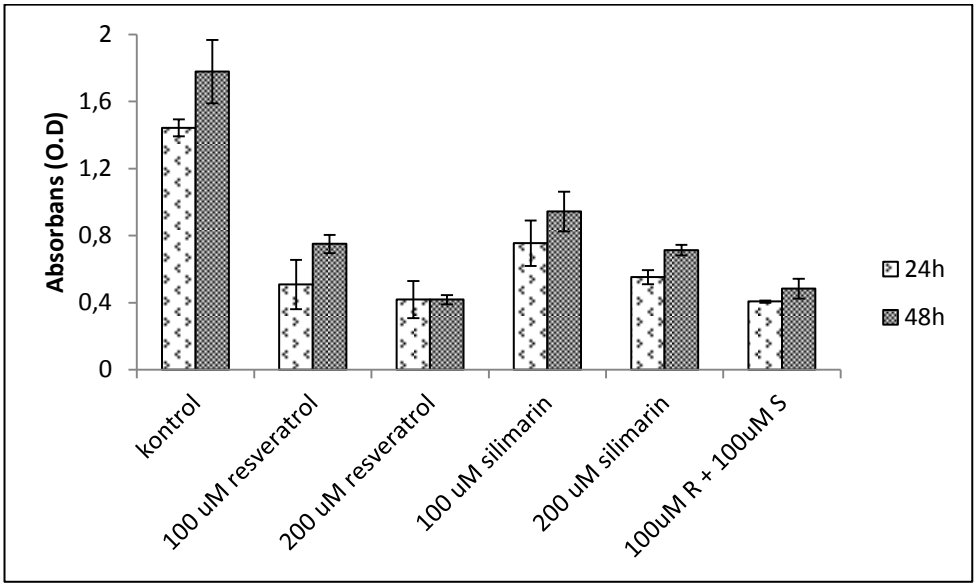
Şekil 4.2: Silimarinin hücre canlılığına etkisi.

4.1.3. Resveratrol/Silimarin Kombinasyonunun Hücre Canlılığına Etkisi

100 μM resveratrol/100 μM silimarin kombinasyonu 24 saatte absorbans değerini 1.44'ten 0.4'e düşürmüştür ($p \leq 0,05$). 48 saat inkübasyon sonucunda ise 100 μM resveratrol/100 μM silimarin kombinasyonu absorbans değerini 1.77'den 0,48'e düşürmüştür ($p \leq 0,05$), (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Resveratrol/Silimarin kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi.



Şekil 4.4: Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi.

4.2. Resveratrol ve Silimarin Uygulanmasının Ardından Sağ Kalım Oranları

Bu bölümde uygulama yapılan Huh7 hücrelerinin MTS indirgenme metoduyla 490 nm'de ölçülen absorbans değerleri, uygulama yapılmayan kontrol grubu hücrelerinin absorbans değerleriyle karşılaştırılarak yüzde oranları saptanmış ve sağ kalım grafikleri elde edilmiştir.

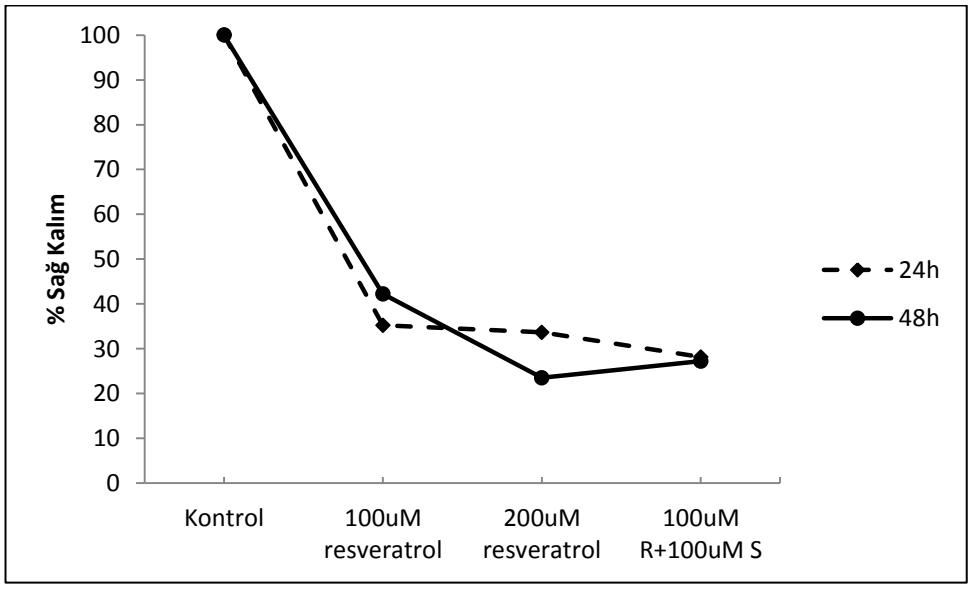
100 μM resveratrol, 24 saat inkübasyon sonucunda kontrol grubuna göre hücre canlılığının %35.22'ye düşmesine sebep olurken aynı konsantrasyonda 48 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığı %42.2'dir. Resveratrol konsantrasyonu 200 μM'a yükseltildiğinde hücrelerin canlılık oranı 24 saat inkübasyon sonucu %33.66, 48 saat inkübasyon sonucu %23.52'dir (Şekil 4.5). Hücre proliferasyonunda %50 inhibisyona (IC_{50}) neden olan resveratrol konsantrasyonu 24 saat için 77,2 μM, 48 saat için 86,5 μM olarak hesaplanmıştır.

100 μM silimarin, 24 saat inkübasyon sonucunda kontrol grubuna göre hücre canlılığının %52.28'e düşmesine sebep olurken aynı konsantrasyonda 48 saat inkübasyon sonrasında hücre canlılığı %53.06'dır. Silimarin konsantrasyonu 200 μM'a yükseltildiğinde hücrelerin canlılık oranı 24 saat inkübasyon sonucu %38.28, 48 saat inkübasyon sonucu %40.12'dir (Şekil 4.6). Hücre proliferasyonunda %50 inhibisyona (IC_{50}) neden olan silimarin konsantrasyonu 24 saat için 104,8 μM, 48 saat için 106,5 μM olarak hesaplanmıştır.

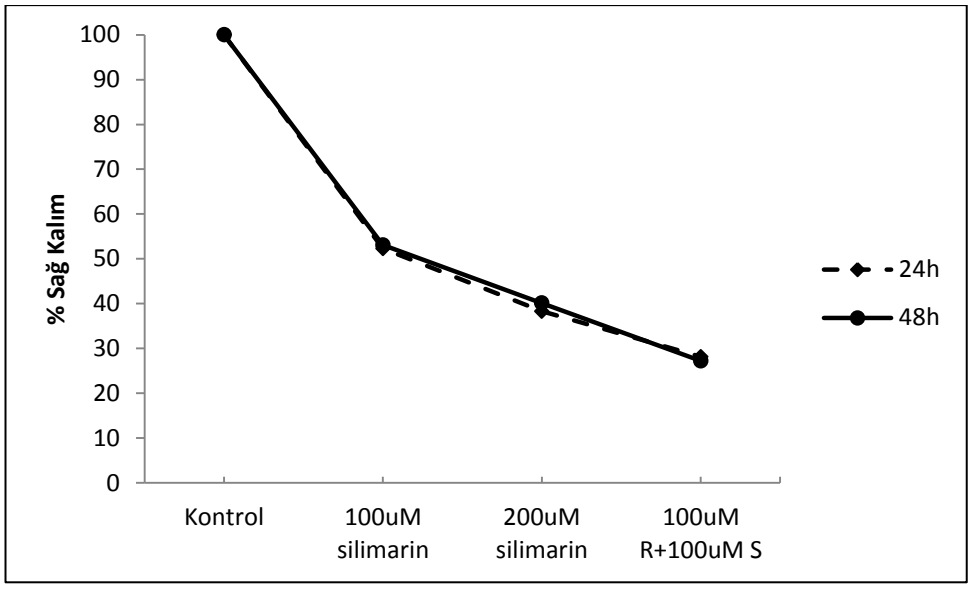
100 μM resveratrol+100 μM silimarin kombinasyonunda ise hücre canlılığı 24 saat inkübasyon sonucunda %28.15, 48 saat inkübasyon sonucunda %27.18'dir (Şekil 4.5), (Şekil 4.6).

Tablo 4.1: Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu uygulamasının ardından hücre sağ kalım oranları.

		100 µM	200 µM	100µM R + 100µM S	% 0,25
Kontrol	% 100				
Resveratrol 24h		% 35,22	% 33,66		
Resveratrol 48h		% 42,20	% 23,52		
Silimarin 24h		% 52,28	% 38,28		
Silimarin 48h		% 53,06	% 40,12		
Kombinasyon 24h				% 28,15	
Kombinasyon 48h				% 27,18	
Etanol 24h					% 99,72
Etanol 48h					% 99,54



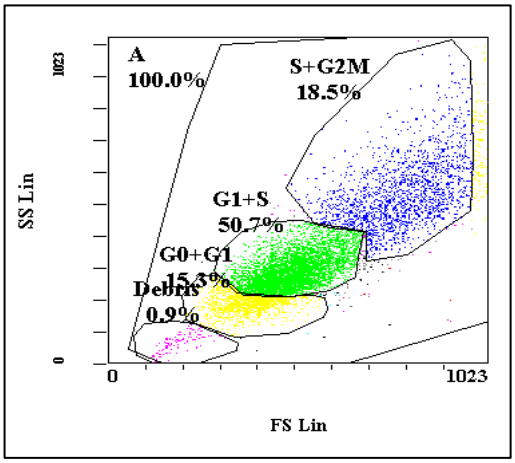
Şekil 4.5: Hücrelerin resveratrolün 100 µM, 200 µM konsantrasyonu ve resveratrol/silimarin kombinasyonu ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu sağ kalım oranları.



Şekil 4.6: Hücrelerin silimarinin 100 μM, 200 μM konsantrasyonu ve resveratrol/silimarin kombinasyonu ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu sağ kalım oranları.

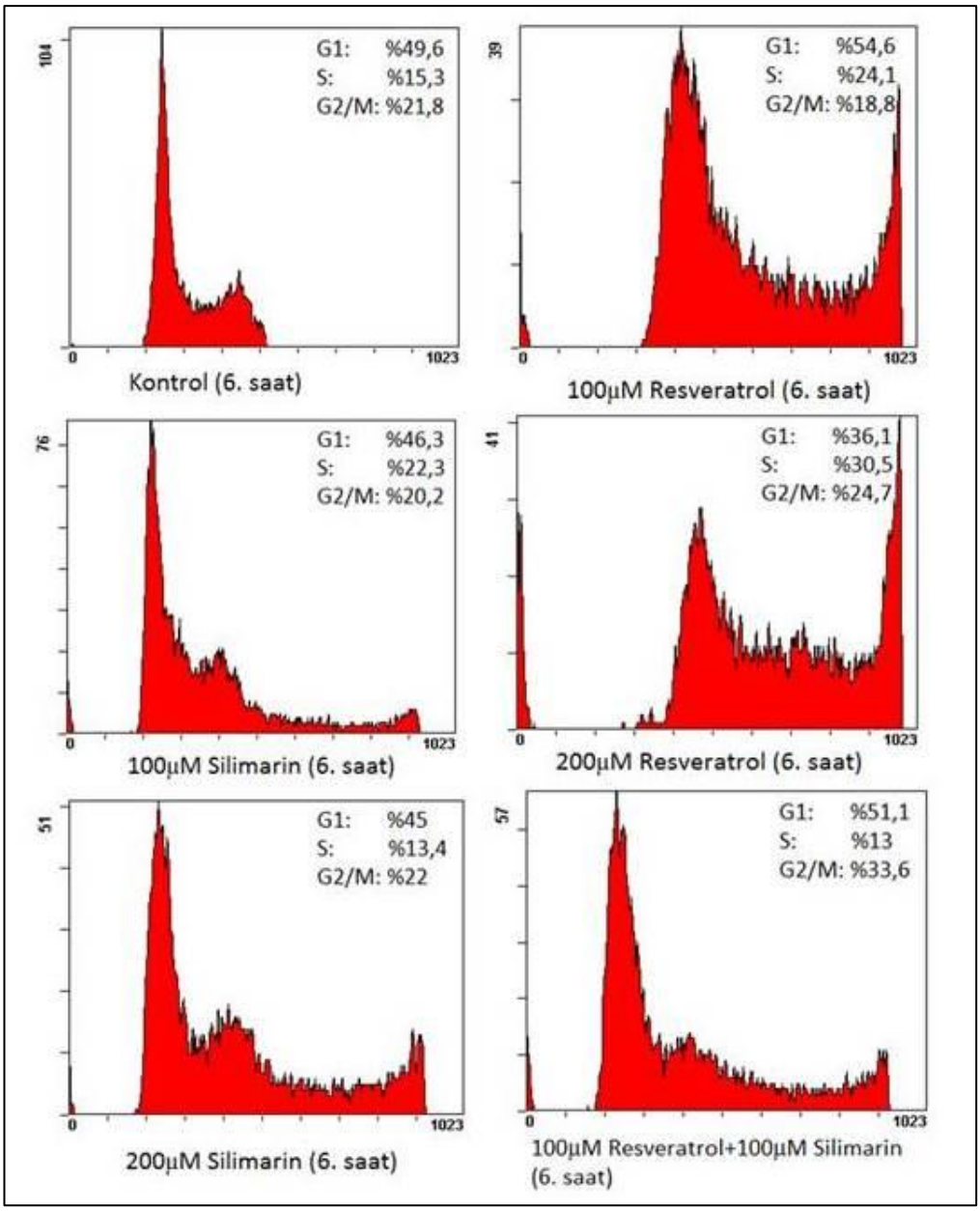
4.3. Resveratrol ve Silimarin Uygulamasının Hücre Siklusu Dağılımı Üzerine Etkisi

Çalışmamızda farklı konsantrasyonlardaki resveratrol ve silimarin hücrelere uygulanarak 6, 12, 18, 24 ve 48 saat inkübe edilmiş ve hücre siklusu dağılımı üzerindeki etkileri analiz edilmiştir. Hücre siklusu dağılımı deneyleri 3 kere tekrar edilmiş ve elde edilen sonuçlar ortalamaları alınarak metinde ve Tablo 4.2'de belirtilmiştir.

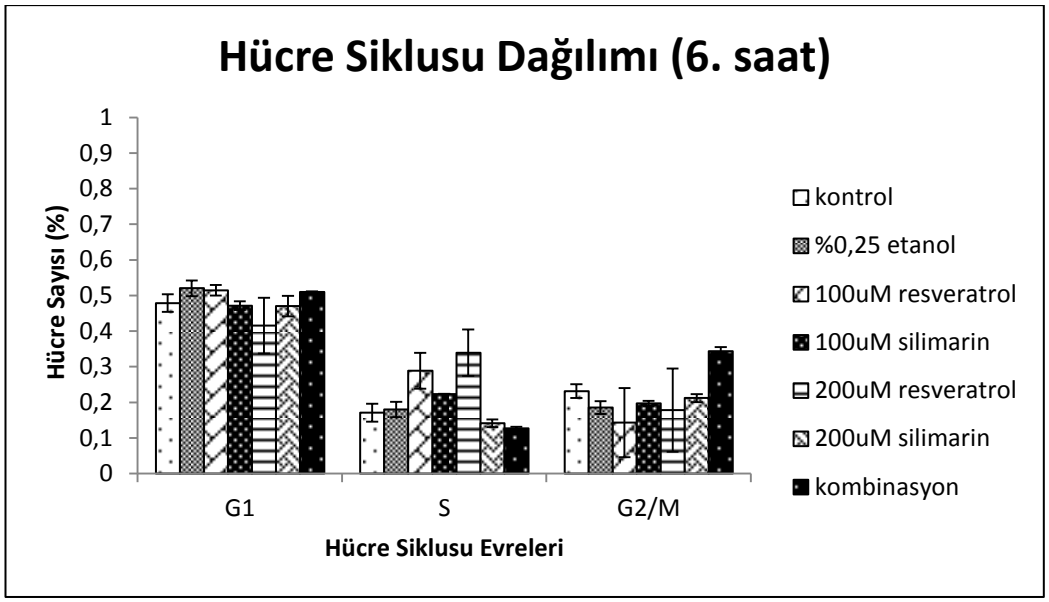


Şekil 4.7: FS/SS grafiğinde Huh7 hücrelerinin kapılanması.

