T.C.

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTÜTÜSÜ

SIP1'İN KARACİĞER KANSER HÜCRELERİNDE RESVERATROL YANITINA ETKİSİ

TUĞÇE UYGUR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2016

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTÜTÜSÜ

SIP1'İN KARACİĞER KANSER HÜCRELERİNDE RESVERATROL YANITINA ETKİSİ

TUĞÇE UYGUR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE
2016

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

THE EFFECTS OF SIP1 ON RESVERATROL RESPONSE OF LIVER CANCER CELLS

TUĞÇE UYGUR

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE

2016

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	**YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU**

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27/06/2016 tarih ve 2016/43 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 14/07/2016 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Tuğçe UYGUR'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) :Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE : Prof. Dr. Uygar Halis TAZEBAY

ÜYE : Prof. Dr. Cengiz YAKICIER

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Hepatosellüler karsinoma (HCC), dünyada en çok görülen kanser türleri arasında 3. sırada yer alır. Hepatosellüler karsinomayla ilişkili etiyolojik faktörler siroz, Hepatit B ve C virüslerine bağlı hepatitler, aşırı alkol kullanımı, alkolik olmayan karaciğer yağlanması ve hemakromatozistir. Epitel Mezenkim Geçişi (EMT) embryonik bir program olup kanser metastazında da etkinleşmektedir. EMT epitel bir hücrenin apiko-bazal hücre polaritesi, hücre-hücre bağlantılarını kaybetmesi, ön-arka polaritesi, artan hücre hareketi ve invazyon yeteneği gibi mezenkimal özelliklerin kazanılması ile karakterizedir. E-kaderinlerin baskılandığı EMT programının indükleyicilerinden SIP1/ZEB2 transkripsiyon faktörü doğrudan E-kaderin promotorundaki E-box dizisine bağlanarak E-kaderin gen ifadesini inhibe eder. SIP1 aynı zamanda hücre proliferasyonu, kök hücre fenotipi ve hücre yaşlanması ile de ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada karaciğer kanseri hücre hattı SNU398'de SIP1 ifadesi susturulmuş (Lot2) ve normal (NSC) kalımlı hücre klonları geliştirildi. SIP1'in resveratrol uygulanan hücre klonlarında hücre proliferasyonu, apoptoz ve hücre döngüsüne olan etkileri araştırıldı. 0, 50, 100, 150 ve 200 µM konsantrasyonlarda resveratrol uygulanan hücreler uygulamadan 24 ve 48. saat sonra analiz edildi. Resveratrol uygulanması sonucunda Lot2 ve NSC hücre gruplarında birbirlerine göre hücre proliferasyonunda anlamlı bir değişim gözlenmedi. Ancak her iki hücre grubunda da 150 µM kansantrasyonda resveratrol uygulandığında hücre proliferasyonunda anlamlı bir azalma görüldü. Apoptoz ve hücre döngüsü analizleri 150 µM resveratrol konsantrasyonunda yapıldı. 24 saat sonrasında Lot2 ve NSC hücre gruplarında resveratrolün etkisi benzer şekilde görülmekteyken, 48 saat resveratrol uygulanması sonucunda NSC hücre grubunda erken-apoptotik hücrelerde ($7AAD^-$/Annexin V^+) bir artış tespit edildi. 150 µM resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra hem Lot2 hem de NSC hücre gruplarında G1 fazında tutulma ve 48 saat sonra da G2/S fazında tutulma gözlendi.

Anahtar Kelimeler: HCC, EMT, SIP1/ZEB2, Resveratrol, Akım Sitometrisi.

SUMMARY

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third most common cancer worldwide. Main etiologic factors associated to hepatocellular carcinoma include cirrhosis, chronic hepatitis resulting from Hepatitis B and C viruses, excessive alcohol consumption, non-alcoholic fatty liver disease and hemochromatosis. Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) is an embryonic program that is also activated in cancer metastasis. EMT is characterized by the loss epithelial apico-basal cell polarity and cell-cell connections, gaining mesenchymal cell characteristics such as front-back polarty, increased cell movement and invasion ability. SIP1/ZEB2 transcription factor is one of the inducers of EMT program and supresses E-cadherin expression by binding to E-box in the promoter region of E-cadherin. Also, SIP1 is associated to other pathophysiological processes including cell proliferation, stem cell phenotype and cellular senescence. In this study, stable knock-down (Lot2) and control cell clones (NSC) of HCC cell line SNU398 were generated. The effects of SIP1 on cell proliferation, apoptosis and cell cycle were investigated in cell clones treated with resveratrol. Resveratrol was applied at 0, 50, 100, 150 and 200 µM concentrations and cells were analyzed at 24 and 48 hours after treatment. There was not any significant change in cellular proliferation when resveratrol treated Lot2 and NSC groups were compared. But, a significant inhibition of cellular proliferation was detected at 150 µM resveratrol treatment in each group. Apoptosis and cell cycle analyses were carried out at 150 µM concentration of resveratrol. The effects of resveratrol on Lot2 and NSC groups were similar after 24 hours of drug treatment, but at 48 hours after treatment an increase in the number of early-apoptotic cells ($7AAD^-$/Annexin V^+) was detected in NSC group. After treatment with 150 µM resveratrol G1 arrest at 24 hours and G2/S arrest at 48 hours were observed in both Lot2 and NSC cell groups.

Key Words: HCC, EMT, SIP1/ZEB2, Resveratrol, Flow Cytometry.

TEŞEKKÜR

Başta, yüksek lisans eğitimimde desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyip bilgisi ile bu tez çalışmasının oluşmasında yardımcı olan danışmanım Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya

Bütün çalışmam boyunca yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli labaratuar arkadaşlarım Arş. Gör. Metin Çetin, Uzm. Biyolog Pelin BALÇIK ERÇİN, Uzm. İrem YALIM CAMCI, Arş. Gör. Görkem ODABAŞ ve tüm MBG ailesine,

ve her zaman maddi, manevi desteklerini esirgemeyen, bundan sonra da hep yanımda olacaklarını bildiğim kuzenim Ertan UYGUR'a ve aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLOLAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. HEPATOSELLULAR KARSİNOMA	3
2.1. Hepatosellülar Karsinomanın Nedenleri	5
2.1.1. Alkol Tüketimi	6
2.1.2. Hepatit B ve C Virüsü Enfeksiyonu	6
2.2. Epitelyal Mezankimal Dönüşümü	8
2.2.1. SIP1/ZEB2 Transkripsiyon Faktörü	11
2.2.1.1.Hepatosellülar Karsinomada SIP1	14
3. HEPATOSELLULAR KARSİNOMADA TEDAVİ YÖNTEMLERİ	15
3.1. Cerrahi Tedaviler	15
3.2. Ablasyon veya Embolizasyon Gibi Bölgesel Tedaviler	15
3.3. İlaç ve Fitoterapi Destekli Tedaviler	16
3.3.1. Resveratrol	16
3.3.1.1. Resveratrol'ün Kalp Üzerine Etkisi	17
3.3.1.2. Resveratrol'ün Kanser Oluşumuna Etkisi	18
3.3.1.3. Resveratrol'ün Apoptoz ve Apoptoza Neden Olan Sinyal Yolaklarına Etkisi	18
3.3.1.4. Resveratrol'ün Hücre Döngüsüne Etkisi	19
3.3.1.5. Resveratrol'ün Antioksidan Etkisi	19
4. HÜCRE ÖLÜMÜ	21
4.1. Nekrotik Hücre Ölümü	21

4.2. Otofaji 21
4.3. Apoptoz 22
4.3.1. Apoptoz Tayininde Kullanılan Yöntem Akım Sitometrisi 24
5. HÜCRE DÖNGÜSÜ 27
6. MATERYAL VE YÖNTEMLER 31
6.1. Materyaller 31
6.1.1. Kimyasallar 31
6.1.2. Hücre Kültürü Malzemeleri 31
6.1.3. Hücre Hattı 31
6.1.4. Çözeltiler 31
6.1.5. Cihazlar 32
6.2. Yöntemler 33
6.2.1. Donmuş Hücrelerin Çözünmesi 33
6.2.2. Hücrelerin Pasajlanması 33
6.2.3. Hücrelerin Dondurulması 33
6.2.4. Hücrelerin Sayılması 34
6.3. Resveratrol'ün Uygulanması 34
6.4. Akım Sitometrisi Apoptoz Analizi 35
6.5. Akım Sitometrisi Hücre Döngüsü Analizi 36
7. BULGULAR 37
7.1. Resveratrol'ün Uygulanmasının Hücre Proliferasyonuna ve Hücre Canlılığına Etkisi 37
7.2. Resveratrol Uygulanmasından Sonra Hücre Döngüsü Analizi 41
7.3.Resveratrol Uygulanmasından Sonra Apoptoz Analizi 46
8. TARTIŞMA VE SONUÇ 51

KAYNAKLAR 57
ÖZGEÇMİŞ 70

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar		**Açıklamalar**
$CaCI_2$	:	Kalsiyum klorür
kDa	:	Kilo dalton
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
L	:	Litre
M	:	Molar
MM	:	Milimetre
NaCI	:	Sodyum Klorür
ADH	:	Alkol dehidrogenaz
ATFS	:	EMT-activating transcription factors
ATG	:	Otofaji ilişkili protein
ATP	:	Adenozin trifosfat
AP	:	Aktivatör Protein 1
Apaf-1	:	Apoptotik proteaz aktifleştirici faktör
bHLH	:	Bazik sarmal-dönüş-sarmal
Bax	:	Bcl-2 bağlantılı X proteini
Bcl-2	:	B-hücre lenfoma 2
Bcl-xL	:	B-cell lymphoma-extra large
CBFA	:	CArG box bağlanma faktör A
CDK	:	Siklin bağımlı kinaz
CtBP	:	C-terminal bağlayıcı protein
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DKK1	:	Wnt inhibitörü
Dsh	:	Dishevelled
EDTA	:	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMT	:	Epitel-mezenkim dönüşümü
E-Kaderin	:	Epideryal kaderin
ERK	:	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar

ER	:	Endoplazmik retikulum
FBS	:	Fötal dana serumu
FSC	:	Forward Scatter (İleri saçılım kanal dedektörü)
FTC	:	Fumitrimorgın C
G_1	:	Gap 1
G_2	:	Gap 2
GTÜ	:	Gebze Teknik Üniversitesi
HA	:	Hepatik arter
HBV	:	Hepatit B virüsü
HBx	:	Hepatit viral protein x
HCC	:	Hepatoselüler karsinoma
HCV	:	Hepatit C virüsü
HD	:	Hemeodomain benzeri dizi
HOXB7	:	Hemeobox geni B7
IC50	:	% 50 inhibisyona neden olan konsantrasyon
IgG	:	Immunoglobulin G
JNK	:	C-Jun N-terminal kinaz
KLF8	:	Krüppel benzeri faktörler 8
LRP	:	LDL ilişki reseptör ailesi
M	:	Mitoz
MAPK	:	Mitojen-aktive protein kinaz
MET	:	Mezenkim-epitel dönüşümü
MMP	:	Matrisks metalloproteaz
mTOR	:	mammalian target of rapamycin
PA	:	Portal alanlar
PBS	:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PI	:	Propidyum iyodür
PI3K	:	Fosfotidilinozitol-3-kinaz
PS	:	Fosfolipid fosfatidilserin
RES	:	Resveratrol
Rb	:	Retinablastoma
Rpm	:	Dakika başına dönüş
ROS	:	Reaktif oksijen radikalleri

RTK	:	Reseptör tirozin kinaz
SBD	:	Smad-bağlayıcı domain
SHIP	:	SH2 (Src homology 2)-containing inositol phosphatase-1
SIP1	:	Smad etkileşimli protein 1
SK	:	Safra kanalı
SV	:	Sentral ven
TAKE	:	Transkateter arteriyal kemoembolizasyon
TGF-β	:	Transforme-edici büyüme faktörü β
TNFR1	:	Tümör nekroz faktör reseptörü tip 1
Twist	:	Twist-related protein
XIAP	:	Apoptoz inhibe edici protein
ZEB	:	Zinc finger E-box-binding homeobox 1
7AAD	:	7 aminoaktinomisin D

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa
2.1:	Karaciğer Parenkiminin mikroskobik yapısı.	4
2.2:	HBV ve HCV'nin hepatosellüler karsinomaya etkisi.	7
2.3:	EMT.	9
2.4:	E-Kaderin.	10
2.5:	SIP1 yolağı.	12
3.1:	Resveratrolün kimyasal yapısı.	17
4.1:	Apoptaza ve nekroza uğrayan hücreler.	23
4.2:	Akım Sitometrisi işlevi.	24
4.3:	Akım Sitometrisi apoptoz ve nekroz.	25
4.4:	Hücre fazı ve DNA'nın durumu.	26
5.1:	Hücre döngüsü.	28
5.2:	Hücre döngüsü kontrol noktaları.	29
7.1:	SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinin resveratrole yanıtı.	38
7.2:	SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerinin resveratrole yanıtı.	38
7.3:	SIP1'i baskılanmamış ve baskılanmış SNU398 hücrelerinin 24. saatte resveratrole yanıtı.	39
7.4:	SIP1'i baskılanmamış ve baskılanmış SNU398 hücrelerinin 48. saatte resveratrole yanıtı.	39
7.5:	SIP1'i baskılanmamış ve baskılanmış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulandıktan 24 ve 48 saat sonra hücre canlılık grafiği.	40
7.6:	a) SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadan 24 saat sonra hücre döngüsü analizi b) Resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra hücre döngüsü analizi.	42
7.7:	a) SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadan 24 saat sonra hücre döngüsü analizi b) Resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra hücre döngüsü analizi.	43
7.8:	a) SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadan 48 saat sonra hücre döngüsü analizi b) Resveratrol uygulandıktan 48 saat sonra hücre döngüsü analizi.	44

7.9: a) SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadan 48 saat sonra hücre döngüsü analizi b) Resveratrol uygulandıktan 48 saat sonra hücre döngüsü analizi. 45
7.10: a) SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadan 24 saat sonra apoptoz analizi b) Resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra apoptoz analizi. 47
7.11: a) SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadan 24 saat sonra apoptoz analizi b) Resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra apoptoz analizi. 48
7.12: a) SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadan 48 saat sonra apoptoz analizi b) Resveratrol uygulandıktan 48 saat sonra apoptoz analizi. 49
7.13: a) SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadan 48 saat sonra apoptoz analizi b) Resveratrol uygulandıktan 48 saat sonra apoptoz analizi. 50

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		Sayfa
7.1:	Resveratrol uygulamasının ardından hücre canlılık yüzdeleri.	41
7.2:	24 ve 48 saat resveratrol uygulaması sonrası hücre döngüsü analizi.	45
7.3:	24 ve 48 saat resveratrol uygulamasının ardından apoptoz analizi.	50

1. GİRİŞ

Hepatosellüler Karsinoma (HCC) karaciğerin en sık rastlanan primer tümörü olup dünya genelinde kansere bağlı ölümlerde üçüncü sırada yer alır. HCC'ye neden olan faktörler siroz, Hepatit B ve C virüslerine bağlı hepatitler, aşırı alkol tüketimi, alkole-bağımlı olmayan karaciğer yağlanması ve hemakromatozistir [1], [2].

Epitelyal tümörlerin komşu dokulara invazyonunun ve metastaz oluşumunun çeşitli adımları vardır. Tümör hücreleri önce komşu dokuya infiltre olur daha sonra kan veya lenfatik akıma karışırlar ve damar dışına çıkarak primer tümörden uzak organlarda çoğalırlar [3]. Epitel mezenkim dönüşümü (EMT) bazal membran üzerinde polarize olmuş epitel hücresinin bir dizi hücresel ve moleküler değişim sonucu mezenkim karakteri kazanmasıdır. EMT'nin en önemli özelliği Epitelyal kaderinin (E-kaderin) baskılanmasıdır [4]. E-kaderin hücreler arası yapışma, hücre polaritesi ve doku yapısının korunmasında önemli bir rol oynar [5]. E-kaderinin inhibe edilmesinde transkripsiyonel represör olarak görev yapan ZEB (ZEB1, SIP1/ZEB2) ve Snail (Snail1, Snail2, Snail3) gibi çinko-parmak protein ailelerinin üyeleri etkilidir [6]. Bu çinko-parmak transkripsiyon faktörleri Snail ve SIP1 (Smad etkileşimli protein 1) doğrudan E-kaderin promotorundaki E-box (ACCTG dizisi) motifine bağlanarak E-kaderin transkripsiyonunu baskılamaktadır [5].

Hepatosellüler karsinomada güncel tedavi yöntemleri cerrahi rezeksiyon, ablasyon, kemoembolizasyon ve sistemik kemoterapi yaklaşımlarından oluşur. Cerrahi tedaviler; karaciğer transplantasyonu, kama rezeksiyon, segmentektomidir [7]. Karaciğer tümör bölgesinin cerrahi müdahale ile alınması işlemine kısmi hepatektomi denir [8]. Ablasyon veya embolizasyon karaciğer transplantasyonu olamayan hastalarda uygulanan yaklaşımlar olup hasta sağ kalımını uzatır ve yaşam kalitesini artırır [2], [7]. Resveratrol (*3,5,4'-trihidroksistilben*), çeşitli bitkilerde doğal olarak oluşan bir polifenolik fitoaleksindir [9]. Resveratrolün hücre döngüsünü inhibe ettiği, apoptozu indüklediği ve melanoma, meme, pankreas, prostat, ovaryum, karaciğer, mide, serviks ve kolon kanserlerinde hücre proliferasyonunu baskıladığı ve kanserin ilerlemesini engellediği bildirilmiştir [10].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

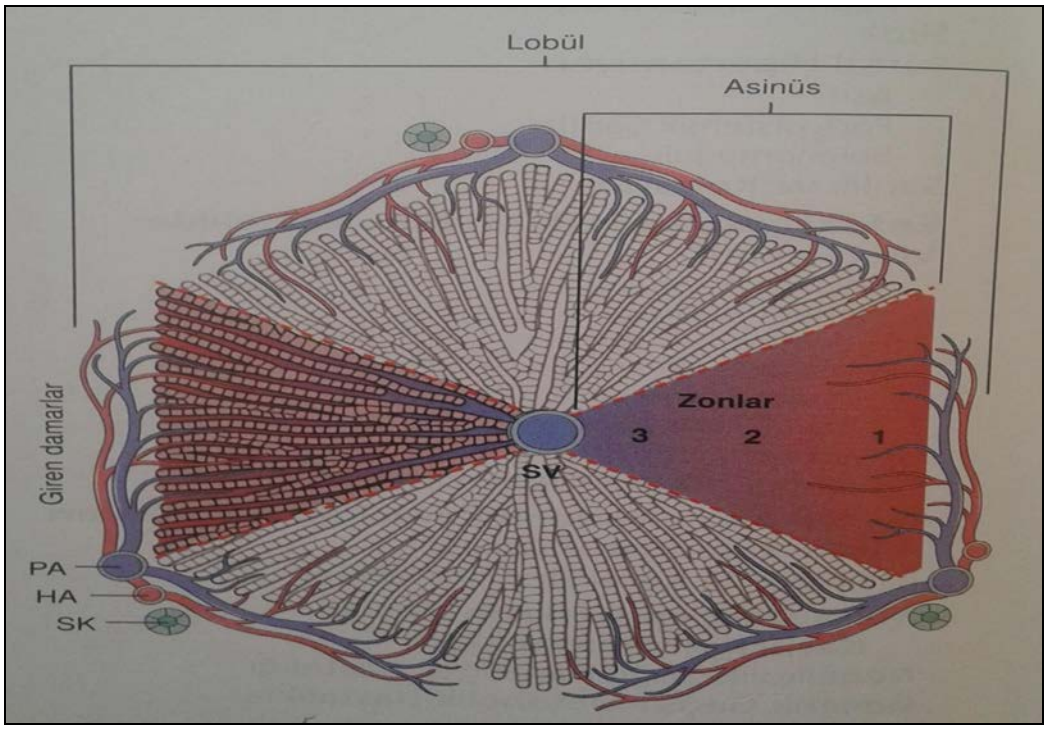
EMT programının indükleyici transkripsiyon faktörlerinden olan SIP1 aynı zamanda hücre proliferasyonu, kök hücre fenotipi ve hücre yaşlanması ile de ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada, karaciğer kanseri hücre hattı SNU398'de SIP1 ifadesi susturulmuş ve normal hücre klonları geliştirilerek SIP1'in resveratrol uygulanan hücrelerde proliferasyon, apoptoz, hücre döngüsünde duraksama gibi patofizyolojik davranışlara olan etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA

Yunanca karkinos kelimesinden köken alan kansere eski Mısır dönemindeki (MÖ 1600) mumyalarda rastlanmıştır [11]. Kanser dünya çapında yayılan bir hastalıktır. 2012 verilerine göre Dünya'da toplam 14.1 milyon kanser vakası gelişmiştir ve 8.2 milyon kişi kanserden dolayı ölmüştür. Bunların % 9.1'i karaciğer kanseridir [12].

Hepatosellüler Karsinoma (HCC) dünya genelinde kansere bağlı ölümlerde üçüncü sırada yer alır. HCC en sık görülen kanserler arasında erkeklerde 5. kadınlarda ise 7. sıradadır. HCC'nin erkeklerde kadınlardan daha sık görülmesinin başlıca nedenleri erkeklerin hepatit virüs infeksiyonlarına, sigara ve alkol tüketimi gibi karaciğer karsinojenlerine maruz kalma oranlarının daha yüksek olması ve testesteron etkisinin androjen reseptör sinyalini etkinleştirerek karaciğer hücre proliferasyonunu arttırmasıdır. Ayrıca, kadınlarda östrojenin interlökin-6 üzerinden inflamasyonu baskılayıp, karaciğer hasarını ve proliferasyonun yayılmasını azaltabilmesi HCC'nın kadınlarda erkeklere göre daha az görülmesine neden olur. HCC'ya yol açan en önemli etkenler hepatit B ve C virüslerine bağlı kronik hepatitler, aşırı alkol ve aflatoksinli besinlerin uzun süreli tüketilmesidir [1], [13], [14].

Vücudun metabolik dengesini sağlayan 1.5 kg ağırlığındaki en önemli organ olan karaciğer diyaframın altında abdominal boşlukta yer alır (Şekil 2.1). Sindirilen aminoasitlerin, lipitlerin, karbonhidratların, vitaminlerin işlenmesi ve depolanması, endojen atık ürünlerin safra ile atılması, zehirli ürünlerin toksinlerinden arındırılması gibi metabolik süreçler karaciğerin hepatosit adı verilen hücreleri tarafından gerçekleştirilir [15], [16].



Şekil 2.1: Karaciğer Parenkiminin mikroskobik yapısı. PA: Portal Alanlar; HA: Hepatik Arter; SK: Safra Kanallı; SV: Sentral Ven.

Histolojik olarak karaciğer hepatosit kordonlarından meydana gelen 6 veya daha fazla yüzeyli lobüllerden oluşur. Karaciğer lobülleri 0,7x2 mm boyutundadır. Yaklaşık olarak 20-30 mikron çaplı hücreler olan hepotositler bir veya iki nükleuslu olup soluk pembe renktedirler. Sitoplazmalarında lipofuksin pigmenti ve yağ vakuolleri bulunur. İki hepatositin bitişik olduğu yerde hücrelerin arasında tübüler bir aralık bulunur ve bunlara safra kanalikülleri denmektedir. Bu kanaliküller safranın taşındığı ilk yapılardır [16].

Kanser hücrelerinde hücre döngüsü, proliferasyon, metastaz ve apoptozisi düzenleyen β-katenin, Rb, BRCA1, Ras ve p53 gibi çok sayıdaki gende mutasyon görülmüştür. Hepatokarsinogenez sürecinde gözlenen hücre döngüsü kontrolünün bozulması, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ya da onkogenlerin (örneğin myc) aktivasyonunun sonucu olarak PTEN/Akt, Wnt/β-katenin, p16INK4A/Rb, p14Arf/p53, TGF-β (transforming büyüme faktörü β), Ras, hedgehog ve c-met protoonkogen/ hepatosit büyüme faktörü reseptörü (MET) yolakları gibi çeşitli sinyal yolaklarının regülasyonu bozulmaktadır [13], [17]. Fosfotidilinozitol-3-kinaz ve Akt (PI3K/Akt) sinyal yolunun aktif olması, Akt'nin negatif düzenleyicisi olan PTEN molekülünün ekspresyonundaki azalma HCC'da görülmüştür. Hücreleri

apoptoza yönlendirebilen TGF-β (transforming büyüme faktörü β) yolağının baskılanmasına Akt sinyal yolağının aktifleşmesi neden olur. Ayrıca Akt sinyal yolağının aktifleşmesi β-katenin sinyal yolunun aktifleşmesine de neden olur [18].

