

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**İNSAN AMNİYOTİK HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
NİKOTİN VE RESVERATROLÜN SOX2 VE SOX4
GENLERİNİN EKSPRESYON DÜZEYLERİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN REAL TIME PCR YÖNTEMİ İLE
İNCELENMESİ**

Gamze CÖMERTPAY

TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMANI
Prof. Dr. H. Ümit LÜLEYAP**

ADANA-2013

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**İNSAN AMNİYOTİK HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
NİKOTİN VE RESVERATROLÜN SOX2 VE SOX4
GENLERİNİN EKSPRESYON DÜZEYLERİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN REAL TIME PCR YÖNTEMİ İLE
İNCELENMESİ**

Gamze CÖMERTPAY

TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMANI
Prof. Dr. H. Ümit LÜLEYAP**

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TF2012YL4 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

**Tez No:.....
ADANA-2013**

KABUL VE ONAY

Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan
“İnsan Amniyotik Hücre Kültürlerinde Nikotin ve Resveratrolün SOX2 ve SOX4
Genlerinin Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Real Time PCR Yöntemi ile İncelenmesi”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih:

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. H. Ümit LÜLEYAP

Çukurova Üniversitesi

Başkan

Prof. Dr. Davut ALPTEKİN

ÇÜRÜK

Çukurova Üniversitesi

Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Akif

Çukurova

Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve sayılı kararı
ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, tez konumun seçilmesinde ve çalışmamın her aşamasında beni destekleyen danışman hocam sayın Prof. Dr. H. Ümit Lüleyap'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan Anabilim Dalımız Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Halil Kasap, Prof. Dr. Mülkiye Kasap, Prof. Dr. Davut Alptekin, Prof. Dr. Osman Demirhan ve Doç. Dr. Ayfer Pazarbaşı'na teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvar çalışmalarım ile tez yazımda her türlü desteklerinden ve içten yardımlarından dolayı Dr. M. Bertan Yılmaz'a ve yüksek lisans öğrencisi Turan Tufan'a özellikle teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması TF2012YL4 numaralı proje ile Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Son olarak manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hamilelik Sırasında Sigara Kullanımı	3
2.2. Nikotin	3
2.2.1. Nikotinin Tarihçesi	4
2.2.2. Nikotinin Kimyası	4
2.2.3. Nikotinin Absorbsiyonu	5
2.2.4. Nikotin Vücut Dokularında Dağılımı	5
2.2.5. Nikotinin Metabolizması	6
2.2.6. Nikotin ve Kotinin Metabolizmasından Sorumlu Karaciğer Enzimleri	8
2.2.7. Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri	9
2.2.8. Nikotinin Vücuttan Atılımı	10
2.2.9. Nikotinin Biyolojik Etkileri	10
2.2.9.1. Nikotinin Oksidatif Stres Üzerine Etkisi	10
2.2.9.2. Nikotinin Apoptoz Üzerine etkisi	11
2.2.9.3. Nikotinin Hücre Çoğalması Üzerine Etkisi	11
2.2.9.4. Nikotinin Genotoksik Etkisi	12
2.2.9.5. Nikotinin Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi	12
2.2.9.6. Nikotinin Hamilelik Sırasında ve Yeni Doğanda Etkileri	13
2.3. Resveratrol	16
2.3.1. Resveratrolün Biyolojik Etkileri	18

2.4. Sox Genleri	19
2.4.1. Sox2 Geni	20
2.4.1.1. Sox2 ve Embriyonik Kök Hücre	20
2.4.1.2. Sox2 ve Kanser	21
2.4.2. Sox4 Geni	22
2.4.2.1. Sox4 ve Kanser	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Araç ve Gereçler	24
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	24
3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler	24
3.2. Amniyotik Sıvı Örneklerinin Sağlanması	25
3.2.1. Hasta Rızası	25
3.3. Yöntem	25
3.3.1. Amniyotik Hücre Kültürü Ekim İşlemi	25
3.3.2. Amniyotik Hücre Kültürü Pasaj İşlemi	26
3.3.3. Amniyotik Hücre Kültürü Hasat İşlemi	27
3.3.4. RNA İzolasyonu	27
3.3.5. cDNA Eldesi	28
3.3.6. Real Time RT-PCR	29
3.3.7. Real-Time RT PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	31
4. BULGULAR	32
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	42
KAYNAKLAR	43
EKLER	50
ÖZGEÇMİŞ	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Nikotinin kimyasal yapısı - Konformasyon I ve Konformasyon II	5
Şekil 2.	Nikotin metabolizması ve konformasyonu	8
Şekil 3.	Nikotin metabolizması ve yıkım yolları	9
Şekil 4.	Resveratrolün kimyasal yapısı	17
Şekil.5.	Sox2 geninin lokalizasyonu	21
Şekil 6.	Sox2 proteininin kanserleşme sürecine etkisi	22
Şekil 7.	Sox4 geninin lokalizasyonu	23
Şekil 8.	Kontrol grubu ve 20 farklı hastaya ait nikotin gruplarında Sox2 ekspresyon değerlerini gösteren grafik	33
Şekil 9.	Kontrol grubu ve 20 farklı hastaya ait nikotin gruplarında Sox4 ekspresyon değerlerini gösteren grafik.	34
Şekil 10.	Sox2 geni için wilcoxon analizi sonucu elde edilen p değeri	35
Şekil 11.	Sox4 geni için wilcoxon analizi sonucu elde edilen p değeri	35
Şekil 12.	20 farklı hastaya ait nikotin ve nikotin+resveratrol grublarında Sox2 ekspresyon değerlerini gösteren grafik	36
Şekil 13.	20 farklı hastaya ait nikotin ve nikotin+resveratrol grublarında Sox4 ekspresyon değerlerini gösteren grafik	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 2xRT master mix bileşenleri ve miktarları	29
Çizelge 2. cDNA eldesi için Thermal Cycler’da kullanılan program	29
Çizelge 3. PCR reaksiyonunun bileşenleri ve miktarları	30
Çizelge 4. Applied Biosystems 7500 real -time PCR için kullanılan program	30

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
BcALB/3T3	: Fare Fibroblast Hücre Hattı
Bcl-2	: B-Hücre Lenfoma 2
C	: Karbon Atomu
°C	: Santigrat Derece
Ca	: Kalsiyum Atomu
cc	: Kübik Santimetre
cDNA	: Komplamenter DNA
CoA	: Koenzim A
CO₂	: Karbondioksit
Ct	: Eşik Döngüsü
Cp	: Geçiş Noktaları
CYP	: Sitokrom P450
CYP1A1	: Sitokrom P4501A1
CYP1B1	: Sitokrom P4501B1
CYP2A6	: Sitokrom P4502A6
CYP2B6	: Sitokrom P4502B6
CYP2CA	: Sitokrom P4502CA
CYP2D6	: Sitokrom P4502D6
CYP2E1	: Sitokrom P4502E1
CYP2S1	: Sitokrom P4502S1
CYP2J2	: Sitokrom P4502J2
CYP3A5	: Sitokrom P4503A5
C-fos	: Hücresel Onkogen fos
C10H14N2	: Nikotinin Ampifirik Formülü
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DNaz	: Deoksiribonükleaz
dNTP	: Deoksiribonükleotiktrifosfat
D121-SP	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Kök Hücre Hattı

EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EPHX1	: Epoksit Hidrolaz 1
E2F	: Retinoblastom Bağlayan Protein
Fas	: Tip2 Transmembran Protein
FasL	: Fas Ligand
FBJ	: Mürin Osteosarkoma Viral Onkogen Homolog
FGFRL1	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü Benzeri 1
FMO	: Flavin Monooksijenaz
G1	: Hücre Döngüsünde İnterfazın İlk Safhası
GSTA2	: Glutatiyon S Transferaz Alfa 2
H	: Hidrojen Atomu
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HL-60	: İnsan Premiyelositik Lösemi Hücre Hattı
HMG	: Yüksek Mobilite Grup
HSP-28	: 28 kilodalton Isı Şoku Proteini
HSP-70	: 70 kilodalton Isı Şoku Proteini
H2O2	: Hidrojen Peroksit
IGF2R	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 2 Reseptörü
K	: Potasyum Atomu
kDA	: Kilodalton
Kg	: Kilogram
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MnSO4	: Mangan 2 Sülfat
MÖ	: Milattan Önce
N	: Azot Atomu
Na	: Sodyum Atomu
NANOG	: Nanog Homeobox
Ng	: Nanogram
NKX31	: Homeobox Protein Nkx. 3.1
NNK	: 4-(Metilnitrozamino)-1-(3-Piridil)-1-Bütanon

NSCLC	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
Ng	: Nanogram
O₂	: Oksijen Atomu
OCT4	: Oktomer Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü 4
PBS	: Kroumalı Fırça Muamele
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	: Hidrojenin Gücü
PON1	: Paraoksonaz 1
P53	: Protein 53
RT-PCR	: Real Time PCR
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Rb	: Retinoblastom Protein
Rb-E2F/DP	: G1'den S1 Faza Geçişi Kontrol Eden Kompleks
RNA	: Ribo Nükleik Asit
rpm	: Dakikada Devir Sayısı
RNaz	: Ribonükleaz
RT	: Ters Transkripsiyon
S	: DNA Sentez Safhası
SiRNA	: Küçük Müdahale RNA
SIDS	: Ani Bebek Ölümü Sendromu
Src	: Reseptör Olmayan Tirozin Kinaz
SOX	: SRY Benzeri Box
SOXA	: SRY-BoxA
SOXB	: SRY-BoxB
SOXB1	: SRY-BoxB1
SOXB2	: SRY-BoxB2
SOX1	: SRY-Box1
SOX2	: Cinsiyet Belirleyen Bölge Homebox 2
SOX3	: SRY-Box3
SOX4	: Cinsiyet Belirleyen Bölge Homebox 4
SOX14	: SRY-Box14
SOX21	: SRY-Box21

SRY	: Cinsiyet Belirleyen Bölge Y
Torr	: Basınç birimi
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
UDP	: Üridin Difosfoglukoronat
UGT	: UDP Glukorunozil Transferaz
UGT2A1	: UDP Glukorunozil Transferaz 2A1
α7-nAChR	: Alfa7 Nikotinik Reseptör
β	: Beta
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
Υ	: Gama
ϵ	: Epsilon
ΔCp	: Cp Hedef Gen-Cp Referans Gen
$\Delta\Delta$Cp	: Δ Cp Muamele Edilen- Δ Cp Kontrol

ÖZET

İnsan Amniyotik Hücre Kültürlerinde Nikotin Ve Resveratrolün Sox2 Ve Sox4 Genlerinin Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisinin Real Time Pcr Yöntemi İle İncelenmesi

Hamilelikte sigara içiminin fetüs gelişiminde ve büyümesinde zararlı etkilerinin olduğuna dair kanıtlar bulunmasına rağmen her 3 kadından biri erken hamilelik döneminde sigara içmektedir. Nikotin sigarada bulunan en önemli toksik bileşenlerden biridir. Biz de çalışmamızda hamilelikte sigara kullanımının tehlikelerine dikkat çekebilmek için; nikotinin, insan amniyotik hücre kültürlerinde Sox2 ve Sox4 genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerine etkisini göstermeyi amaçladık. Ayrıca toksik bileşiklere karşı antioksidanların önemini vurgulayabilmek için; nikotikle muamele edilen insan amniyotik hücre kültürlerinde bir antioksidan olan resveratrolün belirlediğimiz genlerin ekspresyon düzeylerinde nasıl bir etkiye sahip olduğunu göstermeyi hedefledik.