6 saatlik inkübasyon sonucu kontrol grubunun G1 fazında hücre oranı %47.8, 100 µM resveratrol uygulanan grupta %51.5, 100 µM silimarin uygulanan grupta %47.1, 200 µM resveratrol uygulanan grupta %41.6, 200 µM silimarin uygulanan grupta %47, 100 µM resveratrol/100 µM silimarin uygulanan grupta ise %50.9'dur. Kontrol grubunun S fazında hücre oranı %17.1, 100 µM resveratrol uygulanan grupta %28.8, 100 µM silimarin uygulanan grupta %22.3, 200 µM resveratrol uygulanan grupta %34, 200 µM silimarin uygulanan grupta %14.1, 100 µM resveratrol/100 µM silimarin uygulanan grupta ise %12.7'dir. Kontrol grubunun G2/M fazında hücre oranı %23.1, 100 µM resveratrol uygulanan grupta %14.3, 100 µM silimarin uygulanan grupta %19.7, 200 µM resveratrol uygulanan grupta %17.8, 200 µM silimarin uygulanan grupta %21.2 ve 100 µM resveratrol/100 µM silimarin uygulanan grupta ise %34.4'tür ($p \leq 0,05$), (Şekil 4.8).

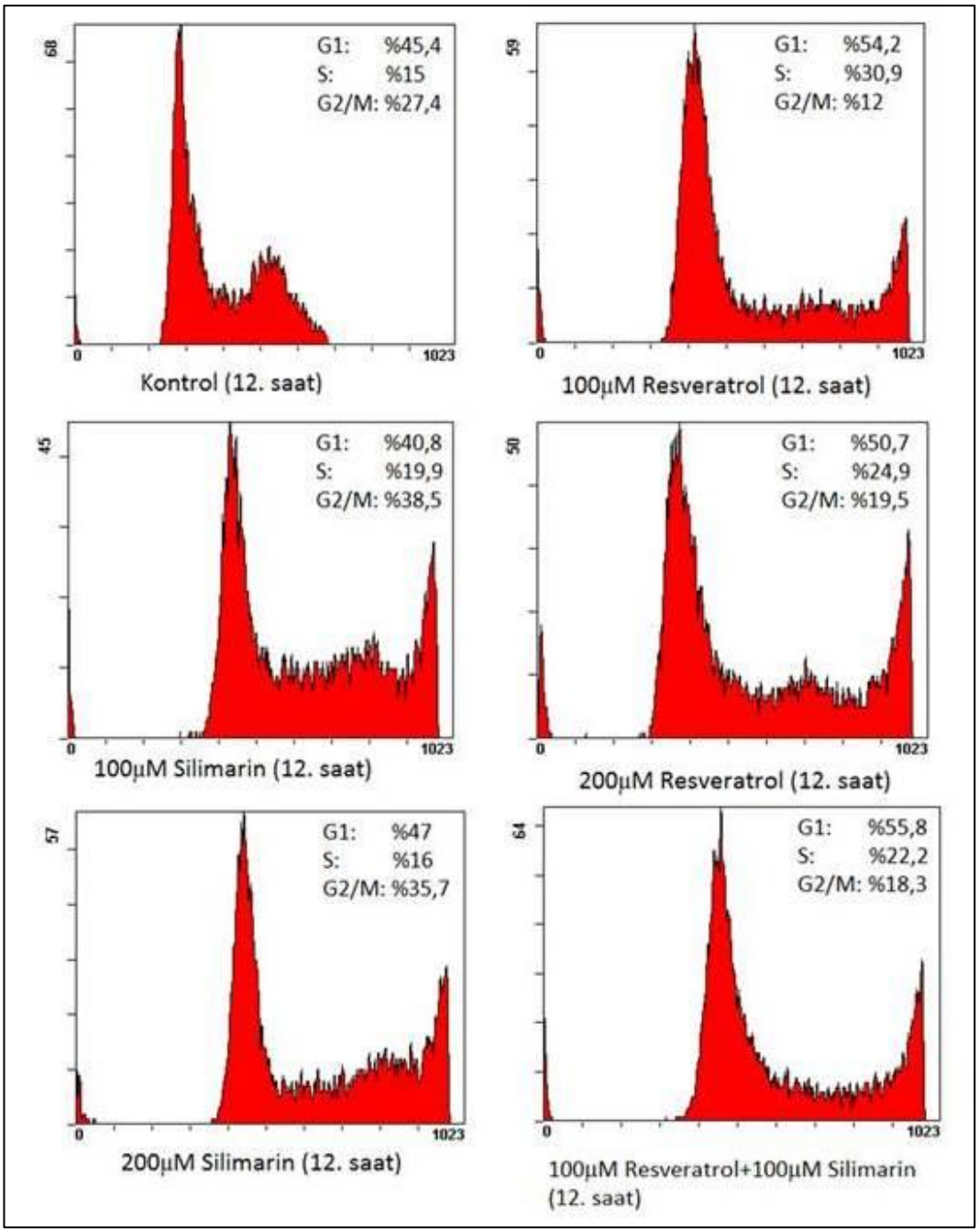


Şekil 4.8: Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile 6 saat boyunca resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu uygulanan hücrelerin hücre siklusu dağılımı.

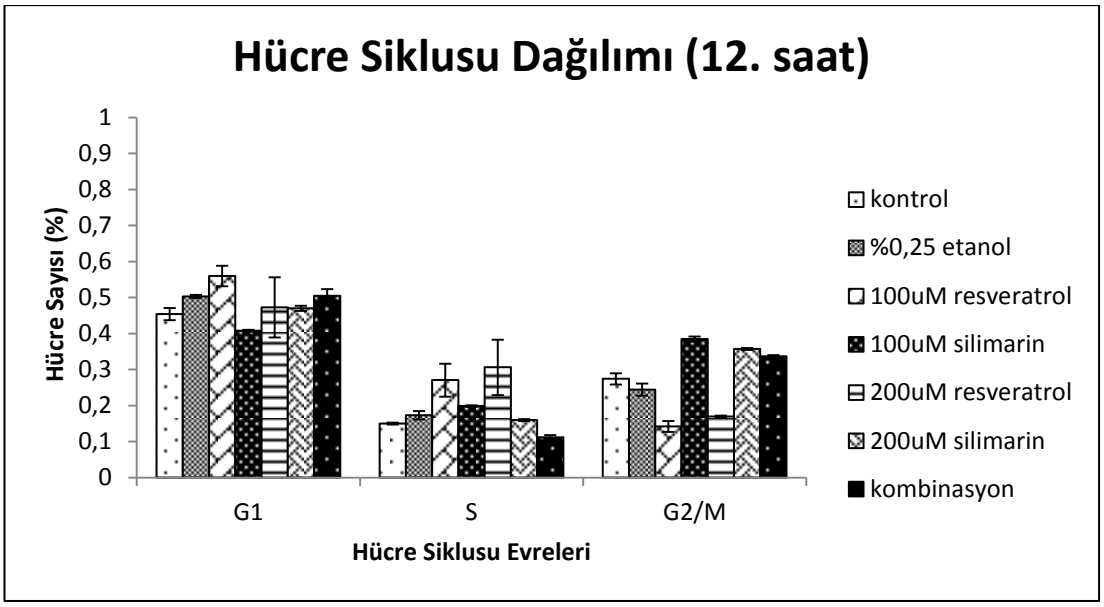


Şekil 4.9: Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu ile 6 saat inkübe edilen hücrelerin hücre siklusu dağılımının herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile karşılaştırılması.

12 saatlik inkübasyon sonucu kontrol grubunun G1 fazında hücre oranı %45.4, 100 μM resveratrol uygulanan grupta %55.9, 100 μM silimarin uygulanan grupta %40.8, 200 μM resveratrol uygulanan grupta %47.2, 200 μM silimarin uygulanan grupta %47, 100 μM resveratrol/100 μM silimarin uygulanan grupta ise %50.5'dir. Kontrol grubunun S fazında hücre oranı %15, 100 μM resveratrol uygulanan grupta %27, 100 μM silimarin uygulanan grupta %19.9, 200 μM resveratrol uygulanan grupta %30.6, 200 μM silimarin uygulanan grupta %16, 100 μM resveratrol/100 μM silimarin uygulanan grupta ise %11.2'dir. Kontrol grubunun G2/M fazında hücre oranı %27.4, 100 μM resveratrol uygulanan grupta %14.2, 100 μM silimarin uygulanan grupta %38.2, 200 μM resveratrol uygulanan grupta %17, 200 μM silimarin uygulanan grupta %35.7 ve 100 μM resveratrol/100 μM silimarin uygulanan grupta ise %33.7'dir ($p \leq 0,05$), (Şekil 4.10).

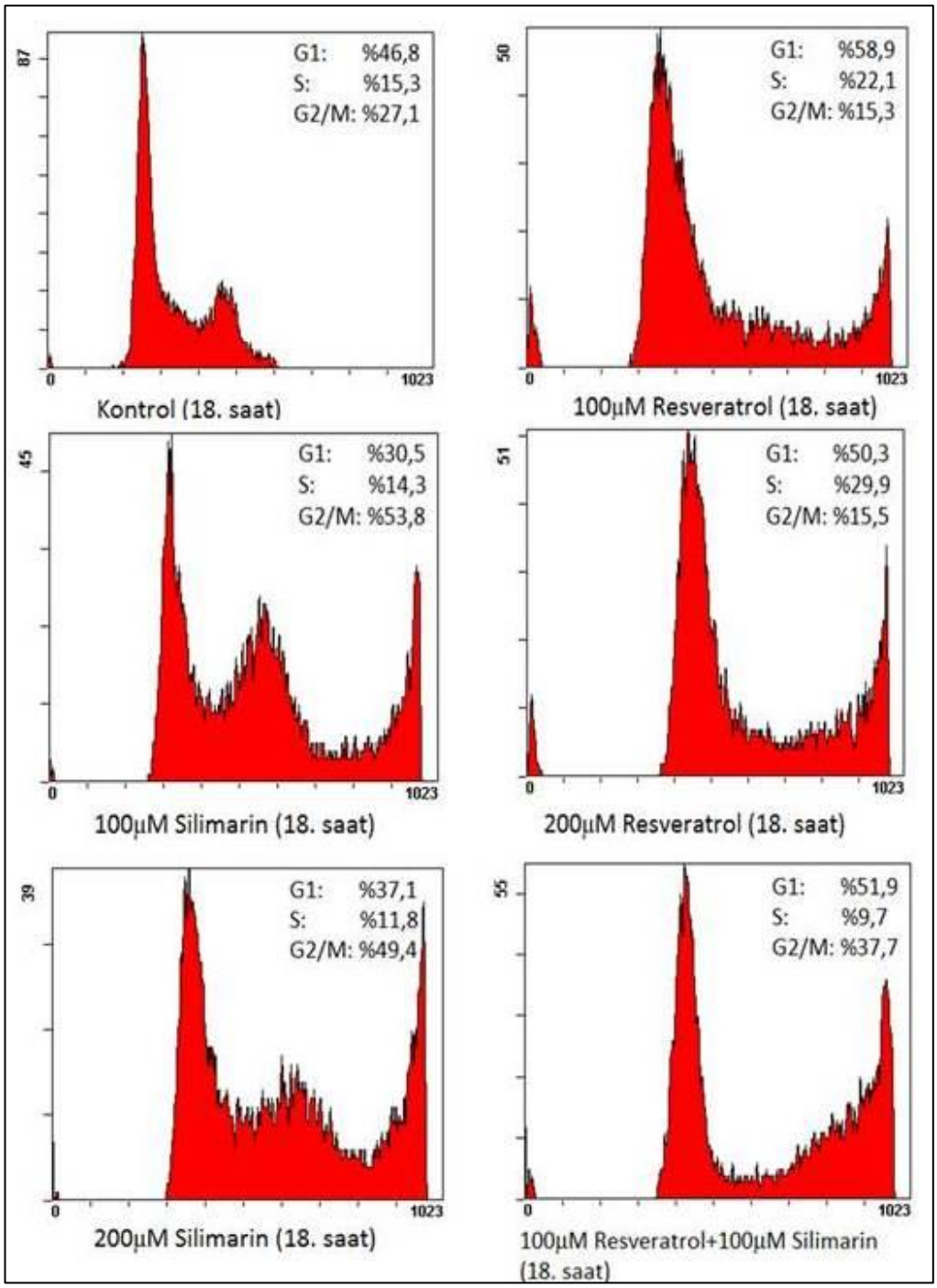


Şekil 4.10: Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile 12 saat boyunca resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu uygulanan hücrelerin hücre siklusu dağılımı.

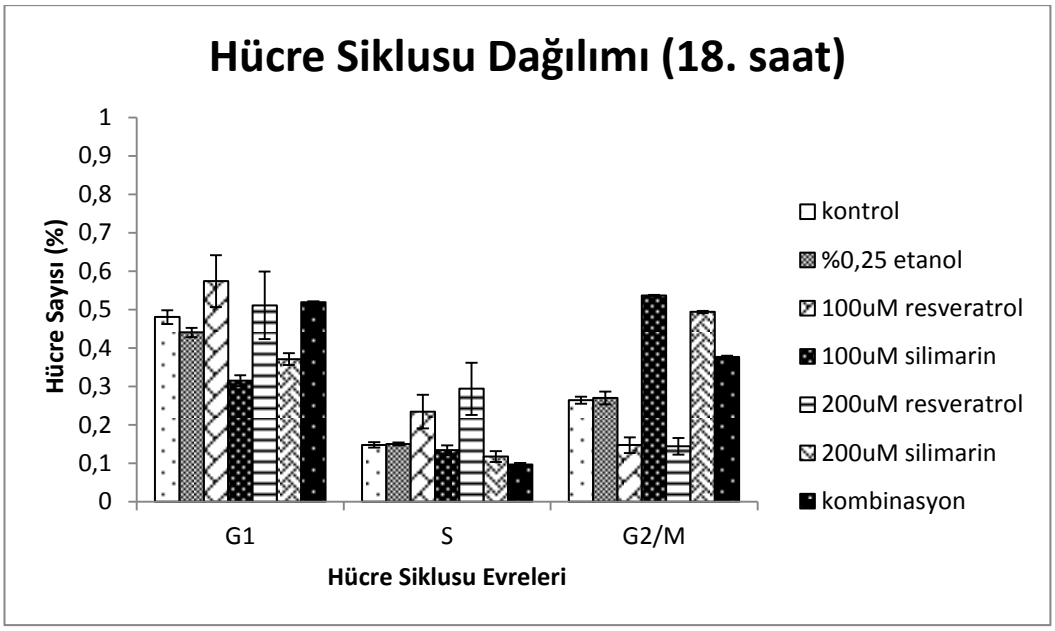


Şekil 4.11: Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu ile 12 saat inkübe edilen hücrelerin hücre siklusu dağılımının herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile karşılaştırılması.