Hepatokarsinogenez de diğer kanserleşme süreçleri gibi iki farklı modelle açıklanabilir. Birincisinde, değişime uğrayan karaciğer hücresi hızlı bir şekilde bölünmesine neden olan genetik ve epigenetik değişimler geçirir. HCC morfolojik olarak farklı lezyonlarla ilişkilidir. 'Preneoplastik lezyonlar' olarak tanımlanan lezyonlar displastik odaklar ve displastik nodülleri içerir. Kronik karaciğer hastalığı olan hastalarda hepatik nodüller ile rejeneratif nodüller birbirinden çok farklılaşmışlardır. Hiperplastik nodüller risk faktörlerine bağlı hücre ölümlerine yanıt olarak karaciğerde gözlenen hepatosit rejenarasyonundan oluşur. Pre-malignant displastik nodüllere dönüşen hiperplastik nodüller HCC oluşumuna neden olan lezyonların başında gelir [19]. Bu değişikliklerde onarım yapılmaya çalışılır. Onarım sırasında yeni mutasyonlar oluşur ve seçilim yapılır. Bu mutasyonlar nedeniyle hücreler heterojen kanser hücrelerine dönüşür. Buna stokastik model denir. Bu modelde, hepatositlerin aşırı bölünüyor olması, mikrosatellit instabilitesi, genlerde mutasyon, kromozomlarda delesyonları olan ve bunlarla birlikte telomeraz ekspresyonunda artış gösteren hücrelerin çoğalmasına sebep olur. Bu hepatositler geri dönüşümsüz yapısal ve genetik değişimleri içeren displastik nodülleri oluştururlar ve HCC'ya evrim sürecinin başında yer alırlar [20], [21]. İkinci model ise karaciğer hücrelerinin çeşitli mutasyonlarla dediferansiye olarak kanser kök hücresi özelliği kazanmasıdır. Normal hepatositten kanser hücresine geçişte hücrenin kazanmış olması gereken sınırsız proliferasyon yeteneği, ilaç dirençliliği, kendini yenileyebilme gibi birçok işlevin bu hücrelerde olması bu teoriyi desteklemektedir [21].

2.1. Hepatosellüler Karsinoma'nın Nedenleri

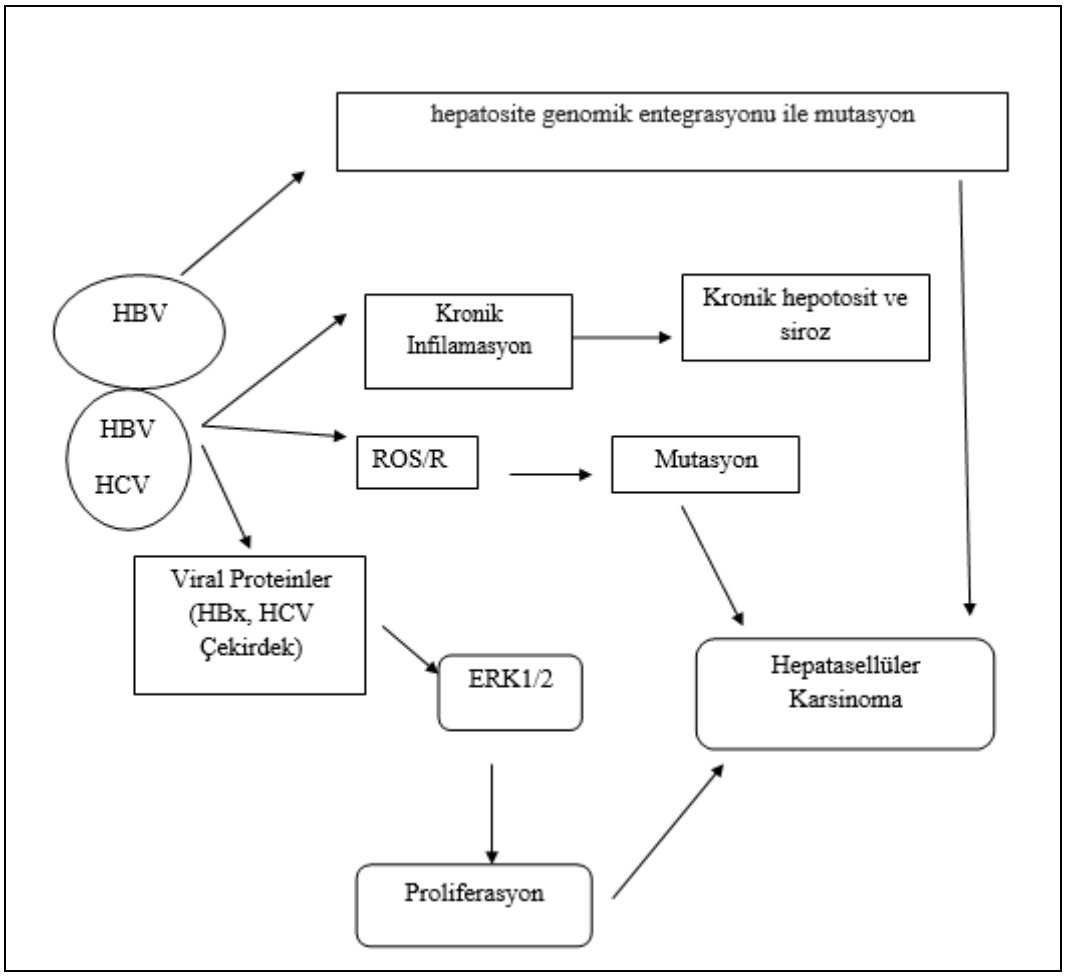
HBV ve HCV enfeksiyonlarının yanında, aflatoksin, aşırı alkol tüketimi, ırk, obezite ve diyabetin HCC gelişme riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur [17], [22].

2.1.1. Alkol Tüketimi

Aşırı alkol alımı kronik karaciğer hastalığı zemininde HCC nedeni olarak kabul edilmiştir [23]. Uzun süreli alkol tüketimi hepatosit dönüşüm sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Alkol doğrudan ve dolaylı yollarla hepatosit fizyolojisini de etkiler. Karaciğer alkol metabolizmasından sorumludur. Karaciğerin alkol oksidasyonunu gerçekleştirme yolları: mikrozomal oksitleyici sistem ile hepatositlerin sitoplazmasında CYP2E1 ve alkol dehidrojenaz enziminin aktivitesi ile metabolize edilmesidir. Asetaldehit hidrojenaz, sitokrom P, CYP2E1 ile üst ve alt mide bağırsak bakterileri tarafından oksidatif metabolizma yolu ile üretilir. Hücre sinyal yollarının DNA bileşenleri de dahil olmak üzere çok sayıda hücresel hedef bölgesi vardır. Asetaldehit, DNA ve proteinlere bağlanır. DNA'da mutasyona sebep olur. Ayrıca DNA tamir mekanizmasının inhibisyonuna, kardeş kromatitlerin değişmesine ve apoptozdan kaçışa neden olur [24]-[26].

2.1.2. Hepatit B veya C Virüsü Enfeksiyonu

Kronik viral hepatitler insan yaşamını tehtit eden, ölüme sebebiyet veren insandan insana geçebilen bir hastalıktır (Şekil 2.2). Dünya genelinde HCC'ya yakalanma nedenlerinden biri de Hepatit B virüsü (HBV)'dir. Asya'da kronik HBV taşıyıcılarının yıllık HCC'e gelişme oranı % 0.4-0.6 arasında değişmektedir. Bu rakam Alaska yerlilerinde (% 0.26) daha düşüktür. HBV'ye delta virüsünün eklenmesi, HCC'nın hem daha erken hem de çabuk ve şiddetli gelişmesine sebep olur. Hepatit B enfeksiyonlarının yaklaşık % 10'u, Flaviviridae ailesi üyesi ve yaklaşık 40-50 nm çapında, dışta lipit zarf taşıyan bir virüs olan hepatit C (HCV) enfeksiyonlarının ise % 50'si erişkinlerde kroniktir. Hepatit B'de hepatosellüler karsinomaya dönüşüm 20-30 yıl sürmektedir ve Hepatit C olgularının % 1-2'sinde hepatosellüler karsinoma geliştiği düşünülmektedir [19], [27], [28].



Şekil 2.2: HBV ve HCV'nin hepatosellüler karsinomaya etkisi.

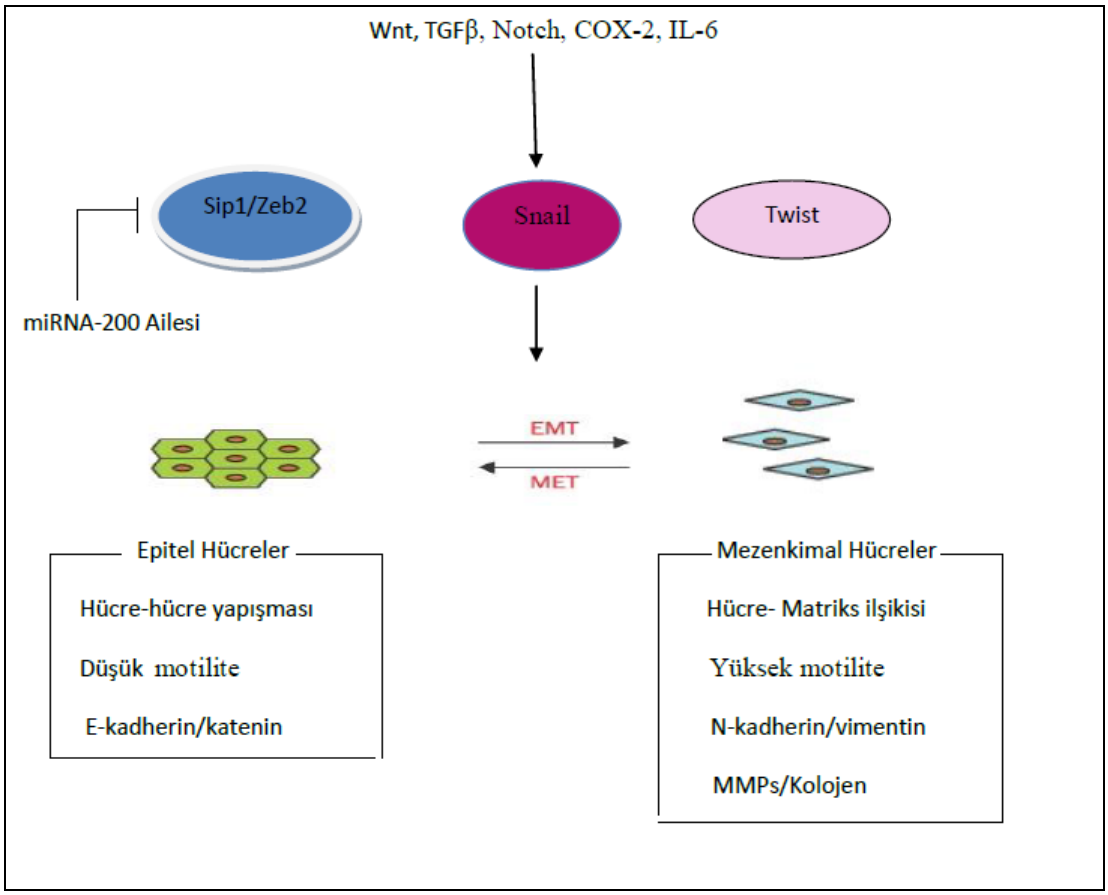
Hepadnaviridae olarak adlandırılan DNA virüs ailesinin bir üyesi olan HBV Orthohepadnavirüs genusunda yer alır. Bu DNA virüs ailesi ters transkriptaz, DNA polimeraz, kapsit proteini, envelop proteinleri (L, M, S) ve belirsiz bazı fonksiyonları olan proteinleri içerir. Bu virüsler para-retrovirüs olarak adlandırılır. HBV kaynaklı HCC oluşumu belirsizdir. HBV'nin DNA'sının konak hücre DNA'sına yerleşmesi ve çoğalmaya başlaması gereklidir. Bununla birlikte HBV proteini viral protein x (HBx) doğrudan hücre proliferasyonunu düzenlenmesinde rol oynayan hücre içi kinazları uyarır. HBx'in p53'e in vivo ve in vitro bağlandığı görülmüştür. HBx, p53'ün indüklediği apoptozu inaktive eder ve hem p53'e bağımlı hemde bağımsız durumlardaki nükleotid eksizisyon tamirini inhibe etmektedir. HBV entegre olduğu bölgelerde kromozom 11 ve 18'de hasara neden olur. Afrika bölgesindeki HCC vakalarında c-myc, c-fos ve c-erb-A onkogenlerin aktive olduğu ve hızlıca sentezlendiği görülmüştür [29], [30].

HCV flaviviridae ailesinden RNA virüs ailesinin bir üyesi olan nonsitopatik bir virüstür. HCV konak hücrenin DNA'sına yerleşmez fakat kendi genomunun kodladığı proteinlerden olan NS5A, p53'e bağlanır ve p53'ü inhibe eder. HCV'nin çekirdek proteininin ve 5A yapısal proteininin trans-aktivasyon özelliği vardır.

2.2. Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm (EMT)

Metastaz insan kanserlerinde morbidite ve mortalitenin en önemli nedenidir. Embriyo gelişiminde ve kanser metastazında etkin olan epitel mezenkim dönüşümü (EMT) programı bazal membran üzerinde polarize olmuş epitel hücresinin bir dizi hücresel ve moleküler değişim sonucu mezenkim karakteri kazanmasıdır. EMT ters işlemi Mezenkimal-Epitel Dönüşüm (MET) olarak adlandırılır (Şekil 2.3). EMT tipik olarak, hücre-hücre yapışması, apikal-bazal hücre polarite kaybı ve artan hücre motilitesi ile karakterize edilir. EMT gerçekleşirken hücrelerin arasındaki bağlantı dengesi bozulur ve hücreler arası etkileşim dağılır. Epitel hücrelerin mezenkimal hücrelerine dönüşümü ile ilgili ilk çalışmalar 1980'lerin başında civciv embriyolarıyla Elizabeth Hay tarafından yapılmıştır [4], [31], [32]. EMT, birbirlerinden ve hücre dışı matriksten ayrılan hücrelerin göç ve invazyon kapasitesini arttırır. Ayrıca apoptoza direnç ve kök hücre özelliklerinin kazanılması gibi biyolojik süreçlerde de rol alır [33], [34].

Epitel hücre tipleri ile yapılan çalışmalarda TGF- β sinyal yolağının, Notch, Ras ve Reseptör Tirozin Kinazlar (RTK'lar) ile birlikte EMT ve metastaza neden olduğu anlaşılmıştır. EMT'ye neden olan RTK'ları SHIP1 veya Ras aktive eder. Ayrıca Ras TGF- β sinyal yolağını aktive ederek EMT'ye neden olur [35].



Şekil 2.3: EMT.

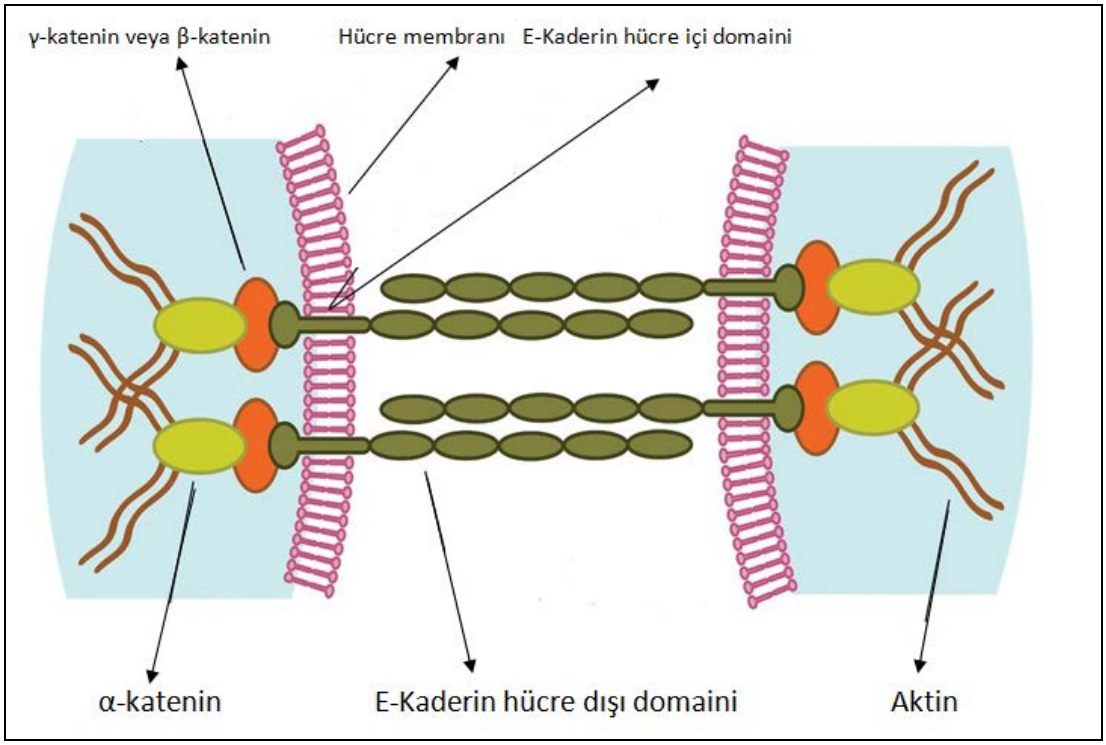
EMT / MET embriyogenez (Tip I EMT); yara iyileşmesi, doku rejenarasyonu veya organ fibrozu (Tip II EMT) ve neoplazi (Tip III EMT) sırasında gözlenir. Epitelyal kaderinler (E-Kaderin) dokularda hücre-hücre adezyonunu sağlar ve yapısal olarak birbirleri ile benzerlik gösteren birçok tekrardan (domain) oluşur. Epitelyal kaderinler Ca^{+2}'a bağımlı, moleküler ağırlıkları 120.000-140.000 kDa arasında değişen, transmembran glikoproteinlerdir. İnsan kanserlerinde yapılan çalışmalarda proteinin kodlandığı kromozom 16q21-22 bölgesinde heterozigotluk (LOH) kaybı ve E-kaderin promotorunda hipermetilasyona bağlı ifade kaybı saptanmıştır (Şekil 2.4). E-kaderin geni CDH1'in lokalize olduğu 16q22.1 bölgesindeki LOH prostat, mide ve karaciğer kanserlerinde görülmüştür. Hücrelerin birbirine bağlanması fermuar benzeri yapıların oluşumuna yol açan E-kaderinlerin hücre-dışı bölgeleri arasındaki homofilik etkileşimlerle olur [36]-[40].

Kaderinler sitoplazmik proteinler arasındaki bağlantıyı kateninler ile yapabilmektedir. Hücre zarı altında bulunan kateninde delesyon olması E-kaderinlerin hücre-hücre adezyonunu engeller. Üç tip katenin vardır:

i) γ-katenin (prokoglobin): 83 kDa ağırlığındadır. Kromozomun 11q11 bölgesinde yer alır. E-kaderinlerin sitoplazmik bölgesine bağlanır.

ii) β-katenin: 92 kDA ağırlığındadır. Kromozomun 3p22 bölgesinde yer alır. E-kaderinlerin sitoplazmik bölgesine bağlanır.

iii) α-katenin: 102 kDa ağırlığındadır ve kromozonun 5q21-22 bölgesinde yer alır. γ-katenini ve β – katenini hücre iskeletine bağlar [41].



Şekil 2.4: E-kaderin.

İnsan tümörlerinde, E-kaderin ekspresyonunun kaybedilmesi ya da azalması; somatik mutasyon, kromozomal delesyon, enzimlerle parçalanması ve CDHI promotorunun susturulmasından kaynaklanır. EMT'de en önemli durum E-kaderinlerin baskılanmasıdır. E-kaderinlerin inhibe edilmesinde birçok faktör etkili olsa da EMT-ATFS (EMT–activating transcription factors) olan çinko parmak proteinlerinden ZEB (ZEB1, ZEB2) ve Snail (Snail 1, Snail2, Snail3) ailelerinin üyeleri, Goosecoid ve HMGA2 ile HOXB7 (homeobox gene B7), bHLH (basic helix-loop-helix) proteinlerden Twist1, Twist2 ve E12/E47, KLF8 (Krüppel-like factor 8), CBFA (CArG box-binding factor-A), FOXC2 E-kaderinlerin inhibisyondan sorumlu başlıca transkripsiyon faktörleridir [32], [42]-[44].

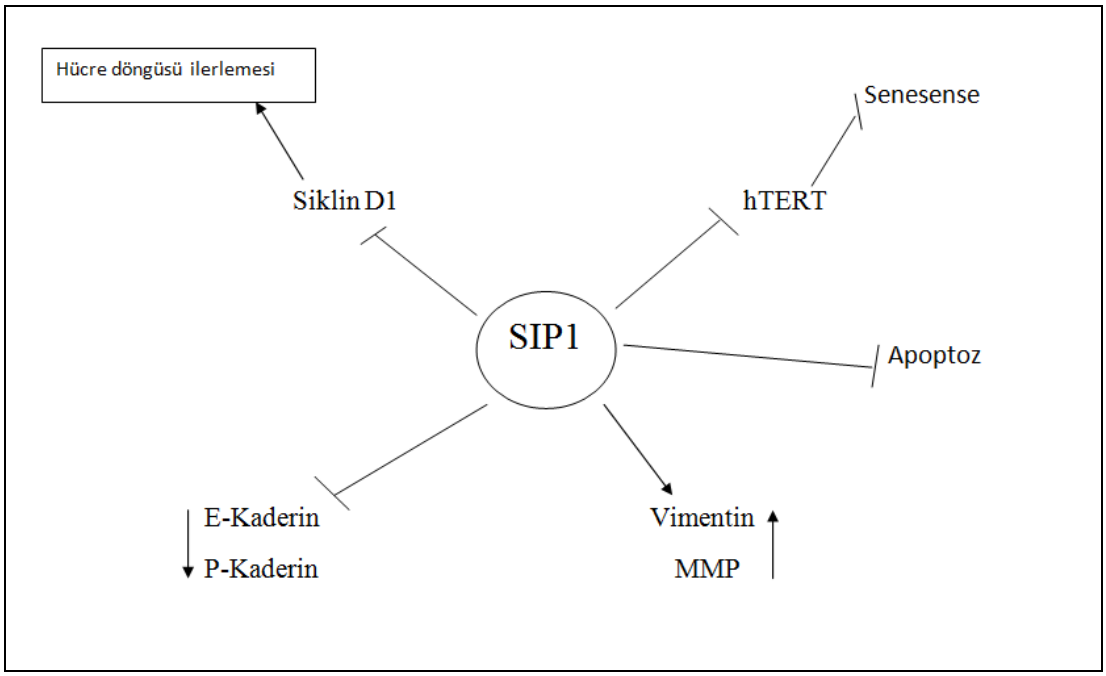
Gelişim ve kök hücre fonksiyonu için gerekli olan sinyal yolakları Wnt/β-katenin, Notch ve Hedgehog aktifleşmesi de EMT'ye sebep olur. Wnt/β-katenin sinyal yolağı kendini yenileme, farklılaşma, kök hücre karakteri, tümör oluşumu, proliferasyon, hücre-hücre bağlantısı, epitelyal-mezenkimal dönüşüm gibi süreçlerde görev alır. APC, AXIN, CK1α ve GSK3β bir araya gelir ve β-katenin yıkılma kompleksini oluşturur. Wnt ligantlarının yokluğunda sitoplazmada olan β-katenin, β-katenin yıkılma kompleksi ile devamlı N-terminalindeki serin rezidülerinden fosforillenir. Fosforillenerek işaretlenen β-katenin ubiquitin-proteozom yolağında yıkılır. Wnt ligantları Frizzled ve LDL ilişkili reseptör ailesi (LRP) üyelerinden özelikle LRP5 ya da LRP6 üyelerinin oluşturduğu komplekse bağlanırsa dishevelled (Dsh) proteini aracılığıyla β-katenin yıkılma kompleksi dağılır. Sitoplazmada biriken β-katenin sitoplazmadan nükleusa geçer ve Wnt/β-katenin hedef genlerinin aktivasyonunu sağlayan, Tcf/Lef (T-cell factor/ lymphocyte enhancer factor) ailesine ait transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Anti-apoptotik role sahip survivin, hücre döngüsünü uyaran c-myc, siklin D ve preinvaziv genlerden MMP gibi genler Wnt/β-katenin hedefleri arasındadır [35], [45], [46].

EMT'de epitel hücrelerinin ayrılmasını uyaran ilk hücre yüzeyi reseptörlerinden biri Met reseptör tirozin kinaz'dır. Met reseptör tirozin kinaz'ın ligandı hepatosit büyüme faktörünün bağlanmasıyla aktivasyonu gerçekleşir bu yolak β-kateninin hücre içi lokalizasyonu düzenler [47].

2.2.1. Sip1/ZEB2 Transkripsiyon Faktörü

Zfhx1a ve Zfhx1b genleri tarafından kodlanan ZEB1 ve ZEB2/SIP1 çinko parmak motifli proteinler birçok fonksiyonel bölgesi olan ve çok işlevli transkripsiyon faktörleridir (Şekil 2.5). Bu proteinler, yüksek derecede homolog olan bir homeodomainden ayrılmış amino ve karboksil uçlarındaki C2H2-tipi çinko parmak motifleri ile karakterizedir. ZEB ailesinin transkripsiyon faktörleri iki üyeden oluşur. Bunlar; ZEB1 (deltaEF1) ve ZEB2 (Smad etkileşimli protein 1 aynı zamanda ZEB2, ZFHX1B, SMADIP1, FLJ42816, KIAA0569 olarak bilinen SIP1)'dir. ZEB2 Smad bağlayıcı domain (SBD), homeodomain benzeri dizi (HD), C-terminal bağlayıcı protein (CtBP) ve POU-like gibi domainlerden oluşur. *ZEB2* geni 9 intron, 10 ekzon içerir. Genin start kodonu ekzon 2'de, stop kodonu ise ekzon 10'da

bulunur. ZEB2, 1215 aminoasitten oluşur. ZEB proteinleri embriyonik gelişim sırasında nöral krest hücrelerinin göç ve türev yapılarının oluşumu için çok önemlidir. Tümör biyolojisi açısından ise hücrelerin primer tümörden ayrılarak invazyon ve metastazında rol alırlar [48]-[52].