Çalışmamıza 20 hasta dahil edilmiş olup her hasta için; kontrol hücre kültürü grubu, nikotin ile muamele edilen hücre kültürü grubu ve resveratrol + nikotin ile muamele edilen hücre kültürü grubu oluşturulmuştur. Grupların her birinde Sox2 ve Sox4 genlerinin ekspresyon düzeyleri real time RT-PCR ile incelenmiştir.

Çalışmamız sonuçlarına göre nikotin ile muamele edilen hücre kültürü gruplarında Sox2 ve Sox4 genlerinin ekspresyon düzeyleri değişiklik göstermiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (p değerleri Sox2 için $p=0,005$ - Sox4 için $p=0,000$). Nikotin ve resveratrol + nikotin grubu karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmiştir. (p değerleri Sox2 için $p=0,036$ - Sox4 için $p=0,026$)

Sonuç olarak nikotinin insan amniyotik hücre kültürlerinde Sox2 ve Sox4 genlerinin ekspresyon düzeylerini değiştirdiği, resveratrolün de nikotin muamelesi ile artan Sox2 ve Sox4 ekspresyon düzeyini azaltma da önemli bir antioksidan olduğu saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Nikotin, Sox2, Sox4, Resveratrol, RT-PCR

ABSTRACT

Investigation The Effects of Nicotine and Resveratrol on Sox2 and Sox4 Genes Expression Levels in Human Amniotic Cell Culture by Real Time PCR

Although there are various evidence relating to the smoking during gestation harms to development and growth of fetus, one-third of women smoke during pregnancy. Nicotine in cigarette is one of the most important toxic components. For this reason, in our study we aimed to show the effects of nicotine in human amniotic cell cultures upon the expression levels of Sox2 and Sox4 genes. In addition, we aimed to show the effect of resveratrol, kind of an antioxidant, upon the expression levels of genes we examined on nicotine treated human amniotic cell cultures to emphasize importance of antioxidant against toxic components.

The twenty patients included to our study and the third group was created for each patients. The groups respectively are called control cell culture group, nicotine treated cell culture group and resveratrol + nicotine treated cell culture group. The levels of expression Sox2 and Sox4 genes were examined by real time RT-PCR method for each group.

The Sox and Sox4 genes showed changes in expression levels and were statistically significance according to our results. ($p=0,005$ for Sox2- $p=0,000$ for Sox4). A statistically significant difference was found between nicotine group and resveratrol + nicotine group were compared. ($p=0,036$ for Sox2- $p=0,026$ for Sox4)

As a result, we founded that nicotine changes the expression levels of Sox2 and Sox4 genes and examined that resveratrol is an important antioxidant to reduce expression levels of Sox2 and Sox4 genes increased by treatment of nicotine.

Key Words: Nicotine, Sox2, Sox4, Resveratrol, RT-PCR

1. GİRİŞ

Gebelikte sigara kullanımı; düşük, perinatal ölümler ve düşük ağırlıklı bebek doğumu sendromu gibi farklı komplikasyonlara neden olduğundan hamilelik sırasında sigara kullanımının fetal gelişim için oldukça tehlikeli olduğu kabul edilmiştir¹. Bununla birlikte sigarada bulunan çeşitli toksik maddeler obstetrik ve gelişimsel komplikasyonlara neden olmaktadır. Sigara içimi oksidatif strese, bağışıklık ve inflamatuvar yanıtta, ksenobiyotik metabolizmasında, pıhtılaşma ve fibrinolizde, tümör oluşumunda, ısı-şok yanıtında, DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) tamirinde, ekstra selüler matrix degradasyonunda yer alan genlerin ekspresyonunu değiştirmektedir². Sigarada bulunan toksik bileşenlerin en önemlilerinden biri nikotindir¹. Nikotin; kritik gelişim safhalarında beyni etkileyen bir nöroteratojen olup, sigara içenlerin çocuklarında bilişsel, duygusal, davranışsal problemlerin görülmesine neden olmaktadır. Aynı zamanda akciğer gibi organların gelişimini etkilemektedir³. Nikotinin tek başına kanseri indüklediğine dair kanıtlar olmamasına rağmen farklı çalışmalar; nikotinin kanser hücrelerinin büyümesine ve endotelial hücrelerin proliferasyonuna katkıda bulunduğunu göstermiştir⁴. Ayrıca nikotinin normal timositlerde, farklılaşmamış fibroblastlarda, birçok kanser hücre serisinde apoptozu engellediği gösterilmiştir⁵.

Çalışmamızda hamilelikte sigara kullanımının zararlarına farklı yönden dikkatleri çekebilmek, literatüre yeni kaynaklar sunabilmek amacıyla; çeşitli sinyal yollarında görev alan SOX2 (Cinsiyet belirleyen bölge homeobox2), SOX4 (Cinsiyet belirleyen bölge homeobox4) genlerinin ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. Buna ek olarak resveratrol içeriği yüksek gıdalar tüketmenin, toksik maddelerin zararlarını indirgemedeki önemli olduğunu vurgulayabilmek adına resveratrolün; nikotinin etkilediği SOX2, SOX4 genlerinin ekspresyon profillerinde nasıl bir etkiye sahip olduğu araştırılmıştır.

SOX2, intronsuz bir gen olup hücrenin moleküler kaderinin belirlenmesinde ve embriyonik gelişiminin düzenlenmesinde rol olan transkripsiyon faktörlerinin SRY (cinsiyet belirleyen bölge Y) ile ilişkili HMG-box (Yüksek mobilite grup-box) ailesinin bir üyesini kodlar. Bu genin ürünü santral sinir sistemindeki kök hücrelerin korunmasında gereklidir. Mutasyonları optik sinir hipoplazisi sendromik mikroftalmi ve

yapısal göz malformasyonlarıyla ilişkilidir⁶. Erken embriyogenezis sırasında pluripotensi için gerekli transkripsiyon faktörüdür. Ön beyin ve gözlerin gelişiminde SOX2'nin önemli olduğu gösterilmiştir⁷. SOX4 geni gelişim ve tümörögenезis ile bağlantılıdır. Çeşitli tümör türlerinde SOX4'ün aşırı eksprese olduğu gözlenmiştir⁸. Tümörögenезisin yanında hücre ölümüne önderlik eden apoptozis yolağında görev yapabilir⁹.

Resveratrol üzümde, çilekte ve bitkisel ilaçlarda bulunan polifenik bir birleşiktir. Hücre döngüsünün düzenlenmesi, endotelial nitrik oksit sentetazın stimülasyonu, trombosit agregasyonu gibi çeşitli biyokimyasal aktiviteler sergilediği gösterilmiştir¹⁰. Resveratrol, aynı zamanda sigara dumanı ekstraktı indüklemesiyle artan mitokondri O₂ (oksijen) ürünlerini azaltarak endotelial hücreleri sigara dumanı ekstraktı indükleyici DNA hasarlarına karşı korumaktadır¹¹.

Bu çalışma, nikotin ile muamele edilen insan amniyotik hücre kültürlerinde; proliferasyonda ve tümör oluşumunda önemli rol oynayan SOX2 ve SOX4 genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişikliğe bağlı olarak bebekte oluşabilecek olumsuzlukları belirlemeyi, gebelikte sigara içiminin zararlarına farklı yönden dikkatleri çekebilmeyi ve resveratrol ile nikotin arasındaki etkileşimi belirlenmiş olan genler üzerinden görebilmeyi amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hamilelikte Sigara Kullanımı

Hamilelikte sigara içiminin fetus gelişiminde ve büyümesinde zararlı etkilerinin olduğuna dair kanıtlar bulunmasına rağmen her 3 kadından biri erken hamilelik döneminde sigara içmektedir¹². Sigara içenlerde toksik bileşiklere maruz kalma, intrauterin fetal gelişimi için oldukça tehlikelidir ve aynı zamanda çeşitli obstetrik ve gelişimsel komplikasyonlara neden olmaktadır. Hamilelik sırasında sigaranın beklenenden farklı etkileri; spontan düşük, önde gelen plasenta, plasental abrupsiyon, erken doğum, düşük doğum, fetal büyüme kısıtlaması, düşük doğum ağırlığı ve ani bebek ölümü sendromunu içermektedir. Sigaranın içerdiği kimyasal bileşikler primer kontakt hücreler ve çeşitli ikincil dokularda genotoksik ve prekarsinojenik lezyonların oluşumunu indüklemektedir. Sigara içimi oksidatif strese, immün ve inflamatuvar yanıtta, ksenobiyotik metabolizmaya, pıhtılaşma ve fibrinolizise, onkogeneze, ısı-şok cevaba, DNA tamirine, DNA paketlenmesine ve ekstraselüler matriks degradasyonuna dahil genlerin ekspresyonunu değiştirmektedir^{2,13}. Sigara insan bedenine zarar verebilen binlerce toksik madde içermektedir. Bunlar içerisinde en önemlisi nikotindir¹⁴.

2.2. Nikotin

Nikotin pridin ve piroldin halkasından oluşan ve tütün bitkisinin yapraklarından izole edilen alkaloid bir bileşiktir¹⁴. Ticari tütün yaprağında bulunan alkaloidlerin % 95 kadarını oluşturmaktadır¹⁵. Nikotinin 2 stereo izomeri bulunmaktadır. Aktif izomer nikotinik kolinerjik reseptörlere bağlanan (S)- nikotindir ve bu izomer tütünde mevcuttur. (R)- nikotin, kolinerjik reseptörlerin sadece zayıf bir agonistidir. Nikotin zayıf bir baz olduğundan hücre zarından geçişi pH'ya bağlıdır. Asidik pH'da nikotin iyonize durumdadır ve hücre membranından kolayca geçemez¹⁶. Sigara dumanının majör toksik bileşeni olup, periferik ve santral sinir sisteminde reaktif oksijen türlerinin üretimini uyararak oksidatif stresin oluşumuna yol açtığı bilinmektedir¹⁴. Nikotin çok düşük miktarlarda merkezi sinir sisteminin hafif bir uyarıcısıdır fakat saf formu yüksek derecede zehirleyicidir ve insektisid olarak kullanılmaktadır¹⁷.