18 saatlik inkübasyon sonucu kontrol grubunun G1 fazında hücre oranı %48, 100 μM resveratrol uygulanan grupta %57.4, 100 μM silimarin uygulanan grupta %31.5, 200 μM resveratrol uygulanan grupta %51.1, 200 μM silimarin uygulanan grupta %37.1, 100 μM resveratrol/100 μM silimarin uygulanan grupta ise %51.9'dur. Kontrol grubunun S fazında hücre oranı %14.8, 100 μM resveratrol uygulanan grupta %23.6, 100 μM silimarin uygulanan grupta %13.4, 200 μM resveratrol uygulanan grupta %28.4, 200 μM silimarin uygulanan grupta %11.8, 100 μM resveratrol/100 μM silimarin uygulanan grupta ise %9.7'dir. Kontrol grubunun G2/M fazında hücre oranı %26.4, 100 μM resveratrol uygulanan grupta %14.7, 100 μM silimarin uygulanan grupta %53.7, 200 μM resveratrol uygulanan grupta %14.4, 200 μM silimarin uygulanan grupta %37.7 ve 100 μM resveratrol/100 μM silimarin uygulanan grupta ise %37.7'dir ($p \leq 0,05$), (Şekil 4.12).

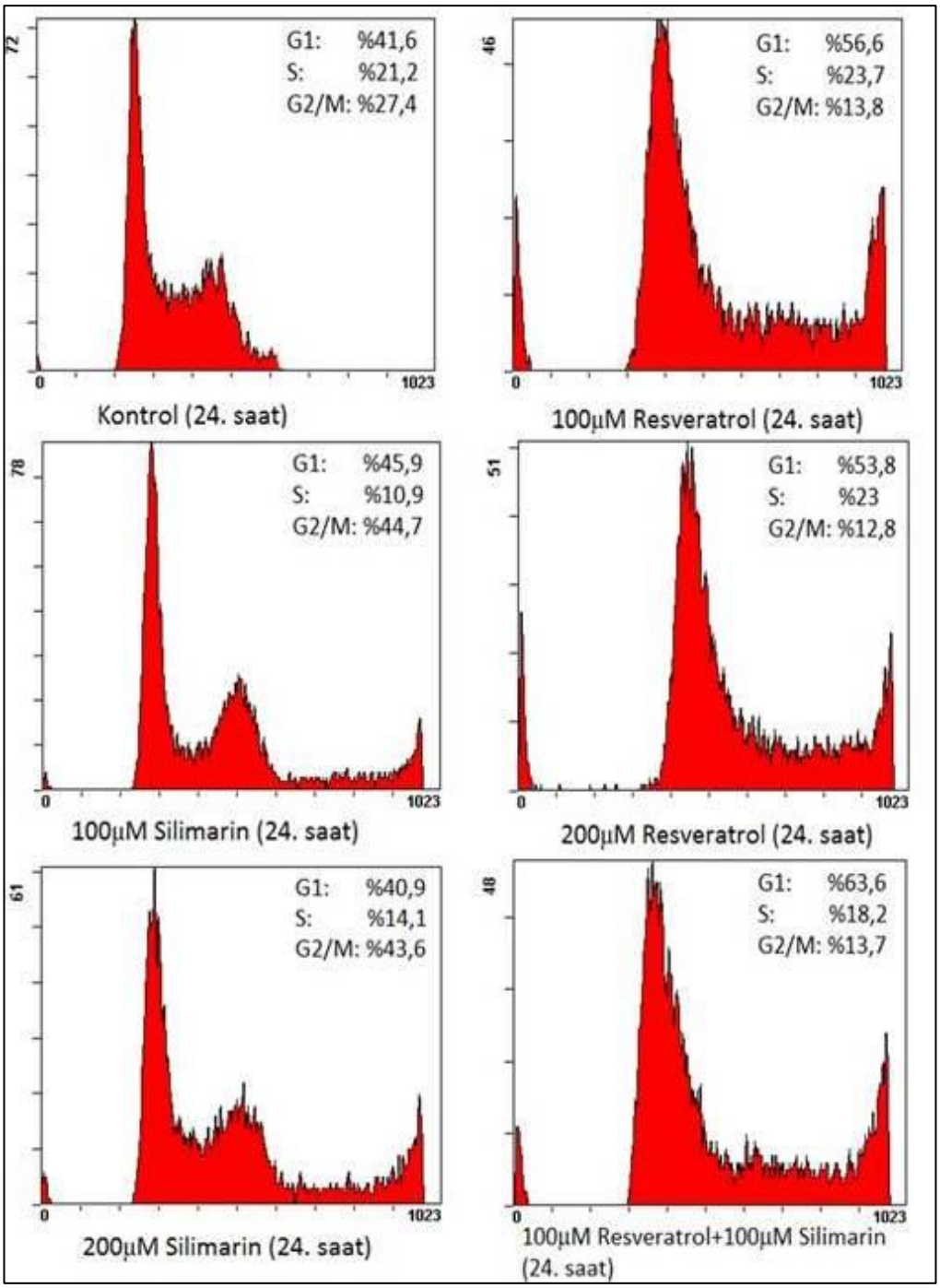


Şekil 4.12: Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile 18 saat boyunca resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu uygulanan hücrelerin hücre siklusu dağılımı.

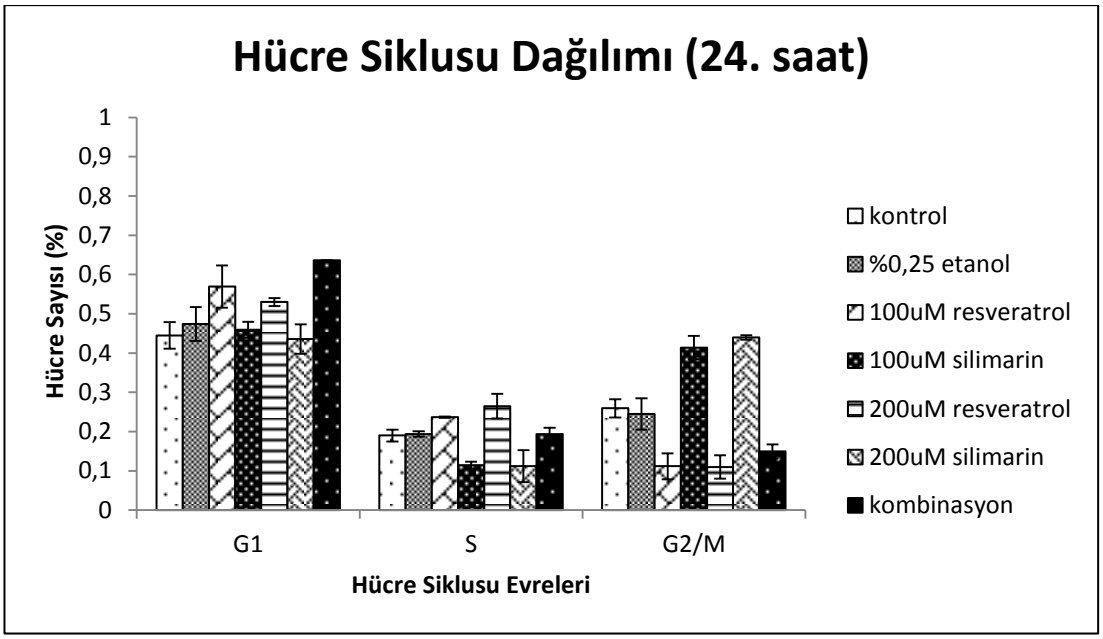


Şekil 4.13: Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu ile 18 saat inkübe edilen hücrelerin hücre siklusu dağılımının herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile karşılaştırılması.

24 saatlik inkübasyon sonucu kontrol grubunun G1 fazında hücre oranı %44.5, 100 μM resveratrol uygulanan grupta %57, 100 μM silimarin uygulanan grupta %45.9, 200 μM resveratrol uygulanan grupta %53, 200 μM silimarin uygulanan grupta %43.5, 100 μM resveratrol/100 μM silimarin uygulanan grupta ise %63.6'dır. Kontrol grubunun S fazında hücre oranı %19, 100 μM resveratrol uygulanan grupta %23.7, 100 μM silimarin uygulanan grupta %11.4, 200 μM resveratrol uygulanan grupta %26.5, 200 μM silimarin uygulanan grupta %11.2, 100 μM resveratrol/100 μM silimarin uygulanan grupta ise %19.3'tür. Kontrol grubunun G2/M fazında hücre oranı %25.9, 100 μM resveratrol uygulanan grupta %11.2, 100 μM silimarin uygulanan grupta %41.4, 200 μM resveratrol uygulanan grupta %11, 200 μM silimarin uygulanan grupta %44 ve 100 μM resveratrol/100 μM silimarin uygulanan grupta ise %15'dir ($p \leq 0,05$), (Şekil 4.14).

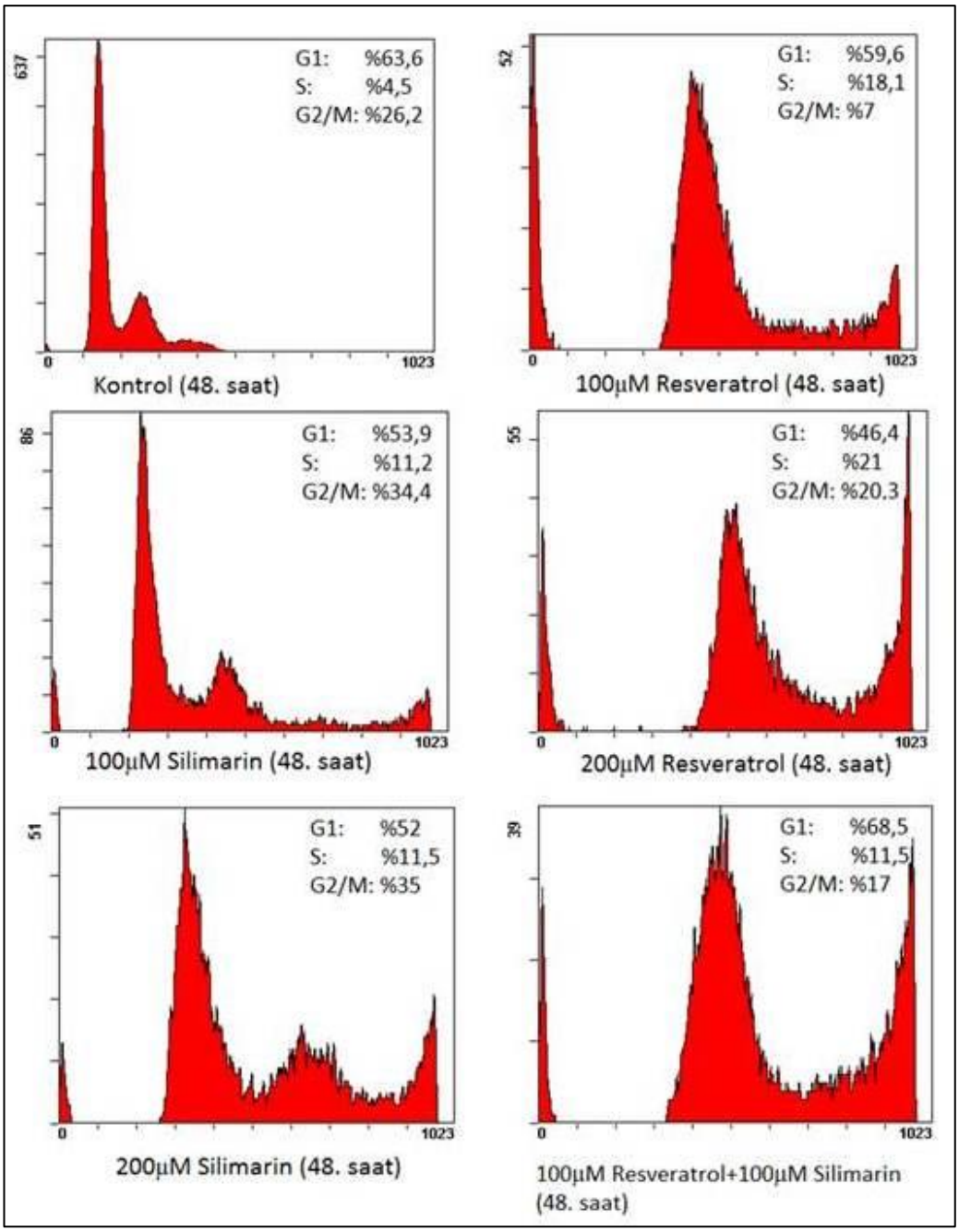


Şekil 4.14: Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile 24 saat boyunca resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu uygulanan hücrelerin hücre siklusu dağılımı.

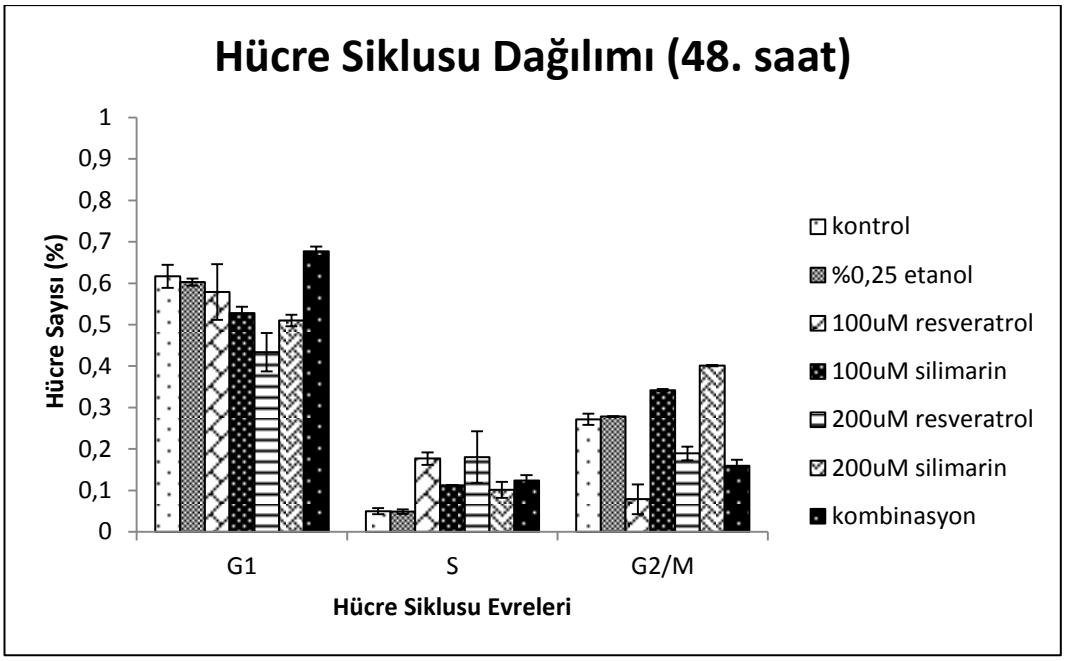


Şekil 4.15: Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu ile 24 saat inkübe edilen hücrelerin hücre siklusu dağılımının herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile karşılaştırılması.

48 saatlik inkübasyon sonucu kontrol grubunun G1 fazında hücre oranı %61.6, 100 μM resveratrol uygulanan grupta %58, 100 μM silimarin uygulanan grupta %52.8, 200 μM resveratrol uygulanan grupta %43.4, 200 μM silimarin uygulanan grupta %51, 100 μM resveratrol/100 μM silimarin uygulanan grupta ise %67.7'dir. Kontrol grubunun S fazında hücre oranı %5, 100 μM resveratrol uygulanan grupta %17.7, 100 μM silimarin uygulanan grupta %11.2, 200 μM resveratrol uygulanan grupta %18, 200 μM silimarin uygulanan grupta %10.1, 100 μM resveratrol/100 μM silimarin uygulanan grupta ise %12.4'tür. Kontrol grubunun G2/M fazında hücre oranı %27.1, 100 μM resveratrol uygulanan grupta %8, 100 μM silimarin uygulanan grupta %34.2, 200 μM resveratrol uygulanan grupta %19, 200 μM silimarin uygulanan grupta %37.4 ve 100 μM resveratrol/100 μM silimarin uygulanan grupta ise %16'dır ($p \leq 0,05$), (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile 48 saat boyunca resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu uygulanan hücrelerin hücre siklusu dağılımı.