Şekil 2.5: SIP1 yolağı.

SIP1 doğrudan çinko parmak domaini ile farklı hedeflerin promotorlarındaki E-box dizilerine bağlanır ve transkripsiyonel represyona aracılık eder. Bu hedeflerden biri E-kaderinin geni olan CDH1'dir. CtBP ilk olarak adenovirüs E1A onkoprotein olarak bulunmuş ve C-terminal segmenti PLDS dizisi ile etkileşen bir protein olarak tanımlanmıştır. ZEB1 ve SIP1'de PXDLS motiflerinin tanımlanması CtBP'nin ZEB1 ve SIP1'in ortak baskılayıcısı olduğuna işaret eder. Transkripsiyonal baskılama eş-baskılayıcı CtBP ve SIP1'in birleşmesi ile gerçekleşir. Bu birleşme CDH1 geninin ekspresyonunu azaltır [48], [52], [53].

Ayrıca SIP1 1999 yılında TGF-β sinyal yolağı ile düzenlenen Smad proteinlerinin MH2 domaini ile etkileşerek DNA'ya bağlanan ve hedef genlerin ifadesini baskılayan bir transkripsiyon faktörü olarak bulunmuştur. Homologu ZEB1 gibi SIP1'de DNA'da E-box (CACCT(G)) adı verilen konsensus dizilere bağlanarak hedef genlerin ifadelerini düzenler [53], [54].

Hücre zarından nukleusa kadar devam eden TGF-β sinyal yolağı, çok farklı hücre tiplerinde embriyonel gelişim ve farklılaşmada, immünmodülasyonda, apoptozda, erişkinde doku tamiri ve hücre büyümesinde kritik roller oynayan sitokinleri içerir [55], [56]. Yapısında bir disülfit köprüsü bulunan 25 kDa'luk homodimer olan TGF- β hücrede inaktif pro-peptit olarak sentezlenir ve LTB–β (inaktif TGF- β bağlayan proteinler) ile birleşerek inaktif TGF- β formunda salgılanır. Pro-peptidin N-terminalinde LAP olarak adlandırılan bir dizi bulunur. İnaktif TGF- β tipII yapısından LTBP ve LAP proteinlerinin serin proteazlarla kesilip atılması sonucu aktif TGF- β oluşmaktadır. Hücre membranında iki tip reseptör vardır. Bunlar TGF- β tipI (TβRI) ve TGF- β tipII (TβRII)'dır. TGF- β tipIII reseptörleri TGF- β'nın TβRI ve TβRII reseptörlerine bağlanmasını sağlar. TGF- β önce TβRII'ye sonrada TβRI'ye bağlanır. Oluşan reseptör kompleksi iki TβRI ve iki TβRII içeren heterotetramerlerdir Aktive olan TβRI Smad2 ve Smad3'ü C-terminal serinlerinden fosforilemektedir. Bu şekilde aktive olan Smadlar ise Smad4 ile üçlü bir yapı oluşturarak hedef genlerin anlatımını düzenlemek üzere nükleusa geçmektedir. SIP1 transkripsiyon faktörü nükleusda Smadlarla etkileşerek hedef genleri baskılamaktadır [57]-[60].

SIP1 embriyogenezde ve hücre farklılaşmasında görev alan düzenleyici faktörlere direkt bağlanarak baskılama işlevini gerçekleştirmektedir. EMT sürecinde epitel hücrelerde E-kaderini baskılar. Mezenkimal nitelik kazanan hücrelerin invazyon ve metastaz kapasiteleri de artar. Epitel hücrelerinde ZEB1 ve SIP1'nin aşırı ekspresyonu yalnızca E-kaderini değil, Proto-kaderinler, hücre polaritesini sağlayan proteinler (örneğin: CRB3, HUGL2, PATJ) ve desmozomları (örneğin: desmoplakin, plakophilin 3)'da baskılar [61]. ZEB1 ve SIP1'in ifadesini arttırdığı başlıca mezenkimal proteinler vimentin ve N-kaderindir.

2.2.1.1. Hepatosellüler Karsinomada SIP1

Hepatosellüler karsinomadaki SIP1 mutasyonları ve SIP1'in promoter hipermetilasyonunun incelendiği araştırmada SIP1 ifadesinin promoter hipermetilasyonu ile azaldığı gösterilmiştir [62]. Diğer çalışmalarda ise, SIP1'in HCC hücrelerinde hTERT baskılamasını gerçekleştirdiği ve bu yolla hücreleri yaşlanmaya yönlendirdiği, iyi-farklılaşmış HCC hücre hatlarında az SIP1 ifadesi bulunurken az-farklılaşmış HCC hücre hatlarında güçlü SIP1 ifadesi bulunduğu saptanmıştır [63].

Ayrıca, SIP1'in Snail ile birlikte matriks metalloproteazların (MMP-1, MMP-2, MMP-7, MTI-MMP) ifadesini ve HCC hücrelerinin invazyonunu arttırdığı, dolayısıyla kötü prognoz, hücre çoğalması ve metastazla ilişkili olduğu gösterilmiştir [5].

3. HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA'DA TEDAVİ YÖNTEMLERİ

3.1. Cerrahi Tedaviler

Karaciğer kanseri tedavisinde en iyi seçenekler tümör rezeksiyonu ve karaciğer naklidir. Karaciğer tümör bölgesinin cerrahi müdahale ile alınması işlemine kısmi hepatektomi denir. Bu yöntem hastanın sağlık durumu iyi ise ve tümör alındıktan sonra yeterli sağlıklı doku kalacaksa yapılır. Karaciğer kanseri ve aynı zamanda ağır siroz hastası olan kişide tümör küçük olsa bile sağlıklı doku kalmayabilir. Siroz hastalarında tümörden sonra kalan hücrelerin ne kadarı sirozlu olduğu Child-Pugh sınıflandırmasıyla anlaşılır. Sirozun karaciğere olan tahribatı ölçülen bu sınıflandırmada A sınıfına cerrahi müdahale yapılabilir. B ve C sınıfına cerrahi müdahale yapılamaz [8], [64]-[66].

Karaciğer nakli, oluşan tümör eğer alınamayacak bir bölgede bulunuyorsa ya da tümör çok geniş bir bölgeye yayılmışsa (örneğin tüm organa) uygulanan cerrahi tedavidir. Karaciğer nakli uygulaması karaciğer kanseri tedavisinde en iyi çözümdür. En büyük problem uygun donörün bulunmasıdır [66].

3.2. Ablasyon veya Embolizasyon gibi Bölgesel Tedaviler

Karaciğer transplantasyonu olamayan hastalarda yapılan tedavilerde hasta yaşamını uzatır ve yaşam kalitesini artırır.

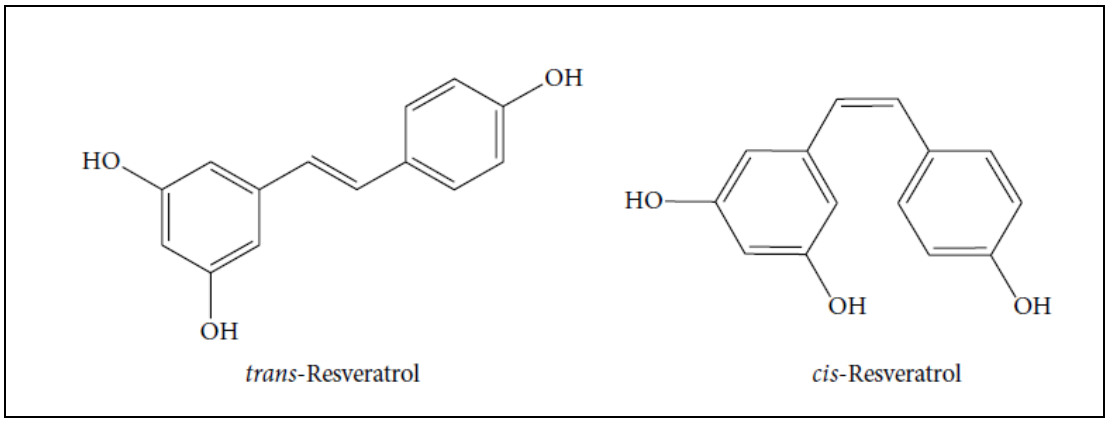
- Transkateter Arteriyel Kemoembolizasyon (TAKE): Cerrahi tedavilere alternatif yöntemlerden biridir. TAKE kateter yoluyla doksorubisin, sisplatin veya mitomisin C olmak üzere kemoterapi ilaçlarını yüksek dozlarda verebilen radyologlar tarafından yapılır. Tümör büyüklüğü fazla olan hastalarda yapılan tedavide % 16-61 oranında başarı elde edilmiştir [67].
- Brakiterapi: Kanser tedavisinde kullanılan tedavi yöntemlerinden biri olan brakiterapi kelime anlamı olarak Braki: kısa mesafe; Terapi: tedavi denmektedir. Dışardan tümörün içine ya da yakınına radyasyon uygulanır [67], [68].

3.3. İlaç ve Fitoterapi Destekli Tedaviler

3.3.1. Resveratrol

Resveratrol ilk kez *Veratum grandiflorum* (akçöpleme) bitkisinin reçinelerinde bulunmuştur. Resveratrol (*trans-trihidroksistilben-3,5,4* C14H12O3) (RES) stilben sentaz enzimi tarafından sentezlenir ve genellikle üzüm, fıstık, çilek, yerfıstığı gibi insanlar tarafından tüketilen birçok bitki türünde bulunan fitoaleksindir (Şekil 3.1). Mekanik hasar, mantar enfeksiyonu, UV radyasyona tepki olarak bitkiler tarafından üretilir [69], [70]. Resveratrol, viniferinler olarak adlandırılan polimer ailesinin bir üyesidir. Geleneksel Japon ve Çin tıbbında *Polyganum Cuspidatum* adlı bitkinin kurutulmuş köklerinden "Kojo-kon" adı verilen ilaç olarak kullanılmıştır. Kojo-kon diğer adıda "Itadori" dir. Ayrıca Japonyada Melinjo (*Gnetum gnemon L.*)' da resveratrol açısından zengin bir besindir. İnflamasyon, karaciğer, mantar hastalıkları, kalp ve damar hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır [71], [72]. Resveratrol karsinogenezi üç farklı aşamada etkiler: tümör başlangıcında, ilerlemesinde ve metastazda [73].

Cis ve trans olmak üzere iki izomeri olan resveratrol bitkilerde doğal olarak üretilmekte ve bu iki izoformun etkilerinin benzer olduğu görülmektedir [74], [75]. Molekül ağırlığı ise 228.25 gr/mol'dür. Oral yolla alındıktan 30-60 dakika sonra sindirilmekte ve sıklıkla karaciğer ve onikiparmak bağırsaklarında konjugasyon ile glukorunoid ve sülfat metabolitlerine dönüşmektedir [76]. Düşük pH, yüksek ısı ve gün ışığı cis izoformunu trans izoformuna dönüştürür. Trans izomerlerinin biyolojik aktiviteleri, cis izomerlerinden daha yüksektir. Resveratrolün bitkilerde olan yaygın türevi glikozid bileşik halinde olan piseid formudur [77]-[80].



Şekil 3.1: Resveratrolün kimyasal yapısı.

Resveratrolün anti-inflamatuar, anti-anjiojenik, anti-metastatik, kardiyoprotektif, nöro-koruyucu, apoptoz ve otofaji-indükleyici, spermatogenez-güçlendirici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [81], [82].

3.3.1.1. Resveratrol'ün Kalp Üzerine Etkisi

Epidemiyolojik çalışmalara göre Fransa'da miyokard enfarktüsü sıklığı diğer ülkelere göre % 40 daha azdır. Dünyadaki birçok gelişmiş ülkenin tersine, Fransa'da kolesterolce yüksek, doygun yağca zengin bir beslenmeye rağmen kalp enfarktüsü sıklığının düşük olmasının kırmızı şaraptaki resveratrolden kaynaklandığı anlaşılmıştır. Etanol serbest oksijen radikallerin üretimini (özellikle hidroksil radikali) ve lipit peroksidasyonu artırarak, beyinde dahil olmak üzere birçok organda oksidatif hasara neden olur. Çalışmalar şarap içindeki resveratrolün, kronik etanol tüketiminden kaynaklanan DNA ve genetik bileşenlere olan zararı azaltığı anlaşılmıştır. Resveratrol beyaz şarapta da bulunmasına rağmen, beyaz şarap yapımında çekirdek ve kabuklar çok daha önce çıkarıldığından, resveratrol seviyesi çok daha düşük seviyededir. Resveratrol kardiyovasküler sistem üzerine etkisinin yanı sıra tümör gelişimini de durdurmaktadır. Resveratrol ayrıca obezite ve diyabet gibi metabolik hastalıkların tedavisinde de etkilidir [83]-[86].

3.3.1.2. Resveratrol'ün Kanser Oluşumuna Etkisi:

Resveratrolün insanlarda meme, kolon, pankreas, mide, prostat, ovaryum, karaciğer, serviks kanseri ve melonom gibi çeşitli kanserlerde hücre proliferasyonunu baskıladığı bilinmektedir [87]. Resveratrol kanser hücrelerinde özellikle DNA sentezinde rol oynayan bir enzim olan ribonükleotid redüktazı inhibe ederek tümör hücrelerinin büyümesini engeller [88]. Resveratrolün anti-kanserojen etkilerinin daha çok antioksidan aktivitesi ile ilişkili olduğu görülmektedir. Hidroksiperoksidaz, protein kinaz C, Bcl-2 fosforilasyonu, Akt, NFKB, mTOR, MMP-9, hücre döngüsü düzenleyicileri ve siklooksijenazı inhibe ettiğini gösteren çalışmalar vardır [73]. Aynı zamanda, mitojen ile aktif edilmiş protein kinaz (MAPK) ekspresyonunu inhibe eder [89]. Resveratrol topoizomeraz II, DNA polimeraz ve çoklu ilaç direnç proteinlerine bağlanarak inhibe eder [90].

3.3.1.3. Resveratrol'ün Apoptoza ve Apoptoza Neden Olan Sinyal Yolaklarına Etkisi

Resveratrol hem hücre ölüm reseptörleri yolağı (Fas/CD95)'nı aktive etmekte, hem de p53 ve p21'i düzenleyerek mitokondriye bağımlı yolak ile apoptozu etkinleştirmektedir. Tümör nekroz faktörü (TNF)'nin bir üyesi olan Fas ligandlarının aktive olması hücreyi apoptoza yönlendirir [91]. Resveratrol, p53-bağımlı bir apoptoza da yol açar. Resveratrol ile uyarılan apoptoz faktörü (PCAF), bir p53 koaktivatörüdür. Resveratrol birçok insan kanseri hücre hatlarında p53'ün N-terminal ve C-terminal serin bölgelerini fosforlamakta ve aynı zamanda p53'ün asetilasyonunu teşvik etmektedir [92], [93]. Resveratrol, mitokondride bazı yolakların aktifleştirilmesi veya durdurulması yoluyla da hücreyi apoptoza yönlendirir. Mitokondride bazı yolakların aktifleştirilmesi membranda depolarizasyonla sağlanır. Resveratrolün expresyonunu arttırdığı proteinler, bax, bak gibi proapoptotik proteinler ile apoptoz proteaz aktive edici faktör-1 (Apop-1) olup, ekspresyonlarını azatlığı proteinler ise antiapoptotik proteinler bcl-2, bcl-XL'dir. Resveratrol, apoptoz inhibe edici protein (XIAP) yardımıyla bax'ın mitokondriye taşınmasını sağlar. Bu durum apoptozu indükleyebilir. Resveratrol, sitoplazma ve mitokondride bax-XIAP arasındaki etkileşimi ve bağlantıyı oluşturur ve bu proteinlerin mitokondriye taşınmalarında ve aktive olmalarında etken maddedir [91].

3.3.1.4. Resveratrol'ün Hücre Döngüsüne Etkisi

Hücre döngüsü G1, G2 ve S evrelerinde siklin bağımlı protein kinazlar (CDK) ve siklinler tarafından kontrol edilir. Bir hasar varsa G0 evresinde durur. Hasar düzelemeyecek durumdaysa apoptoza yönlendirilir. Resveratrol hücre döngüsünde görev alan proteinlerin ekspresyonunun artırılması ya da azaltılması yoluyla hücrenin hızlı ve dengesiz bölünmesini engelleyerek tümör oluşumunu engeller. p53'ün aktive ettiği gibi p21 ve p27'nin ekspresyonunu da arttırır. p21 ve p27'de siklin bağımlı kinazları (CDK) inhibe eder. CDK'ların inhibisyonu hücre döngüsünün G1 fazında durmasına neden olur. Hücrenin G1 fazından S fazına geçişte p21 ve Bcl-2'nin işlevlerine yardımcı olan proto-onkogen c-myc'nin ekspresyonunu azaltmaktadır ve CDK 4, CDK 6, CDK 2 kinazları inhibe ederek Rb'nin (retinoblastoma tümör baskılayıcı proteini) fosforilasyonunu ve hiperfosforilasyonunu engellemektedir. Rb'nin fosforilasyonunun azalması G1 fazının, Rb hiperfosforilasyonunun azalması ise G1/S geçişinin duraklamasına neden olmaktadır [91], [93]-[96].

Resveratrol Rb aktivasyonunu inhibe ederek ya da CDK1 aktivasyonunu inhibe ederek hücreyi S evresinde durdurabilmektedir [96]. Yapılan çalışmalarda resveratrolün, ribonükleotid sentaz ve DNA polimeraz enzimlerini inhibe ederek DNA sentezinin engellenmesine ve hücre döngüsünün S evresinde durmasına neden olduğu belirtilmektedir [88], [97].

3.3.1.5. Resveratrol'ün Antioksidan Etkisi

Güçlü bir antioksidan olan Resveratrol E ve C vitamininden daha etkilidir ve OH^-, 0_2^- radikallerini inhibe eder. OH^- ile H_20_2'in DNA hasarını önler [98], [99]. Resveratrolün oksidatif stresin neden olduğu çeşitli böbrek hasarlarına karşı koruyucu olma özelliği enzimleri düzenlemesinden ve serbest radikalleri inhibe etmesinden ileri gelir [100]. Oksidatif hasarın DNA ve proteinlere olan etkisine karşı testisler, beyin, kalp ve karaciğer gibi çeşitli organlarda koruyucu etkisi vardır [101]. Resveratrol heme oksijenaz-1 ve paraoksonaz-1 olmak üzere antioksidan enzimlerini uyarır [102].

Reaktif oksijen radikalleri (ROS) NF-kB ve AP1 gibi transkripsiyon faktörlerini etkinleştirir ve mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) sinyal yolağının

fosforilasyon ile aktivasyonu üzerinden enflamasyonu artırır. Kronik enflamasyon kalp, nörolojik hastalıklara ve kansere neden olur. Resveratrol MAPK sinyal yolağının üst aşamasında görev alan MAPK'nin aktivasyonunu sağlayan fosfotidilinozitol-3-kinaz (PI3K) fosforilasyonunu ve protein kinaz B'nin (Akt/PKB) fosforilasyonunu inhibe eder. MAPK sinyal yolağının inhibisyonu vazokonstrüksiyon, anjiyogenez, proliferasyon ve hücre farklılaşması ile ilgili genlerin ifadelenmesini azaltmaktadır [103].

Resveratrolün doğrudan insan umblikal kord endotelyal hücrelerinin büyümesini MMP-2'nin jelatinolitik aktivitesini azaltarak ve bazal membran komponentleri fibronektin ve laminine endotelyal hücre bağlanmasını engelleyerek inhibe ettiği gösterilmiştir [104].

Resveratrol anjiyogenezde endotelyal hücre aktivasyonu ve proliferasyonu ile endotelyal hücrelerin stromal boşluğa invazyonu gibi fonksiyonların gerçekleşmesini inhibe eder [105].

4. HÜCRE ÖLÜMÜ

4.1. Nekrotik Hücre Ölümü

Genler tarafından kontrol edilemeyen ve rastgele gelişen hücre ölümü tipi olan nekroz yanıklar, yaralanma, enfeksiyon, kanser, enfarktüs, zehirlenme gibi çeşitli fiziksel nedenlerle ve hipoksi, arsenik, siyanid, insektisitler gibi toksik maddeler ve ağır metaller nedeniyle olur.

Nekrozda hücre şişer ve patlar; mitokondriyal, lizozomal ve plazma zarı bütünlüğünü kaybeder, çevredeki alana içeriğinin yayılması inflamasyona yol açar [106]-[108]. Nekroz uzun bir süre kontrolü olmayan bir ölüm şekli olarak biliniyordu. Yapılan son çalışmalarda ölüm reseptörleri (örneğin TNFR1, Fas / CD95 ve TRAIL-R) ve Toll benzeri reseptörlerin (örneğin TLR3 ve TLR4) kaspaz inhibitörleri varlığında nekrozu düzenlediği gösterilmiştir. Nekroz mitokondriyal ROS üretimini artırır ve non-apoptotik proteazları aktive eder [109].

4.2. Otofaji

Yunanca anlamı “ kendini yeme’’den üretilen terim “otofaji’’ ilk kez kırk yıl önce Christian De Duve tarafından açıklandı. Otofajik hücre ölümü ile anabolik ve katabolik hücre fonksiyonları dengelenir. Zarar görmüş organeller ortadan kaldırılır. Sindirilen organellerin yapıtaşları hücre içinde hücrenin büyümesi ve gelişmesi için tekrar kullanılır. Otofajide endoplazmik retikulum (ER) ve golgi gibi organellere ait endomembran sistemleri bir cep gibi kendi içlerine doğru kıvrılır (autophagosomes) ve hücre içi makromoleküller ile zarar görmüş organelleri içine alır. Sitoplazmanın bir kısmı ya da bir organel ilk önce ER’nin membranı ile sarılır. Primer lizozomlar bu yapıyla birleşerek sekonder lizozomları oluşturur ve lizozomal içerik hidrolitik enzimler ile parçalanır [110], [111]. Karaciğerde glukagon kaynaklı otofaji mekanizması siklik (AMP) protein kinaz A aktivasyonunu uyarır.

Otofaji, otofaji ilişkili protein (Atg)’ler tarafından düzenlenir; ilk olarak mayada tanımlanmış olan Atg proteinleri otofagozom biyosentezini kontrol eder. Otofaji proteinleri Atg1/ULK (Unc-51-Like Kinase) kompleksi, Vps34 class III fosfotidilinozitol 3- kinaz kompleksi (PI3K), Paralel ubiquitin- benzeri (Atg12 ve

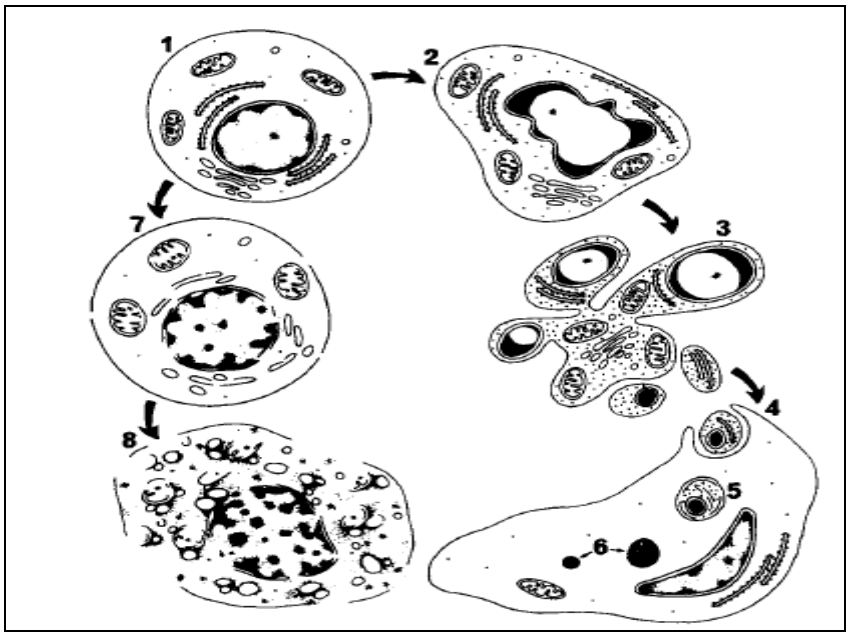
Atg 8) konjugasyon sistemleri ve iki transmembran proteinleri Atg9 ve VMP112 olmak üzere incelenir [112].

Kanser hücrelerinde metabolik strese yanıt olan apoptoz ve otofaji indüklenir. Metabolik stres esnasında tümör hücrelerinin hayatta kalması için otofajinin baskılanması gereklidir. Dolaylı olarak Atg-5 allelik kaybı veya doğrudan PI3K yolağının aktivasyonu süreci kısmen açıklayan mekanizmalardır [113].

4.3. Apoptoz

Hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm olarak 1842 yılında Carl Vogt tarafından tanımlanan ve Yunanca ağaçtan düşen yaprak veya çiçekten düşen petal (Apo:ayrı, Ptosis:düşme) anlamına gelen apoptoz kontrolü hücre ölümüdür ve ilk kez Kerr, Wyllie ve Currie, 1972 yıllında yayınladıkları bir makalede nekrozdan farklı morfolojik özellikler taşıyan bir hücre ölümü olarak tanımlamışlardır (Şekil 4.1).