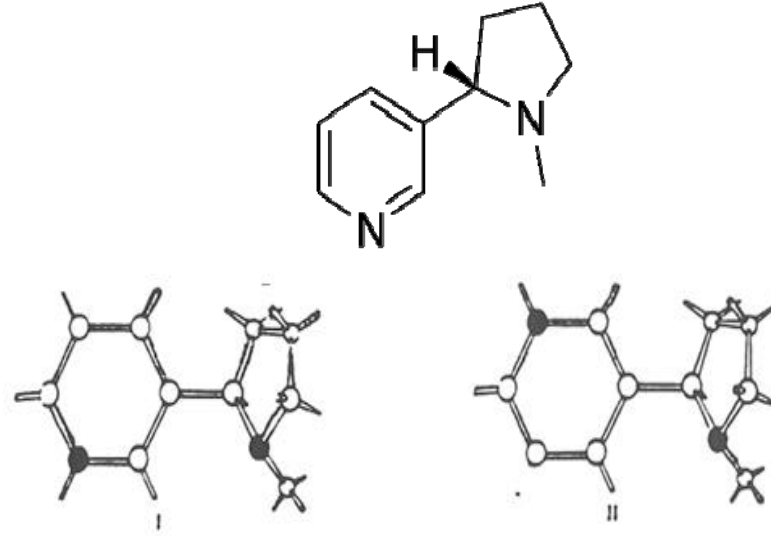
2.2.1. Nikotinin Tarihçesi

Tütün tarımı MÖ. 6000 yılında Amerika kıtasında başlamıştır. Bu tarihten 4.500 yıl sonra Orta Amerika'da yaşayan Mayaların tütün kullandığı kitaplara geçmiştir. Avrupalılar tütünü 1492 yılında Küba'ya ayak basan Christopher Colomb sayesinde öğrenmiş, tütünün Avrupa'da yayılması ise Fransa'nın Portekiz elçisi Jean Nicot sayesinde olmuştur¹⁸.1559 yılında Avrupa'ya getirilen tütün bitkisi sigara içme ve bitkisel insektisit elde etme amacıyla kullanılmıştır¹⁹.

1809 yılında tütün bitkisinde nikotini gözlemleyen Fransız bilim adamı Vauquelin tütün özünde alkali ve uçucu aktif bir madde olduğunu fark etmiştir. Nikotinin tütün bitkisinden izolasyonu ve pürifikasyonu 1828 yılında Heidelberg Üniversitesinden Poselt ve Reimann tarafından yapılmış; tütünün Avrupa'da yayılmasına sebep olan Nicot onuruna elde ettikleri ürüne nikotin adı verilmiştir. 1843 yılında Melsens tarafından nikotinin ampirik formülü ($C_{10}H_{14}N_2$), 1847 yılında ise Schloesing tarafından moleküler ağırlığı tanımlanmıştır. Nikotinin bugün bilinen gelişmiş yapısı 1895 yılında Aldof Pinner tarafından açıklığa kavuşturulmuştur. 1950'li yıllarda nikotin metabolizmasının ilk çalışması yapılmış, 1981 yılında doğal (S)- nikotin enantiyoseçici sentezi, 2000 yılında ise (R)- nikotin enantiyoseçici sentezi yapılmıştır²⁰.

2.2.2. Nikotinin Kimyası

Nikotinin kimyasal formülü $C_{10}H_{14}N_2$, moleküler ağırlığı ise 162,23 kDa'dır. Sistematikte, nikotin 3- (1-metil- 2- pirolidinil) piridin olarak adlandırılmaktadır. Nikotinin 4 olası konformasyonu vardır. Nikotinin en olası konformasyonu, konformasyon 1 ve 2 arasındaki dönüşümdür. Konformasyon 1'de pirolidin halkasının C_3 'ündeki hidrojen, piridin halkasının H_4 'nün arkasındayken; Konformasyon 2'de piridin halkasının H_2 'sinin arkasındadır. İki konformasyon arasındaki dönüşüm pirolidin halkası döndürülerek elde edilir²¹. Saf nikotin karakteristik bir kokuya sahip ve sıvıdır. Hava ile temas ettiğinde kahverengine dönüşür. Nikotin 760 Torr'da 247,5 °C'de kaynama noktasına sahiptir²².



Şekil 1: Nikotinin kimyasal yapısı - Konformasyon I ve Konformasyon II²¹

2.2.3. Nikotinin Absorbsiyonu

Nikotinin biyolojik zarlar üzerinden absorpsiyonu pH'ya bağlıdır. pH asidik ise nikotin iyonizedir ve membranı kolaylıkla geçemez. Fizyolojik pH'da (pH=7,4) nikotin iyonize değildir ve kolaylıkla membranı geçebilir²³. Tütün dumanı küçük hava yollarına ve akciğerin alveollerine eriştiğinde nikotin hızla absorbe edilir. Sigara içimi sırasında nikotinin kandaki konsantrasyonu hızla yükselir ve sigara içimi bittiğinde pik yapar. İnsan akciğerinde pH 7,4 değerindeki sıvı, nikotinin çözünmesini sağlayarak membranlardan transferini kolaylaştırır. Ortalama olarak nikotinin 1mg kadarı sigara içimi sırasında absorbe edilir¹⁶. Nikotinin emilimi ağız boşluğu, deri, akciğer, mesane ve gastrointestinal sistem aracılığıyla gerçekleşebilir²².

2.2.4. Nikotinin Vücut Dokularında Dağılımı

Absorpsiyondan sonra nikotin kan dolaşımına katılır. pH=7,4'te % 69 kadarı iyonize, % 31 kadarı ise anyonize durumdadır. Sigara içenlerin otopsi örnekleri temel alındığında nikotin afinitesinin karaciğer, böbrekler, dalak ve akciğerlerde yüksek; yağ dokuda ise daha düşük olduğu görülmüştür^{16,24}. Nikotin ayrıca anne sütünde de birikmektedir. Plasental bariyeri kolayca geçtiğinden amniyotik sıvı ve fetal serumda daha yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Bir sigara içiminden sonra arteriyel

kandaki nikotin konsantrasyonu çoğunlukla 20- 60 ng/ml arasında değişen oranlarda bulunur¹⁶.

2.2.5. Nikotin Metabolizması

Nikotin karaciğer tarafından birçok metabolite kapsamlı olarak metabolize edilir. Nikotinin 6 ana metaboliti tanımlanmıştır. Kantitatif olarak çoğu memeli türlerindeki nikotinin en önemli metaboliti laktam türevli kotinindir. İnsanlarda nikotinin %70- 80 kadarı kotinine dönüştürülür^{16,24}. Nikotini metabolize eden 2 majör monooksijenaz bulunmaktadır. Bunlar sitokrom P-450 ve flavin monooksijenaz (FMO)'dır²⁵. Nikotin metabolizması yolları FazI ve FazII nikotin metabolizması olarak ele alınabilir. FazI metabolizması nikotinin mikrozomal oksidasyonunu içermektedir ve 4 gruba ayrılır²².

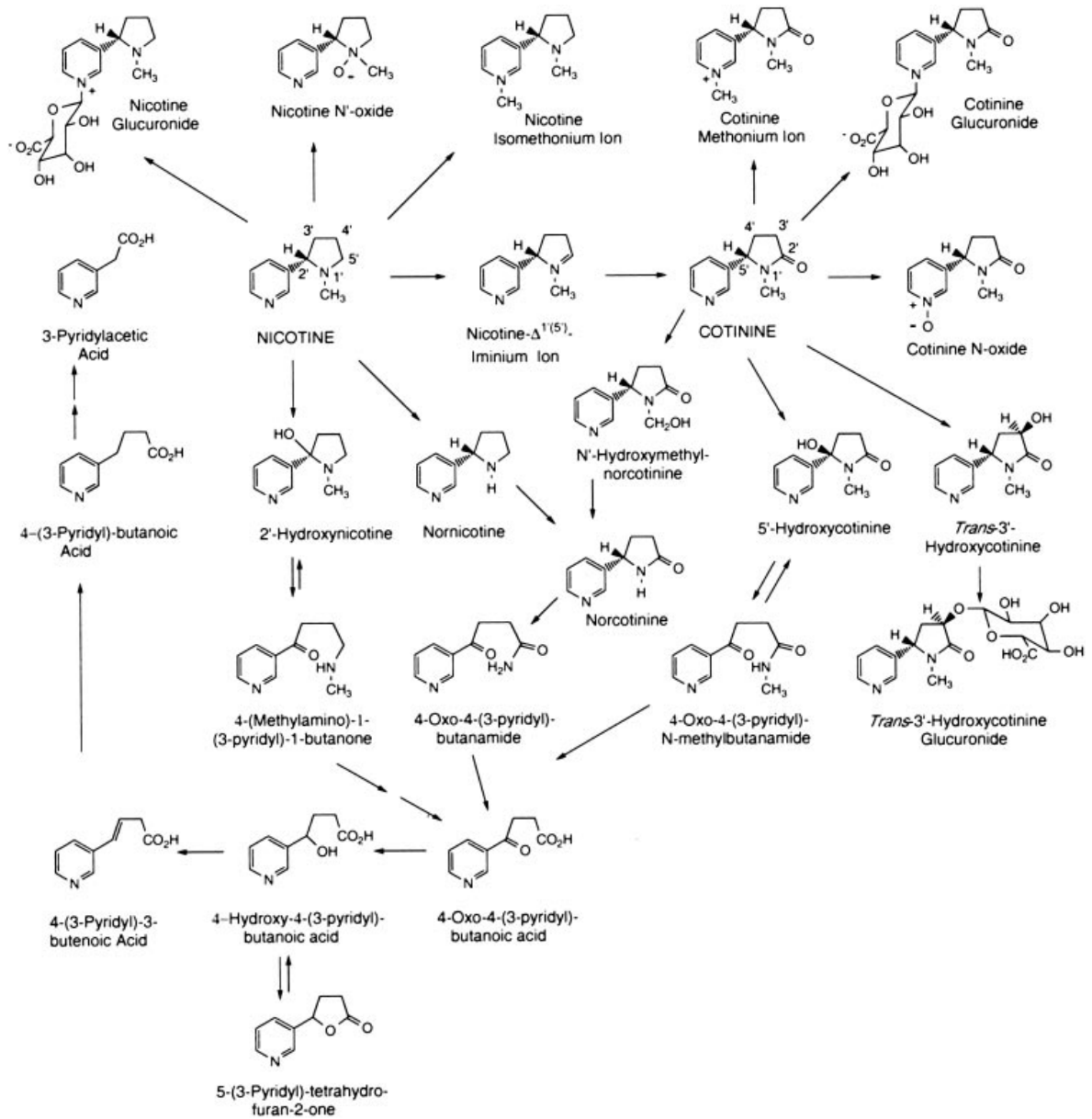
Faz I Metabolizması birinci grubu C-oksidasyon ve 5'- hidroksi – nikotinin 3-piridilasetik asite dönüşümü içermektedir. İnsanların çoğunda nikotin %70- %80 oranında C-oksidasyonu ile kotinine metabolize olur. Kotinin insan, tavşan, fare ve sıçanda bir idrar metaboliti olarak tespit edilmiştir. Nikotinin kotinine dönüşümünü ileri süren mekanizma; mikrozomal enzimler tarafından katalizlenen hidroksilasyon sonucu aldehit dönüşümü ve sitozolik enzimlerle indüklenen kotinin dönüşümlerinden ibarettir. Nikotin iminyum iyonun 5'- hidroksinikotinden su kaybı ile oluştuğu ve kotinine dönüştüğü bilinmektedir. γ - (3-piridil)- γ -oxo-N-metil bütiramit, kotinin uygulamasını takiben izole edilen metabolittir. γ - (3-piridil)- γ -oxo-N-metil bütiramit insan idrarında da tespit edilmiştir. 3-Piridil asetik asit (-)- kotinin uygulamasını takiben izole edilen bir metabolittir. Ayrıca diğer ara ürünler dimetil kotinin ve δ - (3-piridil)- γ - oxobütrikasit, 3-piridil asetik asite dönüşmektedir. Nikotinin C- oksidasyonunda yer alan en önemli enzim kotinin oluşumuna öncülük eden CYP2A6 (sitokrom P450 2A6)'dır²².