Şekil 4.17: Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu ile 48 saat inkübe edilen hücrelerin hücre siklusu dağılımının herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile karşılaştırılması.

Tablo 4.2: Resveratrol, silimarin ve resveratrol silimarin kombinasyonu ile 6, 12, 18, 24 ve 48 saat inkübe edilen hücrelerin hücre siklusu dağılımı.

	G1			S			G2/M		
	KONTROL	100µM Resveratrol	100µM Silimarin	KONTROL	100µM Resveratrol	100µM Silimarin	KONTROL	100µM Resveratrol	100µM Silimarin
6H	% 47,8	% 51,5	% 47,1	% 17,1	% 28,8	% 22,3	% 23,1	% 14,3	% 19,7
12H	% 45,4	% 55,9	% 40,8	% 15	% 27	% 19,9	% 27,4	% 14,2	% 38,2
18H	% 48	% 57,4	% 31,5	% 14,8	% 23,6	% 13,4	% 26,4	% 14,7	% 53,7
24H	% 44,5	% 57	% 45,9	% 19	% 23,7	% 11,4	% 25,9	% 11,2	% 41,4
48H	% 61,6	% 58	% 52,8	% 5	% 17,7	% 11,2	% 27,1	% 8	% 34,2
	G1			S			G2/M		
	KONTROL	200µM Resveratrol	200µM Silimarin	KONTROL	200µM Resveratrol	200µM Silimarin	KONTROL	200µM Resveratrol	200µM Silimarin
6H	% 47,8	% 41,6	% 47	% 17,1	% 34	% 14,1	% 23,1	% 17,8	% 21,2
12H	% 45,4	% 47,2	% 47	% 15	% 30,6	% 16	% 27,4	% 17	% 35,7
18H	% 48	% 51,1	% 37,1	% 14,8	% 28,4	% 11,8	% 26,4	% 14,4	% 37,7
24H	% 44,5	% 53	% 43,5	% 19	% 26,5	% 11,2	% 25,9	% 11	% 44
48H	% 61,6	% 43,4	% 51	% 5	% 18	% 10,1	% 27,1	% 19	% 37,4
	G1			S			G2/M		
	KONTROL	100µM Resveratrol +100µM Silimarin		KONTROL	100µM Resveratrol +100µM Silimarin		KONTROL	100µM Resveratrol +100µM Silimarin	
6H	% 47,8	% 50,9		% 17,1	% 12,7		% 23,1	% 34,4	
12H	% 45,4	% 50,5		% 15	% 11,2		% 27,4	% 33,7	
18H	% 48	% 51,9		% 14,8	% 9,7		% 26,4	% 37,7	
24H	% 44,5	% 63,6		% 19	% 19,3		% 25,9	% 15	
48H	% 61,6	% 67,7		% 5	% 12,4		% 27,1	% 16	

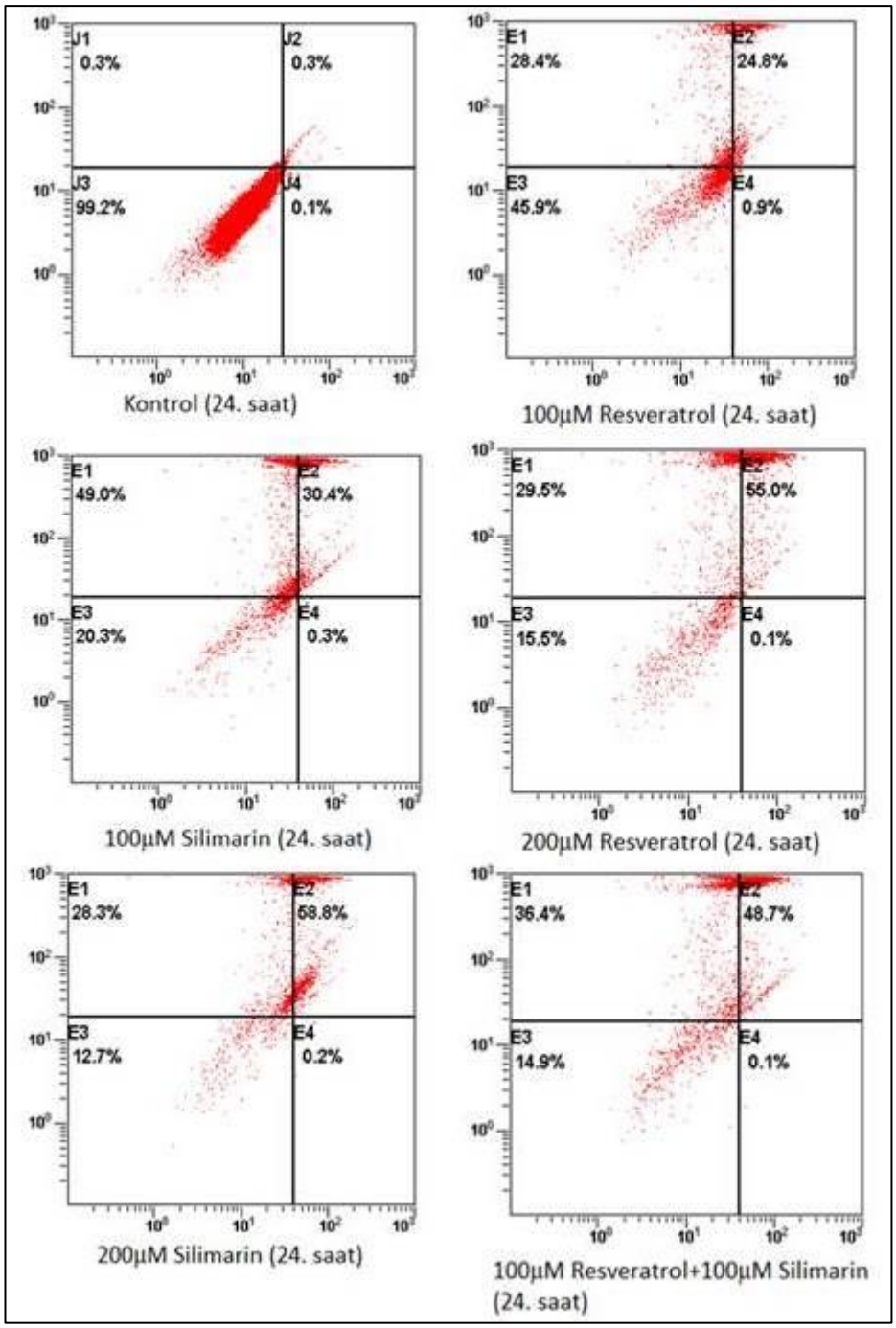
4.4. Programlı Hücre Ölümü (Apoptoz) Analizleri

Materyal ve yöntem kısmında belirtildiği gibi hücreler 6 kuyulu plaklara her kuyuda $3x10^5$ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat sonra resveratrol ve silimarin 100 µM ve 200 µM konsantrasyonlarında ayrı ayrı ve 100 µM resveratrol+100 µM silimarin kombinasyon şeklinde hücrelere ikili tekrarlar halinde uygulanmış, 24 ve 48 saatlik inkübasyonların ardından akan hücre ölçer cihazı ile canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre oranları saptanmıştır.

Akan hücre ölçerde her noktanın bir hücreyi gösterdiği dot plot analizlerinde Anneksin V'e bağlı FITC'nin ve Propidyum iyodürün (PI) yaymış olduğu floresan yoğunluğu saptanabilmektedir. Böylece erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre oranlarını canlı hücre oranıyla karşılaştırmak mümkündür. Dot plot

analizlerinde X ekseni Anneksin V-FITC'nin, y ekseni ise PI'nın yaydığı floresanı göstermektedir. Sadece PI ile boyanan hücreler dot plotlarda E1 bölgesinde yer alıp, apoptotik olmayan hücre oranını belirtmektedir. E2 bölgesindeki hücreler, hem Anneksin V hem de PI ile boyanan hücreler olup, geç apoptotik hücre oranını göstermektedir. Sadece FITC ile boyanan hücreler E4 bölgesinde yer almakta ve erken apoptozise uğrayan hücre oranını belirtmektedir. Erken apoptozda hücre membranının iç kısmında bulunan fosfotidilserinler dış kısma göç etmiştir ve Anneksin V antikorunun bağlanmasına olanak sağlamıştır. Bu da hücrelerin apoptozis yoluyla öldüğünün kanıtıdır. Membran yapısı bozulmadığından ötürü hiçbir boya ile boyanmayan hücreler E3 bölgesinde canlı hücre oranını ifade etmektedir. Programlı hücre ölümü deneyleri 3 kere tekrar edilmiş ve elde edilen sonuçlar ortalamaları alınarak metinde ve Tablo 4.3'te belirtilmiştir.

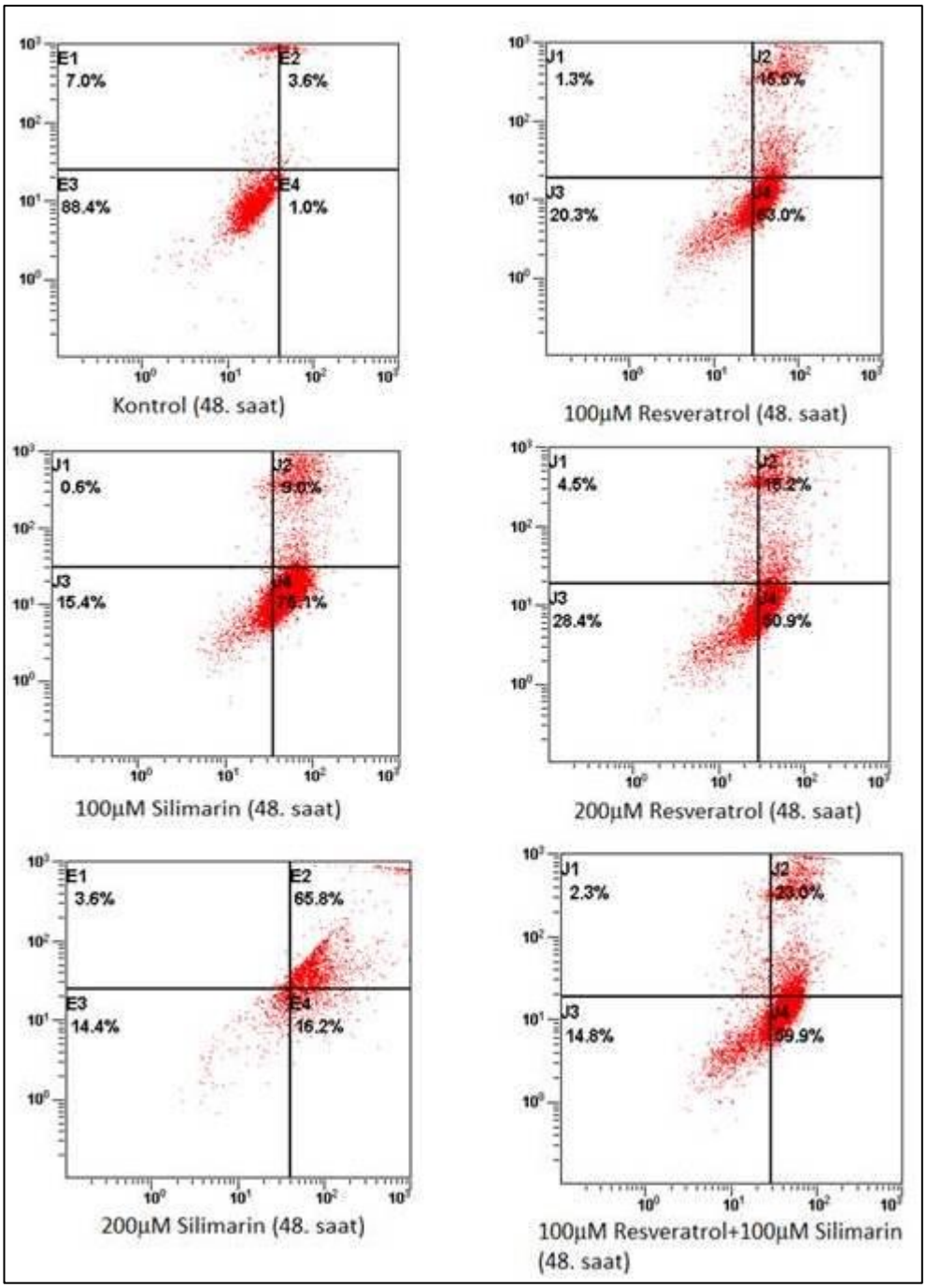
24 saat inkübasyon sonucu kontrol grubunda hücre canlılığı %98.9'dur. 100 μM resveratrol uygulanan hücre grubunda canlılık %45.7'ye düşerken bu gruptaki hücrelerin %26.1'i apoptoza, %28.2'si nekroza uğramıştır. Konsantrasyon 2 katına çıkarılıp 200 μM resveratrol uygulandığında ise hücre canlılığı %15.4'e düşmüş, apoptoza uğrayan hücreler %55'e, nekroza uğrayan hücreler %29.7'ye çıkmıştır. 100 μM silimarin uygulanan hücre grubunda canlılık %20.5'e düşerken bu gruptaki hücrelerin %30.8'i apoptoza, %48.7'si nekroza uğramıştır. Konsantrasyon 2 katına çıkarılıp 200uM silimarin uygulandığında ise hücre canlılığı %12.6'ya düşmüş, apoptoza uğrayan hücreler %59'a çıkmış, nekroza uğrayan hücreler ise %28.2'ye düşmüştür. 100 μM resveratrol+100 μM silimarin uygulanan hücre grubunda canlılık %14.8, apoptoza uğrayan hücre oranı %48.7 ve nekroza uğrayan hücre oranı %36.6'dır (Şekil 4.18).



Şekil 4.18: Huh7 hücreleri ile 24 saat inkübe edilen resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonunun hücre ölümüne etkisi.

48 saat inkübasyon sonucu kontrol grubunda hücre canlılığı %88.7'dir. 100 µM resveratrol uygulanan hücre grubunda canlılık %20'e düşerken bu gruptaki hücrelerin %78.6'sı apoptoza, %1.4'ü nekroza uğramıştır. Konsantrasyon 2 katına çıkarılıp 200 µM resveratrol uygulandığında ise hücre canlılığı %28.3 iken, apoptoza uğrayan hücrelerin oranı %67, nekroza uğrayan hücrelerin oranı ise %4.7'dir. 100

μM silimarin uygulanan hücre grubunda canlılık %15.6'ya düşerken bu gruptaki hücrelerin %84.1'i apoptoza, %0.4'ü nekroza uğramıştır. Konsantrasyon 2 katına çıkarılıp 200 μM silimarin uygulandığında ise hücre canlılığı %14.3'e, apoptoza uğrayan hücrelerin oranı %81.9'a düşmüş, nekroza uğrayan hücrelerin oranı ise %3.8'e çıkmıştır. 100 μM resveratrol+100 μM silimarin uygulanan hücre grubunda canlılık %14.6, apoptoza uğrayan hücre oranı %83.4 ve nekroza uğrayan hücre oranı %2'dir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19: Huh7 hücreleri ile 48 saat inkübe edilen resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonunun hücre ölümüne etkisi.