Apoptoz hücre içi dengenin korunmasında, erkek fetüste Müller ya da dişi fetüste Wolf kanallarının körelmesi sırasında, embriyonik dönemde ekstremitelerin ve içi boş organların oluşumunda, merkezi sinir sistemi gelişiminde, nöron sayısının düzenlenmesinde, organogenez ve sinaptogenez olaylarında, farklılaşmış dokuların olgunlaşmasında, doğumdan sonra T ve B lenfositlerin seçiminde ve DNA’sı hasar gören hücrelerin ölümünde yer alarak temel bir işlev yürüten fizyolojik bir mekanizma olarak karşımıza çıkar [114]-[117].



Şekil 4.1: Apoptoza ve nekroza uğrayan hücreler (1: normal hücre; 2-6: apoptotik hücre ölümü; 7-8: nekroz).

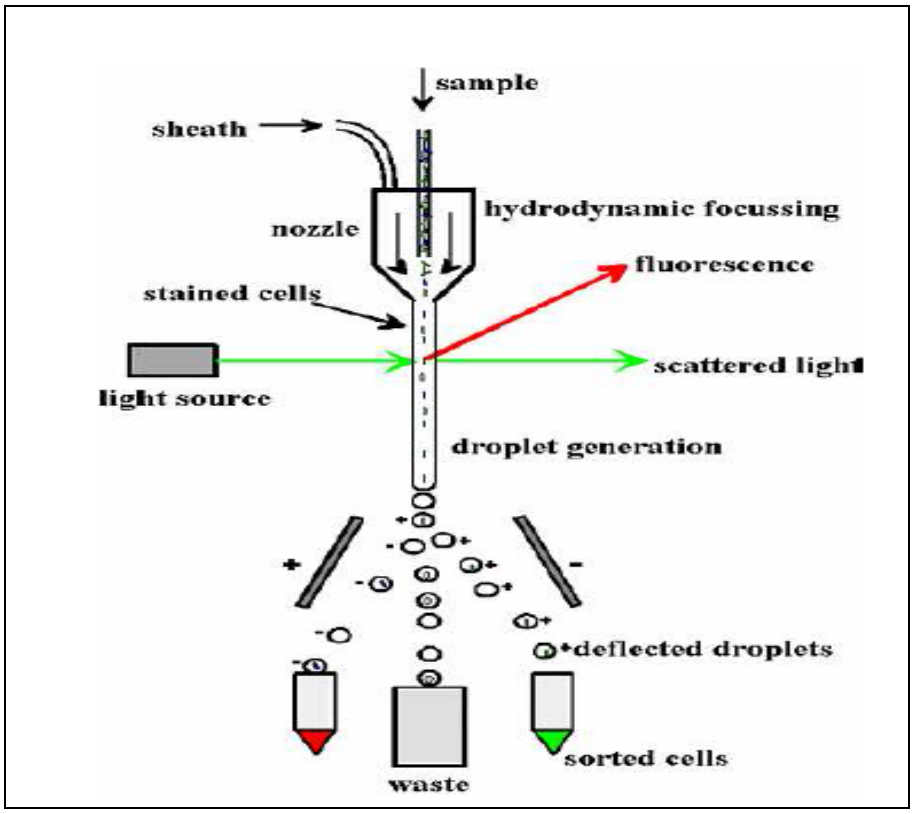
Apoptozun regülasyonundan sorumlu Bcl-2/Bax gen ailesi mitokondri çekirdek zarı ve endoplazmik retikulum zarında yerleşmişlerdir [118]. Bir hücrenin apoptoza yönelip yönelmeyeceği Bcl-2 ailesi genlerinin Bcl-2/Bcl-2 homodimer ya da Bcl-2/Bax heterodimer formlarının oluşumuna bağlıdır. Bcl-2 ailesi birbirine zıt iki gruptan oluşur.

i) Proapoptotik üyeler: Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa'dir.
ii) Antiapoptotik üyeler: Bcl-2, Bcl-Xl ve Mcl-1'dir.

Proapoptotik üyeler antiapoptotik üyelere göre daha çok apoptoza gitme eylemindedir. Proapoptotik üyeler ile antiapoptotik olan üyelerden kompleks oluştuğunda hangi üye grubu daha çok ise hücre yaşamının süresini o üye belirler. Proapoptotik üyeler çoksa hücre apoptoza gider. Antiapoptotik olan üyeler çoksa hücre bölünmeye devam eder [119].

4.3.1 Apoptoz Tayininde Kullanılan Yöntem Akım Sitometri

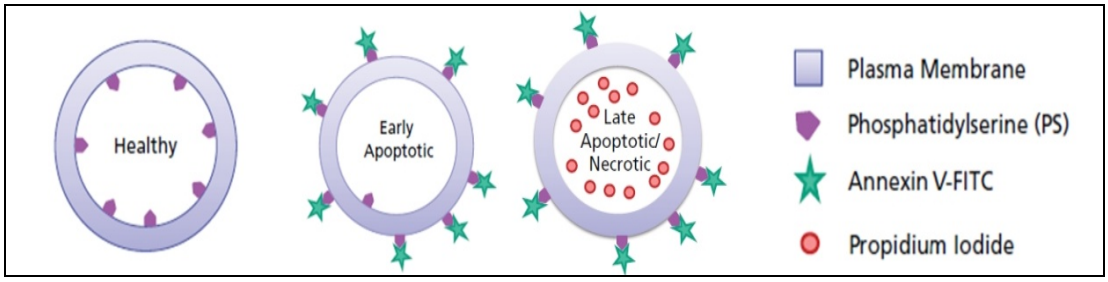
Araştırma laboratuvarlarında 1950'li yıllarda hücrelerin kimyasal ve fizyolojik özelliklerini incelemek için üretilen akım sitometride ortalama 10.000 hücre 20 saniyede analiz edilmektedir ve bir ışık demeti ile sıvı akımı içinden geçen hücrelerin birden fazla fiziksel ve kimyasal özelliklerini ölçer (Şekil 4.2). Hücrelerin üzerine ilettiği floresan ışığın hücrelerdeki yansımasını ölçerek hücrenin büyüklüğünü (Forward Scatter-FSC), granül yapısını (Side Scatter-SSC), floresans miktarını (FL1, FL2, FL3 ve FL4), hücre ölüm fazını ve hücre döngüsünün hangi fazda olduğunu belirler [120]-[122].



Şekil 4.2: Akım sitometrinin işlevi.

Akım sitometri, akış sistemi, lazer optikler, elektronik dedektörler, analog dijital çevrimciler ve bilgisayarları içerir. Akış sistemi lazer ışığının önünden tek tek hücrelerin geçmesini sağlayan sıvıdan oluşur ve ışığın tek bir hücrenin üzerine düşmesini sağlar. Solid dokulardan analiz yapılamaz. Bu nedenle solid dokulardan hücreler elde edilmeli ve hücre süspansiyonu hazırlanmalıdır. Lazer optiklerde

hücreler optik alandan hücrenin büyüklüğü ve iç yapısına göre paralel olarak yayılan ışınlar ileri açılım kanal dedektörü (fsc= forward scatter channel dedektörü) ile toplanır. Bu da hücrenin büyüklüğü hakkında bilgi verir. Hücre içerisinden 90^0'lik açı ile geçip absorbe edilen ışınlar yana açılım kanal dedektörü (ssc= side scatter channel dedektörü) ile toplanır. Hücrenin granül içeriği ve iç yapısı hakkında bilgi verir [123]. Florokromlarla işaretlenmiş hücre içi ve dışı proteinler gelen ışığı yayar. Ayrıca hücre yüzeyindeki ve hücre dışındaki membran proteinlerine ya da DNA'ya uygun boyalarla işaretli antikorlarla bağlanmaları ve antijenlerle birleşmeleri sağlanır. Antijene sahip hücreler belirli bir basınç altında "flow cell'' denilen lazer ışığın vurduğu yerden teker teker geçer. Hücreler bu lazer ışığı absorbe eder ve işaretlendikleri floresansın özelliğine göre farklı dalga boylarında ışın saçar. Bu ışınlar elektronik dedektörler, dijital çevrimciler ve bilgisayarlar ile analiz edilir [120], [124].

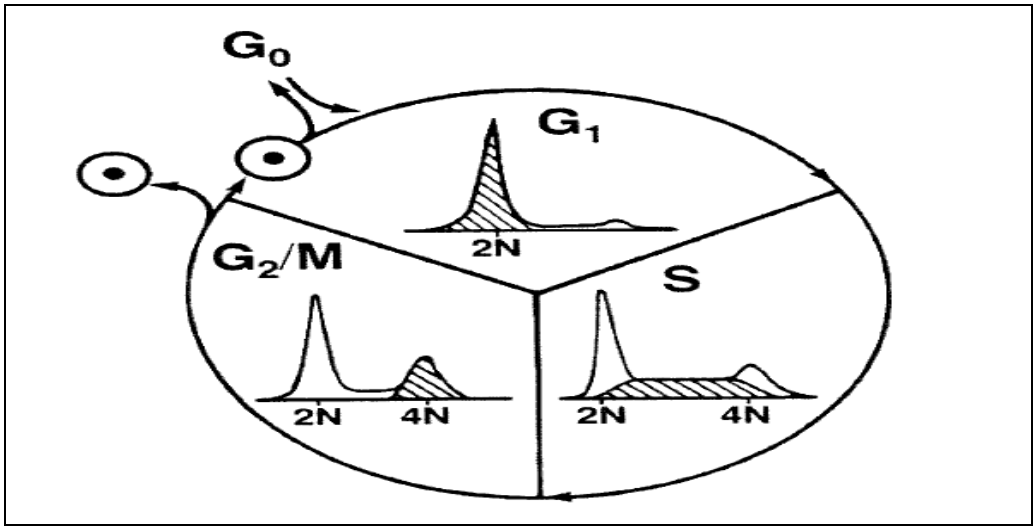


Şekil 4.3: Akım sitometride apoptoz ve nekroz.

Sitometrik DNA içeriği "DNA indeksi'' (DI) veya "DNA kromozom sayısı'' olarak belirtilir. G0/G1 evrelerindeki normal hücreler için DI=1.0'dır. G2/M evresinde DI=2.0 S evresinde ise 1.0‹DI›2.0'dır. Benzer içeriğe sahip hücre populasyonlarında DNA içeriğinin ortalama değerinin varyasyon katsayısı (CV) akım sitometri tarafından yapılan DNA içerik analizleri için hassaslık belirtecidir [125].

Anneksin V, yapısal ve işlevsel olarak benzer özellikleri paylaşan ve fosfolipid-bağlayan anneksin ailesinin bir üyesidir. Bu üyelerden her biri geri dönüşümlüdür ve Ca^{2+} bağımlıdır. Ca^{2+} ile bağlanabildiğinde fosfolipidleri bağlayabilme özelliğine sahiptir. Anneksin ailesinin 12 üyesi vardır. Plazma membranı asimetri kaybı apoptozun ilk özelliklerinden biridir. Apoptik hücrelerde, hücre membranının iç kısmında bulunan negatif yüklü fosfolipidlerin yani fosfolipid

fosfatidilserin (PS)'nin dış membrana geçmesine neden olur. Annexin V PS için yüksek çekim gücü olan 35-36 kDA moleküler ağırlıklı bir proteindir. Hücre membranı dışına çıkınca PS Annexin V'e bağlanır. Işığa maruz kalınca akım sitometride ışıma yapar. Apoptozun erken evrelerindeki hücreler, noktasal grafiğin alt sağ köşesinde tek pozitif anneksin V-bağlı hücreler olarak konumlanır ve bu evrede hücre membranları hala bütünlüklerini korudukları için propidyum iyodür (PI) hücre içerisine geçememektedir. DNA'ya bağlanamadığı içinde analiz edilememektedir (Şekil 4.3). Apoptoz ilerledikçe membran yapısı bozulur ve korumasız kalan DNA PI ile muamele edildiğinde PI DNA'ya bağlanır. Böylece hücrenin geç apoptoz ya da nekrozda olup olmadığı belirlenir [125], [126].



Şekil 4.4: Hücre fazı ve DNA'nın durumu

Hücre bölünmesinde G1 fazı DNA replikasyonu için gerekli proteinlerin sentezlendiği fazdır. S fazı DNA replikasyonun gerçekleştiği fazdir. G2 fazında DNA replikasyonu durur ve hücre bölünmesi için gerekli olan proteinler sentezlenir.

Akım sitometrinin hücre döngüsünde kullanılan boyalar Propidium iyodür (PI) ve *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI)'dir. PI ve DAPI DNA sarmalının küçük oluğuna bağlanır ve PI aynı zamanda çift iplikli RNA'ya da bağlanabilir. Bu nedenle PI ile boyama yapılırken RNAse'de eklenir. PI'nın DNA'ya bağlanabilmesi için deterjan, hipotonik müdahale ya da çözücü (etanol) ile hücre membranında delikler açılması gerekir. Akım sitometri hücre döngüsü analizinde fazlardaki (G1, S, G2 ve M) DNA miktarına göre ölçüm yapılır [127]. İki özdeş DNA içeriğine sahip G2 ve M fazı ayırt edilememektedir.

5. HÜCRE DÖNGÜSÜ

Hücre döngüsü bölünmek üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin olduğu, DNA'nın kontrollü replikasyonunun gerçekleştiği tek yönlü bir süreçtir. Bu süreç ikiye ayrılır:

i) İnterfaz

- G1 (DNA sentezi için hazırlık evresi)
- S (DNA sentezi)
- G2 (post-DNA sentezi sonrası bölünme hazırlığı)

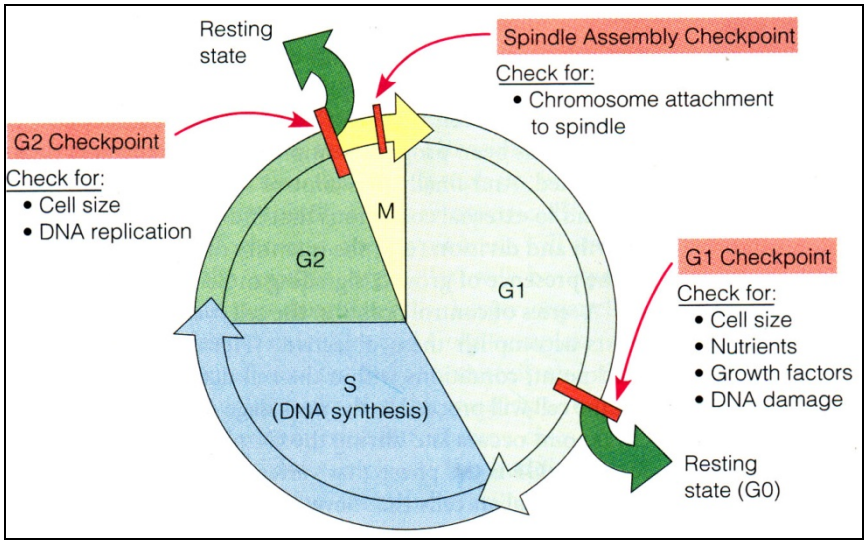
ii) M Fazı (Mitoz) [128]-[130]

Hücreler bölünme sinyali ile uyarılmadıkları sürece bölünmezler. G0 evresinde beklerler. Hücre bölünmesi için sinyal aldığında sinyal ileti kaskadı denilen ileti mekanizması (örneğin MAP Kinaz, Protein kinaz C, JAK/STAT yolakları) aktifleşir. Bu sinyal ileti kaskadı bölünme sinyallerini fosforlar. Hücre bölünmeden önce bölünmek için gerekli olan proteinlerin, enzimlerin sentezlenmesi için interfaz evresine girer. Interfaz kendi içinde G1, G2 ve S evrelerine ayrılır [129], [131], [132].

G1 evresi, hücre döngüsünün süresini belirleyen evredir. Bu fazda hücre ya bölünür ya da ölüme gider. Bazı genlerde değişiklikler olur. Örneğin c-fos, c-myc, c-jun gibi transkripsiyon faktörü genlerinde değişiklikler olur. Bu transkripsiyon faktörleri aktivatör protein 1 (AP1) bölgelerini aktive eder. AP1 aktivasyonu sonucu siklin ve siklin bağımlı kinazların (CDK) aktivasyonları sağlanır. RNA ve protein sentezinin olduğu ve hücre büyümesinin gerçekleştiği evredir. G1 evresinde sentezlenen proteinlerin görevi hücre döngüsünü kontrol etmek ve hücre hacminin normal büyüklüğüne ulaşmasını sağlamaktır [129], 130].

S evresi, hızlıca DNA sentezinin ve sentrozom eşlenmesinin olduğu evredir. DNA iplikçikleri birbirinden ayrıldığında dış etkenlere, mutajenlere karşı savunmasızdır. Bu nedenle replikasyon hızlıca gerçekleşir. G2 evresi DNA sentezinin durduğu, hücre hacminin artığı ve bölünme için gerekli olan proteinlerin sentezlendiği evredir. G2 evresinin sonunda kontrol noktası bulunur. Burada hücrenin bölünebilmesi için DNA sentezinin ve gerekli olan proteinlerin yapılıp

yapılmadığı kontrol edilmektedir. M evresi hücre büyümesi ve protein sentezinin durduğu hücrenin iki hücreye bölündüğü evredir [130, 133, 134].

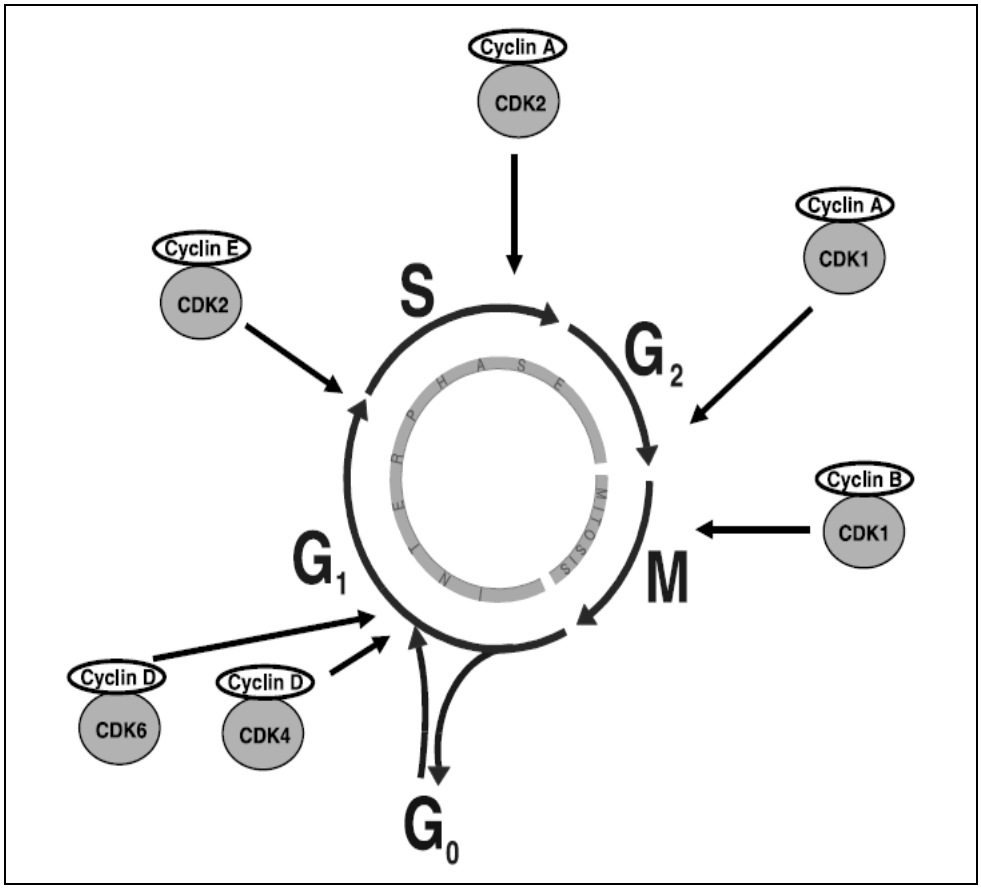


Şekil 5.1: Hücre döngüsü.

Mitozun devam etmesi için siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve CDK'ları aktive eden siklinler ve CDK inhibitörleri ile CDK etkileşimli protein/kinaz inhibitörü protein (CIP/KIP) ailesinden inhibitörler görev almaktadır [135]. Siklinler hücre döngüsünde G1 evresinde sentezlenen ve hücre bölünmesinden sonra hızlıca parçalanan protein ailesidir. Siklin bağımlı kinazlar hücre döngüsü düzenleyicisidir ve siklin bağlı olduklarında aktifleşirler (Şekil 5.1) [136], [137].

Hücre döngüsünde G1 evresinin en önemli rolü DNA'yı mutajenlerin etkisinden korumaktır. Bu nedenle siklin D, G1 evresi için önemlidir. G1 evresinin başında siklin D, CDK4 ve CDK6 ile birleşir ve aktif hale gelir. Retinoblastoma, p107 ve p130 proteinlerini (pRb) fosforlayarak hücre döngüsünün ilerlemesini sağlar. pRb, siklin D/CDK4-6 kompleksleri tarafından fosforlanmadan önce siklin E gibi DNA replikasyonunu başlatan genlerin promotorları üzerinde E2F grubu transkripsiyon faktörlerini inhibe eder. Siklin E'nin ekspresyonu E2F grubu ile kontrol edilir. E2F aktivitesi pRb tarafından fosforlanan siklin D/CDK4-6 kompleksi ile inhibe edilir [138]-[142]. Siklin E'nin 2 izoformu vardır: E1 ve E2. S evresinde CDK2 ile birleşerek aktif bir kompleks oluşturur. Siklin E hücrede yoksa bölünme durur ve hücreler G0 evresinde bekler. DNA replikasyonu siklin E/CDK2 komleksi oluşunca başlar. Siklin E/CDK2 komleksi DNA polimerazın transkripsiyonunu artırır

ve DNA sentezini uyarır. G2/M kontrol noktasında E2F'in transkribe ettiği siklin A ve onun bağlandığı CDK1'in birbirine bağlanması ile G2/M evresinden geçişi sağlar. Siklin A/CDK2 kompleksi profaz evresindeki olayları düzenler. Profaz'dan geçiş Siklin B/CDK1 kompleksi tarafından sağlanır ve bir protein fosfataz tarafından aktive edilir. Siklin B/CDK1 kompleksi hücrenin çekirdeğinin kaybolmasını ve böylelikle de hücre bölünmesinin başlamasını sağlar [142], [143].



Şekil 5.2: Hücre döngüsü kontrol noktaları.

Hücre döngüsünün evreleri arasında kontrol noktaları vardır (Şekil 5.2) [144]. Kontrol noktaları hücresel bölünmeyi kontrol eder ve hasar varsa hücre döngüsünü durdurur. Hücre G0 evresine geçer ve hata düzeltilmeye çalışılır. Düzelirse hücre bölünmeye devam eder. Ama düzelmezse hücre apoptoza gider. Hücre kontrol noktalarının üç fonksiyonu vardır:

i) DNA replikasyonu sırasında DNA hasar gördüğünde bu hasarı algılayan mekanizma

ii) Hasarı algılayan mekanizma ile düzeltme mekanizması arasındaki sinyal yolağı

iii) Hasar giderilinceye kadar hücreyi G0'da tutan mekanizmalar

G1/S kontrol noktası DNA hasarını bulma mekanizmasıdır. G1 evresinin başında hasar gören hücreler G1 evresinde durur. Eğer G1 evresinin ilerleyen aşamasında hasar olursa S evresine geçer. Ama DNA eşleşmesini kontrol noktasında durur. Diğer evrelerde de kontrol noktalarından geçer ve hasar olmayan hücrelerin bölünmesi sağlanır. Restriksiyon noktası hücrenin G1 evresinin sonunda olan kontrol noktasıdır. Hücre için gerekli sinyallerin alınmasından sonra hücrenin G1 evresinden S evresine geçişini sağlayan restriksiyon noktasıdır [126].

6. MATERYAL VE YÖNTEMLER

6.1. Materyaller

6.1.1. Kimyasallar

Hücre canlılık testi için kullanılan MTS, Etanol (Ensure), Hepes (Fisher Chemicals), Sodyum Klorur (NaCI, Fisher Chemicals), Kalsiyum Klorur ($CaCI_2$), FITC AnnexinV Apoptosis Kit I (BD Pharmingen), Triton X-100 (Fisher Chemicals), Propidium Iodide (BD Pharmingen), Resveratrol (Sigma-Aldrich).

6.1.2. Hücre Kültürü Malzemeleri

Hücre besiyeri için RPMI-1640 (GIBCO), % 10 fetal dana serumu (FBS, GIBCO), Penisilin/Streptomisin (GIBCO), 1X Fosfat tamponlu tuz solusyonu (PBS), Tripsin-EDTA, Dondurma ortamı için kullanılan DMSO (Sigma, D5879).

6.1.3. Hücre Hattı

Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Onkoloji laboratuvarı hücre stoklarında bulunan hepatosellüler karsinoma hücre hattı SNU398'in SIP1 ifadesi shRNA ile susturulmuş (Lot2) ve susturulmamış (NSC) hücre klonlarıyla çalışılmıştır.

6.1.4. Çözeltiler

- Hücre kültürü çözeltileri

  Dondurma ortamı hazırlamak için % 10 DMSO, % 90 FBS kullanılmıştır.

- 1X Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (PBS)

  10X PBS, steril distile su ile %10 seyreltilmiştir. 1X PBS $+4^{o}$ C saklanmıştır.

- TritonX-100

Triton X-100 stok çözeltisi 1X PBS içinde % 0.1'e seyreltilmiştir.