Faz I metabolizması ikinci grubu nornikotin, demetil kotinin, trans-3-hidroksikotinin ve δ - (3-piridil)- γ -metilaminobütrikasit oluşumudur. Demetil kotinin, nornikotin ve 3-hidroksikotinin insanlara ve hayvanlara (-)-nikotin ve (-)-kotinin uygulamasını takiben izole edilmiş ve idrar metaboliti olarak tanımlanmıştır. 3-Hidroksikotinin'in, ¹⁴C(-) nikotinden oluştuğu bilinmektedir. Nikotin-metil-¹⁴C'; 3-hidroksikotinin, kotinin ve δ - (3-piridil)- γ -oxo-N-metil bütiramite dönüşürken ¹⁴C-kotininin; 3-hidroksikotinin, demetilkotinin ve γ - (3-piridil)- γ -oxo-N-metil bütiramide dönüştüğü gösterilmiştir²².

Faz I metabolizması üçüncü grubu N-oksidasyon'dur. Nikotin-1'-N-oksit, ilk olarak tavşan karaciğer ekstraktında tanımlanmıştır. Nikotin-1'-N-oksit oluşumu, hepatik flavin içeren monooksijenaz 3 (FMO3) tarafından katalize edilir. Kotininin de N-oksidasyonu yapılmaktadır. Ancak kotinin N-oksidasyonunda yer alan enzim henüz tanımlanmamıştır²².

Faz I metabolizmasının 4. grubunu N-metilasyon oluşturmaktadır. Nikotin metabolizmasının diğer yolları nikotinin N-metilasyonu ve N-demetilasyonunu içermektedir. Hayvanlara (-) - nikotin ve (-)- kotinin uygulamasını takiben idrar metaboliti olarak izometilnikotinyum ve kotinin methoniyum oluşmuştur²².

Faz II Metabolizması N- ve O- glukuronidasyonu içermektedir. UDP-glukuronoziltransferaz (UGT) enzimleri, glukuronid ile birleşmeyi sağlamaktadır. Nikotinin glukuronid'li metabolitleri, nikotin ve kotinin N-glukuronidler olup bu metabolitler idrarda saptanmıştır²².

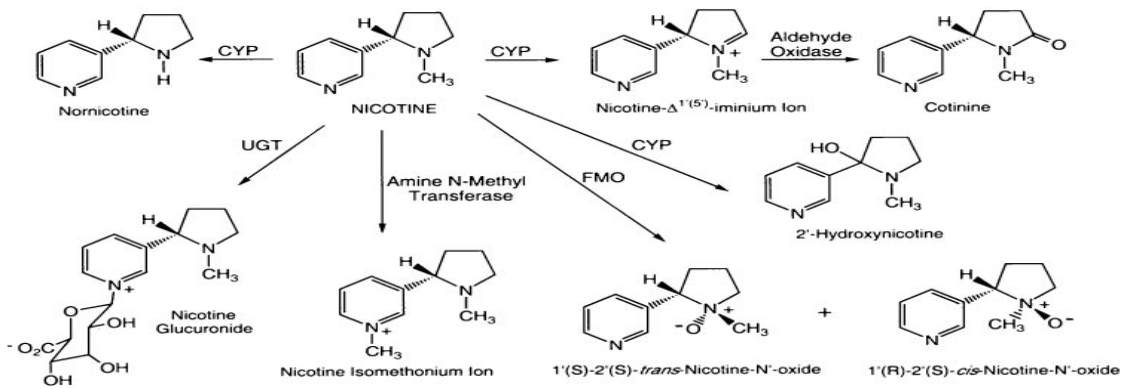


Şekil 2: Nikotin metabolizması ve konformasyonu¹⁶.

2.2.6. Nikotin ve Kotinin Metabolizmasından Sorumlu Karaciğer Enzimleri

Nikotin ve kotinin metabolizmasından sorumlu karaciğer enzimleri; sitokrom P450 enzimleri, aldehit oksidazlar, flavin monooksijenaz 3'ler, amin N-metiltransferazlar, UDP-Glukuronoziltransferazlar olmak üzere 5 gruba ayrılır¹⁶. Sitokrom P450 enzimlerinden CYP2A6, nikotin ve kotinin oksidasyonundan sorumlu primer enzimdir^{16,22,26}. CYP2B6 (sitokrom P450 2B6) nikotinin oksidasyonunda görevli ikinci aktif hepatik enzimdir. CYP2D6 (sitokrom P450 2D6) nikotin metabolizmasında

aktif iken kotinin metabolizmasında etkin bir role sahip değildir. CYP2E1 (sitokrom P450 2E1) ise yüksek nikotin konsantrasyonunda nikotin metabolizmasında etkilidir. Aldehit oksidazlar nikotin- $\Delta^{1(5)}$ -iminiyum iyonun kotinine dönüşümünü katalizleyen sitosolik enzimlerdir. Tavşan karaciğer mikrozomlarında yapılan invitro çalışmalarda; aldehit oksidaz yokluğunda nikotin- $\Delta^{1(5)}$ -iminiyum iyonun biriktiği gözlenmiştir. Flavin monooksijenazlar, endoplazmik retikuluma ve de çekirdek zarına yapışık bulunan ksenobiyotik metabolizmada rol alan FazI enzimleridir²⁷. Flavin içeren monooksijenaz 3 (FMO3), nikotin N' oksit oluşumundan sorumlu temel enzimdir. Amin N-Metiltransferazlar tarafından nikotin N-metilasyon katalizlenmektedir¹⁶. UDP-Glukuroniltransferazlar, nikotin ve kotininin faz II reaksiyonları ile glukuronidasyonun gerçekleşmesini sağlar. Glukuronidasyon ile glukuronik acidin substrata transferi gerçekleşir. Böylece suda çözünürlüğü yüksek metabolik ürünler oluşur²⁸.



Şekil 3: Nikotin metabolizması ve yıkım yolları¹⁶

2.2.7. Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri

Nikotin bir asetilkolin agonistidir ve nikotinik reseptörler aracılığıyla etkilidir. Nikotinik asetilkolin reseptörleri ilk defa sinir kas sinapsında tespit edilen 290 kDa ağırlığında bir proteindir²⁹. Nikotinik reseptörler etkilerini Na kanalları üzerinden gösterir. Nörotransmitter olan asetilkolin hücre duvarının dışında bulunan nikotinik reseptörü etkileyerek, sodyum iyon kanallarını açan konformasyonel değişikliğe sebep olur³⁰. Nikotinik asetilkolin reseptörlerini Na^+ ve Ca_2^+ girişi ve K çıkışı ile yönetilen klasik ligand kapılı iyon kanal proteinleri veya iyonotropik reseptörler olarak

tanımlamak da mümkündür²⁹. Nikotinic asetil kolin reseptörleri alfa, beta, gama, sigma, epsilon olmak üzere 5 ayrı grupta incelenir³¹.

2.2.8. Nikotinin Vücuttan Atılımı

Nikotin atılımının idrar, gaita, safra, mide özsuğu ve ter yolu ile olabileceği gösterilmiştir^{16,22}. C¹⁴- nikotin hayvanlara verilmiş ve %55 kadarı idrarda gözlenmiştir. Nikotin ve kotinin sigaraya maruz kalan annelerin bebeklerinin idrarında da tespit edilmiştir²². Ratlarla yapılan çalışmalarda işaretli nikotinin intravenöz uygulanmasından sonra radyoaktivitenin bir kısmının safrada salgılandığı görülürken insanlarda safradaki nikotin miktarını ölçebilecek bir çalışma yapılmamıştır¹⁶.

2.2.9. Nikotinin Biyolojik Etkileri

Nikotin; apoptozis, anjiogenezis, hücre aracılıklı bağışıklık gibi organizma için çok önemli olan çeşitli biyolojik fonksiyonları bozarak bir tümör tetikleyicisi gibi görev yapmaktadır³². Yüksek doz nikotin P450 enzimlerin aktivitesini artırarak serbest radikal oluşumuna öncülük etmektedir¹⁵. Nikotin; oksidatif radikal oluşumuna sebep olduğundan nöral hücrelerde oksidatif zarara yol açan bir nörotoksikanttır³³. Nokta mutasyonları oluşturarak akciğer yapısının korunması ve akciğer büyümesini kontrol eden programı değiştirmektedir. Aynı zamanda akciğerlerin antioksidan kapasitesini azaltmaktadır^{34,3}.