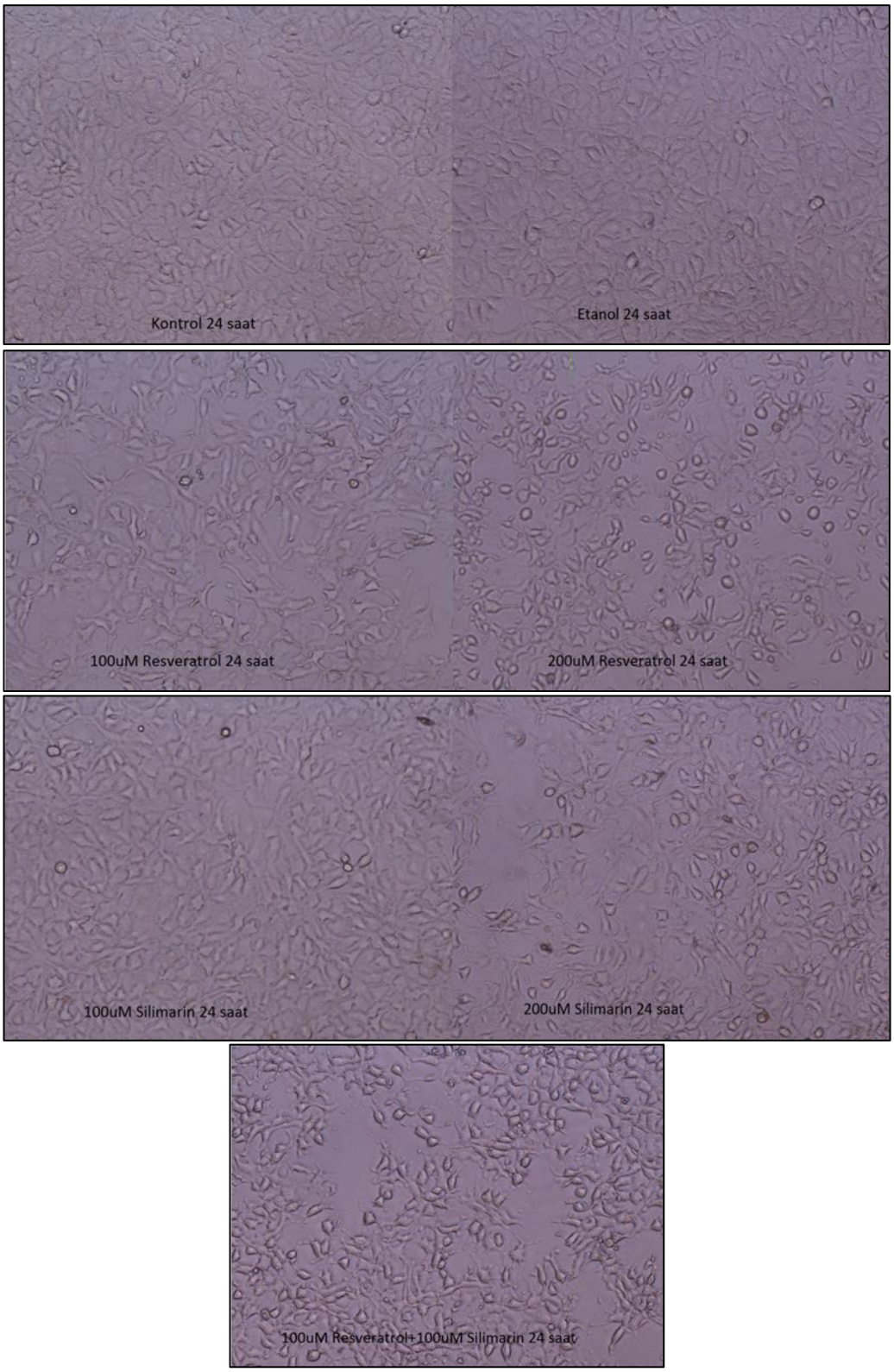
Tablo 4.3: Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonu uygulamasından sonra akan hücre ölçer analizinde canlılık ve hücre ölümü yüzdeleri.

24H	Canlı	Erken apoptoz	Geç apoptoz	Nekroz
Kontrol	98,9	0,2	0,4	0,4
100R	45,7	1	25,1	28,2
200R	15,4	0,2	54,8	29,7
100S	20,5	0,3	30,5	48,7
200S	12,6	0,4	58,6	28,2
R+S	14,8	0,2	48,5	36,6
48H	Canlı	Erken apoptoz	Geç apoptoz	Nekroz
Kontrol	88,7	1,1	3,3	6,9
100R	20	62,9	15,7	1,4
200R	28,3	51	16	4,7
100S	15,6	75,2	8,9	0,4
200S	14,3	16	65,9	3,8
R+S	14,6	61	22,4	2

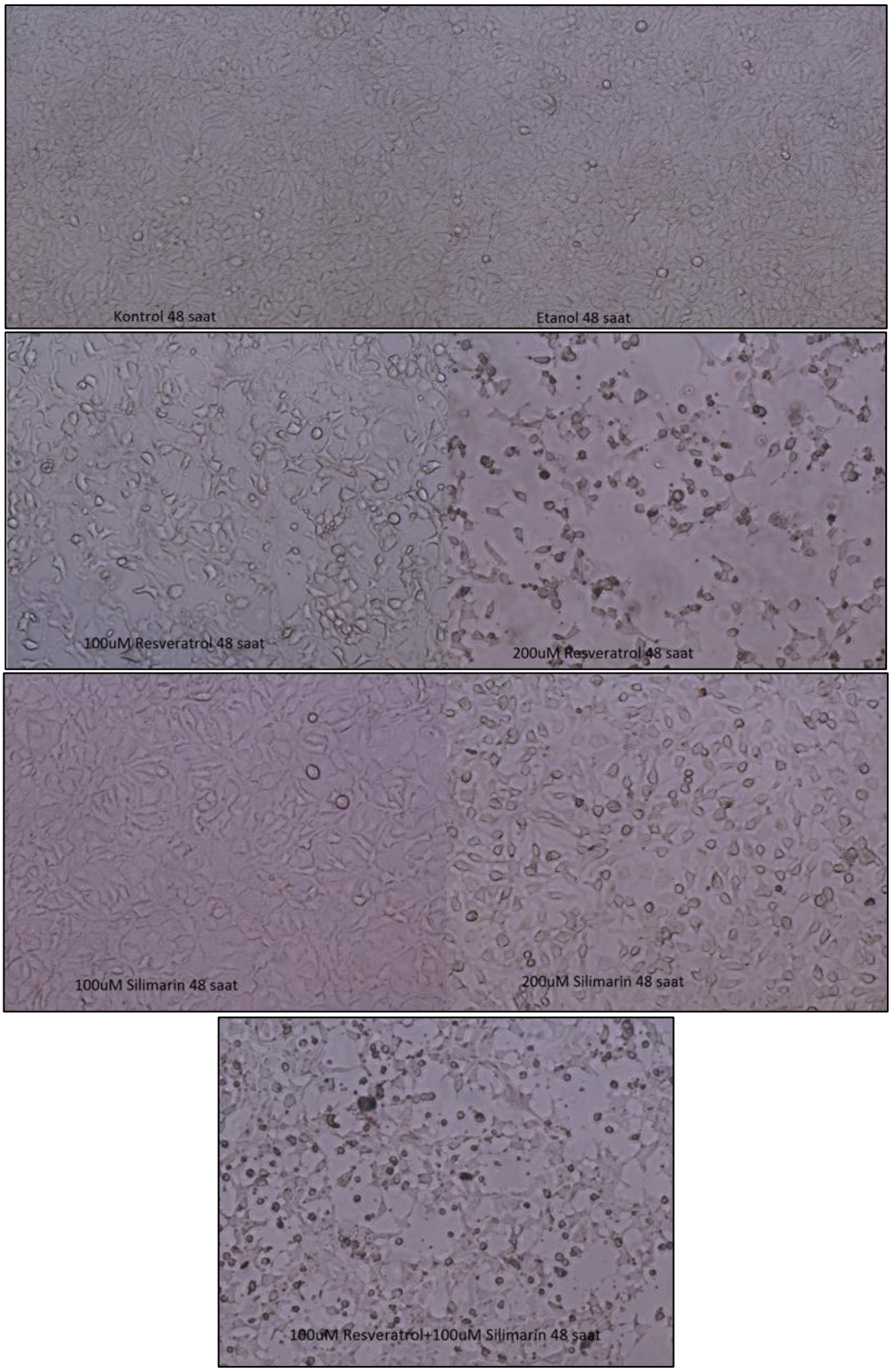
4.5. Resveratrol ve Silimarin Uygulamaları Sonrası Hücre Morfolojisinin İncelenmesi

Resveratrol, silimarin ve resveratrol+silimarin kombinasyonu uygulamaları sonrası Huh7 hücrelerinin morfolojik görüntüleri ışık mikroskobu kullanılarak gözlemlenmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol hücreleri ile %0,25 etanol eklenen hücreler arasında morfolojik bir farklılık gözlenmemiştir. Uygulama

yapılan hücreler ile kontrol hücreleri karşılaştırıldığında ise uygulama yapılan hücrelerin küçüldüğü ve oval hale geldiği gözlemlenmiştir. Ayrıca hücre sayısında azalma olduğu dolayısıyla hücre proliferasyonun inhibe edildiği görülmektedir.



Şekil 4.20: Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonunun 24 saatte Huh7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler.



Şekil 4.21: Resveratrol, silimarin ve resveratrol/silimarin kombinasyonunun 48 saatte Huh7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimler.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Konvansiyonel kanser tedavilerinde başarı oranının düşük olması, hastalığın çoğunlukla nüksetmesi ve çeşitli yan etkilerin ortaya çıkmasından dolayı sağlıklı bir diyetle besin terapisi uygulanarak destek terapi yolları aranmaktadır [Venugopal and Liu, 2012].

Bitkilerde kendiliğinden doğal olarak oluşan ve antikanser özellik gösteren kemopreventif maddelerden resveratrol ve silimarin toksik özellik göstermedikleri, kısmen etki mekanizmaları bilindiği ve elde edilmesi kolay olduğu için gıda takviyesi olarak kullanılabilmektedir [Athar, 2007], [Singh, 2013].

Tez çalışmamızda değişik konsantrasyonlarda resveratrol, silimarin ve kombinasyonlarının hepatoselüler karsinoma Huh7 hücreleri üzerine anti-kanser etkileri araştırılmıştır. Çalışmamız sonucunda resveratrol, silimarin ve resveratrol+silimarin kombinasyonunun anti-proliferatif etki gösterdiği, apoptozu indüklediği ve hücre siklus fazlarında durdurmaya yol açtığı tespit edilmiştir.

Hücre ölümünü tayin eden sitotoksisite deneylerinin sonucuna göre, hücrelerin 100 μM (22,8 μg/ml) ve 200 μM (45,6 μg/ml) resveratrol ile 24 saat inkübasyonu canlılık oranını %35 civarına düşürmektedir. Resveratrolün 100 μM konsantrasyonunda 48 saat sonra canlı hücre oranı %42,2'dir ($p \leq 0,05$). Bu %7 gibi farkın Huh7 hücrelerinin ikilenme zamanının 31 saat olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Hücrelerin 100 μM resveratrol ile 24 veya 48 saat inkübasyonunun hücre proliferasyonuna etkisinin hemen hemen aynı olduğu görülmektedir. Resveratrolün 200 μM konsantrasyonunun 48 saat sonra hücre proliferasyonuna etkisinin daha belirgin olduğu ve canlı kalan hücre oranının %23,5'e düştüğü saptanmıştır ($p \leq 0,05$). Liao ve arkadaşları Huh7 hücrelerini 48 saat boyunca değişik konsantrasyonlarda resveratrol ile inkübe etmişler ve bunun sonucunda 20 μg/ml konsantrasyon için hücre ölümünü %49.9 ve 40 μg/ml konsantrasyon için hücre ölümünü %72.9 olarak saptamışlardır [Liao et al., 2010]. Bu sonuçlar çalışmamızın sonuçlarıyla karşılaştırıldığında yakın benzerlik göstermekte dolayısıyla sitotoksisite sonuçlarımızı desteklemektedir. Resveratrolün IC_{50} değeri ise 24 saat için 77,2 μM, 48 saat için ise 86,5 μM olarak hesaplanmıştır. Bai ve arkadaşları T24 kan kanseri hücre hattına farklı konsantrasyonlarda resveratrol uygulamış ve IC_{50} değerlerini 12, 24 ve 48 saat için sırasıyla 250, 180 ve 160 μM olarak bulmuşlardır [Bai et al.,

2009]. Farklı hücrelerle yapılan çalışmalar resveratrolün antiproliferatif etkisini ortaya koymaktadır.

Silimarin uyguladığımız sitotoksisite deneylerinde, hücrelerin 100 μM (48,25 μg/ml) silimarin ile 24 saat ve 48 saat inkübasyonu sonucunda canlı kalan hücre oranı %52 civarındadır. Silimarinin konsantrasyonu 200 μM'a (96,5 μg/ml) yükseltildiğinde prolifere olan hücre oranı 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda %40 civarındadır ($p \leq 0,05$). Bu sonuç inkübasyon süresi artmasına rağmen ölen hücre oranının sabit kaldığını dolayısıyla hücre proliferasyonunda büyük bir değişiklik olmadığını göstermektedir. Silimarinin IC_{50} değerleri 24 saat için 104,8 μM, 48 saat için 106,5 μM olarak hesaplanmıştır. Ramakrishnan ve arkadaşları HepG2 hepatoselüler karsinoma hücreleri ile yaptıkları bir çalışmada HepG2 hücrelerine 50, 75, 100, 200 μg/ml silimarin uygulayarak 24 saat inkübe etmişlerdir. İnkübasyon sonucu konsantrasyona bağlı olarak %10 - %85 aralığında hücre ölümü tespit etmişlerdir [Ramakrishnan et al., 2008]. Varghese ve arkadaşları HepG2 ve Hep3B hücreleriyle yaptıkları bir çalışmada hücrelere 100, 200, 300 μmol/L silimarin uygulayarak 48 ve 72 saat inkübe etmişlerdir. İnkübasyon sonucu proliferasyonun HepG2 hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak sırasıyla %30 - %65 ve %43 - %77, Hep3B hücrelerinde %45 - %69 ve %40 - %75 inhibe edildiğini bildirmişlerdir [Varghese et al., 2005]. Güncel literatürdeki çalışmalar sonuçlarımızı (ör: 100 μM) desteklemekte ve silimarinin antiproliferatif etkisini göstermektedir.

Resveratrol (100 μM) ve silimarinin (100 μM) birlikte uygulandığı sitotoksisite deneylerine göre, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonucu hücre canlılığı sırasıyla %28.15 ve %27.18'dir ($p \leq 0,05$). Resveratrol ve silimarin kombinasyonunun tek başına yapılan uygulamalara göre hücre canlılığını daha yüksek oranda düşürdüğü böylece sinerjistik bir etki yarattığı görülmektedir. Güncel literatür incelendiğinde hem resveratrolün hem de silimarinin birlikte uygulandığı çalışmalara rastlanmamıştır. Ancak diğer başka maddelerle (örn: quercetin) kombinasyonları bulunmaktadır. Bu çalışmalarda bu iki fitokimyasalın kanser hücre dizilerinde etkin anti-proliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir [Zhou et al., 2012].

Son yıllarda yapılan *in vitro* çalışmalar, gerek resveratrolün gerekse silimarinin kanser hücrelerini büyük oranda apoptoz yoluyla ölüme götürdüğünü bildirmiştir [Bai et al., 2009], [Ramakrishnan et al., 2008]. Tez çalışmasında akan hücre ölçer cihazı kullanılarak erken apoptoz belirteci olan fosfotidilserinin saptanmasına dayalı

analizler yapılarak resveratrol ve silimarinin etkisine bağlı programlı hücre ölümü incelenmiştir.