- 10X Binding Buffer (Akım sitometri)

0.1 M Hepes (pH 7,4), 1.4 M NaCI ve 25 mM $CaCI_2$ ile hazırlanmıştır. +4° C saklanmıştır.

- 1X Binding Buffer (Akım sitometri)

10X Binding Buffer steril distile su ile % 10 seyreltilmiştir.

- Etanol (%70'lik)

% 99'luk stoktan alınan 70 ml etanole 30 ml steril distile su eklenmiştir. -20^{0}C'de saklanmıştır.

- Dondurma Ortamı

% 90 serum (FBS) ve % 10 DMSO ile hazırlanmış ve +4^0 C'de saklanmıştır.

6.1.5. Cihazlar

CO_2 inkübatörü (Scancell), +4^{0}C buzdolabı (Ariston), -20^{0}C derin dondurucu (Ariston), -80^{0}C derin dondurucu (Thermo, Forma -86^{0}C ULT Freezer), Buz makinası (BAR-LİNE BF85), Laminar Akım Kabini (Labconco, Logic), otoklav (Hirayamai, Hiclave HVE-50), Su Banyosu (WiseBath, Wisd.23), Santrafüj (Nüve), Soğutmalı Santrafüj (Scanspeed 1580R), Vortex (DragonLabs), MX-S ışık mikroskobu (Nikon ELWD0,310d75), 2-1000 µl mikropipetör ve uçları (Dragonmedi, Gilson), Elisa Reader (Thermo Scientific), Akım sitometri cıhazı (BD Accur C6), Pipet Tabancası (Therno S1), Elisa plakları (TPP,92096, Startedt), Kültür kapları (Corning), Thoma lamı (Hejnz Herens Hamburg), Ependorf tüpleri (Axygen), Etüv (Drylife,VWR).

6.2.Yöntemler

6.2.1 Donmuş Hücrelerin Çözünmesi

Belirli zaman aralıkları ile tekrar kullanılabilmek için dondurulan hücreler -80^{0}C'den veya azot tankından alınıp DMSO'nun hücreye toksik etkisi olmaması için buz üzerinde erimesi sağlandı. RPMI besiyerinin 37^{0}C'e gelmesi beklendi ve eriyen hücrelerin üzerine 1ml kadar RPMI konulduktan sonra karıştırıldı. DMSO, RPMI ve hücre karışımı kryotüpten falkona alındı. Falkona alındıktan sonra üzerine 5 ml daha RPMI eklendi ve 15000 rpm'de 5 dakkika santrafüj edildi. Santrafüjden sonra pelete zarar vermeden süpernatant alındı ve peletin üzerine besiyeri eklendi. Hücrelerin besiyeri içinde çözünmesi sağlandı. Hücreler çözündükten sonra petriye alındı ve CO_2 inkübatörüne konuldu.

6.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

SNU398 hücreleri cam ya da plastik yüzeye yapışarak büyüyen ölümsüz kanser hücreleridir. Hücreler belirli bir zaman sonra petriyi kapladıkları için pasajlama yapmak gerekir. Petriye yapışan hücrelerin birbirlerinden ve yüzeyden ayrılmaları tripsin, kollajenaz gibi enzimler aracılığıyla sağlanır. CO_2 inkübatöründe olan hücrelerin üzerindeki besiyeri alındı ve 3 ml PBS eklenip PBS'in hücrenin her yerine ulaşması sağlandı. PBS hücrelerin üzerinden alınıp 1 ml Tripsin-EDTA eklendi ve 2 dakika CO_2 inkübatöründe bekletilen hücreler kalktıktan sonra 9 ml besiyeri (RPMI) ile karıştırılıp petriye konuldu. Işık mikroskobunda bakıldıktan sonra tekrar CO_2 inkübatörüne konuldu.

6.2.3. Hücrelerin Dondurulması

DMSO'nun toksitesinin azalması için hücrelerin üzerine direkt konulmamalıdır. Bu nedenle dondurma ortamı hazırlandı (% 90 FBS ve % 10 DMSO). CO_2 inkübatöründe olan hücrelerin üzerindeki besiyeri alındı ve 3 ml PBS eklenip PBS'in hücrenin her yerine ulaşması sağlandı. PBS hücrelerin üzerinden alınıp 1 ml Tripsin-EDTA eklendi ve 2 dakika CO_2 inkübatöründe bekletilen hücreler

kalktıktan sonra üzerine 6 ml besiyeri eklenip 15000 rpm'de 5 dakika santrafüj yapıldı. Süpernatant alındı ve peletin üzerine dondurma ortamı eklendi. Pipetlenerek karışması sağlandıktan sonra kryotüpe alındı; hemen eşit şekilde donması ve hücrelerin zarar görmemesi için -80^{0}C'de derin dondurucuya konuldu. Daha sonra azot tankının sıvı kısmına konuldu.

6.2.4. Hücrelerin Sayılması

Hücre proliferasyon deneyi, akım sitometrisi ve diğer çalışmalar için belirli sayıda hücre ekimi gereklidir. Toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için, üzeri 4 adet 16 küçük kare içeren bölgeden oluşan 1mm^2'lik alan ve 0,1 mm derinliğe sahip Thoma lamı kullanılır. CO_2 inkübatöründen alınan hücrelerin durumu ışık mikroskobunda incelendi. Besiyeri alınarak PBS ile yıkanıp PBS uzaklaştırıldı. Üzerine 1 ml Tripsin-EDTA eklendi. CO_2 inkübatöründe 2 dakika beklendikten sonra üzerine 5 ml besiyeri eklendi ve falkona alınan hücrelerden 500 µl alınıp eppendorf tüplerine konuldu. Thoma alkolle silindikten sonra lamel ile thomanın arasına 10 µl olacak şekilde hem üst bölüme hem de alt bölüme konuldu. Sonrada mikroskopta sayımı yapıldı.

6.3. Resveratrolün Uygulanması

Deneylerde ticari olarak satın alınan resveratrol uygulanmıştır. Hücre proliferasyonu için 24. ve 48. saatlerde inkübasyon sürelerinin ardından sitotoksik etkiyi belirlemek üzere MTS eklendi ve iki saat sonra analiz edildi.

- 1.Gün

Hücre pasajlanmasında ve hücre sayımında anlatılan çalışmalar yapıldı. Hücreler 96'lık platede her bir kuyuya 5x10^3 hücre/100 µl olacak şekilde ekim yapıldı.

- 2.Gün

Hücreler lag fazına geldiğinde CO_2 inkübatöründen alınan hücrelerin üzerindeki besiyeri alındı ve her bir kuyuda % 0.2 etanol olacak şekilde resveratrol

50, 100, 150, 200 µM konsantrasyonlarında besiyeri ile birlikte ekildi. Yalnız besiyerinin olduğu kontrol grubu ve etanolün sitotoksitesinin belirlenmesi için etanol ve besiyeri içeren kontrol grubu oluşturuldu.

- 3. ve 4. Gün

Hücrelerin üzerine 24. ve 48. saat inkübasyondan sonra MTS eklendi ve iki saat sonra analiz edildi.

6.4. Akım Sitometri Apoptoz Analizi

Anneksin V, yapısal ve işlevsel olarak benzer özellikleri paylaşan ve fosfolipid-bağlayan anneksin ailesinin bir üyesidir. Apoptoz hücrelerde, hücre membranının iç kısmında bulunan negatif yüklü fosfolipidlerin yani fosfatidilserin (PS)'nin dış membrana geçmesine neden olur. Hücre membranı dışına çıkınca PS Annexin V'e bağlanır. Işığa maruz kalınca akım sitometride ışıma yapar. Dot plot analizlerinde X ekseni Anneksin V-FITC'nin, y ekseni ise PI'nın yaydığı floresanı göstermektedir. Sadece PI ile boyanan hücreler dot plotlarda sol üst bölgesinde yer alıp, apoptotik olmayan hücre oranını belirtmektedir. Sağ üst bölgesindeki hücreler, hem Anneksin V hem de PI ile boyanan hücreler olup, geç apoptotik hücre oranını göstermektedir. Membran yapısı bozulmadığından dolayı hiçbir boya ile boyanmayan hücreler sol alt bölgesinde canlı hücre oranını ifade etmektedir. Sadece Anneksin V-FITC ile boyanan hücreler sağ alt bölgesinde yer almakta ve erken apoptozise uğrayan hücre oranını belirtmektedir.

- 1.Gün

Hücre pasajlanmasında ve hücre sayımında anlatılan çalışmalar yapıldı. Hücreler 6'lık platede her bir kuyuya 3 x 10^5 hücre/ 2000 µl olacak şekilde ekim yapıldı.

- 2.Gün

Lag fazına geldiğinde inkübasyondan alınan hücrelerin üzerindeki besiyeri alındı. Hücre proliferasyon deneyinde etkili doz olan 150 µM konsantrasyonundaki resveratrol her bir kuyuda % 0.2 etanol olacak şekilde ve besiyeri ile birlikte eklendi.

- 3.ve 4. Gün

Hücrelerin üzerindeki besiyeri alındı PBS ile yıkandı. Üzerine Tripsin-EDTA eklendi. Hücreler birbirinden ayrıldıktan sonra besiyeri eklendi ve akım sitometri tüplerine alındı. 7 dakika 2500 rpm'de +4^0C santrifüj edildi. Süpernatant döküldü. Hücrelerin üzerine soğuk PBS eklendi. Tekrar 7 dakika 2500 rpm +4^0C santrifüj edildi. Süpernatant döküldü. 1X Binding buffer ile sullandırıldı. 100 µl'lik karışım 5 ml'lik tüplere alındı. Kontrol grupları yapıldı. (Boyasız,+Annexin ve –PI, -Annexin ve +PI), 5 µl Annexin V ve PI tüplere eklendi. Hücreler vortexlendi. Karanlıkta oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 400 µl 1X Binding Buffer eklendi ve 1 saat içinde akım sitometri ile analiz edildi.

6.5. Akım Sitometri Hücre Döngüsü Analizi

- 1. ve 2.Gün

Akım sitometri apoptoz analizinde 1. ve 2. günü yapılan çalışmaların aynısı yapılmıştır.

- 3. ve 4. Gün

Hücrelerin üzerindeki besiyeri alındı. PBS ile yıkandı. Üzerine Tripsin-EDTA eklendi. Hücreler birbirinden ayrıldıktan sonra besiyeri eklendi ve akım sitometri tüplerine alındı. 7 dakika 2500 rpm'de +4^0C santrafüj edildi. Süpernatant döküldü. Boyasız gruplar için hücreler ayrıldı. Herbir tüpe 200 µl PBS eklendi ve pelletin çözünmesi sağlandı üzerine buzda bekleyen (önce -20^0C sonra buz) % 70 etanol eklendi. Vortexlenerek çözünmesi sağlandı. Buzda bir saat inkübe edildi. 2500 rpm'de 5 dakika +4^0C santrifüj edildi. 3'er ml PBS eklenip tekrar 2500 rpm'de 5 dakika +4^0C santrifüj edildi. Pelletin üzerine 1ml PI solusyonu eklendi. 1 saat 37°C inkübasyona bırakıldı ve sonra santrifüj ile boya uzaklaştırıldı. 500 µl PBS eklendi ve akım sitometri ile analiz edildi.

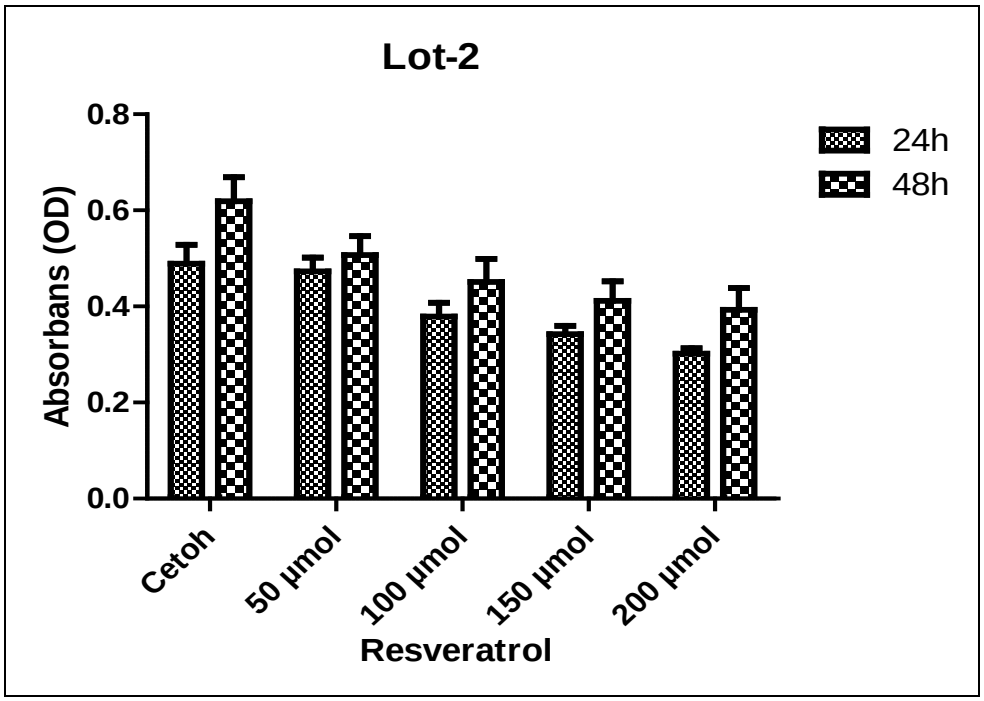
7.BULGULAR

Bu bölümde, resveratrol çeşitli konsantrasyonlarda (50, 100, 150, 200 µM) lentiviral shRNA transdüksiyonu metoduyla SIP1 ifadesi baskılanmış hepatoselüler karsinoma hücre hattına (SNU398 (Lot-2)) ve SIP1 ifadesi baskılanmamış karsinoma hücre hattına (SNU398 (Nsc)) uygulanarak hücre canlılığına etkisi, apoptoz-nekroz analizi ve hücre siklusu dağılımı ile ilgili elde edilen sonuçlar ve SIP1'in hücrelerin resveratrole olan yanıtına etkisi gösterilmektedir.

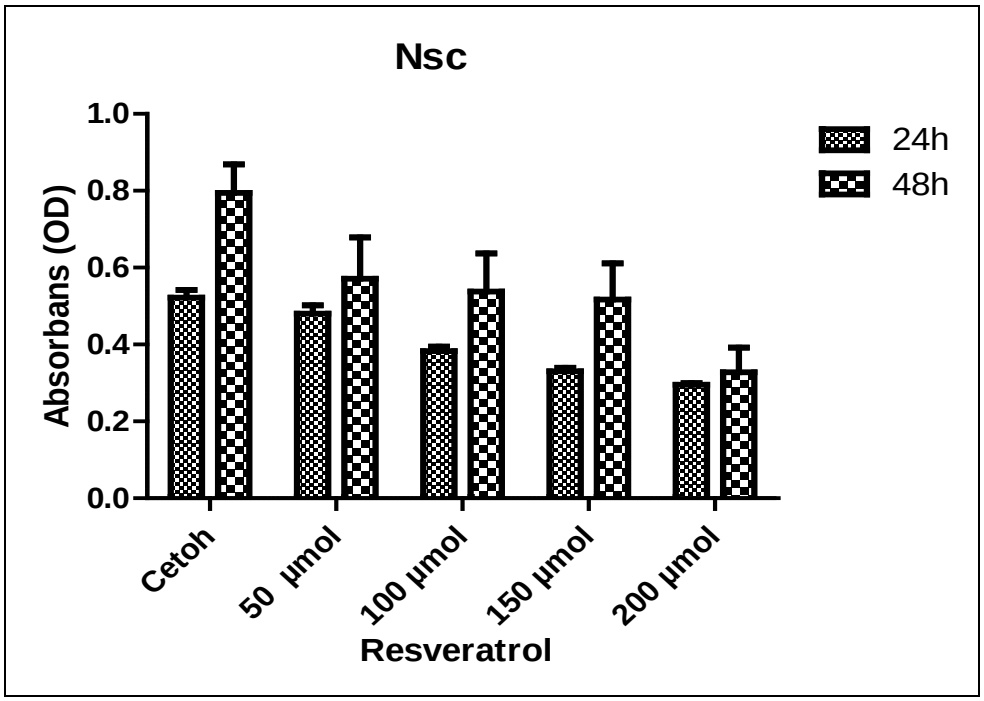
7.1. Resveratrol Uygulamasının Hücre Proliferasyonuna ve Hücre Canlılığına Etkisi

Tez çalışmasında resveratrol uygulamasına ait deneysel verilerin istatistiksel analizi 'Çift Yönlü Anova (Two way anova)' karşılaştırma testi kullanılarak yapılmıştır. Bu anova testleri içinde GraphPad Prism programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizlerde güvenilirlik derecesi $p \leq 0.05$ olarak belirlenmiştir.

Şekil 7.1 ve Şekil 7.2 de görüldüğü gibi 50, 100, 150 ve 200 µM dozlarda resveratrol SIP1'i baskılanmamış (NSC) ve SIP1'i baskılanmış (Lot-2) SNU398 hücrelerine uygulanmıştır. 24 saat ve 48 saat inkübasyon sonrası absorbans değerleri grupların içerisinde değerlendirildiğinde hem SIP1'i baskılanmış hem de SIP1'i baskılanmamış hücrelerde 50 µM dışındaki dozlarda anlamlı bir azalma görülmektedir (24 saat için: p_{Lot2}= 0,0105 p_{NSC}< 0,0001; 48 saat için: p_{Lot2}< 0,0001 p_{NSC}< 0,0001).

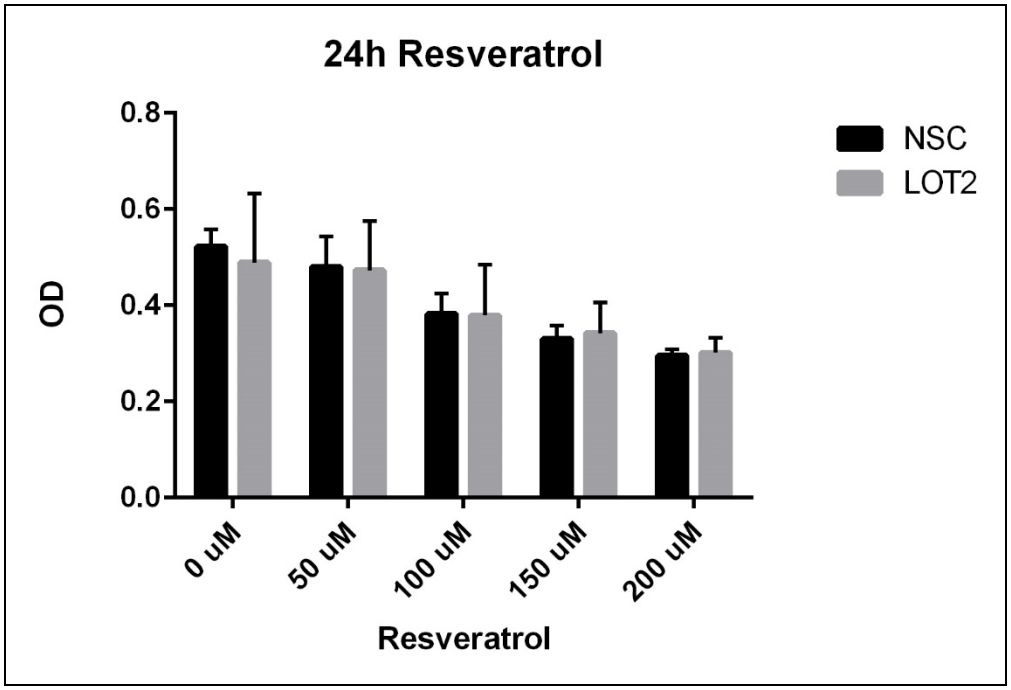


Şekil 7.1: SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinin resveratrole yanıtı.

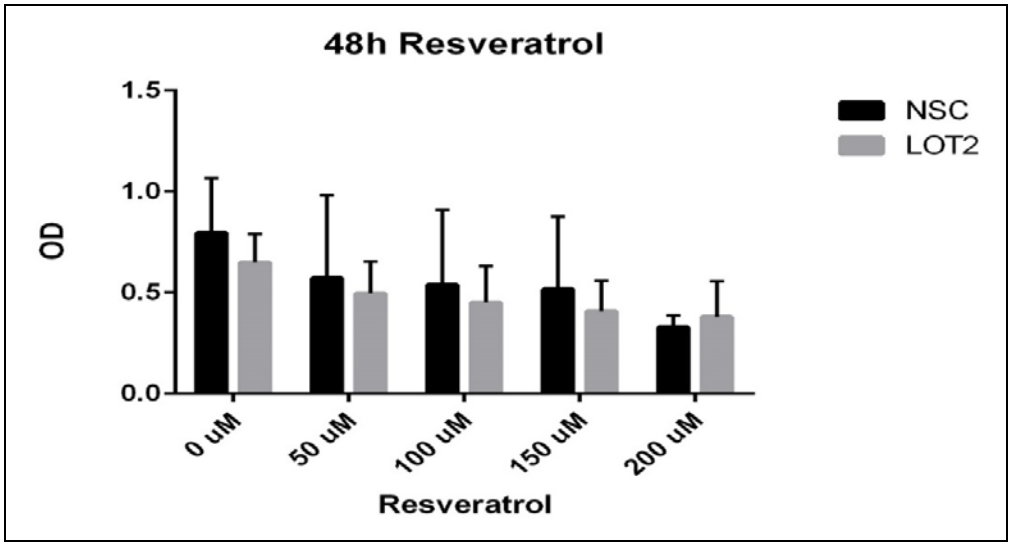


Şekil 7.2: SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerinin resveratrole yanıtı.

Ancak Şekil 7.3 ve Şekil 7.4 de görüldüğü üzere 50, 100, 150 ve 200 µM dozlarda resveratrolün etkisi SIP1'i baskılanmamış ve SIP1'i baskılanmış SNU398 hücre grupları arasında karşılaştırıldığında ise anlamlı bir azalma görülmemektedir.



Şekil 7.3: SIP1'i baskılanmamış ve baskılanmış SNU398 hücrelerinin 24. saatte resveratrole yanıtı.

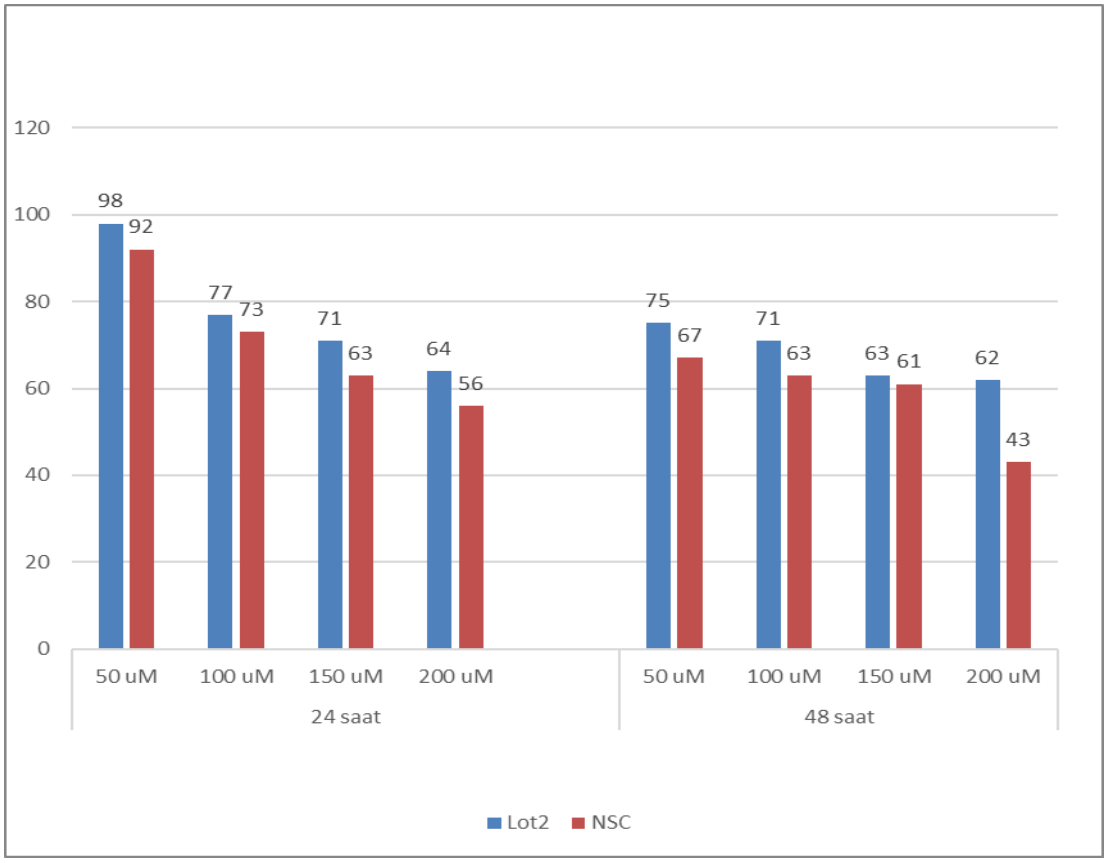


Şekil 7.4: SIP1'i baskılanmamış ve baskılanmış SNU398 hücrelerinin 48. saatte resveratrole yanıtı.