2.2.9.1. Nikotinin Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Nikotinin in vivo ve invitro oksidatif stresi indüklediği bildirilmiştir. Lipid peroksidasyon işleminin çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Lipid peroksidasyonunun başlatılması; çoğu durumda süperoksit, hidroksil radikaller gibi serbest radikaller ve hücrenel zarara sebep olan H₂O₂ (hidrojen peroksit) gibi diğer reaktif oksijen türleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Intraperitoneal nikotin uygulanan sıçan dokularında lipid peroksidasyon düzeylerinin arttığı gözlenmiştir. Nikotin karaciğerde ana metaboliti olan kotinine oksitlenir ve dokularda serbest radikallerin oluşumuna sebep olur. Dokulardaki glutatyonun azalması ile birlikte bu serbest radikallerin oluşumu oksidatif hasara sebep olur³⁵. 2mg/kg subkutanöz nikotin uygulaması yapılan ratların böbrek ve karaciğerlerinde oksidatif stresin arttığı

gösterilmiştir³⁶. Oksidatif stresin rolü özellikle solunan tüm oksijenin % 20'sini tüketen beyinde önemlidir. Beyin antioksidanların ve ilgili enzimlerin nispeten zayıf bir konsantrasyonunu içerir. Nikotinin ve klorpirifosun gelişmekte olan sinir hücrelerinde oksidatif hasara yol açtığı gösterilmiştir. Gelişmekte olan beyin; koruyucu enzimlerin ve glutasyon gibi antioksidanlarının rezervlerinin az olması, nöronları oksidatif moleküllerden koruyan gliaların yetişkin beynine göre eksik olması nedeniyle oksidatif strese karşı daha hassastır³⁵. Maternal sigara içimi yavrularda oksidatif stresi arttırmaktadır. Ratlarda fetal ve neonatal dönemde nikotine maruz kalma pankreatik glutasyon peroksidaz ile MnSO₄ protein ekspresyonu ve ROS (reaktif oksijen türleri) üretimini arttırmıştır. Hayvan çalışmaları fetusun reaktif oksijen türlerine maruz kalması sonucunda pankreatik hücre fonksiyonunun değişerek diabete önücülük edebileceğini göstermiştir³⁷.

2.2.9.2. Nikotinin Apoptoz Üzerine Etkisi

Nikotin çeşitli faktörleri uyararak apoptoza engel olmaktadır⁴. İnsan akciğer kanserinin gelişimini içeren çalışmada nikotinin, Bcl-2 (B-hücre lenfoma-2) onko-proteininin ekspresyonunu artıran ve apoptozu baskılayan kinazı (ERK2) aktive ettiği kanıtlanmıştır²³. Bcl-2 antiapoptotik olması nedeniyle hasarlı hücrenin ölmesinden ziyade bölünerek çoğalmasını sağladığı için hasarın nesilden nesile kümülatif şekilde aktarılmasını sağlayarak onko-protein gibi davranır³⁸. Başka bir çalışmada nikotinin, UV-uyarılı apoptozisi engellediği gösterilmiştir^{23,5}. Akciğer karsinom hücrelerinde ise nikotinin, antiapoptotik olarak görev yapan protoonkogen Bcl-2'nin fosforilasyonunu uyardığı gözlenmiştir^{23,39}. Nikotin aracılıklı apoptozun engellenmesi tütün ile ilişkili kanserlerin patogeneze katkıda bulunabilmektedir⁵. Son yıllarda pek çok araştırmacı nikotinin asetilkolin reseptörlerine bağlandığını ve kolinerjik antiinflamatuvar yolağın agonistik aktivasyonunun birçok invitro sistemde apoptozisi engellediğini ifade etmiştir

32

2.2.9.3. Nikotinin Hücre Çoğalması Üzerine Etkisi

Nikotin akciğer kanseri hücre serilerinin çoğalmasını teşvik eden aktif bir sigara bileşenidir. Aynı zamanda anjiogenezisi uyararak apoptozise karşı direnç oluşumunda etkilidir. Akciğer kanseri hücrelerinde bu olaylar nikotinik asetilkolin reseptörleri aracılığı ile gerçekleşirken; NSCLC'de (non- small cell lung cancer) nikotinin pro-

invaziv etkisi, $\alpha 7$ -nAChR (alfa7 nikotinik reseptör) yolu ile oluşmaktadır. Real- Time PCR analiz sonuçları $\alpha 7$ -nAChR'nin insan meme kanseri ve pankreatik kanser hücre hatlarında da eksprese olduğunu göstermiştir. Nikotinin, insan meme kanseri hücrelerinin çoğalmasına ve yayılmasına katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Meme kanseri hücrelerinde nikotinin pro-invaziv etkisi; nAChR, Src (reseptör olmayan tirozin kinaz) ve Ca bağımlı yolak aracılığı ile gerçekleşir⁴⁰. Konno ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise nikotinin, doz bağımlı hücre çoğalmasının inhibisyonunda etkili olduğu gözlenmiştir²². Nikotin; düz kas hücrelerinin, murin embriyonik fibroblastların ve insan embriyonik akciğer fibroblastlarının büyümesini ya da DNA sentezinin başlatılmasını uyarılmaktadır. Ancak nikotin HL-60 (insan premyelositik lösemi hücre hattı) lösemik hücrelerde ve BALB/3T3 (fare fibroblast hücre hattı) hücrelerinde hücre çoğalmasını inhibe etmektedir⁴¹.

2.2.9.4. Nikotinin Genotoksik Etkisi

İnsanlarda ve kemirgenlerde sigaranın genetik hasara sebep olduğu açıkça gösterilirken nikotinin genotoksik etkisine dair çalışmalar çelişkili ve sınırlıdır. Bazı araştırmacılar nikotin ve metabolitlerinin genotoksik bir tehlike teşkil etmediğini bildirmiştir⁴². Son zamanlarda nikotinin, insan dış eti fibroblastlarında mikroçekirdek sıklığını arttırdığını ve insan spermatozoalarında DNA zincir kırıklarını uyardığını bildiren çalışmalar yapılmıştır⁴³. Aynı zamanda nikotinin; anöploidi, poliploidi ve kardeş kromatid değişimini uyardığı belirtilmiştir⁴⁴.

2.2.9.5. Nikotinin Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Nikotinin farklı kromozomal lokasyonlarda bulunan genlerin, gen aktiviteleri ile gen ifadeleri üzerindeki etkisini araştıran ve gösteren değişik çalışmalar yapılmıştır. Nikotin kateşolamin sekresyonunu arttırmakta ve kateşolamin biyosentez yoloğında işlev gören adrenal medüller hücrelerdeki tirozin hidroksilaz ve dopamin β -hidroksilaz gibi enzimleri aktif hale getirmektedir. Tirozin hidroksilaz ve dopamin β -hidroksilaz gen ekspresyonunda, nikotine uzun süre maruz kalmanın etkisi incelenmiştir. 1-2 gün nikotine maruz kalmanın her iki genin mRNA seviyesini yükselttiğini göstermiştir. Bu durum nikotinin transkripsiyon aracılıklı etkisini belirtmektedir. Diğer bir çalışmada nikotinin ısı şok proteinlerini [HSP70 (70 kilodalton ısı şoku proteini) ve HSP28 (28

kilodalton ısı şoku proteini)] uyardığı ve c-fos (hücrel onkogen fos) protoonkogen ekspresyonun azalmasına sebep olduğu gösterilmiştir²². Nikotinin HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein) ilişkili bir enzim olan laktat dehidrogenazı peroksidasyona karşı koruyan PON1 (paraoksonaz 1) geninin ekspresyonunu azalttığı gözlenmiştir⁴⁵. Ratların prefrontal korteksinde nikotinin, Dopamin D1 Reseptör mRNA ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı bunun da Dopamin D1 reseptör geninin promotör bölgesinin H₄ asetilasyonu ile gerçekleşebileceği bildirilmiştir⁴⁶. Nikotin maruziyeti ile metabolik genlerin de ekspresyonları değişmektedir. Sigara içenlerin bronkoalveoler hücrelerinde CYP1A1 (sitokrom p4501A1), CYP1B1 (sitokrom p4501B1), CYP2S1 (sitokrom p4502S1), GSTP1 (Glutatiyon S-transferaz P1) ve EPHX1 (epoksit hidrolaz 1) genlerinin ekspresyonları artırılırken CYP2B6/7, CYP3A5 (sitokrom p4503A5) ve UGT2A1 (UDP-Glukuronoziltransferaz 2A1) genleri baskılanmıştır. Sigara içenlerin biyopsi örneklerinde ise CYP1A1, CYP1B1, CYP2C9, GSTP1 VE GSTA2 (Glutatiyon S transferaz alfa 2) genlerinin ekspresyonu artırılırken; CYP2J2, EPHX1 baskılanmaktadır⁴⁷.

2.2.9.6. Nikotinin Hamilelik Sırasında ve Yeni doğanda Etkilileri

Azalan fetal ağırlık, artan prematüre doğumlar-perinatal ölümler, kendiliğinden oluşan düşükler, konjenital kusurlar; tütün dumanı ve nikotin maruziyeti ile ilişkilendirildiğinden; nikotin embriyonik gelişim ile ilgili çeşitli hastalıklardan sorumlu tutulmuştur⁴⁸. Nikotinin fetus gelişimi üzerinde tek başına etkisinin olup olmadığını araştırmak için çok sayıda hayvan deneyleri yapılmıştır. Koyunlarda ve maymunlarda nikotinin, anne ile yavrunun kardiyovasküler sistemini etkilediği görülmüştür. Hamilelik sırasında ratlara enjekte edilen günlük 5mg/kg gibi düşük dozda nikotinin, kaçınma tepkisini öğrenmede seçici eksikliklere neden olduğu saptanmıştır. Prenatal dönemde nikotin maruziyetinin etkileri yetişkinlikte de sürmektedir. Nikotin ile muamele edilen fare ve ratların yavrularında hafıza ve dikkat eksikliği gözlenmiştir. Otonomik fonksiyonlarda prenatal nikotin maruziyetinin etkisi çeşitli türlerde araştırılmıştır. Prenatal nikotin maruziyeti hipoksi ya da anoksiye karşı geliştirilen direnci bozmaktadır. Kemirgenlerde prenatal nikotine maruz kalma postnatal hiperaktiviteye, bilişsel bozukluklara, artan anksiyeteye, somatosensoryel eksikliklere, kalıcı nörokimyasal değişikliklere sebep olmaktadır. Hayvan deneylerinde fetal nikotin

maruziyetinin; obezite, hipertansiyon ve tip-2 diyabet ile ilişkili postnatal metabolik değişikliklerle sonuçlanabileceği ileri sürülmüştür⁴⁹.

Prenatal nikotin maruziyetinin, artan postnatal vücut ağırlığı ve vücut yağı ile sonuçlandığı ratlarla yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Prenatal nikotin maruziyetinin, vücut ağırlığı dengesinin merkezi endokrin kontrolündeki değişiklikler sayesinde vücut ağırlığını/yağlanmayı arttırabileceği ileri sürülmüştür. Vücut ağırlığını, enerji dengesini düzenleyen sinyaller; iştah ve vücut ağırlığı dengesini sağlayan beyindeki en önemli merkez olan hipotalamusta bulunmaktadır. Nikotinic asetil kolin reseptörleri geniş olarak hipotalamusta yer almaktadır. Prenatal dönemde nikotine maruz kalmanın, Rhesus makaklarının hipotalamuslarında iştah ve tokluk düzenleyicileri olan proopiomelanokortin mesajcı RNA ve nöropeptid Y ekspresyonunu değiştirdiği saptanmıştır. Benzeri çalışmalar vücut ağırlığı dengesinde nikotin uyarımlı değişikliklerin, fetal yaşam sırasında hipotalamik kontrol mekanizmasındaki değişikliklerle düzenlenebileceğini ileri sürmektedir⁴⁹.