Sonuç bölümünde tablo 4.3'te detaylı olarak belirtildiği gibi resveratrol uygulamaları sonucu 24 saat sonra hücre ölümü geç apoptoz ve nekroz yoluyla olmaktadır. 100 μM resveratrolün 24 saat sonra meydana getirdiği apoptoz oranı %26,1 nekroz yoluyla hücre ölümü ise %28,2'dir. Resveratrolün 200 μM konsantrasyonunda bu değerler sırasıyla %55 ve %29,7'dir. Bu sonuca göre 200 μM resveratrol konsantrasyonunun daha etkin olduğu gözlenmektedir. Hücrelerin 48 saat 100 ve 200 μM resveratrol ile inkübasyonunun ardından apoptoz oranı sırasıyla %78,6 ve %67'dir. Bu sonuç 200 μM resveratrolün 100 μM resveratrole kıyasla daha az hücreyi apoptoza götürdüğünü göstermektedir. Bu farklı sonucun hücrelerin analize götürülürken oluşan taşıma koşulları veya bazı teknik olumsuzluklardan ortaya çıktığı düşünülmektedir. Sonuçlarımızda resveratrol uygulamaları sonrası erken apoptoz 48 saat sonra oluşmaktadır. Bu durum ikilenme zamanı 31 saat olan Huh7 hücrelerinde fosfotidilserinin 31. saatten sonra hücre dışına lokalize olduğunu düşündürmektedir. Liao ve arkadaşları Huh7 hücre hattı ile yaptıkları çalışmada 48 saat boyunca uygulanan resveratrolün (40 μg/ml) %35 civarında apoptozu indüklediğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada resveratrolün p53'ten bağımsız olarak p21 ifadesini arttırdığı ve mitokondriyal membranın geçirgenliğini değiştirerek kaspaz bağımlı yolağı aktive ettiği gösterilmiştir [Liao et al., 2010]. HepG2 hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada araştırmacılar resveratrol uygulanan hücrelerde p21 proteininin ve hücre siklusu tutuklanması ve apoptozun indüklenmesinde rol oynayan Chk2 enziminin seviyesinde artış olduğunu göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada pro-apoptotik proteinlerden Bax, Bim ve Puma'nın ifadesinde artış olduğu bulunmuştur [Zhou et al., 2009]. T24 kan kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada resveratrolün anti-apoptotik Akt sinyal yolağını inhibe ettiğini ayrıca anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-XL proteinlerinin ifadesini azaltırken pro-apoptotik Bax proteininin ifadesini arttırdığını bildirmiştir [Bai et al., 2009].

Hücrelerin 100 μM silimarin ile 24 saat inkübasyonu sonucunda hücrelerin %30,8'i apoptoz, %48.7'si nekroz yoluyla ölmektedir. 200 μM silimarin uygulaması sonucunda ise hücrelerin %59'u apoptoz, %28,2'si nekroz yoluyla ölmektedir. Hücrelerin silimarin ile 48 saat inkübasyonu sonucu 100 μM silimarinde ortaya çıkan apoptoz oranı %84,1 iken 200 μM silimarinde oluşan apoptoz oranı %81.9'dur.

Yaptığımız deneyler silimarinin 24 saat inkübe edilen hücrelerde hem nekrotik hem de apoptotik hücre ölümünü indüklediği, 48 saat inkübe edilen hücrelerde ise apoptotik hücre ölümünü indüklediğini göstermiştir. Lah ve arkadaşları Huh7 hücre hattı ile yaptıkları çalışmada silibininin Bcl-2 ifadesinde değişikliğe yol açmadığını ancak sağ kalımı inhibe ettiğini ve aktif kaspaz 3 ve kaspaz 9 seviyelerini arttırdığını, aktif Akt (p-Akt) seviyesini ise azalttığını belirtmişlerdir [Lah et al., 2007]. HepG2 hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada silimarin uygulanan hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelinin azaldığı ve bu sayede sitokrom c salınımının gerçekleştiği, pro-apoptotik proteinlerden APAF-1, Bax, p53 ifadelerinin ve aktif kaspaz 3 seviyesinin arttığı, Bcl-2 ifadesinin ise azaldığı bildirilmiştir [Ramakrishnan et al., 2008].

Yaptığımız deneylerde resveratrol ve silimarin kombinasyonunun (100 μM+100 μM) hücrelerle 24 saat inkübasyonu sonucunda hücre ölümü %48.7 oranında apoptoz, %36.6 oranında nekroz yoluyla gerçekleşmiştir. 48 saat inkübasyon sonucunda ise bu oranlar sırasıyla %83.4 ve %2'dir. Bu sonuç 2 fitokimyasalın birlikte uygulanmasının hücreleri oldukça yüksek oranda apoptoza götürdüğünü, ancak tek başına uygulamalarla karşılaştırıldığında belirgin bir farka yol açmadığını göstermektedir.

Akan hücre ölçer analizlerine göre, gerek resveratrolün, gerekse silimarinin apoptozu indüklediğini, saptanan nekrotik hücre ölümünün ise aslında apoptotik hücrelerin intakt membran yapısının bozulmasından ötürü boyanmayan parçalanmış apoptotik hücrelerden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Resveratrol+silimarin kombinasyonu uygulaması sonucu oluşan %83.4 gibi oldukça yüksek apoptotik hücre oranı ve güncel literatürdeki çalışmalar bu düşüncemizi kuvvetli bir şekilde desteklemektedir.

Tez çalışmamızın diğer bölümünde; resveratrolün, silimarinin ve kombinasyonlarının Huh7 hücrelerinin hücre döngüleri üzerine etkileri ve olası hücre siklusu bloklarının (ya da fazlarda tutulmaların) incelenmesi hedeflenmiştir.

Tablo 4.2'de özetlendiği gibi; 6, 12, 18, 24 ve 48 saat 100 μM ve 200 μM resveratrol ile inkübe edilen hücrelerde siklusun S evresinde kontrole kıyasla daha fazla hücrenin toplandığı saptanmıştır ($p \leq 0,05$). Liao ve arkadaşları da Huh7 hücre serisi ile yaptıkları çalışmada resveratrolün siklin A, siklin E ve cdk2 ifadelerini azalttığını ve bu şekilde S evresinde bloğa neden olduğunu bildirmişlerdir [Liao et al., 2010]. Diğer bir çalışmada da; U937 lenfoma hücrelerinde resveratrol siklin E,

siklin A, siklin D3 ifadesini arttırırken cdk2 ifadesini azaltıcı etki göstererek S evresinde tutuklanmaya neden olmuştur [Park et al., 2001]. HepG2 hücreleri ile yapılan bir çalışmada araştırmacılar resveratrol uygulanan hücrelerde hücre siklusu tutuklanmasında rol oynayan Chk2 enziminin seviyesinde artış olduğunu ve S evresinde tutuklanmaya yol açtığını göstermişlerdir [Zhou et al., 2009]. T24 kan kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada ise resveratrol G1 evresinde tutuklanmaya sebep olmuştur. Çalışmanın devamında resveratrolün hücrelerde p21/WAF-1 proteinin ifadesini indüklediği fosforillenmiş Rb, siklin D1 ve cdk4 ifadelerini ise azalttığı tespit edilmiştir [Bai et al., 2009].

Histogram analizlerine göre; 6 saat 100 μM ve 200 μM silimarin ile inkübe edilen hücrelerin hücre siklusunun hiçbir fazında herhangi bir tutuklanma görülmemiştir. Ancak 12, 18, 24 ve 48 saat 100 μM ve 200 μM silimarin ile inkübe edilen hücrelerde siklusun G2/M fazında diğer siklus fazlarına kıyasla daha fazla hücrenin toplandığı gözlenmektedir ($p \leq 0,05$). Lah ve arkadaşları Huh7 hücre hattı ile yaptıkları çalışmada silibininin siklin D1/CDK4 kompleksini inhibe ettiğini buna bağlı olarak da Rb fosforilasyonunu azaltarak G1-S geçişinde tutuklanmaya sebep olduğunu göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada silibinin uygulanan hücrelerde siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinden p21 ve p27 ifadelerinde önemli bir artış tespit edilmezken p21/CDK4 ve p27/CDK4 komplekslerinin oluşumunda artış olduğu bulunmuştur [Lah et al., 2007]. Hepatoselüler karsinoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada silibinin uygulanan HepG2 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak yüksek oranda G1 fazında tutuklanma görülürken Hep3B hücrelerinde G2/M evresinde tutuklanma tespit edilmiştir. HepG2 ve Hep3B hücrelerinde silibinin uygulaması siklin D1, siklin D3, siklin E, CDK4 ve CDK2 seviyelerinde önemli bir düşüşe yol açmıştır. Araştırmacılar Hep3B hücrelerinde G2/M geçişinde rol oynayan CDK1'i fosfor eklenmiş inaktif formdan aktif forma dönüştüren CDC25C fosfataz ve siklin B1 seviyesinde azalma tespit etmişlerdir [Varghese et al., 2005]. Deep ve arkadaşları PC3 prostat kanseri hücrelerine silibinin ve silimarin uygulayarak etkilerini karşılaştırmışlar. Silimarin ve silibinin uygulanan hücrelerde doza ve zamana bağlı olarak G1 (50 μg/ml) ve G2/M (100 μg/ml) evrelerinde tutuklanma gözlenmiş ve 100 μg/ml Silimarin ve silibinin uygulanan hücrelerde siklin B1, siklin A, CDK1 ve G2/M geçişinde rol oynayan Cdc25B ve Cdc25C ifadelerinde azalma tespit edilmiştir [Deep et al., 2006].

Tez çalışmamızda 100 μM resveratrol ve 100 μM silimarin birlikte Huh7 hücrelerine uygulanarak resveratrol ve silimarinin sinerjistik etkisi ortaya konmaya çalışılmıştır. 6, 12, 18 saat resveratrol ve silimarin kombinasyonu hücre siklusunun G2/M fazında bloğa sebep olmuştur. 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda ise G2/M evresinde belirgin bir azalma ile G1 fazında blok tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$).

Ökaryotik hücre döngüsünde 3 ana kontrol noktası (check-points) bulunur. G1 kontrol noktası: DNA hasarına ve olumsuz koşullara duyarlıdır. DNA tamiri, G0 ya da apoptoza giriş sağlanır. S-fazı kontrol noktasında; DNA'nın devamlı olarak bütünlüğü sağlanır ve replikasyon sonucu oluşan hatalar kontrol edilir ve onarılır. G2 kontrol noktasında ise replike olmamış ve hasarlı DNA'nın onarımı hedeflenir. Tamamlanmadan mitoza geçişe izin verilmez [Alarcon et al., 2004]. Hücre siklusunun fazlarda durması DNA hasarının tamiri için gereklidir. Örneğin; G1 fazında durma p53 bağımlı cdk inhibitörleri aracılığıyla sağlanır. Bu olayda görevli olan p21 cyclin/cdk kompleksini inhibe ederek hücrenin S fazına girmesini engeller. Fazlarda durdurulmaya rağmen DNA hasarının tamir edilemediği durumlarda apoptozisi indükleyen genler (örneğin; bax, IGF gibi) aktive olabilir. Bax bcl-2'ye bağlanarak onu antagonize eder ve apoptozisin oluşmasını sağlar. Huh7 hücreleri ile yapılan çalışmalarda apoptozisin p53'ten bağımsız p21 ifadesinin artması ve pro-apoptotik proteinlerin ifadesinin indüklenmesi ile gerçekleştiği, hücre siklusundaki blokların ise hücre siklusunun düzenlenmesinde rol oynayan siklin (ör: Siklin A, Siklin E), siklin bağımlı kinaz (ör: CDK2) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin (ör: p21, p27) ifadelerindeki değişimler sebebiyle olduğu bildirilmiştir [Liao et al., 2007], [Lah et al., 2007]. Tez çalışmasından elde ettiğimiz hücre döngüsünün çeşitli fazlarında ki bloklar ve nihayetinde apoptozis yoluyla ölüm birbiriyle uyumlu sonuçlardır.

Sonuç olarak her 2 fitokimyasalın ve kombinasyonlarının hücre siklusunun G1, S ve G2/M fazlarında bloklara neden olduğu ancak DNA hasarının onarılamadığı, dolayısıyla hücrelerde apoptotik hücre ölümlerinin oluştuğu saptanmıştır.

Tez çalışması kapsamında Huh7 hücreleri ile yapmış olduğumuz bu ilk öncü *in vitro* deneylerin devamı olarak gerek apoptotik yolaklarda ki, gerekse hücre siklusu kontrol noktalarındaki siklin/siklin-bağımlı kinaz genlerinin ifadeleri üzerindeki etkilerin araştırılması hedeflenmektedir.

Uzun süreli iyi dizayn edilmiş moleküler düzeyde ki kapsamlı deneyleri içeren çalışmalar hem resveratrolün hem silimarinin ve özellikle kombinasyonlarının klinikte kullanılabilirliğine dair yeni bakış açıları kazandıracaktır.

KAYNAKLAR

Agarwal M. L., Taylor W. R., Chernov M. V., Chernova O. B., Stark G. R., (1998), "The p53 network", Journal of Biological Chemistry, 273, 1.

Agarwal R., Agarwal C., Ichikawa H., Singh R. P., Aggarwal B. B., (2006), "Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side", Anticancer Research, 26 (6B), 4457-98.

Ahmad N., Gali H., Javed S., Agarwal R., (1998), "Skin cancerchemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarinare mediated via impairment of receptor tyrosine kinasesignaling and perturbation of cell cycle progression", Biochemical and Biophysical Research Communications, 247, 294–301.

Alarcon T., Byrne H. M., Maini P. K., (2004), "A mathematical model of the effects of hypoxia on the cell cycle of normal and cancer cell", Journal of Theoretical Biology, 229 (3), 395-411.

Allain H., Schück S., Lebreton S., Strenge-Hesse A., Braun W., Gandon J. M., Brissot P., (1999), "Aminotransferase levels and silymarin in de novo tacrine-treated patients with Alzheimer's disease", Dementia and Geriatric Cognitive Disorders, 10, 181-185.

Almeida L., Vazda S. M., Falcao A., Soares E., Costa R., Loureiro A., Fernandes-Lopes C., Rocha J. F., Nunes T., Wright L., Soares-da-Silva P., (2009), "Pharmacokinetic andsafety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dosestudy in healthy volunteers", Molecular Nutrition Food Research, 53 (1), 7-15.

Amaravadi R. K., Thompson C. B., (2007), "The Roles of Therapy-Induced Autophagy and Necrosis in Cancer Treatment", Clinical Cancer Research, 13, 7271-7279.

Amon A., (1999), "The spindle checkpoint", Current Opinion Genetics and Development, 9, (1), 69-75.

Aravalli R. N., Steer C. J., Cressman E. N., (2008), "Molecular mechanism of hepatocellular carcinoma", Hepathology, 48, 2047-2063.

Arellano M., Moreno S., (1997), "Regulation of CDK /cyclin complexes during the cell cycle", The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 29 (4), 559-73.

Assoian R. K., Zhu X., (1997), "Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression", Current Opinion in Cell Biology, 9 (1), 93-8.

Athar M., Back J. H., Tang X., Kim K. H., Kopelovich L., Bickers D. R., Kim A. L., (2007), “Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention”, Toxicology and Applied Pharmacology, 224 (3), 274-83.

Atten M. J., Godoy-Romero E., Attar M. A., Milson T., Zopel M., Holian O., (2005), “Resveratrol regulates cellular PKC α and δ to inhibit growth and induce apoptosis in gastric cancer cells”, Inventigational New Drugs, 23, 111-119.

Baez A., Torres K., Tan E. M., Pommier Y., Casiano C. A., (1996), “Expression of proliferation-associated nuclear autoantigens, $P330^{d}$/CENP-F and PCNA, in differentiation and in drug-induced growth inhibition using two-parameter flow cytometry”, Cell Proliferation, 29, 183–196.