Şekil 7.5' de SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinde (Lot-2) resveratrol uygulandıktan 24 saat inkübasyondan sonra 50 µM konsantrasyonda canlılık oranı % 98 iken 100 µM konsantrasyonda canlılık oranı % 77, 150 µM konsantrasyonda canlılık oranı % 71 ve 200 µM konsantrasyonda canlılık oranı % 64'dür. Resveratrol

uygulandıktan 48 saat inkübasyondan sonra 50 µM konsantrasyonda canlılık oranı % 75, 100 µM konsantrasyonda canlılık oranı % 71, 150 µM konsantrasyonda canlılık oranı % 63, 200 µM konsantrasyonda canlılık oranı % 62'dir.

SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerinde (Nsc) resveratrol uygulandıktan 24 saat inkübasyondan sonra 50 µM konsantrasyonda canlılık oranı % 92, 100 µM konsantrasyonda canlılık oranı % 73, 150 µM konsantrasyonda canlılık oranı % 63, 200 µM konsantrasyonda canlılık oranı % 56'dır. Resveratrol uygulandıktan 48 saat inkübasyondan sonra 50 µM konsantrasyonda canlılık oranı % 67, 100 µM konsantrasyonda canlılık oranı % 63, 150 µM konsantrasyonda canlılık oranı % 61, 200 µM konsantrasyonda canlılık oranı % 43'tür.



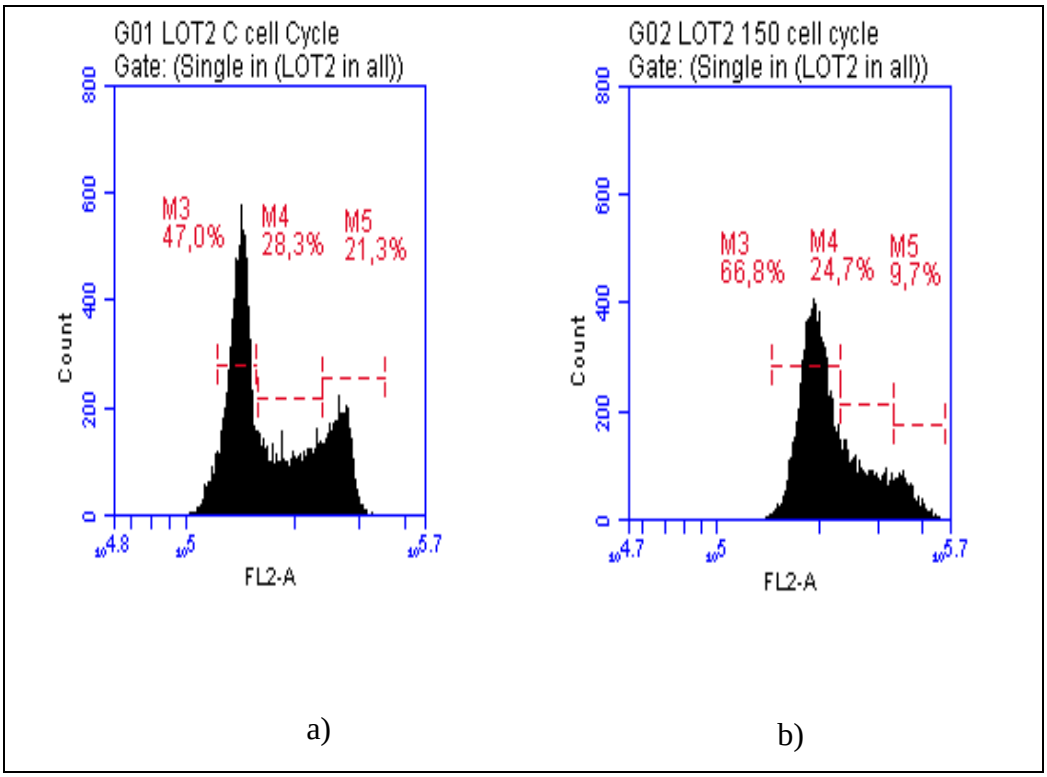
Şekil 7.5: SIP1'i baskılanmamış ve baskılanmış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulandıktan 24 ve 48 saat sonra hücre canlılık grafiği.

Tablo 7.1: Resveratrol uygulamasının ardından hücre canlılık yüzdeleri.

Yüzde ortalama	Lot2-24h	Lot2-48h	Nsc-24h	Nsc-48h
50 µmol	98,22392	75,74441	92,12437	67,19397
100 µmol	77,92037	71,07363	73,3437	63,9915
150 µmol	71,53615	63,89729	63,44363	61,04333
200 µmol	64,81176	62,65732	56,86367	42,99521

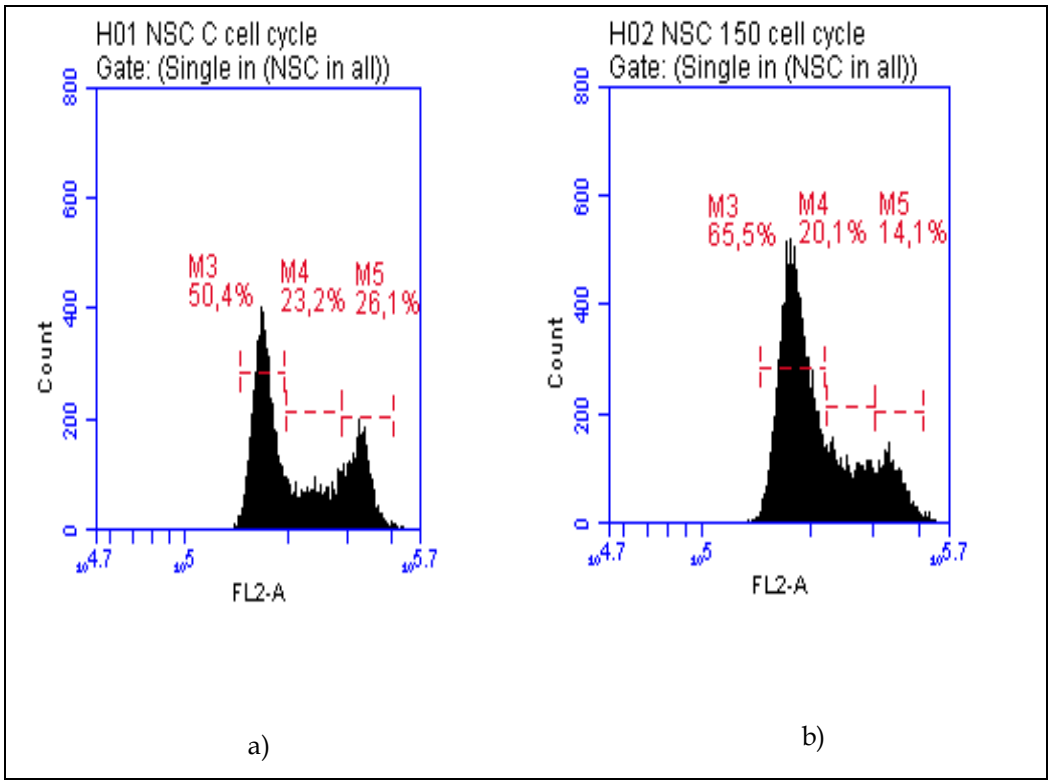
7.2. Resveratrol Uygulamasından Sonra Hücre Döngüsü Analizi

Resveratrolün hücreyi hangi fazda öldürdüğünü anlamak için hücre döngüsü analizi yapıldı. Şekil 7.6.a ve b'de görüldüğü gibi SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinin resveratrol ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda, resveratrol uygulanmayan hücre grubunun G1 fazında hücre oranı % 47, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra G1 fazında hücre oranı % 66.8, resveratrol uygulanmayan hücre grubunun S fazında hücre oranı % 28.3, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan sonra S fazındaki hücre oranı % 24.7, resveratrol uygulanmayan hücre grubunun G2/M fazında hücre oranı % 21.3, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan sonra G2/M fazındaki hücre oranı % 9.7'dir.



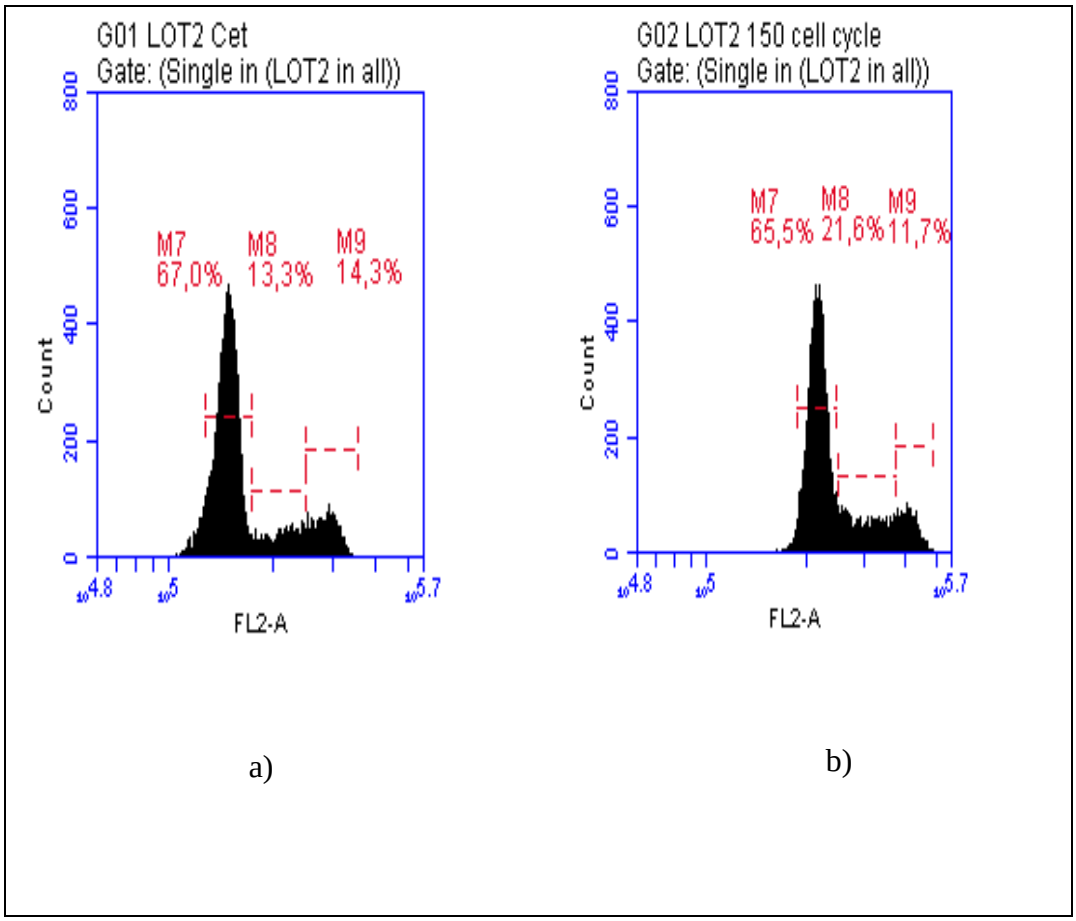
Şekil 7.6: a) SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadan (kontrol grubu) 24 saat sonra hücre döngüsü analizi b) Resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra hücre döngüsü analizi.

Şekil 7.7.a ve b'de görüldüğü gibi SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerinin resveratrol ile 24 saatlik inkübasyon sonucu resveratrol uygulanmayan hücre grubunun G1 fazında hücre oranı % 50.4, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra G1 fazında hücre oranı % 65.5, resveratrol uygulanmayan hücre grubunun S fazında hücre oranı % 23.2, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan sonra S fazındaki hücre oranı % 20.1, resveratrol uygulanmayan hücre grubunun G2/M fazında hücre oranı % 26.1, 150 µM konsantrasyonlarda resveratrol uygulandıktan sonra G2/M fazındaki hücre oranı % 14.1'dir.



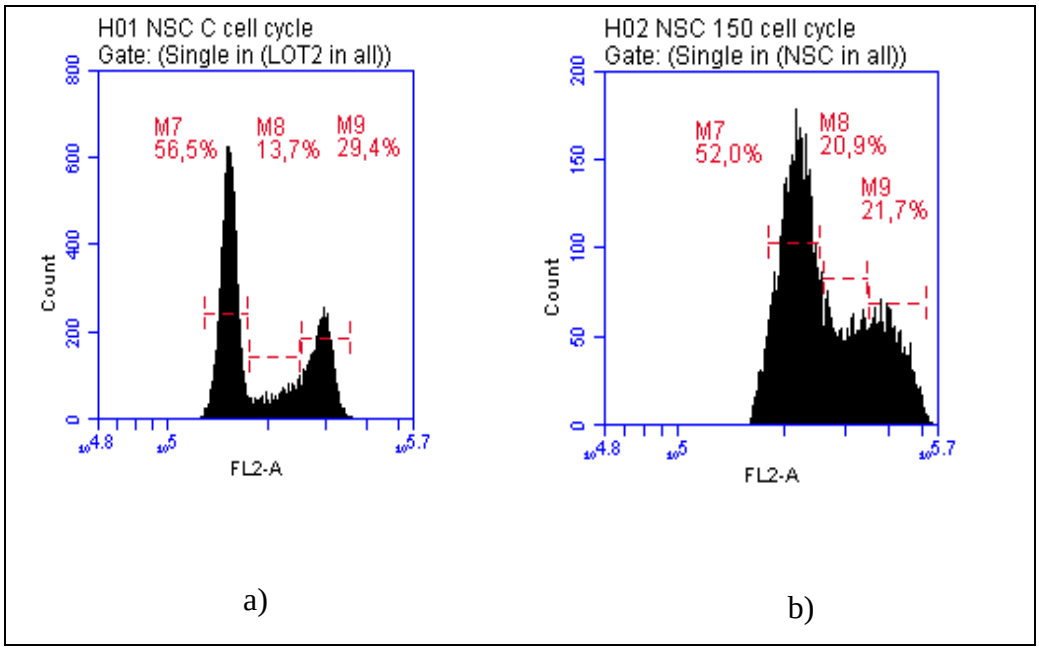
Şekil 7.7: a) SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadan (kontrol grubu) 24 saat sonra hücre döngüsü analizi b) Resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra hücre döngüsü analizi.

Şekil 7.8.a ve b'de görüldüğü gibi SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinin resveratrol ile 48 saatlik inkübasyon sonucu resveratrol uygulanmayan hücre grubunun G1 fazında hücre oranı % 67.0, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 48 saat sonra G1 fazında hücre oranı % 65.5, resveratrol uygulanmayan hücre grubunun S fazında hücre oranı % 13.3, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan sonra S fazındaki hücre oranı % 21.6, resveratrol uygulanmayan hücre grubunun G2/M fazında hücre oranı % 14.3, 150 µM konsantrasyonlarda resveratrol uygulandıktan sonra G2/M fazındaki hücre oranı % 11.7'dir.



Şekil 7.8: a) SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadan (kontrol grubu) 48 saat sonra hücre döngüsü analizi b) Resveratrol uygulandıktan 48 saat sonra hücre döngüsü analizi.

Şekil 7.9.a ve b'de görüldüğü gibi SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerinin resveratrol ile 48 saatlik inkübasyonu sonucu, resveratrol uygulanmayan hücre grubunun G1 fazında hücre oranı % 56.5, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 48 saat sonra G1 fazında hücre oranı % 52.0, resveratrol uygulanmayan hücre grubunun S fazında hücre oranı % 13.7, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 48 saat sonra S fazındaki hücre oranı % 20.9, resveratrol uygulanmayan hücre grubunun G2/M fazında hücre oranı % 29.4, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan sonra G2/M fazındaki hücre oranı % 21.7'dir.



Şekil 7.9: a) SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadan (kontrol grubu) 48 saat sonra hücre döngüsü analizi b) Resveratrol uygulandıktan 48 saat sonra hücre döngüsü analizi.

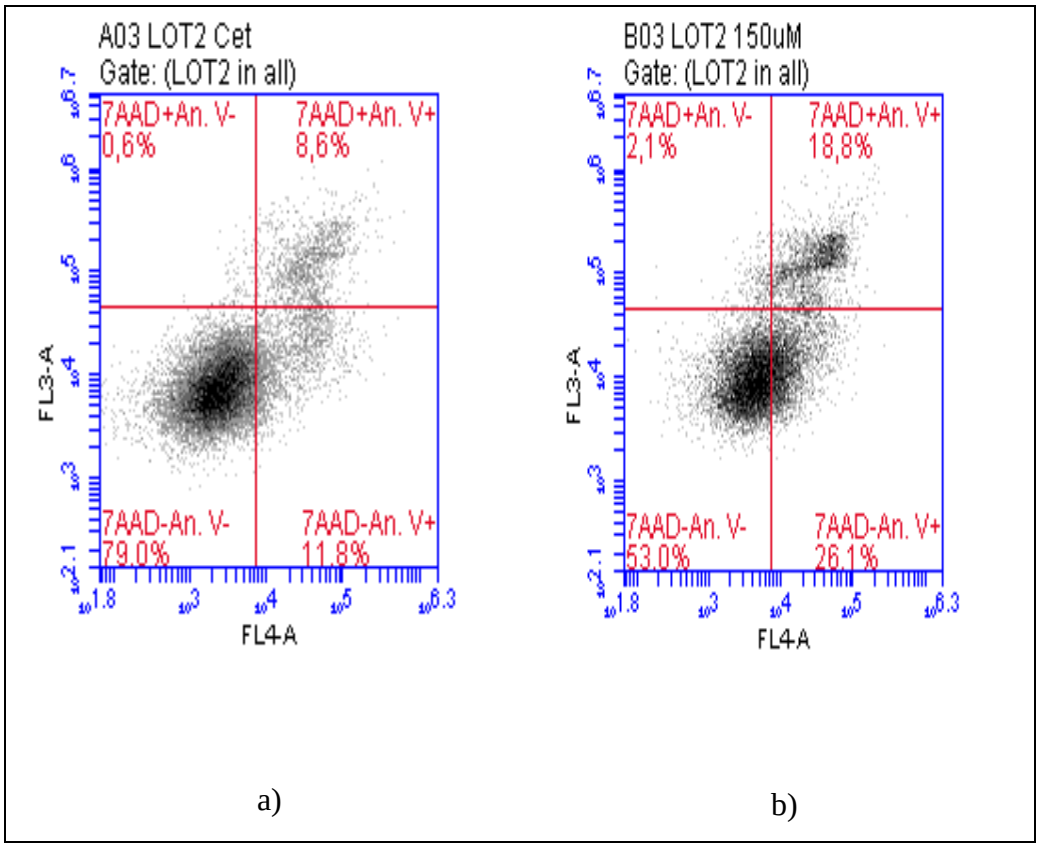
Tablo 7.2: 24 ve 48 saat resveratrol uygulaması sonrası hücre döngüsü analizi.

24h	G1	S	G2/M
Nsc-Control	50.4	23.2	26.1
Nsc-150 µM	65.5	20.1	14.1
Lot-2-Control	47	28.3	21.3
Lot-2-150 µM	66.8	24.7	9.7
48h	G1	S	G2/M
Nsc-Control	56.5	13.7	29.4
Nsc-150 µM	52	20.9	21.7
Lot-2-Control	67	13.3	14.3
Lot-2-150 µM	65.5	21.6	11.7

7.3. Resveratrol Uygulamasından Sonra Apoptoz Analizi

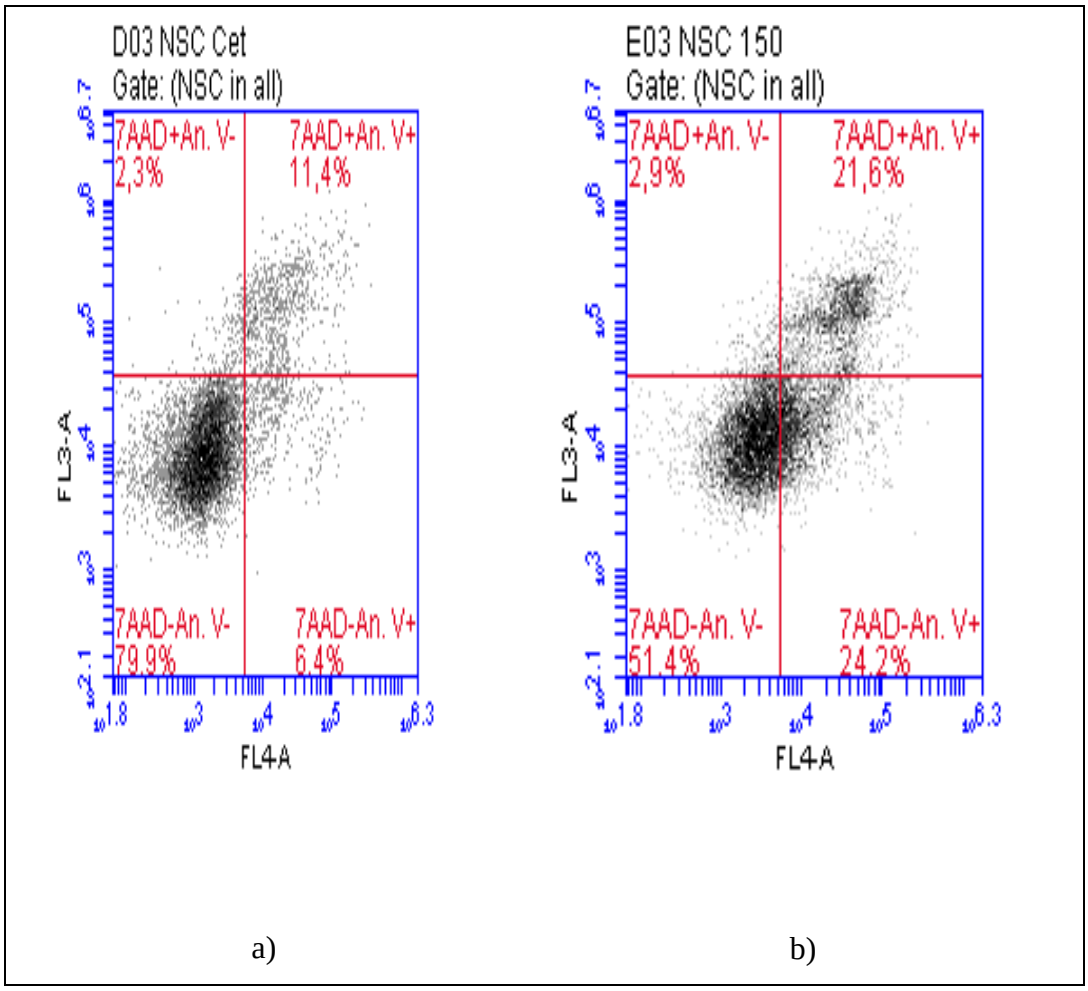
Resveratrol uygulamasına bağlı olarak erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre oranlarına bakılmıştır. Dot plot analizlerinde X ekseni Anneksin V-FITC'nin, y ekseni ise PI'nın yaydığı floresanı göstermektedir. Sadece PI ile boyanan hücreler dot plotlarda sol üst bölgede yer alıp, apoptotik olmayan hücre oranını belirtmektedir. Sağ üst bölgedeki hücreler, hem Anneksin V hem de PI ile boyanan hücreler olup, geç apoptotik hücre oranını göstermektedir. Membran yapısı bozulmadığından dolayı hiçbir boya ile boyanmayan hücreler sol alt bölgede canlı hücre oranını ifade etmektedir. Sadece Anneksin V ile boyanan hücreler sağ alt bölgede yer almakta ve erken apoptoza uğrayan hücre oranını belirtmektedir.

Şekil 7.10.a ve b'de görüldüğü gibi, SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinin resveratrol ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda, resveratrol uygulanmayan hücre grubunda apoptotik olmayan hücre oranı % 0.6, geç apoptotik hücre oranı % 8.6, canlı hücre oranı % 79 ve erken apoptoza uğrayan hücre oranı % 11.8'dir. SIP1'i baskılamış SNU398 hücrelerine 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra apoptotik olmayan hücre oranı % 2.1, geç apoptotik hücre oranı % 18.8, canlı hücre oranı % 53 ve erken apoptoza uğrayan hücre oranı % 26.1'dir.



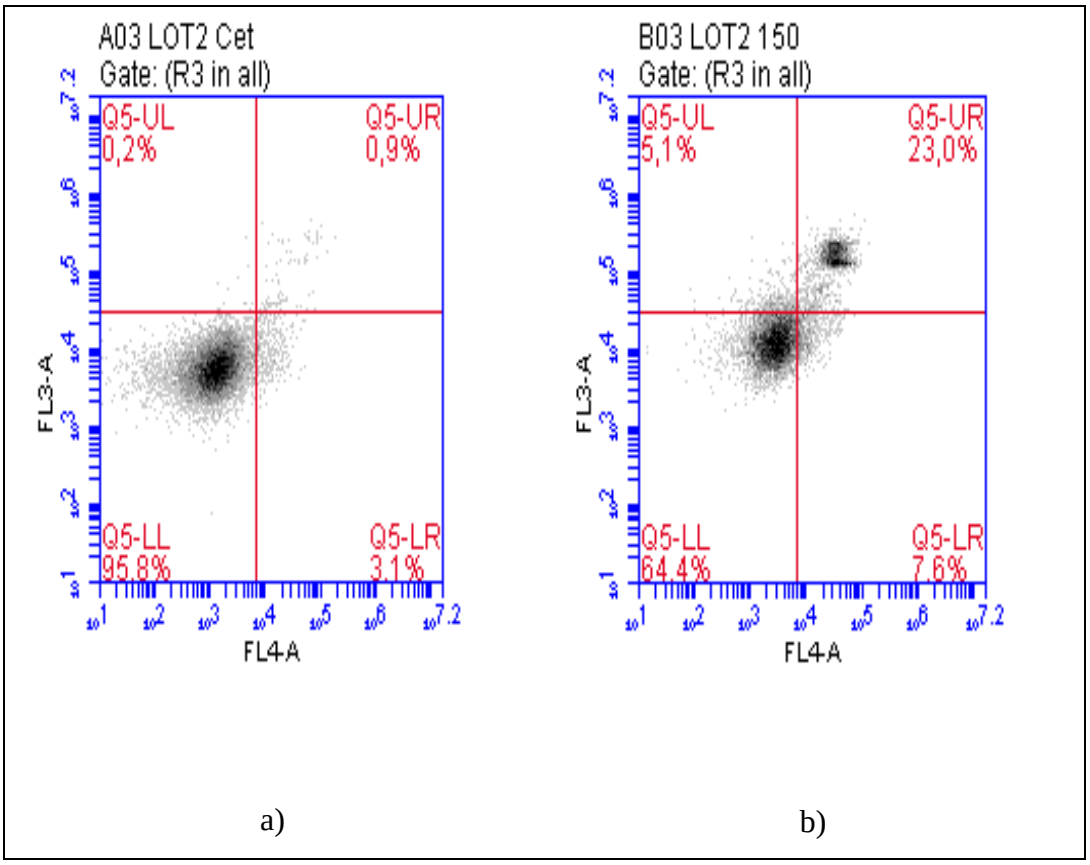
Şekil 7.10: a) SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadan (kontrol grubu) 24 saat sonra apoptoz analizi b) Resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra apoptoz analizi.