Ratlarda; fetal ve neonatal dönemde nikotine maruz kalma pankreatik gelişimi, postnatal beta hücrelerinin sağ kalımını ve fonksiyonunu olumsuz etkilemektedir. Pankreatik gelişimdeki olumsuzluklar yetişkinlikte anormal glikoz dengesine sebep olmaktadır. Beta hücre yığını ve fonksiyon kaybı, nikotinin gelişen beta hücrelerindeki asetilkolin reseptörlerine bağlanmasından dolayı hücre içi reaktif oksijen türlerinin artması ile ilişkilendirilmiştir. Prenatal nikotin maruziyeti aynı zamanda Tip-2 diyabetin başka bir özelliği olan insülin hassasiyetinin bozulmasına sebep olur⁴⁹.

Prenatal dönemde sigara içimine maruz kalmayla ilişkili sağlık problemlerinden biri de hipertansiyondur. Hayvan deneyleri bu etkinin nikotin aracılıklı olabileceğini ileri sürmektedir. Gerçekten de fetal ve neonatal nikotin maruziyeti Wistar-Kyoto fare soylarında yetişkinlikte artan kan basıncı ile sonuçlanmıştır. Fetal ve neonatal dönemde nikotinine maruz kalan ratlarda endotel fonksiyon bozukluğu ve/ya da böbrek fonksiyon bozukluğu yüzünden postnatal dönemde yüksek kan basıncı gözlenmiştir. Gao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise nikotine maruz kalan yavrularda endotel ya da böbrek fonksiyon bozukluğu gözlenmemiştir. Bunun yerine fetal ve neonatal nikotin maruziyetinin perivasküler adipoz dokunun miktarını, niteliğini değiştirdiği ve kan damarlarının kasılma tepkisini azaltmak için perivasküler adipoz dokunun yeteneğinin bozulduğu gösterilmiştir. Çünkü perivasküler adipoz doku hemen hemen tüm sistemik

arterleri sarmaktadır ve vasküler işlevin önemli bir modülatörüdür. Hamilelikte nikotine maruz kalma sonucunda oluşan postnatal kan basıncı perivasküler adipoz dokunun işlevini değiştirebilir. Aynı zamanda prenatal dönemde nikotine maruz kalma strese dayalı kardiyak bozukluklara sebep olur. Yavru ratların nikotine maruz kalması sol ventrikülde damar tıkanıklığının boyutunu artırmaktadır ve ergenlik döneminde iskemi durumunu takiben ilk 25 dakikalık zaman diliminde sol ventrikülün işlevinin postiskemik dönemde iyileştirilmesini azaltmaktadır. Bununla birlikte nikotin tarafından indüklenen kardiyak işlev bozukluğu sigara dumanına maruz kalan yeni doğanlarda ani bebek ölümü sendromu (SIDS) riskini arttırmaktadır⁴⁹.

Perinatal dönemde nikotine maruz kalmanın akciğer gelişiminde ve postnatal akciğer işlevinde şiddetli etkileri vardır. Örneğin nikotin fetal maymunlarda hava yolu yapısını ve mekaniği değiştirebilir ki buda ekspiratuar rezerv volüm, zorlu vital kapasite ve zorlu ekspiratuar volüm gibi akciğer fonksiyon parameterlerinin azalmasına neden olur. İlâveten perinatal dönemde nikotine maruz kalma ratların akciğerlerinde alveolarizasyonu bozmaktadır. Nikotin ile muamele edilen koyunların yavrularında postnatal nefes darlığı ve anormal nefes alma paterni gözlenmiştir. Hamilelik sırasında sigara içimi SIDS riskini arttırmaktadır. Gerçekten de gebelik sırasında ratların nikotine maruz kalması doğumdan sonra oksijen yetersizliğine bağlı olarak mortaliteyi arttırmaktadır⁴⁹.

Hayvan deneylerinden elde edilen bilgilere göre nikotine maruz kalmak sigara içen bayanların yavrularının üretkenliğini olumsuz etkilemektedir. Fetal ve neonatal gelişim sırasında nikotine maruz kalmak yeni doğan dişilerde; fertilitenin azaltmasına, ovaryum steroidojenezisin disregülasyonuna ve folikül dinamiğinin değişmesine sebep olmaktadır. Bununla birlikte granuloza hücre çoğalmasına, artan ovaryum hücre apoptozuna ve ergenlik döneminde ovaryum anjiogenezisine yol açmaktadır. Yenidoğan erkek yavrularda ise sperm hareketinin engellenmesine, seminifer tübüllerin vakuollaşmasına, epididimal kanal içerisine lökosit ve germ hücrelerinin nüfuz etmesine, germ hücrelerinin eksfoliasyonuna, seminifer tübüllerin boşalmasına sebep olmaktadır⁴⁹.

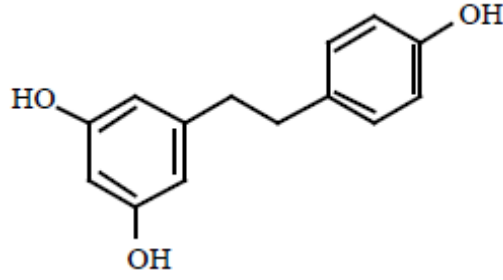
Prenatal dönemde sigara dumanına maruz kalma beyin tümörü ve lösemi dahil çocukluk kanserlerinde artışa sebep olmaktadır. Fetal ve neonatal dönemde kanser gelişiminde nikotinin uzun süreli etkisi çok iyi araştırılmamıştır fakat nikotinin bu

dönemlerde kanserle ilişkisi olabileceğine dair görüşler ileri sürülmüştür. Nikotin ve metabolitleri tümörün oluşmasında ve ilerlemesinde etkilidir. Nikotinin, detoksifikasyon yeteneğini azaltmasından dolayı fetus için zararlı olabilir. Nikotin sigaraya özgü nitrozamin ve 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-bütanon (NNK) gibi karsinojenik bileşenlere dönüşebilir. Sigara içen annelerin yenidoğan bebeklerinin idrarında NNK ve metabolitleri gözlenmiştir ki bu da karsinojenlerin plasentaya transfer olduğunun belirtisidir. NNK düşük dozlarda bile hamsterlar için transplasental karsinojendir. NNK ile muamele edilmiş gebe hamsterların yavrularında solunum sistemi, pankreas, karaciğer ve böbreküstü bezleri dahil bir çok farklı dokuda tümör gelişimi gözlenmiştir. Böylece fetal ve neonatal dönemde nikotine maruz kalma kanser gelişimi riskini arttırmaktadır. Ancak birçok araştırmayla bu hipotezin doğrulanması gerekmektedir⁴⁹.

2.3. Resveratrol

Resveratrol; üzüm, yerbıstığı, dut gibi çeşitli bitkiler tarafından stres, ultraviyole, yaralanma ve fungal iltihaba yanıt olarak üretilen doğal bir fitoaleksindir^{50,51}. Resveratrol antioksidan aktiviteye ve anti-inflamatuar etkiye sahip olup birçok hastalığı önlemektedir⁵². Resveratrolün doğal antioksidan rolü üç farklı antioksidan mekanizma ile açıklanmaktadır. Bunlardan biri koenzim Q ile yarışmak ve ROS oluşum yerinde oksidatif zincir kompleksini azaltmaktır. Diğeri mitokondride oluşan süperoksit radikalini yakalamak sonucusu ise fenton reaksiyonu ürünleri tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunun inhibasyonudur⁵³.

Resveratrol klasik terminolojide 3,5,4'-trihidroksistilben olarak adlandırılmaktadır⁵⁴. Tam beyaz olmayan bir toz görünümündedir. Erime noktası 253 – 255 °C'dir⁵⁰. Resveratrol stilbenden köken alan önemli bir stilbenoidtir. sis-E ve trans Z olmak üzere 2 geometrik izoformu bulunmaktadır. Trans ve sis resveratrolerin her ikisi de serbest veya glikoza bağlı olabilir⁵⁵.



Şekil 4: Resveratrolün kimyasal yapısı⁵⁴

Resveratrol biosentezini stilben sentaz enzimi kataliz eder. Resveratrol bitkiler tarafından strese yanıt olarak üretilir ve normalde fazla miktarda üretilmez. Resveratrolün biosentezi *p*-kumarol-CoA'nın *p*-kumarol kalıntısı ile malonil-CoA'dan 3 adet C -2 alt ünitesinin dekarboksilasyonu ile kondensasyon sonucu oluşur. Daha ileri reaksiyonları resveratrolün bifenolik halkasının 3. pozisyonunda glikozil ya da sülfat kalıntıları ile konjuge olmasıdır⁵³.

Resveratrolün büyük kısmı jejunumdan, az kısmı ileumdan emilir. Bazolateral tarafa transport edilen resveratrolün çoğu, glukuronid ve sülfat formlarına konjuge edilir. Tüm perfüze edilen resveratrolün ve konjugatlarının yalnızca % 6'sı barsak epitelini geçmektedir. Glikozile formu 3-O- β -D-glukozidtir. Glikozilasyon resveratrolün enzimatik olarak oksidasyonunu önler ve böylece biyolojik etkinliğini korur, kararlılığını ve biyoyararlanımını artırır. Barsak hücreleri sadece glikozile olmayan resveratrolü absorbe ettiği için emilim sürecinde glikozidazlar gerekir⁵³. Andlauer ve arkadaşlarının ratlarla yaptığı çalışmada absorbe edilen resveratrolün büyük bir kısmı glukoronide (%16,8) konjuge olmuştur. Değişmeden kalan trans-resveratrol oranı sadece %3,4 olarak tespit edilmiştir⁵⁶.

Düşük dozdaki resveratrolün plazmadaki ana metabolitleri glukuronidlerdir. Yüksek doz resveratrol uygulamasında plazmadaki önemli metabolitler monosülfatlar haline gelir. Yüksek doz resveratrol uygulamasında metabolizmanın ilk adımı 3-sülfo konjugasyondur. Bu adımı takiben glukuronidasyon veya sülfatlama oluşur⁵⁷. Resveratrol karaciğerde glukuronatlanır, karaciğer ve duodenumda sülfatlanır. Sülfatla konjugasyon resveratrolün biyoyararlanımında hız sınırlayıcı basamaktır⁵³.

Yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre resveratrol ve metabolitleri esas

olarak dışkı ve idrar yoluyla atılmaktadır⁵⁷. Atılım zamanı plazmada bulunan resveratrolün konsantrasyonuna bağlıdır. Üretilen miktar ile atılan miktar arasında ilişki yoktur. Çok küçük miktarda glikozile olmayan resveratrol idrarda bulunur. Böbrekte başlıca doğal formda bulunurken, idrarda konjuge formu büyük çoğunluktadır⁵³.