Bai Y., Mao Q. Q., Qin J., Zheng X. Y., Wang Y. B., Yang K., Shen H. F., Xie L. P., (2010), “Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo”, Cancer Science, 101 (2), 488-93.

Bao Q., Shi Y., (2003), “Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases”, Cell Death and Differentiation, 14, 56–65.

Baur J. A., Sinclair D. A., (2006), “Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence”, Nature Reviews Drug Discovery, 5 (6), 493-506.

Belghiti J., Regimbeau J. M., Durand F., (2002), “Resection of hepatocellular carsicinoma: a European experience of 328 cases”, Hepatogastroenterology, 49, 41-46.

Bell S. P., Dutta A., (2002), “DNA replication in eukaryotic cells”, Annual Review of Biochemistry, 71, 333–74.

Benitez D. A., Pozo-Guisado E., Alvarez-Barrientos A., Pedro M., Salguero F., Castellon E. A., (2007), “Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cellcycle arrest in prostate cancer-derived cell lines”, Journal of Andrology, 28 (2), 282-293.

Bishayee A., Dhir N., (2009), “Resveratrol-mediated chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis: Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis”, Chemico-Biological Interactions, 179 (2-3), 131–144.

Boatright K. M., Renatus M., Scott F. L., Sperandio S., Shin H., Pedersen I. M., Ricci J. E., Edris W. A., Sutherlin D. P., (2003), “A unified model for apical caspase activation”, Molecular Cell, 11, 529–41.

Boocock D., Patel K., Faust G., Normolle D. P., Marczylo T. H., Crowell J. A., Brenner D. E., Tristan D. B., Gescher A., Steward W. P., (2007), “Quantitation of trans resveratrol and detection of its metabolites in human -plasma and urine by high performance liquid chromatography”, Journal of Chromatography B, 848 (2), 182-187.

Borriello A., Cucciolla V., Ragione F. D., Galletti P., (2010), “Dietary polyphenols: Focus on resveratrol, a promising agent in theprevention of cardiovascular diseases and control of glucosehomeostasis”, Nutrition Metabolism and Cardiovascular Disease, 20 (8), 618-625.

Bortner C. D., Oldenburg N. B., Cidlowski J. A., (1995), “The role of DNA fragmentation in apoptosis”, Trends in Cell Biology, 5, 21–6.

Bosch F. X, Ribes J, Diaz M, Cleries R., (2004), “Primary liver cancer: worldwide incidence and trends”, Gastroenterology, 127, 5-16

Bratton D. L., Fadok V. A., Richter D. A., Kailey J. M., Guthrie L. A., Henson P. M., (1997), “Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flipflop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase”, Journal of Biological Chemistry, 272, 26159–26165.

Brown V., Patel K., Viskaduraki M., Crowell J. A., Perloff M., Booth T. D., Vasilinin G., Sen A., Schinas A. M., Piccirili G., Brown K., Steward W. P., Gescher A. J., Brenner D. E., (2010), “Repeat dose study ofthe cancer chemopreventive agent resveratrol in healthyvolunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on theinsulin-like growth factor axis”, Cancer Research, 70 (22), 9003-9011.

Butt A. J., Firth S. M., Baxter R. C., (1999), “The IGF axis and programmed cell death”, Immunology and Cell Biology, 77, 256–62.

Calamini B., Ratia K., Malkowski M. G., Cuendet M., Pezzuto J. M., Santarsiero B. D., Mesecar A. D., (2010), “Pleitropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites”, Biochemical Journal, 429, 273-282.

Cam H., Dynlacht B. D., (2003), “Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication”, Cancer Cell, 3, 311–6.

Carnero A., Hannon G. J., (1998), “The INK4 family of CDK inhibitors”, Current Topics in Microbiology and Immunology, 227, 43.

Cecchinato V., Chiaramonte R., Nizzardo M., Cristofaro B., Basile A., Sherbet G. V., Comi P., (2007), “Resveratrol-induced apoptosis in human T-cell acutelymphoblastic leukaemia MOLT-4 cells”, Biochemical Pharmacology, 74 (11), 1568-1574.

Chachay V. S., Kirkpatrick C. J., Hickman I. J., Ferguson M., Prind J. B., Martin J. H., (2011), “Resveratrol-pills to replace a healthy diet”, British Journal of Clinical Pharmacology, 72 (1), 27-38.

Chen L., Willis S. N., Wei A., Smith B. J., Fletcher J. I., Hinds M. G., Colman P. M., Day C. L., Adams J. M., Huang D. C., (2005), “Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function”, Molecular Cell 17 (3), 393–403.

Chow H., Garland L., Hsu C., Vining D. R., Chew W. M., Miller J. A., Perloff M., Crowell J. A., Alberts D. S., (2010), “Resveratrol modulates drugand carcinogen-metabolizing enzymes in a healthy volunteer study”, Cancer Prevention Research, 3 (9), 1168-1175.

Deep G., Agarwal R., (2007), “Chemopreventive efficacy of silymarin in skin and prostate cancer”, Integrative Cancer Therapies, 6 (2), 130-45.

Deep G., Singh R. P., Agarwal C., Kroll D. J., Agarwal R., (2006), “Silymarin and silibinin cause G1 and G2–M cell cycle arrest via distinct circuitries in human prostate cancer PC3 cells: a comparison of flavanone silibinin with flavanolignan mixture silymarin”, Oncogene, 25 (7), 1053–1069.

Deng J. Y., Hsieh P. S., Huang J. P., Lu L. S., Hung L. M., (2008), “Activation of estrogen receptor is crucial for resveratrol-stimulating muscular glucose uptake via both insulin-dependent and -independent pathways”, Diabetes, 57 (7), 1814-23.

Deniz G., (2007), “Flow sitometrik tekniklerin klinik kullanımı”, Türkiye Klinikleri, Journal of Internal Medical Science, 3 (43), 73-8.

Docherty J. J., Sweet T. J., Bailey E., Faith S. A., Booth T., (2006), “ Resveratrol inhibition of varicella-zoster virus replication in vitro”, Antiviral Research 72 (3), 171–177.

Donepudi M., Mac S. A., Briand C., Grutter M. G., (2003), “Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation”, Molecular Cell, 11 (2), 543-549.

Doonan F., Cotter T. G., (2008), “Morphological assessment of apoptosis”, Methods, 44, 200–204.

Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X., (2000), “Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition” Cell, 102, 33–42.

Dunphy C. H., (2004), “Applications of Flow Cytometry and immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology”, Archives and Pathology & Laboratory Medicine, 128 (9),1004-1022.

Eckelman B. P., Salvesen G. S., (2006), “The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases”, Journal of Biological Chemistry, 281, 3254–60.

Edinger A. L., Thompson C. B., (2004), “Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy”, Current Opinion in Cell Biology, 16, 663–669.

El-Deiry W. S., Tokino T., Velculescu V. E., Levy D. B., Parsons R., Trent J. M., Lin D., Mercer W. E., Kinzler K. W., Vogelstein B., (1993), “WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression”, Cell, 75 (4), 817-825.

Elmore S., (2007), “Apoptosis: A review of programmed cell death”, Toxicologic Pathology, 35 (4), 495–516.

El-Serag H. B., (2011), “Hepatocellular carcinoma”, New England Journal of Medicine, 365 (12), 1118-27.

El-Serag H. B., Rudolph K. L., (2007), “Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis”, Gastroenterology, 132 (7), 2557–76.

Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S., (1998), “A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD”, Nature, 391, 43–50.

Fadok V. A., Bratton D. L., Rose D. M., Pearson A., Ezekewitz R. A., Henson P. M., (2000), “A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells”, Nature, 405, 85–90.

Fang G., Yu H., Kirschner M. W., (1998), “The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation”, Genes Development, 12 (12), 1871-1883.

Farber E., (1984), “The multi-step nature of cancer development”, Cancer Research, 44, 4217–4223.

Folkman J., (2002), “Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis”, Seminars in Oncology, 29, 15–18.

Fulda S., Debatin K. M., (2004), “Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol”, Oncogene, 23 (40), 6702-11.

Gatti R., Belletti S., Orlandini G., Bussolati O., Dall’asta V., Gazzola G. C., (1998), “Comparison of Annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy”, Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 46, 895–900.

Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. A., (1992), “Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation”, Journal of Cell Biology, 119, 493-501.

Girard F., Strausfeld U., Fernandez A., Lamb N. J., (1991), “Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts”, Cell, 67 (6), 1169-1179.

Gottlieb T. M., Oren M., (1998), “p53 and apoptosis”, Seminars in Cancer Biology, 8 (5), 359-368.

Gresele P., Cerletti C., Guglielmini G., Pignatelli P., de Gaetano G., Violi F., (2011), “Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: anupdate”, Journal of Nutritional Biochemistry, 22 (3), 201-211.

Güleş Ö., Eren Ü., (2008), “Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler”, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2, 73-78.

Hanahan D., Weinberg R. A., (2000), “The hallmarks of cancer”, Cell, 100, 57–70.

Hao H. D., He L. R., (2004), “Mechanisms of cardiovascular protection by resveratrol”, Journal of Medicinal Food, 7 (3), 290-8.

Harbour J. W., Dean D. C., (2000), “Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis”, Nature Cell Biology, 2, E65–7.

Hengst L., Reed S. I., (1998), “Inhibitors of the Cip / Kip family”, Current Topics in Microbiology and Immunology, 227, 25-41.

Niida H., Tsuge S., Katsuno Y., Konishi A., Takeda N., Nakanishi M., (2005), “Depletion of Chk1 Leads to Premature Activation of Cdc2-cyclin B and Mitotic Catastrophe”, Journal of Biological Chemistry, 280, 39246-39252.

Hogan F. S., Krishnegowda N. K., Mikhailova M., Kahlenberg M. S., (2007), “Flavonoid, silibinin, inhibits proliferation and promotes cell-cycle arrest of human colon cancer”, Journal of Surgical Research, 143 (1), 58-65.

Hsieh T., Wang Z., Hamby C. V., Wu J. M., (2005), “Inhibition of melanoma cell proliferation by resveratrol is correlated with upregulation of quinone reductase 2 and p53”, Biochemical and Biophysical Research Communications 334 (1), 223–230

Imamura H., Matsuyama Y., Tanaka E., Ohkubo T., Hasegawa K., Miyagawa S., Sugawara Y., Minagawa M., Takayama T., Kawasaki S., Makuuchi M., (2003), “Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy”, Journal of Hepatology, 38 (2), 200–7.

Jamieson D., Tung A. T., Knox R. J., Boddy A. V., (2006), “Reduction of mitomycin C is catalysed by human recombinant NRH: quinone oxidoreductase 2 using reduced nicotinamide adenine dinucleotide as an electron donating co-factor”, British Journal of Cancer, 95 (9), 1229-1233.

Jeffrey P. D., Russo A. A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massague J., Pavletich N. P., (1995), “Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex”, Nature, 376, 313-320.

Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J., Ward E., Forman D., (2011), “Global cancer statistics”, Cancer Journal of Clinicians, 61 (2), 69–90.

Jiang C., Agarwal R., Lu J., (2000), “Anti-angiogenic potential of a cancerchemopreventive flavonoid antioxidant, silymarin: Inhibitionof key attributes of vascular endothelial cells and angiogeniccytokine secretion by cancer epithelial cells”, Biochemical and Biophysical Research Communications, 276 (1), 371–8.

Joe A. K., Liu H., Suzui M., Vural M. E., Xiao D., Weinstein I. B., (2002), “Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis and changes in

biomerker expression in several human cancer cell lines", Clinical Cancer Research, 8 (3), 893-903.

Karaboz İ., Kayar E., Akar S., (2008), "Flow Sitometri ve Kullanım Alanları", Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, 6, 1-18.

Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R., (1972), "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics", British Journal of Cancer, 26, 239–57.

Kischkel F. C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P. H., Peter M. E., (1995), "Cytotoxicitydependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor", EMBO Journal, 14, 5579–88.

Kitanaka C., Kuchino Y., (1999), "Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology", Cell Death Differentiation, 6, 508-515.

Kojiro M., Roskams T., (2005), "Early hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules", Seminars in Liver Disease, 25, 133-142.

Kressel M., Groscurth P., (1994), "Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA", Cell Tissue Research, 278, 549–56.

Kuwana T., Mackey M. R., Perkins G., Ellisman M. H., Latterich M., Schneiter R., Green D. R., Newmeyer D. D., (2002), "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane" Cell, 111, 331–42.

La P. C., Voduc N., Zhang G., Seguin I., Singhal N., Cameron D. W., (2010), "Steady-state pharmacokineticsand tolerability of trans-resveratrol 2000 mg twice daily with food, quercetin and alcohol (ethanol) in healthy human subjects", Clinical Pharmacokinetics, 49 (7), 449-454.

Labinskyy N., Csiszar A., Veress G., Stef G., Pacher P., Oroszi G., Wu J., Ungvari Z., (2006), "Vascular dysfunction in aging: potential effects of resveratrol, an anti-inflammatory phytoestrogen", Current Medicinal Chemistry, 13 (9), 989-96.

Ladas E. J., Cheng B., Hughes D., (2006), "Milk thistle (Silybum marianum) is associated with reductions in liver function tests (LFTs) in children undergoing therapy for acute lymphoblastic leukemia (ALL)", Society of Integrative Oncology; November 11, Boston, Massachusetts.

Lah J. J., Cui W., Hu K. Q., (2007), "Effects and mechanisms of silibinin on human hepatoma cell lines", World Journal of Gastroenterology, 13 (40), 5299-5305.

Leist M., Jaattela M., (2001), "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms", Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2 (8), 589-598.

Leonard S. S., Xia C., Jiang B. H., Stinefelt B., Klandorf H., Harris G. K., Shi X., (2003), "Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced

cellular responses", Biochemical and Biophysical Research Communications, 309 (4), 1017-26.

Letai A., Bassik M. C., Walensky L. D., Sorcinelli M. D., Weiler S., Korsmeyer S. J., (2002), "Distinct BH3 domains either sensitize oractivate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics", Cancer Cell 2, 183–92.

Levine A. J., (1997), "p53, the cellular gatekeeper for growth and division", Cell 88 (3), 323-31.

Lew D. J., Kornbluth S., (1996), "Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control", Current Opinion in Cell Biology, 8 (6),795-804.

Liao P. C., Ng L. T., Lin L. T., Richardson C. D., Wang G. H., Lin C. C., (2010), "Resveratrol arrests cell cycle and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells", Journal of Medicinal Food, 13 (6), 1415-23.

Liu R. H., (2004), "Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action", The Journal of Nutrition 134, 3479–3485.

Livraghi T., Solbiati L., Meloni F., Ierace T., Goldberg S. N., Gazelle G. S., (2003), "Percutaneous radiofrequency ablationof liver metastases in potential candidates for resection: The "test of time" approach", Cancer, 97, 3027-35.

Llovet J. M., Bru C., Bruix J., (1999), "Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification", Seminars in Liver Disease, 19 (3), 329–38.

Llovet J. M., Bruix J., (2003), "Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival", Hepatology, 37 (2), 429–42.

Lockshin R. A., Zakeri Z., (2004), Caspase-independent cell death? Oncogene, 2, 2766-2773.

Lockshin R. A., Zakeri Z., (2007), "Cell death in health and disease", Journal of Cellular and Molecular Medicine, 11, 1214-24.

Los M., Mozoluk M., Ferrari D., Stepczynska A., Stroh C., Renz A., Herceg Z., Wang Z. Q., Schulze-Osthoff K., (2002), "Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling", Molecular Biology og the Cell, 13 (3), 978-988.

Mahady G. B., Pendland S. L., (2000), "Resveratrol inhibits the growth of Helicobacter pylori in vitro", American Journal of Gastroenterology 95 (7), 1849.