Şekil 7.11.a ve b' de görüldüğü gibi, SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerinin resveratrol ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda, resveratrol uygulanmayan hücre grubunda apoptotik olmayan hücre oranı % 2.3, geç apoptotik hücre oranı % 11.4, canlı hücre oranı % 79.9 ve erken apoptoza uğrayan hücre oranı % 6.4'dir. SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerine 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra apoptotik olmayan hücre oranını % 2.9, geç apoptotik hücre oranı % 21.6, canlı hücre oranı % 51.4 ve erken apoptoza uğrayan hücre oranı % 24.2'dir.



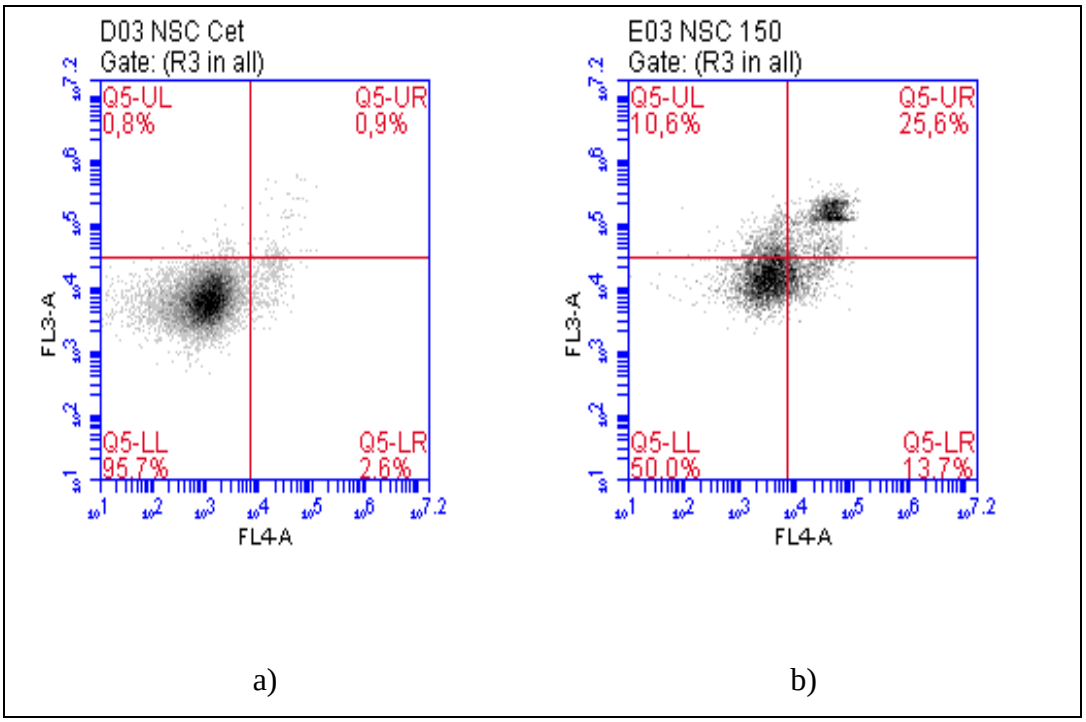
Şekil 7.11: a) SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadan (kontrol grubu) 24 saat sonra apoptoz analizi b) Resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra apoptoz analizi.

Şekil 7.12.a ve b'de görüldüğü gibi SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinin resveratrol ile 48 saatlik inkübasyonu sonucunda, resveratrol uygulanmayan hücre grubunda apoptotik olmayan hücre oranı % 0.2, geç apoptotik hücre oranı % 0.9, canlı hücre oranı % 95.8 ve erken apoptoza uğrayan hücre oranı % 3.1'dir. SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerine 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 48 saat sonra apoptotik olmayan hücre oranı % 5.1, geç apoptotik hücre oranı % 23, canlı hücre oranı % 64.4 ve erken apoptoza uğrayan hücre oranı % 7.6'dir.



Şekil 7.12: a) SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadan (kontrol grubu) 48 saat sonra apoptoz analizi b) Resveratrol uygulandıktan 48 saat sonra apoptoz analizi.

Şekil 7.13.a ve b' de görüldüğü gibi, SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerinin resveratrol ile 48 saatlik inkübasyon sonucunda, resveratrol uygulanmayan hücre grubunda apoptotik olmayan hücre oranı % 0.8, geç apoptotik hücre oranı % 0.9, canlı hücre oranı % 95.7 ve erken apoptoza uğrayan hücre oranı % 2.6'dir. SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerine 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 48 saat sonra apoptotik olmayan hücre oranını % 10.6, geç apoptotik hücre oranı % 25.6, canlı hücre oranı % 50 ve erken apoptoza uğrayan hücre oranı % 13.7'dir.



Şekil 7.13: a) SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadan (kontrol grubu) 48 saat sonra apoptoz analizi b) Resveratrol uygulandıktan 48 saat sonra apoptoz analizi.

Tablo 7.3: 24 ve 48 saat resveratrol uygulamasının ardından apoptoz analizi.

24h	Canlı	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz	Nekroz
Nsc-Control	79.9	6.4	11.4	2.3
Nsc-150 µM	51.4	24.2	21.6	2.9
Lot-2-Control	79	11.8	8.6	0.6
Lot-2-150µM	53	26.1	18.8	2.1
48h	Canlı	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz	Nekroz
Nsc-Control	95.7	2.6	0.9	0.8
Nsc-150 µM	50	13.7	25.6	10.6
Lot-2-Control	95.8	3.1	0.9	0.2
Lot-2-150µM	64.4	7.6	23	5.1

8. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hepatosellüler karsinoma (HCC) dünyada en yaygın görülen ve aynı zamanda en öldürücü kanser türlerinden biridir [62]. Tez çalışmasında, SIP1'in resveratrol uygulanan hücrelerde proliferasyon, apoptoz, hücre döngüsünde duraksama gibi patofizyolojik davranışlarına olan etkisine bakılmıştır.

Hücre canlılığını belirleyen sitotoksite deneylerinin sonucuna göre, SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinde (Lot-2) 50 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra canlılık oranı % 98, 48 saat sonra % 75 cıvarındadır. SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerinde (Nsc) 50 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra canlılık oranı % 92, 48 saat sonra % 67 cıvarındadır. Wagner Anika E. ve arkadaşları Huh7 hücrelerine 50 µmol/l konsantrasyonda resveratrol uygulamışlar ve 24 saat sonra hücre canlılığını % 10 azaltığını ifade etmişlerdir [102]. Liao Pei-Chi ve arkadaşları Huh7 hücrelerine 10, 20, 40 ve 60 µg/mL (50 µM (11.4 µg/mL), 100 µM (22,8 µg/mL), 200 µM (45.6 µg/mL)) resveratrol uygulamışlar ve 10 µg/mL konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 48 saat sonra hücre ölümünü % 32.7 olarak ifade etmişlerdir [145]. Yu Hai Bo ve arkadaşları HepG2 hücrelerine 50 µM konsantrasyonda resveratrol uygulamışlar ve 24 saat sonra canlılık oranı % 83-98 olarak ifade etmişlerdir [146]. Ou Xıuyuan ve arkadaşları HepG2 hücrelerine 50 µM kansantrasyondaki resveratrol için 48 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığını % 70 olarak ifade etmişlerdir [147].

SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinde (Lot-2) 100 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra canlılık oranı % 77, 48 saat sonra ise % 71 cıvarındadır. SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerinde (Nsc) resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra 100 µM konsantrasyonda canlılık oranı % 73, 48 saat sonra % 63 cıvarındadır. Yeh Chao-Bin ve arkadaşları Huh7 hücrelerine 50 µM kansantrasyonda resveratrol uyguladıktan 24 saat sonra canlılık oranını % 95-99, 48 saat sonra % 95-98 arasında, 100 µM konsantrasyonda 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra canlılık oranını % 90-100 arasında ve 200 µM konsantrasyon için 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra % 40-60 arasında bulmuşlardır [148]. Weng Chıa-Juı ve arkadaşları HepG2 hücrelerine 100 µM konsantrasyonda resveratrol uyguladıktan 24 saat inkübasyondan sonra canlılık oranını % 81-90, 48 saat inkübasyondan sonra % 55-60 olarak bulmuşlardır [149].

SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinde (Lot-2) 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra canlılık oranı % 71, 48 saat sonra % 63, SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerinde (Nsc) ise 24. saatte canlılık oranı % 63, 48. saatte % 61 cıvarındadır. Çalışmamız ile uyumlu bir şekilde; Du Qin ve arkadaşları Hepa1-6 hücrelerine 160 µM konsantrasyonda resveratrol uyguladıklarında canlılık oranını 24 saatte % 40-59, 48 saat inkübasyondan sonra % 32-50 arasında bulmuşlardır [150]. Coı Hee Young ve arkadaşları SK-HEP-1 hücrelerine 150 µM konsantrasyonda resveratrol uyguladıktan 24 ve 48 saat sonra canlılık oranını % 66 olarak ifade etmişlerdir [151].

SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerine (Lot-2) 200 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra canlılık oranı % 64, 48 saat sonra % 62 cıvarındadır. SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerine (Nsc) 200 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra canlılık oranı % 56, 48 saat sonra % 43 cıvarındadır. Coı Hee Young ve arkadaşları SK-HEP-1 hücrelerine 200 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 24 ve 48 saat sonra canlılık oranını % 48 olarak ifade etmişlerdir [151]. Ling Yang ve arkadaşları; HepG2 hücrelerine 200 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra canlılık oranının % 51.45 cıvarında olduğunu belirtmişlerdir [152]. Tameda Masahiko ve arkadaşları HepG2 hücrelerine resveratrol uyguladıktan 48 saat sonra canlılık oranını % 35 olarak belirtmişlerdir [153]. Parek ve arkadaşları hepatosellüler karsinoma hücrelerinden HepG2 ve Chang'e 200-225 µM konsantrasyonda resveratrol uygulamış ve 24 saat inkübasyondan sonra büyümelerinin % 55-60 oranında inhibe olduğunu bulmuştur [154]. Sonuç olarak, farklı hepatosellüler hücre hatlarında resveratrolün proliferasyona etkisinin belirlendiği bu çalışmalar tez çalışmasındaki bulgularımızla uyumludur.

Resveratrolün SIP1 baskılanmış ve SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerine uygulamaları ayrı ayrı kendi içinde karşılaştırıldığında 50, 100 µM konsantrasyondaki hücrelerin 150 µM konsantrasyona göre daha canlı kaldığı görülmüştür. 150 µM konsantrasyonda 24 ve 48 saat inkübasyonda anlamlı bir azalma görülmektedir. Bu nedenle hücre döngüsü ve apoptoz deneylerinde resveratrol 150 µM konsantrasyonda uygulanmıştır.

Tez çalışmasında, akım sitometrisi kullanılarak resveratrol uygulanan hücrelerdeki hücre ölüm formları araştırılmıştır. SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinde resveratrol uygulanmayan hücre grubunda 24. saatte geç apoptotik

hücre oranı % 8.6, erken apoptoza uğrayan hücre oranı % 11.8, nekroza uğrayan hücre oranı % 0.6 ve canlı hücre oranı % 79'dır. 48 saat inkübasyon sonrasında ise resveratrol uygulanmayan hücre grubunda geç apoptotik hücre oranı % 0.9, erken apoptoza uğrayan hücre oranı % 3.1, nekroza uğrayan hücre oranı % 0.2 ve canlı hücre oranı % 95.8'dir. SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinde 24 saatlik 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulanması sonrasında geç apoptotik hücre oranı % 18.8, erken apoptoza uğrayan hücre oranı % 26.1, nekroza uğrayan hücre oranı % 2.1 ve canlı hücre oranı % 53'dür. SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinde 48 saatlik 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulanması sonrasında geç apoptotik hücre oranı % 23, erken apoptoza uğrayan hücre oranı % 7.6, nekroza uğrayan hücre oranı % 5.1 ve canlı hücre oranı % 64.4'dür. SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerinde resveratrol uygulanmayan hücre grubunda 24. saatte geç apoptotik hücre oranı % 11.4, erken apoptoza uğrayan hücre oranı % 6.4, nekroza uğrayan hücre oranı % 2.3 ve canlı hücre oranı % 79.9'dur. SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerinde resveratrol uygulanmayan hücre grubunda 48 saat sonunda geç apoptotik hücre oranı % 0.9, erken apoptozise uğrayan hücre oranı % 2.6, nekroza uğrayan hücre oranı % 0.8 ve canlık oranı % 95.7'dir. SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerinin 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulaması sonrasında 24. saatte geç apoptotik hücre oranı % 21.6, erken apoptozise uğrayan hücre oranı % 24.2, nekroza uğrayan hücre oranı % 2.9 ve canlı hücre oranı % 51.4'tür. 48 saatlik inkübasyon sonucu 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulanan hücre grubunda ise geç apoptotik hücre oranı % 25.6, erken apoptozise uğrayan hücre oranı % 13.7, nekroza uğrayan hücre oranı % 10.6 ve canlı hücre oranı % 50'dir. SIP1'i baskılanmış ve baskılanmamış hücrelerde 24 saat resveratrol uygulanmasından sonra erken-apoptotik hücreler, apoptotik hücreler ve nekrotik hücrelerde gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. 48 saat resveratrol uygulanması sonucunda SIP1'i baskılanmamış hücre grubunda erken-apoptotik hücreler ile nekrotik hücrelerde bir artış tespit edilmiştir.

SIP1'in resveratrol uygulanan hücrelerde hücre döngüsüne etkileri yine akım sitometrisi ile analiz edilmiştir. Resveratrol uygulanmayan, SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinde 24 saat sonunda G1 fazında hücre oranı % 47, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra ise G1 fazındaki hücre oranı % 66.8 olarak bulunmuştur. Resveratrol uygulanmayan SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonucunda G1 fazında hücre oranı

% 67.0, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 48 saat sonra ise G1 fazındaki hücre oranı % 65.5'dir. SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadığında 24 saat sonra G1 fazında hücre oranı % 50.4, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra ise % 65.5'dir. SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadığında 48 saatlik inkübasyon sonunda G1 fazındaki hücre oranı % 56.5, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandığında ise G1 fazında hücre oranı % 52.0'dir. Resveratrol uygulanmayan, SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinde 24 saat sonunda S fazındaki hücre oranı % 28.3, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra ise S fazındaki hücre oranı % 24.7'dir. SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadığında 24 saat sonra S fazında hücre oranı % 23.2, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 24 saat sonra ise S fazındaki hücre oranı % 20.1'dir. Resveratrol uygulanmayan, SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinde 48 saat sonunda S fazındaki hücre oranı % 13.3, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 48 saat sonra ise S fazındaki hücre oranı % 21.6'dır. SIP1'i baskılanmamış SNU398 hücrelerine resveratrol uygulanmadığında 48 saat sonra S fazında hücre oranı % 13.7, 150 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandıktan 48 saat sonra ise S fazındaki hücre oranı % 20.9'dur. Hem SIP1'i baskılanmamış hem de SIP1'i baskılanmış SNU398 hücrelerinde 24 saat inkibasyondan sonra G1 fazında ve 48 saat sonra ise S fazında durma gözlenmiştir. Benzer şekilde A431, insan epidermoid karsinomu hücreleriyle yapılan bir çalışmada, hücrelere resveratrol uygulanmış, apoptoz ve hücre döngüsü analizi gerçekleştirilmiştir. Resveratrol uygulandıktan sonra hücrelerin G1 fazında durduğu ve apoptoza girdiği belirtilmiştir. p21 bazal seviyede kalırken, siklin D1, D2 ve E ile CDK2, CDK4 ve CDK6'nın protein seviyelerinin azaldığı görülmüştür [94]. Çalışmamız ile uyumlu olarak Parek ve arkadaşları hepatosellüler karsinoma hücrelerinden HepG2 ve Chang'de resveratrolün etkisini siklin D1, büyüme ve proliferasyon analizi üzerinden incelemişlerdir. HepG2 hücrelerine 200 µM konsantrasyonda resveratrol uygulandığında G_1 fazında hücrelerde artış ve S fazındaki hücrelerde azalma görülmüştür. Chang hücrelerinde S fazında hücre artışı görülmüştür. Bu sonuçlar resveratrolün G_1 fazında hücrelerin durmasına neden olarak HepG2 hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiğini göstermiştir. 200 µM konsantrasyonun siklin D1 protein seviyesini azalttığı belirlenmiştir. Resveratrolün ERK ve MAPK yolaklarını nasıl etkilediğine de bakılmıştır. Erk proteininin

seviyesinde bir değişiklik olmadığı ancak p38, AKT ve PAK1 ekspresyonunun azaldığı görülmüştür [154]. Hui Ling Yang ve arkadaşları hepatosellüler karsinoma hücrelerinden HepG2 ile çalışmış ve HepG2 hücrelerine resveratrolü 0, 10, 30, 50, 100, 200 ve 300 µmol /l dozlarında uygulamışlardır. Resveratrolün yüksek konsantrasyonlarda alt-G1 ve G0 / G1 fazında hücre sayısında belirgin bir artışa neden olduğunu gösterilmiştir [152]. Bu çalışmalar bulgularımızı desteklerken aksi yönde çalışmalar da vardır. Schuster ve arkadaşları hepatosellüler karsinoma hücrelerinden HepG2 ve Hep3B ile çalışmışlar ve bu hücrelerdeki NAMPT ve SIRT1 protein fonksiyonlarına bakmışlardır. Resveratrolün p53, apoptoz ve hücre döngüsüne etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada resveratrol 0, 25, 50, 75, 100 µM konsantrasyonlarında uygulanmıştır. Normal hepatositlerin aksine, resveratrol ile muamele edilmiş HepG2 hücrelerinde NAMPT enzimatik aktivitesinde bir azalma ve p53 asetilasyonunda (K382) artma görülmüştür. Resveratrolün HepG2 hücrelerini hücre döngüsünün S fazı ile G2/M fazında durdurduğu ve p53 ile kaspaz-3'ü aktive ettiği saptanmıştır [155].

Resveratrol 3 farklı yolakla hücreleri apoptoza yönlendirir. Birinci yolak hücre ölüm reseptörleri yolağı (Fas/CD95), ikinci yolak p53 ve p21'in düzenlediği ve üçüncüsü de mitokondriye bağımlı yolak'tır [91]. Çalışmalarımızda 150 µM konsantrasyonda resveratrol uyguladığında 48. saatte hem SIP1 baskılanmış hem de kontrol hücrelerinin erken apoptoza ve nekroza yöneldiği anlaşılmıştır. Farklı hücre hatlarında da, örneğin T24 mesane kanserinde de benzer dozlarda resveratrol uygulaması hücreleri apoptoza yönlendirmiştir [152].

Resveratrol'ün p53'ü aktive ettiği ve p21 ile p27'nin ekspresyonunu arttırdığından bahsedilmişti. p21 ve p27 de siklin bağımlı kinazları (CDK) inhibe eder. CDK'ların inhibisyonu hücre döngüsünün G1 fazında durmasına neden olur [94]. Çalışmalarımızda SIP1'i baskılanmış ve baskılanmamış SNU398 hücrelerinin G1 fazında durmasının nedeni CDK'ların inhibisyonu ile açıklanabilir. S fazındaki duraksama ise resveratrolün, ribonükleotid sentaz ve DNA polimeraz enzimlerini inhibe ederek DNA sentezinin engellenmesi olgusu ile açıklanabilir [88], [97].

Sonuç olarak, SIP1 baskılanmış ve kontrol grubu hücrelerinde resveratrolün hücre proliferasyonuna etkisi anlamında anlamlı bir fark bulunamamış, ancak resveratrol her iki hücre grubunda da doza bağlı anti-proliferatif bir etki göstermiştir. Aynı zamanda, resveratrolün SIP1'i baskılanmış ve baskılanmamış SNU398

hücrelerinde hücre döngüsünün G1 ve S fazında durmasına, apoptotik ve nekrotik hücre ölümüne neden olduğu anlaşılmıştır.

KAYNAKLAR

[1] Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J., Ward E., Forman D., (2011), "Global cancer statistics.", CA: A Cancer Journal for Clinicians, 61(2), 69-90.

[2] Pascual S., Herrera I., Irurzun J., (2016), "New advances in hepatocellular carcinoma.", World Journal of Hepatology, 8(9), 421.

[3] Bonnomet A., Brysse A., Tachsidis A., Waltham M., Thompson E. W., Polette M., Gilles C., (2010), "Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells.", Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 15(2), 261-273.

[4] Moreno-Bueno G., Portillo F., Cano A., (2008), "Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer.", Oncogene, 27(55), 6958-6969.

[5] Miyoshi A., Kitajima Y., Sumi K., Sato K., Hagiwara A., Koga Y., Miyazaki K., (2004), "Snail and SIP1 Increase Cancer Invasion by Upregulating MMP Family in Hepatocellular Carcinoma Cells.", British Journal of Cancer, 90(6), 1265–1273.

[6] Lindsey S., Langhans S. A., (2014), "Crosstalk of Oncogenic Signaling Pathways during Epithelial-Mesenchymal Transition.", Frontiers in Oncology, 4, 358.

[7] Yıldırım Y., Özyılkan Ö., Karakayalı H., Haberal M. (2008)., "Hepatosellüler Karsinomda Tedavi Yaklaşımlar.", Uluslararası Hematoloji ve Onkoloji Dergisi,18(4), 248-253

[8] Web 1, (2015), http://www.karacigerkanseriankara.com/karacigerkanseri/karaciger- kanserinin-tedavi-yontemleri-nelerdir.html , (Erişim Tarihi: 02/11/2015).

[9] Singh N., Agrawal M., Doré S., (2013), "Neuroprotective properties and mechanisms of resveratrol in in vitro and in vivo experimental cerebral stroke models.", ACS Chemical Neuroscience, 4(8), 1151-1162.

[10] Aggarwal B. B., Bhardwaj A., Aggarwal R. S., Seeram N. P., Shishodia S., Takada Y., (2004), "Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies.", Anticancer Research 24 (5a), 2783-2840

[11] Sudhakar A., (2009), "History of cancer, ancient and modern treatment methods.", Journal of Cancer Science & Therapy, 1 (2), 1-4.

[12] Web 2, (2015), http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/860-yeni-d%C3%BCnya-kanser-istatistikleri-yay%C4%B1nland%C4%B1.html, (Erişim Tarihi: 10/09/2015)

[13] El–Serag H. B., Rudolph, K. L., (2007), “Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis.”, Gastroenterology, 132(7), 2557-2576.

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

[15] Kumar V., Abbas A. K., Fausto N., Mitchell R. N., (2007), “Robbins Temel Potology.”, 8. Basım, Nobel Tıp Kitapevleri.

[16] Junqueira L. C., Carneiro J., Kelley R. O.,(1993),“ Temel Histoloji.”, 7. Basım, Barış Kitapevi, 385-386.

[17] Farazi P. A., DePinho R. A., (2006), “Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment.”, Nature Reviews Cancer, 6(9), 674-687

[18] Wang R., Brattain M. G., (2006), “AKT can be activated in the nucleus.”, Cellular Signalling, 18(10), 1722-1731.

[19] Marra M., Sordelli I. M., Lombardi A., Lamberti M., Tarantino L., Giudice A., Stiuso P., Abbruzzese A., Sperlongano R., Accardo M., Agresti M., Caraglia M., Sperlongano P., (2011), “Molecular targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma: an overview.”, Journal of Translational Medicine, 9(1), 171.

[20] Feitelson M. A., Sun B., Satıroğlu Tufan N. L., Liu J., Pan J., Lian Z. (2002), “ Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis.’’,Oncogene, 21(16), 2593-2604.

[21] Roskams T., (2006), “Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma.”, Oncogene, 25(27), 3818-3822.

[22] Sherman M., (2005), “Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and screening.”, Seminars in Liver Disease, 25(2), 143-154.

[23] Donato F., Tagger A., Gelatti U., Parrinello G., Boffetta P., Albertini A., Decarli A., Trevisi P., Ribero M.L., Martelli C., Porru S, Nardi G., (2002)., “Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women.”, American Journal of Epidemiology, 155(4), 323-331.