2.3.1. Resveratrolün Biyolojik Etkileri

Kuvvetli bir antioksidan olan resveratrolün; oksidatif stres, apoptoz, yaşlanma, hücre çoğalması, hücre farklılaşması ve inflamasyonun baskılanması gibi çeşitli biyolojik süreçlerde etkili olduğu kabul görmektedir^{50,58}.

Serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda çiftlenmemiş bir veya daha fazla tek elektron taşıyan moleküllere verilen isimdir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere oksidan moleküller veya reaktif oksijen partikülleri de denmektedir. Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere de antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir⁵⁹. Birçok çalışmada resveratrolün, hücresel antioksidan ve detoksifikasyon kapasiteyi artırarak hücreyi oksidatif hasara ve hücre ölümüne karşı koruduğu bildirilmiştir⁹. Resveratrol; katalaz, süperoksit dismutaz, hemooksijenaz-1 gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini yükseltmektedir⁵⁸. Jang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; serbest oksijen radikalleri üretimini uyaran zymosan ile indüklenen insan monositlerinde ve çeşitli hücre tiplerinde resveratrolün; ros ürünlerinin inhibitörü olduğu gösterilmiştir. Tadolini ve arkadaşları ise resveratrolün, membran içindeki lipid peroksil radikallerini tutarak lipid peroksidasyonunu engellediğini göstermiştir⁵⁰.

Apoptoz, kaspaz aktivasyonunu içeren karmaşık biyokimyasal kaskadlardan oluşan sıkı şekilde düzenlenmiş bir süreçtir. Kaspazlar, apoptoz başlatılması ve yürütülmesi ile ilgili sistein proteaz sınıfıdır¹⁰. Mekaniksel olarak iki farklı apoptoz tipi tarif edilmiştir; birincisi kaspaz-8 bağımlı ve reseptör aracılıklı tip-1 diğeri ise kaspaz-9 bağımlı ve mitokondri aracılıklı tip-2'dir. Resveratrolün farklı yollar vasıtası ile apoptoza aracılık ettiği gösterilmiştir. Fas yolağında; resveratrol ölüm reseptörlerini uyarmaktadır ki bu da tip-1 apoptozu aktive etmektedir. Fas (tip2 transmembran protein), tümör nekroz faktörü (TNF) süper ailesinin ölüm reseptörlerinden biridir. Clement ve arkadaşları resveratrolün, insan tümör hücrelerinde FasL (fas-ligand) sinyal

bağımlı apoptozu tetiklediğini belirtmiştir. Resveratrolün apoptoz üzerine mitokondriyal yolak aracılıklı etksi Dorrie ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmada ALL (akut lenfoblastik lösemi) hücrelerinde mitokondriyal membranların depolarizasyonu ve kaspaz -9 aktivasyonu ile resveratrolün apoptozu indüklediği gözlenmiştir. Rb (retinoblastoma protein) ve transkripsiyon faktörlerinin E2F (retinoblastom bağlayan protein) ailesi G1/ S (interfazın ilk safhası/DNA sentez safhası) fazına geçişte hücre döngüsünün ilerlemesini düzenleyen önemli proteinlerdir. Rb-E2F/DP (G1-S faz geçişini kontrol eden kompleks) yolağının resveratrol aracılıklı hücre döngüsü düzenlenmesinde ve apoptozda etkili olduğu Adhami ve arkadaşları tarafından ileri sürülmektedir. Resveratrolün bir tümör baskılayıcı gen olan p53'ün (protein 53) aktivasyonunu arttırarak apoptozu uyardığına dair çalışmalar mevcuttur. Resveratrol uyarımlı apoptoz aynı zamanda seramid üretimini de içermektedir⁶⁰. Seramidler apoptotik kaskadların aktivasyonunda ikincil haberci olarak rol oynamaktadır⁶¹. Bazı toksol gibi kemoterapötik ajanlar tübülün polimerizasyonu ile etkileşerek apoptozu uyarmaktadır. Resveratrol tübülün polimerizasyon yolağını kullanarak apoptozu öncülük edebilmektedir. Resveratrolün apoptozu uyardığı diğer bir yolak ise Adenilat-siklaz yolağıdır⁶⁰.

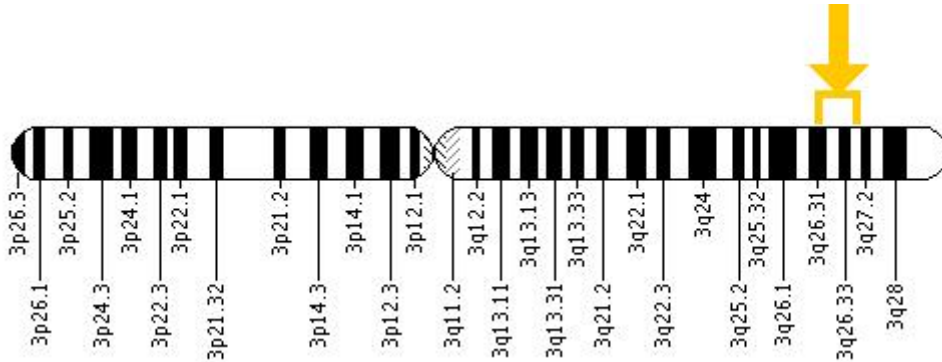
2.4. Sox Genleri

Sox genleri gen ifadesi ve düzenlenmesinde çok önemli rolü olan DNA bağlanma domainlerinin yapısındadır ve HMG (yüksek mobilite grup)-box süper ailesinin bir üyesi olup animalia şubesinde yüksek homoloji gösteren konservatif genlerdir⁶². Gelişimin erken aşamalarında birçok hücre tipinde ifade olan Sox proteinleri pluripotensinin korunmasında önem taşımaktadır⁶³. Germ tabakası oluşumu, hücre tipi tayini, organ gelişimi gibi çeşitli gelişimsel süreçlerin düzenlenmesinde görev almaktadırlar. Dolayısıyla sox genlerinin delesyonu veya mutasyonu insanlarda çoğunlukla gelişim kusurları ve konjenital hastalık ile sonuçlanır⁶². Sox grubuna ait genlerin sayısı 30 civarındadır. Sox grubu; yapısı ve fonksiyonu temel alınarak SoxA- J adı altında 10 alt gruba ayrılmış olup çeşitli hücre soylarında gelişimin düzenlenmesinde görev yapmaktadır. Sox proteinlerinin çoğu transkripsiyonel aktivatördür fakat bazıları represördür. SoxB'nin SoxB2 alt grubunun Sox14 ve Sox21 üyeleri transkripsiyonel represör iken; C-terminal bölgelerindeki farklılıktan dolayı

SoxB1 alt grubunun Sox1, Sox2, Sox3 üyeleri transkripsiyonel aktivatörlerdir⁶⁴. Sox genleri nörol dokuların, merkezi ve periferal sinir sisteminin, iskelet dokunun gelişiminde önemli rol oynamaktadır⁶⁵.

2.4.1. Sox 2

Sox2 geninin resmi adı sex deterring region Y-box2'dir. 3. kromozomun uzun kolu üzerinde 26.3 – 27. pozisyonlar arasında yer alan intronsuz bir gen olup, hücre kaderinin belirlenmesinde ve embriyonik gelişimin düzenlenmesinde etkili HMG -box ailesinin bir üyesini kodlar⁶. Sox2 geni, Sox gen alt familyasının B1 grubuna aittir. cDNA (komplamenter DNA) dizisi 2418 baz büyüklüğündedir. Hücrede; kendini yenileme, çoğalma ve apoptozda önemli rol oynamaktadır. Çoğu tümör tiplerinde aşırı ifade edilmektedir. Sox2'nin susturulmasının tümör oluşumunun kaybı ve çoğalmanın durması ile sonuçlanabileceği gösterilmiştir⁶⁶. Transkripsiyon faktörlerinin yüksek mobilite grubu ailesine dahil olan Sox2 farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerin korunmasında önem taşır^{66,67}.



Şekil 5: Sox2'nin 3. kromozom üzerinde lokalizasyonu⁶⁸

2.4.1.1. Sox2 ve Embriyonik Kök Hücre

Kök hücrelerin kendini yenilemesi, pluripotensinin kontrolü altındaki mekanizmaları ve hücre farklılaşmasını aydınlatmak için çeşitli çalışmalar embriyonik kök ve embriyonal kanser hücreleri üzerine yoğunlaşmıştır. Sox2 pluripotent kök hücrelerin belirteçidir⁶⁹. Kök hücrelerde pluripotensinin korunmasında OCT4 (oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktör 4), NANOG (Nanog homeobox) ve Sox2 birlikte görev

yapmaktadır. Sox2; OCT4 ile heterodimer olarak bulunmuştur. Embriyonik kök hücrelerin kendilerini yenilemesinde ve pluripotensinin korunmasında işlev gösteren bu üç faktör, çeşitli genlerin düzenleyici bölgelerinde birlikte yer aldığından ana düzenleyiciler (master regülatörler) olarak adlandırılmaktadır^{70,71}.

2.4.1.2. Sox2 ve Kanser

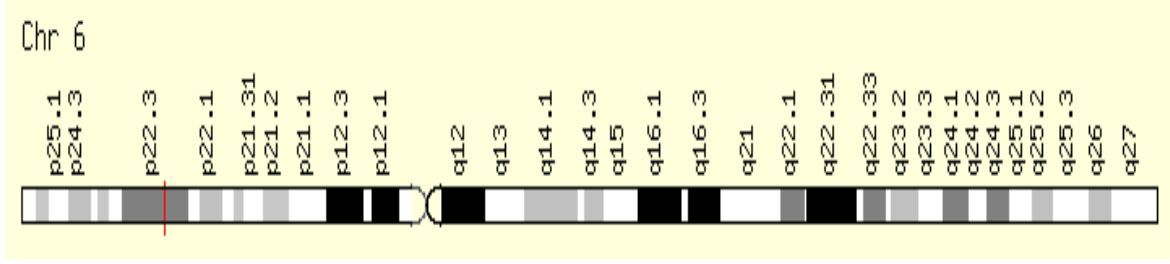
Ortaya çıkan çalışmalar Sox2'nin kök hücre özelliğini korumasının yanı sıra çeşitli kanser türleriyle ilişkili olduğunu; özofagus, akciğer gibi birçok kanser türlerinde amplifiye olduğunu göstermiştir⁶⁷. Sox2'nin aşırı ekspresyonu onkogeniktir ve akciğer-meme kanserlerinde hücre popülasyonunun büyümesini önemli ölçüde uyarmaktadır⁷⁰. Sox2'nin inhibisyonu prostat kanseri hücre dizilerinde hücre proliferasyonunu azaltmakta, apoptozu indüklemektedir⁶⁶. Dr Li ve arkadaşları, prostat kanseri hücre dizilerinde Sox2'nin hücre büyümesine katkıda bulunduğunu ve artan apoptoz direncine sebep olduğunu göstermiştir⁷². Nöral progenitör hücrelerden Sox2'nin ablasyonu gelişen beyinde artan apoptoz ile ilişkilendirilmiştir⁷¹. D121-SP (küçük hücreli dışı akciğer kanseri kök hücre hattı) akciğer karsinom hücrelerinde Sox2'nin siRNA (küçük müdahale RNA) teknolojisi kullanılarak baskılanması artan apoptozis ile sonuçlanmıştır⁷³.