Marelli L., Stigliano R., Triantos C., Senzolo M., Cholongitas E., Davies N., Tibballs J., Meyer T., Patch T. W., Burroughs A. K., (2007), "Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: which technique is more effective? A systematic review of

cohort and randomized studies", Cardiovascular and Interventional Radiology, 30 (1), 6–25.

Mazzaferro V., Regalia E., Doci R., Andreola S., Bozzetti F., Montalto F., Ammatuna M., Morabito A., Gennari L., (1996), "Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis", New England Journal of Medicine, 334 (11), 693–9.

McGlynn K. A., Tsao L., Hsing A. W., Devesa S. S., Fraumeni J. F. Jr., (2001), "International trends and patterns of primary liver cancer", International Journal of Cancer, 94 (2), 290-296.

Mehendale H. M., Roth R. A., Gandolfi A. J., Klaunig J. E., Lemasters J. J., Curtis L. R., (1994), "Novel mechanisms in chemically induced hepatotoxicity", FASEB Journal, 8 (15), 1285–1295.

Michels G., Watjen W., Weber N., Niering P., Chovolou Y., Kampkotter A., Proksch P., Kahl R., (2006), "Resveratrol induces apoptotic cell death in rat H4IIE hepatoma cells but necrosis in C6 glioma cells", Toxicology, 225, 173–182.

Mizushima N., Levine B., Cuervo A. M., Klionsky D. J., (2008), "Autophagy fights disease through cellular self-digestion", Nature, 451, 1069-75.

Morgan D. O., (1995), "Principles of CDK regulation", Nature 374 (6518), 131-4.

Mountz J. D., Zhou T., (2001), "Apoptosis and autoimmunity" In: A WJ Kopman Editor, "Textbook of Rheumatology: Artritis and allied conditions", Lippincott-Williams&Wilkins.

Nagata S., (1997), "Apoptosis by death factor", Cell, 88, 355–65.

Naugler, W. E., Sakurai T., Kim S., Maeda S., Kim K., Elsharkawy A. M., Karin M., (2007), "Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production", Science, 317 (5834), 121-124.

Naumov G. N., Akslen L. A., Folkman J., (2006), "Landes Bioscience Spotlight on Cancer Cell Dormancy Role of Angiogenesis in Human Tumor Dormancy Animal models of the Angiogenic Switch", Cell Cycle, 5 (16), 1779-1787.

Nguyen A., Martinez M., Stamos M., Moyer M. P., Planutis K., Hope C., Holcombe R. F., (2009), "Results of a phase Ipilot clinical trial examining the effect of plant-derivedresveratrol and grape powder on Wnt pathway target geneexpression in colonic mucosa and colon cancer", Cancer Management and Research, 1, 25-37.

Nurse P., (1994), "Ordering S phase and M phase in the cell cycle", Cell, 79 (4), 547-550.

Ohsumi Y., (2001), "Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems", Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2 (3), 211-6.

Ohtsubo M., Theodoras A. M., Schumacher J., Roberts J. M., Pagano M., (1995), “Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition”, Molecular Cell Biology, 15 (5), 2612-24.

Oliveira P. A., Colaço A., Chaves R., Guedes-Pinto H., De-La-Cruz L. F. P., Lopes C., (2007), “Chemical carcinogenesis”, Anais da Academia Brasileira de Ciências 79 (4), 593-616.

Oren M., (1999), “Regulation of the p53 tumor suppressor protein”, Journal of Biological Chemistry, 274, 36031-36034.

Overbeeke R., Steffens N. H., Vermes I., Reutelingsperger C., Hanen C., (1998), “Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays”, Apoptosis, 3, 115.

Özdemir H., Artaç H., (2013), “Akim sitometri ve temel özellikleri”, Selçuk Pediatri Dergisi, 1 (1), 12-15

Park J. W., Choi Y. J., Jang M. A., Lee Y. S., Ju, D. Y., Suh S. I., Baek W. K., Suh M. H., Jin I. N., Kwon T. K., (2001), “Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, reversibly inhibits progression through S and G2 phases of the cell cycle in U937 cells”, Cancer Letters, 163, 43–49.

Parkin D. M., Bray F., Ferlay J., Pisani P., (2005), “Global cancer sitatistics, 2002”, CA Cancer Journal of Clinicians, 55 (2), 74-108.

Patel K. R., Scott E., Brown V. A., Gescher A. J., Steward W. P.,Brown K., (2011), “Clinical trials of resveratrol”, Annals of the New York Academy of Science, 1215, 161-169.

Paulovich A. G., Hartwell L. H., (1995), “A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in S. Cerevisiae in response to DNA damage”, Cell, 82 (5), 841-7.

Pines J., (1991), “Cyclins: wheels within wheels”, Cell Growth Differentiation, 2 (6), 305-10.

Pitot H. C., Goldsworthy T. L., Moran S., (1981), “The natural history of carcinogenesis: Implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer”, Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry 17 (2), 133-146.

Player A., Barrett J. C., Kawasakı E. S., (2004), “Laser capture microdissection, microarrays and the precise definition of a cancer cell”, Expert Review of Molecular Diagnostics, 4 (6), 831–840.

Pop C., Timmer J., Sperandio S., Salvesen GS., (2006), “The apoptosome activates caspase-9 by dimerization”, Molecular Cell, 22 (2), 269–75.

Rahman M. A, Kim N. H, Kim S. H, Oh S. M., Huh S. O., (2012), “Antiproliferative andcytotoxic effects of resveratrol in mitochondria-mediatedapoptosis in rat B103 neuroblastoma cells”, Korean Journal of Physiology & Pharmacalogy, 16 (5), 321-326.

Ramakrishnan G., Muzio L. L., Elinos-Báez C. M., Jagan S., Augustine T. A., Kamaraj S., Anandakumar P., Devaki T., (2009), “Silymarin inhibited proliferation and induced apoptosis in hepatic cancer cells”, Cell Proliferation, 42 (2), 229-240.

Ramasamy K., Agarwal R., (2008), “Multitargeted therapy of cancer by silymarin”, Cancer Letters, 269 (2), 352-62.

Roy N., Deveraux QL., Takahashi R., Salvesen G. S., Reed J. C., (1997), “The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases”, EMBO Journal, 16, 6914–25.

Sakahira H., Enari M., Nagata S., (1998), “Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis”, Nature, 391, 96–9.

Samani A. A., Chevet E., Fallavollita L., Galipeau J., Brodt P., (2004), “Loss of tumorigenicity and metastatic potential in carcinoma cellsexpressing the extracellular domain of the type 1 insulin-likegrowth factor receptor”, Cancer Research, 64, 3380–5.

Sanchez Y., Wong C., Thoma R. S., Richman R., Wu Z., Piwnica W. H., Elledge S. J., (1997), “Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25”, Science, 277 (5331), 1497-501.

Shang L., Wang X., (2011), “AMPK and mTOR coordinate the regulation of Ulk1 and mammalian autophagy initiation”, Autophagy, 7 (8), 924-6.

Sherr C. J., (1994), “G1 phase progression: cycling on cue”, Cell, 79 (4), 551-5.

Sherr C. J., Roberts J. M., (1995), “Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases”, Genes and Development, 9 (10), 1149-63.

Shintani T., Klionsky D. J., (2004), “Autophagy in health and disease: a double-edged sword”, Science, 306, 990-5.

Siliciano J. D., Canman C. E., Taya Y., Sakaguchi K., Appella E., Kastan M. B., (1997, “DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53”, Genes and Development, 11 (24), 3471-81.

Singh C. K., George J., Ahmad N., (2013), “Resveratrol-based combinatorial strategies for cancer management”, Annals of the New York Academy of Science, 1290, 113-21.

Singh R. P., Agarwal R. A., (2004), “Cancer chemopreventive agent silibinin, targets mitogenicand survival signaling in prostate cancer”, Mutation Research, 555 (1-2), 21–32.

Slater S. J., Seiz J. L., Cook A. C., Stagliano B. A., Buzas C. J., (2003), “Inhibition of protein kinase C by resveratrol”, Biochimica et Biophysica Acta, 1637, 59-69.

Stennicke H. R., Deveraux Q. L., Humke E. W., Reed J. C., Dixit V. M., Salvesen G. S., (1999), “Caspase-9 can be activated without proteolytic processing”, Journal of Biological Chemistry, 274, 8359–62.

Stocco B., Toledo K., Salvador M., Paulo M., Koyama N., Torqueti T. M. R., (2012), “Dose-dependent effect of resveratrol on bladder cancer cells: chemoprevention and oxidative stress”, Maturitas, 72 (1), 72-8.

Su J. L., Yang C. Y., Zhao M., Kuo M. L., Yen M. L., (2007), “Forkhead proteins are critical for bone morphogenetic protein-2 regulation and anti-tumoractivity of resveratrol”, Journal of Biological Chemistry, 282 (27), 19385-19398.

Sudhakar A., (2009), “History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods”, Journal of Cancer Science and Therapy, 1 (2), 1-4.

Susin S. A., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Costantini P., Ferri K. F., Irinopoulou T., Prevost M. C., Brothers G., Mak T. W., Penninger J., Earnshaw W.C., Kroemer G., (2000), “Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis”, Journal of Experimental Medicine, 192, 571–80.

Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K., Takahashi R., (2001), “A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death”, Molecular Cell, 8, 613–21.

Taneli F., (2007), “Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarlarda kullanımı”, Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 5, 75-82.

Trincheri N. F., Nicotra G., Follo C., Castino R., Isidoro C., (2007), “Resveratrol induces cell death in colorectal cancer cells by a novel pathway involving lysosomal cathepsin D”, Carcinogenesis, 28 (5), 922-931.

Trosko J. E., Chang C. C., Madhukar B. V., Dupont E., (1996), “Intercellular communication: A paradigm for the interpretation of the initiation/promotion/progress model of carcinogenesis”, In: Arcos, J. C. Editor, “Chemical Induction of Cancer: Modulation and Combination Effects”, Birkkhauser, Boston, Massachusetts.

Varghese L., Agarwal C., Tyagi A., Singh R. P., Agarwal R., (2005), “Silibinin efficacy against human hepatocellular carcinoma”, Clinical Cancer Research, 11 (23) 8441-8448.

Venugopal R., Liu R. H., (2012), “Phytochemicals in diets for breast cancer prevention: The importance of resveratrol and ursolic acid”, Food Science and Human Wellness, 1 (1), 1-13

Verhagen A. M., Ekert P.G., Pakusch M., (2000), “Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins”, Cell, 102, 43–53.

Vermeulen K., VanBockstaele D. R., Berneman Z. N., (2003), “The cell cycle : a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer”, Cell Proliferation, 36, 131- 49.

Villanueva A., Newell P., Chiang D.Y., Friedman S. L., Llovet J.M., (2007), “Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma”, Seminars in Liver Disease, 27, 55-76.

Vousden K. H., Lane D. P., (2007), “p53 in health and disease”, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 8, 275–83.

Waladkhani A. R., Clemens M. R., (1998), “Effect of dietary phytochemicals on cancer development”, International Journal of Molecular Medicine, 1 (4), 747–753.

Walker D. H., Maller J. L., (1991), “Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication”, Nature, 354 (6351), 314-7.

Weaver R. F., Hedrick P. W., (1997), “Genes and Cancer”, 3rd edition, Brown Publishers.

Web 1, (2012), http://y3r6.hostei.com/wpcontent/uploads/2012/06/kulturel_sayim_yontemleri.pdf , (Erişim Tarihi: 13/07/2012).

Web 2, (2012), http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/research/cytotech/apopto/data/chap4.htm, (Erişim Tarihi: 05/09/2012).

Web 3, (2012), http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisdersnotu.pdf, (Erişim Tarihi: 04/04/2012).

Web 4, (2013), http://www.ivis.org/proceedings/ACVP/2004/wilkerson/ivis.pdf, (Erişim Tarihi: 20/02/2013).

Web 5, (2013), http://www.coulterflow.com/bciflow/practical.php, (Erişim Tarihi: 26/02/2013).

Web 6, (2013), http://static.abdserotec.com/Lit-pdfs/Brochures1/flowcytometry.pdf, (Erişim Tarihi: 19/03/2013)

Wei M. C., Zong W. X., Cheng E. H., (2001), “Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death”, Science, 292, 727–30.

Wörns M. A., Galle P.R., (2010), “Future perspectives in hepatocellular carcinoma”, Digestive and Liver Disease, 3, 302–309.

Wu C., Yang J., Wang F., Wang X. X., (2013), “Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications”, Chinese Journal of Natural Medicines, 11 (1), 0001−0015.

Wu J. W., Lin L. C., Tsai T. H., (2009), “Drug-drug interactions of silymarin on the perspective of pharmacokinetics”, Journal of Ethnopharmacology, 121 (2), 185-93.

Xiangming C., Hokita A., Natsugoe S., Tanabe G., Baba M., Takao S., Kuroshima K., Aidou T., (2000), “p21 expression is a prognostic factor in patients with p53-negative gastric cancer”, Cancer Letters, 148, 181-188.

Yadav M., Jain S., Bhardwaj A., Nagpal R., Puniya M., Tomar R., Singh V., Parkash O., Prasad G. B., Marotta F., Yadav H., (2009), “Biological and medicinal properties of grapes and their bioactive constituents: an update”, Journal of Medicinal Food, 12, 473–84.

Yang Z., Klionsky D., (2010), “Eaten alive: a history of macroautophagy”, Nature Cell Biology, 12, 814-822.

Yen Y., Hsu C., Cheng A. L., Arvelakis A., Saif M. W., Emre S., (2010), “Hepatocellular cancer” In: Saif M. W., Editor. “Emerging Cancer Therapeutics: Gastrointestinal Malignancies”, New York: Demos Medical.

Yılmaz I., (2005), “Erişkin ratlarda deneysel varikosel oluşturulmasi sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi”, Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul.

Yu M. W., Chen C. J., (1993), “Elevated serum testosterone levels and risk of hepatocellular carcinoma”, Cancer Research, 53 (4), 790-794.

Zeng Y., Forbes K. C., Wu Z., Moreno S., Piwnica W. H., Enoch T., (1998), “Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1”, Nature, 395 (6701), 507-10.

Zhang G., Gurtu V., Kain S. R., Yan G., (1997), “Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V”, Biotechniques, 23, 525–531.
Zhang Y., Ge Y., Chen Y., Li Q., Chen J., Dong Y., Shi W., (2012), “Cellular and molecular mechanisms of silibinin induces cell-cyclearrest and apoptosis on HeLa cells”, Cell Biochemistry and Function, 30, 243–248.

Zhou M., Wang S., Zhao A., Wang K., Fan Z., Yang H., Liao W., Bao S., Zhao L., Zhang Y., Yang Y., Qiu Y., Xie G., Li H., Jia W. J., (2012), “Transcriptomic and metabonomic profiling reveal synergistic effects of quercetin and resveratrol supplementation in high fat diet fed mice”, Proteome Research, 11 (10), 4961-71.

Zhou Ru., Masayuki F., Joung C. H., Ting Z. B., (2009), “Induction of a reversible, non cytotoxic S-phase delay by resveratrol: implications for a mechanism of lifespan prolongation and cancer protection”, British Journal of Pharmacology, 158, 462–474.

Zi X., Agarwal R., (1999), “Silibinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implications for prostate cancer intervention”, Proceedings of the National Academy Science United States of America, 96, 7490–5.

Zi X., Grasso A. W., Kung H. J., Agarwal R., (1998), “A flavonoid antioxidant, silymarin, inhibits activation of erbB1 signaling and induces cyclin-dependent kinase inhibitors, G1 arrest and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells”, Cancer Research, 58, 1920–9.

ÖZGEÇMİŞ

Elif SIRMA, 15 Temmuz 1985'te İstanbul'da doğdu. 2006 yılında Muğla Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2010 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ve 2013 yılında tamamladı.