[24] McKillop I. H., Schrum L. W., (2005), “Alcohol and liver cancer.”, Alcohol, 35(3), 195-203

[25] Testino G., Leone S., Borro P, (2014), “Alcohol and Hepatocellular Carcinoma: A Review and a Point of View.” World Journal of Gastroenterology , 20.(43), 15943–15954.

[26] Stickel F., Schuppan D., Hahn E. G., Seitz H. K., (2002), “Cocarcinogenic effects of alcohol in hepatocarcinogenesis.”, Gut;51(1), 132-139

[27] Ġnal A. S., Dundar H. Ġ., (2005), “Viral Hepatit.”, 1.Baskı. İstanbul, Orhan Matbaası, 10-20.

[28] Web 3, (2015), http://www.liver-cancers.de/index.php/tr/riskfakt%C3%B6rleri.html (Erişim<%20http://www.liver-cancers.de/index.php/tr/risk-fakt%C3%B6rleri.html%20, (Erişim Tarihi 12/10/2015).

[29] Block T. M., Mehta A. S., Fimmel C. J., Jordan R. (2003), “Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma.”, Oncogene, 22(33), 5093-5107

[30] Anzola M., (2004), “Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis.”, Journal of Viral Hepatitis, 11(5), 383-393.

[31] Lamouille S., Xu J., Derynck R., (2014), “Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition.”, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 15(3), 178-196.

[32] Web 4, (2015), http://flipper.diff.org/app/items/info/6934, (Erişim Tarihi: 02/12/2015).

[33] Kalluri R., Weinberg R. A., (2009), “The basics of epithelial-mesenchymal transition.”, The Journal of Clinical Investigation, 119(6), 1420-1428

[34] Nisticò P., Bissell M. J., Radisky D.C., (2012), “Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases.”, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 1, 4(2).

[35] Huber M. A., Kraut N., Beug H., (2005), “Molecular requirements for epithelial–mesenchymal transition during tumor progression.”, Current Opinion in Cell Biology 17(5), 548-558

[36] Choi S. S., Diehl A. M., (2009), “Epithelial to mesenchymal transitions in the liver.”, Hepatology, 50(6), 2007-2013.

[37] Mateus A. R., Simões-Correia J., Figueiredo J., Heindl S., Alves C. C., Suriano G., Luber B., Seruca R., (2009), “E-cadherin mutations and cell motility: a genotype–phenotype correlation.”, Experimental Cell Research, 315(8), 1393-1402.

[38] Behrens J., (1994), “Cadherins as determinants of tissue morphology and supressors of invasion.”, Cells Tissues Organs 149(3), 165-169.

[39] Berx G., Van Roy F., (2009), “Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer.”, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 1(6).

[40] Perry J. K., Lins R. J., Lobie P. E., Mitchell M. D., (2010), “Regulation of invasive growth: similar epigenetic mechanisms underpin tumour progression and implantation in human pregnancy.”, Clinical Science, 118(7), 451-457.

[41] Wijnhoven B. P. L., Dinjens W. N. M., Pignatelli M., (2000), “E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer.”, British Journal of Surgery, 87(8), 992-1005.

[42] Thiery J. P., (2003), “Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and pathologies.”, Current Opinion in Cell Biology, 15(6), 740-746.

[43] Onder T. T., Gupta P. B., Mani S. A., Yang J., Lander E. S., Weinberg R. A,. (2008), “Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways.”, Cancer Research, 68(10), 3645-3654.

[44] Sánchez-Tilló E., Liu Y., de Barrios O., Siles L., Fanlo L., Cuatrecasas M., Darling D. S., Dean D. C., Castells A., Postigo A., (2012), “EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness.”, Cellular and Molecular Life Sciences, 69(20), 3429-3456.

[45] Reya T, Clevers H., (2005), “Wnt signalling in stem cells and cancer.”, Nature, 434, 843–850

[46] Akiyama T., (2000), “Wnt/beta-catenin signaling. Cytokine Growth Factor Review.”, 11(4), 273-282.

[47] Lee J. M., Dedhar S., Kalluri R., Thompson E. W., (2006), “The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development and disease.”, The Journal of Cell Biology, 172(7), 973-981

[48] Postigo A. A., Depp J. L., Taylor J. J., Kroll K. L., (2003), “Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins.”, The EMBO Journal. 22(10), 2453-2462.

[49] Vandewalle C., Van Roy F., Berx G., (2009), “The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease.”, Cellular and Molecular Life Sciences ,66(5), 773-787.

[50] Sánchez-Tilló E., Siles L., de Barrios O., Cuatrecasas M., Vaquero E. C., Castells A., Postigo A., (2011), “Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression.”, American Journal of Cancer Research, 1(1), 897-912.

[51] Browne G., Sayan A. E., Tulchinsky E., (2010), “ZEB proteins link cell motility with cell cycle control and cell survival in cancer.”, Cell Cycle, 9(5), 886-891.

[52] Sayan A. E., Griffiths T. R., Pal R., Browne G. J., Ruddick A., Yagci T., Edwards R., Mayer N. J., Qazi H., Goyal S., Fernandez S., Straatman K., Jones G. D., Bowman K. J., Colquhoun A., Mellon J. K., Kriajevska M., Tulchinsky E., (2009), “SIP1 protein protects cells from DNA damage-induced apoptosis and has independent prognostic value in bladder cancer.”, Proceedings of The National Academy of Sciences, 106(35), 14884-14889

[53] Öztas E., Avci M. E., Özcan A., Sayan A. E., Tulchinsky E., Yagci T., (2010), “Novel monoclonal antibodies detect Smad-interacting protein 1 (SIP1) in the cytoplasm of human cells from multiple tumor tissue arrays.”, Experimental and Molecular Pathology, 89(2), 182-189.

[54] Verschueren K., Remacle J. E., Collart C., Kraft H., Baker B. S., Tylzanowski P., Nelles L., Wuytens G., Su M. T., Bodmer R., Smith J. C., Huylebroeck D., (1999), “SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5′-CACCT sequences in candidate target genes.”, Journal of Biological Chemistry, 274(29), 20489-20498.

[55] Derynck R., Zhang Y. E., (2003), “Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-β family signalling.”, Nature, 425(6958), 577-584.

[56] Vural P., (2010), “Transforming Growth Factor-β" nın Kanserde Baskılayıcı Rolü.”, Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 8(1), 035-042

[57] Moustakas A., Heldin C. H., (2012), “Induction of epithelial–mesenchymal transition by transforming growth factor β.”, In Seminars in Cancer Biology, 22(5), 446-454.

[58] Annes J. P., Munger J. S., Rifkin D. B., (2003), “Making sense of latent TGFβ activation.”, Journal of Cell Science, 116(2), 217-224

[59] Shi Y., Massagué J., (2003), “Mechanisms of TGF-β signaling from cell membrane to the nucleus.”, Cell, 113(6), 685-700

[60] Feng X. H., Derynck R., (2005), “Specificity and versatility in TGF-β signaling through Smads.”, Annual Review of Cell and Developmental Biology., 21, 659-693

[61] Aigner K., Dampier B., Descovich L., Mikula M., Sultan A., Schreiber M., Mikulits W., Brabletz T., Strand D., Obrist P., Sommergruber W., Schweifer N., Wernitznig A., Beug H., Foisner R., Eger A., (2007). “The transcription factor ZEB1 (δEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity.”, Oncogene, 26(49), 6979-6988

[62] Acun T., Oztas E., Yagci T., Yakicier M. C., (2011), “SIP1 is downregulated in hepatocellular carcinoma by promoter hypermethylation.”, BMC Cancer, 11(1), 223.

[63] Özturk N. , Erdal E., Mumcuoglu M., Akcali K. C., Yalcin O., Senturk S., Arslan-Ergul A., Gur B., Yulug I., Cetin-Atalay R., Yakicier C., Yagci T., Tez M., Özturk M., (2006), “Reprogramming of replicative senescence in hepatocellular carcinoma-derived cells.”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(7), 2178-2183.

[64] Web 5, (2015), http://drozdogan.com/kanser-turleri-ve-tedavisi/karaciger-kanseri/karaciger-kanserinde-cerrahi/, (Erişim Tarihi: 06/11/2015).

[65] Web 6, (2015), www.ctf.edu.tr/stek/pdfs/28/2819EG_MK.pdf , (Erişim Tarihi: 06/11/2015).

[66] Web 7, (2015), http://www.hamdikarakayali.com.tr/karacigerkansericerrahi.asp, (Erişim Tarihi: 06/11/2015).

[67] Web 8, (2015), guncel.tgv.org.tr/journal/34/pdf/362.pdf, (Erişim Tarihi:10/11/2015).

[68] Yılmaz B. D., Ünsal M., (2013), "Brakiterapi.", Okmeydanı Tıp Dergisi 29 (1), 35-40.

[69] Gambini J., Inglés M., Olaso G., Lopez-Grueso R., Bonet-Costa V., Gimeno-Mallench L., Mas-Bargues C., Abdelaziz K. M., Gomez-Cabrera M. C., Vina J., Borras C., (2015), "Properties of resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans.", Oxidative Medicine and Cellular Longevity,13.

[70] Shukla Y., Singh R., (2011), "Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention.", Annals Of The New York Academy Of Sciences, 11(5), 383-393.

[71] Arichi H., Kimura Y., Okuda H., Baba K., Kozawa M., Arichi S., (1982), "Effects of stilbene components of the roots of Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc. on lipid metabolism.", Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 30(5), 1766-1770.

[72] Chiba T., Kimura Y., Suzuki S., Tatefuji T., Umegaki K., (2016), "Trans-Resveratrol Enhances the Anticoagulant Activity of Warfarin in a Mouse Model.", Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 23.

[73] 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), 274-283.

[74] Borriello A., Cucciolla V., Ragione F. D., Galletti P., (2010), "Dietary polyphenols: focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis.", Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 20(8), 618-625.

[75] Bisht K., Wagner K. H., Bulmer A. C., (2010), "Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto-and DNA-protective dietary compounds.", Toxicology, 278(1), 88-100.

[76] Ndiaye M., Kumar R., Ahmad N., (2011), "Resveratrol in cancer management: where are we and where we go from here?.", Annals of the New York Academy of Sciences, 1215(1), 144-149.

[77] Trela B. C., Waterhouse A. L. (1996), “Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability.”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(5), 1253-1257.

[78] Bradamante S., Barenghi L., Villa A., (2004), “Cardiovascular protective effects of resveratrol.”, Cardiovascular Drug Reviews, 22(3), 169-188.

[79] Prokop J., Abrman P., Seligson A. L., Sovak M., (2006), “Resveratrol and its glycon piceid are stable polyphenols.”, Journal of Medicinal Food, 9(1), 11-14.

[80] Bertelli A. A., Giovannini L., Bernini W., Migliori M., Fregoni M., Bavaresco L., Bertelli A., (1996), “Antiplatelet activity of cis-resveratrol.”, Drugs Under Experimental and Clinical, 22, 61–63.

[81] Kang O. H., Jang H. J., Chae H. S., Oh Y. C., Choi J. G., Lee Y. S., Kim J. H., Kim C K., Sohn D. H., Park H., Kwon D. Y., (2009), “Anti-inflammatory mechanisms of resveratrol in activated HMC-1 cells: pivotal roles of NF-κB and MAPK.”, Pharmacological Research, 59(5), 330-337.

[82] Belleri M., Ribatti D., Nicoli S., Cotelli F., Forti L., Vannini V., Stivala L. A., Presta M., (2005), “Antiangiogenic and vascular-targeting activity of the microtubule-destabilizing trans-resveratrol derivative 3, 5, 4′-trimetho-xystilbene.”, Molecular Pharmacology, 67(5), 1451-1459.

[83] De Lorgeril M., Salen P., Paillard F., Laporte F., Boucher F., de Leiris J., (2002), “Mediterranean diet and the French paradox: two distinct biogeographic concepts for one consolidated scientific theory on the role of nutrition in coronary heart disease.”, Cardiovascular Research, 54(3), 503-515.

[84] Sun A. Y., Simonyi A., Sun G. Y., (2002), “ The ‘French paradox’ and beyond: neuroprotective effects of polyphenols 1, 2.”, Free Radical Biology and Medicine, 32(4), 314-318.

[85] 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 (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1637(1), 59-69.

[86] Kondratyuk T. P., Park E. J., Marler L. E., Ahn S., Yuan Y., Choi Y., Yu R., van Breemen R. B., Sun B., Hoshino J., Cushman M., Jermihov K. C., Mesecar A. D., Grubbs C. J., Pezzuto J. M., (2011), “Resveratrol derivatives as promising chemopreventive agents with improved potency and selectivity.”, Molecular Nutrition & Food Research, 55(8), 1249-1265.

[87] Athar M., Back J. H., Kopelovich L., Bickers D. R., Kim A. L., (2009), “Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms.”, Archives of Biochemistry and Biophysics, 486(2), 95-102.

[88] Fontecave M., Lepoivre M., Elleingand E., Gerez C., Guittet O., (1998), “Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase.”, Febs Letters, 421(3), 277-279.

[89] El-Mowaf A. M., White R. E., (1999), “Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary artery smooth muscle: reversal of endothelin-1 stimulatory ejects.”, Febs Letters, 451(1), 63-67.

[90] Uguralp S., Mizrak B., Karabulut A. B., (2005), “Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion.”, European journal of pediatric surgery: official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery...[et al]= Zeitschrift fur Kinderchirurgie, 15(2), 114-119.

[91] Cucciolla V., Borriello A., Oliva A., Galletti P., Zappia V., Della Ragione F., (2007), “Resveratrol: from basic science to the clinic.”, Cell Cycle, 6(20), 2495-2510.

[92] Fulda S., Debatin K. M., (2004), “Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol.”, Oncogene, 23(40), 6702-6711.

[93] Vallianou N. G., Evangelopoulos A., Geladari E., Kazazis C., (2015), “Resveratrol and Cancer.”, Hospital Chronicles, 10(3), 137-144.

[94] Ahmad N., Adhami V. M., Afaq F., Feyes D. K., Mukhtar H., (2001), “Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G1-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells.”, Clinical Cancer Research, 7(5), 1466-1473

[95] Zhang S., Cao H. J., Davis F. B., Tang H. Y., Davis P. J., Lin H. Y., (2004), “Oestrogen inhibits resveratrol-induced post-translational modification of p53 and apoptosis in breast cancer cells.”, British Journal of Cancer, 91(1), 178-185.

[96] Sareen D, van Ginkel P. R., Takach J. C., Mohiuddin A, Darjatmoko S. R., Albert D. M., Polans A. S., (2006), “Mitochondria as the Primary Target of Resveratrol-Induced Apoptosis in Human Retinoblastoma Cells.”, Investigative Ophthalmology & Visual Science. 47(9), 3708-3716.

[97] Stivala L. A., Savio M., Carafoli F., Perucca P., Bianchi L., Maga G., Forti L., Pagnoni U. M., Albini A., Prosperi E., Vannini V., (2001), “Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol.”, Journal of Biological Chemistry, 276(25), 22586-22594.

[98] Soleas G. J., Grass L., Josephy P. D., Goldberg D. M., Diamandis E. P., (2002), “A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols.”, Clinical Biochemistry, 35(2), 119-124.

[99] 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), 1017-1026.

[100] Rodrigo R., Bosco C., (2006), “Oxidative stress and protective effects of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney.”, A review. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 142(3), 317-327.

[101] Kasdallah-Grissa A., Mornagui B., Aouani E., Hammami M., El May M., Gharbi N., Kamoun A., El-Fazaâ S., (2007), “Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver.”, Life Sciences, 80(11), 1033-1039.

[102] Wagner A. E., Boesch-Saadatmandi C., Breckwoldt D., Schrader C., Schmelzer C., Doring F., Hashida K., Hori O., Matsugo S., Rimbach G., (2011). “Ascorbic acid partly antagonizes resveratrol mediated heme oxygenase-1 but not paraoxonase-1 induction in cultured hepatocytes - role of the redox-regulated transcription factor Nrf2.”, BMC Complementary and Alternative Medicine , 1, 1472-6882

[103] Shakibaei M., Harikumar K. B., Aggarwal B. B., (2009), “Resveratrol addiction: to die or not to die.”, Molecular Nutrition & Food Research, 53(1), 115-128.

[104] Chambers A. F., Matrisian L. M., (1997), “Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis.”, Journal of the National Cancer Institute, 89(17), 1260-1270.

[105] Huang C., Ma W. Y., Goranson A., Dong Z., (1999), “Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway.”, Carcinogenesis 20, 237–242.

[106] Golstein P., Kroemer G., (2007), “Cell death by necrosis: towards a molecular definition.”, Trends in Biochemical Sciences, 32(1), 37-43.

[107] Web 9, (2015), http://www.evrimagaci.org/makale/268, (Erişim tarihi 15/11/2015)

[108] Web 10, (2016), http://www.diffen.com/difference/Apoptosis_vs_Necrosis , (Erişim tarihi 23.08.2016).

[109] Kroemer G., El-Deiry W. S., Golstein P., Peter M. E., Vaux D., Vandenabeele P., Zhivotovsky B., Blagosklonny M.V., Malorni W., Knight R.A., Piacentini M., Nagata S., Melino G., (2009), “Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.”, Cell Death and Differentiation, 16(1), 3–11.

[110] Arslan D. Ö., Korkmaz G., Gözüaçık D., (2011), “Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması.”, Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2(4).

[111] Glick D., Barth S., Macleod K. F., (2010), “Autophagy: cellular and molecular mechanisms.”, The Journal of Pathology, 221(1), 3-12.

[112] Yang Z., Klionsky D. J., (2010), “Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation.”, Current opinion in cell biology, 22(2), 124-131.

[113] Mathew R., Karantza-Wadsworth V., White E., (2007), “Role of autophagy in cancer.”, Nature Reviews Cancer, 7(12), 961-967.

[114] Solakoğlu Z. (2009). “Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni.’’, Klinik Gelişim, 22(3), 20-25.

[115] Web 11, (2015), http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm, (Erişim Tarihi :20/11/2015).

[116] Web12, (2015), http://www.academia.edu/572721/Programl%C4%B1_h%C3%BCcre_%C3%B6l%C3%BCm%C3%BC_ve_spermatozoon ,(ErişimTarihi :20/11/2015).

[117] Kerr J. F., Winterford C. M., Harmon B. V., (1994), “Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy.”, Cancer, 73(8), 2013-2026.

[118] Adams J. M., Cory S. (2001). “Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family.”, Trends in Biochemical Sciences, 26(1), 61-66.

[119] Coşkun G., Özgür H., (2011), “Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması.”, Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 20(3).

[120] Karaboz İ., Kayar E., Akar S., (2008), “Flow sitometri ve kullanım alanları.”, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, 6, 1-18.

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

[122] Web 13, (2015), BD Biosciences. Introduction to flow cytometry: A learning guide, (2000.) Available at: http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med80691.pdf, (Erişim Tarihi :20/11/2015).

[123] Web 14, (2015), Rahman M. Introduction to Flow Cytometry, Serotec Ltd. Oxford (UK) 2006. Available at: http://static.abdserotec.com/uploads/ Flow-Cytometry.pdf., (Erişim Tarihi :21/11/2015).

[124] Kanev M. O., Muranlı F. D. K., (2015), “Flow sitometri ve kullanım alanları.”, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 20(1),33-38.

[125] Biosciences, B. D. “Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerse™ System.”, (2011).

[126] DAL F., (2011), "Oksidatif Stresin Hücre Döngüsü Fazları Üzerindeki Etkileri.", Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi.

[127] Web 15, (2015), http://www.phnxflow.com/Introduction%20to%20Cell%20Cycle%20Analysis.pdf, (Erişim Tarihi 23/12/2015).

[128] Junqueira L. C., Carneiro J., (2006), "Temel Histoloji.", İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 60-64.

[129] Howell A. S., Lew D. J., (2012), "Morphogenesis and the cell cycle.", Genetics 190(1), 51-77.

[130] Web 16, (2015), http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/, (Erişim Tari h:26.08.2015).

[131] Kolch, W., (2000), "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions.", Biochemical Journal, 351, 289-305.

[132] Web 17, (2015), http://www.ck12.org/user:Dysart/section/Cell-Division-and-the-Cell-Cycle%253A%253Aof%253A%253A-Cell-Growth-%2526-Division/, (Erişim Tarihi:24.08.2015).

[133] Web 18, (2015), http://www.nature.com/nrm/journal/v15/n7/fig_tab/nrm3819F3.html, (Erişim Tarihi:26.08.2015).

[134] Web 19, (2015), http://www.cellsalive.com/cell_cycle.htm, (Erişim Tarihi:26. 08.2015).

[135] Web 20, (2015), http://bme.yeditepe.edu.tr/Faculty/AUK/OJ1.pdf, (Erişim Tari -hi:06.12.2015).

[136] Esposito V., Baldi A., Tonini G., Vincenzi B., Santini M., Ambrogi V., Mineo T. C., Persichetti P., Liuzzi G., Montesarchio V., Wolner E., Baldi F., Groeger A. M., (2004), "Analysis of cell cycle regulator proteins in non-small cell lung cancer.", Journal of Clinical Pathology, 57(1), 58-63.

[137 Web 21, (2015), https://oncogenesandcancer.wordpress.com/cell-cycle-check-points- and-effect-of-oncogenes-2/, (Erişim Tarihi: 10/12/2015).

[138] Hulleman E., Boonstra J., (2001), "Regulation of G1 phase progression by growth factors and the extracellular matrix.", Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 58(1), 80-93.

[139] Sherr C. J., (1994), "G1 phase progression: cycling on cue.", Cell, 79(4), 551-555.

[140] Brehm A., Kouzarides T., (1999), "Retinoblastoma protein meets chromatin.", Trends in Biochemical Sciences, 24(4),142-145.

[141] DeGregori J., (2002), “The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles.”, Biochim et Biophys Acta 1602,131-150.

[142] 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 and Cellular Biology, 15(5),2612-2624.

[143] Web 22, (2015), http://egetipdergisi.com.tr/text.php3?id=643, (Erişim Tarihi:10/12/2015).

[144] Vermeulen K., Van Bockstaele D. R., Berneman Z. N., (2003), “The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer.’’, Cell Proliferation, 36(3),131-149.

[145] 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), 1415-1423.

[146] Yu H. B., Li D. Y., Zhang H. F., Xue H. Z., Pan C. E., Zhao S. H., Wang L., (2010), “Resveratrol inhibits invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells.”, Journal of Animal and Veterinary Advances , 9,3117-3124.

[147] Ou X., Chen Y., Cheng X., Zhang X., He Q., (2014), “Potentiation of resveratrol-induced apoptosis by matrine in human hepatoma HepG2 cells.”, Oncology Reports, 32(6),2803-2809.

[148] Yeh C. B., Hsieh M. J., Lin C. W., Chiou H. L., Lin P. Y., Chen T. Y., Yang S. F., (2013), “The antimetastatic effects of resveratrol on hepatocellular carcinoma through the downregulation of a metastasis-associated protease by SP-1 modulation.”, PLoS One,8(2).

[149] Weng C. J., Wu C. F., Huang H. W., Wu C. H., Ho C. T., Yen G. C., (2010)., “Evaluation of anti-invasion effect of resveratrol and related methoxy analogues on human hepatocarcinoma cells.”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(5), 2886-2894.

[150] Du Q., Hu B., An H. M., Shen K. P., Xu L., Deng S., Wei M. M., (2013), “Synergistic anticancer effects of curcumin and resveratrol in Hepa1-6 hepatocellular carcinoma cells.”, Oncology Reports, 29(5), 1851-1858.

[151] Choi H. Y., Chong S. A., Nam M. J., (2009), “Resveratrol induces apoptosis in human SK-HEP-1 hepatic cancer cells.”, Cancer Genomics-Proteomics, 6(5), 263-268.

[152] Yang H. L., Chen W. Q., Cao X., Worschech A., Du L. F., Fang W. Y., Xu Y. Y., Stroncek D. F., Li X., Wang E., Marincola F. M., (2009), “Caveolin-1 enhances resveratrol-mediated cytotoxicity and transport in a hepatocellular carcinoma model.”, Journal of Translational Medicine, 7(1), 22.

[153] Tameda M., Sugimoto K., Shiraki K., Inagaki Y., Ogura S., Kasai C., Yoneda M., Okamoto R., Yamamoto N., Takei Y., Ito M., Nobori T., (2014), “Resveratrol sensitizes HepG2 cells to TRAIL-induced apoptosis. Anti-cancer drugs.”, Experimental and Toxicologic Pathology, 25(9), 1028-1034.

[154] Parekh P., Motiwale L., Naik N., Rao K. V. K., (2011), “Downregulation of cyclin D1 is associated with decreased levels of p38 MAP kinases, Akt/PKB and Pak1 during chemopreventive effects of resveratrol in liver cancer cells.”, Experimental and Toxicologic Pathology, 63(1), 167-173.

[155] Schuster S., Penke M., Gorski T., Petzold-Quinque S., Damm G., Gebhardt R., Kiess W., Garten A., (2014), “Resveratrol differentially regulates NAMPT and SIRT1 in hepatocarcinoma cells and primary human hepatocytes.”, PloS one, 9(3).

ÖZGEÇMİŞ

Tuğçe Uygur, 29 Ekim 1984'te Kadıköy'de doğdu. Bahariye İlkokulu ve Kadıköy Kız Lisesi'nden mezun olduktan sonra 2006 yılında Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm'ünde lisans eğitimi aldı. 2010 yılnda mezun oldu. 2011 yıllında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstütüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı ve 2016 yılında tamamladı.