Şekil 6: Sox2 proteininin kanserleşme sürecine etkisi⁶⁷

2.4.2. Sox4 Geni

6p22.3 bölgesinde lokalize olan Sox4 geni intronsuz bir gen olup hücre kaderinin belirlenmesinde ve embriyonik gelişimin düzenlenmesinde yer alan transkripsiyon faktörlerinin SRY ilişkili HMG-box ailesinin bir üyesini kodlar⁹. Sox4 geni Sox genleri alt familyasının C grubuna dahildir⁷⁴. Omurgalılarda çok önemli bir transkripsiyon faktörü olan Sox4 birçok dokuda hücre farklılaşması ve proliferasyonu için gereklidir⁷⁵.



Şekil 7: Sox4 geninin lokalizasyonu⁷⁶

2.4.2.1. Sox4 ve Kanser

Birçok kanser türünde Sox4 ekspresyonunun deregülasyonu ile artan kanser hücre proliferasyonu, hücre sağ kalımı, apoptozun inhibasyonu, tümör gelişimi ve metastaz arasında ilişki bulunduğu gösterilmiştir. Ancak bazı tümörlerde Sox4'ün tümör süpresör gibi davrandığı rapor edilmiştir. Bu zıtlık durumu; Sox4 aktivasyonunun hücre durumuna ve tümör orjinine göre farklılık gösterdiğini belirtmektedir⁷⁷. Son zamanlarda elde edilen bulgular, Sox4'ün meme kanseri, akciğer kanseri, kolon kanseri, medülloblastoma, tükrük bezi kanseri, hepatosellüler karsinom dahil olmak üzere bir çok tümörde upregüle olduğunu göstermiştir^{77,78}. Sox4 melanom, glioblastom ve lösemilerde aşırı ifade olmaktadır⁷⁴. Fare myeloid lösemi gelişiminde Sox4 geninin onkogen olduğu gösterilmiştir. Bu farklı tümörlerde aşırı eksprese olan Sox4'ün akciğer ve mesane kanseri hücre hatlarında ise tümör baskılayıcı etkisi olduğu ileri sürülmektedir⁷⁹.

Hedef genler temel alındığında Sox4'ün çeşitli şekillerde kanser gelişimini etkilediği söylenebilir. Birincisi Wnt, Notch, Hedgehog ve TGF β gibi gelişimsel yolların aktivasyonunda anahtar rol oynamaktadır. İkincisi NKX3.1 (homeobox protein Nkx. 3.1) transkripsiyon faktörlerinin baskılanması aracılığıyla farklılaşmayı inhibe etmektedir. Üçüncüsü tümörlerde hücre proliferasyonunu artırarak EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü), FGFR1 (fibroblast büyüme faktörü reseptörü benzeri 1) ve IGF2R (insülin benzeri büyüme faktörü 2 reseptörü) gibi büyüme faktörü reseptörlerini hedefler⁸⁰.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, cihazlar ve teknik malzemeler temin edildikleri firmalarla birlikte aşağıda belirtilmiştir.

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

- Besi yeri (Amcel grow ve Basal Media)
- Tripsin (MULTİCELL)
- Nikotin (Acros Organics)
- Resveratrol (Sigma)
- PBS (HyClone)
- RNA izolasyon kiti (Vivantis)
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems)
- Taq man Gene expression assay (Applied Biosystems)

3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler

- Steril kabin (KOJAİR)
- Etüv (MEMMERT)
- CO₂ inkübatörü (Hera cell 150)
- Santrifüj (Nüve Nf 800)
- İnvart mikroskop (Olympus CK40)
- - 20 (Bosch)
- Mikrosantrifüj (Techne force 16)
- Thermal Cycler (Bioer Xp Thermal Cycler)
- Real Time PCR cihazı (Applied Biosystems 7500)
- Vorteks (Nüve NM 110)

Araştırmanın yapıldığı Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarı, Ç.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda bulunmaktadır.

3.2. Amniyotik Sıvı Örneklerinin Sağlanması

Çalışma grupları Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Anabilim Dalı Polikliniğinde takip edilen amniyosentez yapılması zorunlu olan, sigara kullanmayan 25-30 yaş grubu ve 16-17 haftalık gebelerden oluşturuldu. Hastalar için yapılması gerekli olan testler tamamlandıktan sonra arta kalan amniyotik sıvılar hasta rızası alınarak çalışmamızda kullanıldı. Her hastanın amniyotik sıvısı 12-14 günlük kültür aşamasından sonra pasajlanarak 3 flaska ayrıldı. Flasklar kontrol grubu, nikotin grubu ve nikotin + resveratrol grubu olmak üzere 10 günlük kültür aşamasına tabi tutuldu.

3.2.1. Hasta Rızası

Çalışmada yer alan tüm hasta grubunun çalışmaya katılımları, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulları Araştırma Projesi Bilgi ve Taahhüt Formunda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmış hasta rıza formu doldurularak sağlandı (Ek-1).

3.3. Yöntem

3.3.1. Amniyotik Hücre Kültürü Ekim İşlemi

1. Şırıngadaki amniyotik sıvı örneklerinin 8cc'si steril falkonlara aktarıldı.
2. Falkonlar 1000 devirde 8 dakika santrifüj edildi.
3. Falkonlardaki süpernatant 1 cc'ye kadar atıldı.
4. Pipetaj yapıldıktan sonra pellet 2 cc besiyeri eklenmiş 2 farklı flaska bölündü.
5. Flasklara besiyeri aktarılma işlemi şu şekilde gerçekleştirildi:
Her hastadan alınan örnek için iki flask hazırlandı. Flasklardan birine 2 cc Amcel grow besiyeri diğerine ise Basal Media besiyeri eklendi. Besiyeri şırınga ile çekildi, şırınganın ucuna filtre takılarak flasklara aktarıldı. Flaskların üzerine besi yeri markasının ilk harfi ve tarih ve hastanın protokol numarası yazıldı. Flaskların kapakları inkübatöre konmadan önce CO₂ geçişine izin verecek şekilde ayarlandı.
6. Flasklar CO₂ inkübatöründe üremeye bırakıldı.
7. Ekimden 1 hafta sonra üreme kontrolü yapıldı.

8. Flasktaki besiyeri behere döküldü ve aynı besiyerinden 2 cc eklenerek medium değiştirme işlemi gerçekleştirildi.
9. 12. günde hasat ekilecek flask seçildi ve seçilen flaskın besiyeri değiştirildi.

3.3.2. Amniyotik Hücre Kültürü Pasaj İşlemi

Pasaj işlemi için hasta sonuçları verildikten sonra hasat etmediğimiz hücre kültürleri kullanıldı.

1. Daha önceden flasklara ekilmiş ve çoğaltılmış hücreler kullanıldı.
2. Flasklardaki besiyeri pastör pipeti yardımı ile falkonlara aktarıldı.
3. Flask tabanına yapışmış olan amniyotik hücreleri çözebilmek için flaska şırınga ile 1cc tripsin ilave edildi. Tripsinin her yere nüfuz etmesini sağlamak için flask hafifçe çalkalandı ve tripsin ile çözünen hücreler pastör pipeti yardımıyla falkona aktarıldı.
4. Arta kalan hücreleri de falkona aktarabilmek için için flaska 1 cc tripsin daha ilave edildi. Flasklar 37 derecelik etüvde flask 3-4 dakika bekletildi.
5. Hücrelerin flask tabanından çözünüp çözünmediğini anlamak için invert mikroskop altında flasklar incelendi.
6. Flasklara 2 cc yıkama besi yeri ilave edilerek çözülmüş olan amniyotik hücreler pastör pipeti yardımı ile falkona aktarıldı.
7. Falkon 1000 devirde 8 dakika santrifüj edildi.
8. Süpernatant 1,5 cc'ye kadar atıldı.
9. Pellet, aynı marka besiyeri konulan 3 flaska eşit olarak paylaştırıldı.
10. Flasklardan birincisi kontrol grubu olarak adlandırıldı.
11. İkinci flaska 100 mikro litre (20 ng/ml) nikotin ilave edildi ve nikotin grubu olarak adlandırıldı.
12. Üçüncü flaska 100 mikro litre (20 ng/ml) nikotin ve 100 mikro litre (0,5µM) resveratrol ilave edildi, nikotin+ resveratrol grubu olarak adlandırıldı.
13. Flasklar 10 gün süre ile CO₂ inkübatöründe üremeye bırakıldı.
14. İvert mikroskop altında üreme kontrolü yapıldıktan sonra hasat işlemi yapıldı.

3.3.3. Amniyotik Hücre Kültürü Hasat İşlemi

1. Üreme kontrolü yapılan flasklardaki besiyeri pastör pipeti yardımı ile falkonlara aktarıldı.
2. Besiyeri falkona aktarıldıktan sonra flask tabanına yapışmış olan amniyotik hücreleri çözebilmek için enjektör yardımı ile flaska 1 cc tripsin ilave edildi. Tripsinin flaskın her yerine nüfuz edebilmesi için flask hafifçe çalkalandı.
3. Tripsin ile çözünen hücreler pastör pipeti yardımı ile falkona aktarıldı.
4. Tamamen çözünemeyen hücreleri de falkona aktarabilmek için için flaska 1 cc tripsin daha ilave edildi ve 37 derecelik etüvde flask 3-4 dakika bekletildi.
5. Hücrelerin flask tabanından çözünüp çözünmediğini anlamak için invert mikroskop altında flasklar incelendi.
6. Flasklara 2 cc yıkama besiyeri ilave edilerek çözülmüş olan amniyotik hücreler pastör pipeti yardımı ile falkona aktarıldı.
7. Falkon 1000 devirde 8 dakika santrifüj edildi.
8. Süpernatant yarım cc'ye kadar atıldı.
9. Yıkama işleminin gerçekleştirilmesi için falkondaki pellet üzerine 1 ml PBS eklendikten sonra pastör pipeti ile pipetaj yapılarak PBS içindeki hücreler eppendorfa aktarıldı.
10. Eppendorflar vortekslelendikten sonra 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
11. Yıkama ve santrifüj işlemi tekrar edildi.
12. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Pellet RNA izolasyonu için kullanıldı.

3.3.4. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için Vivantis RNA izolasyon kiti kullanıldı. RNA izolasyon protokolü:

1. 350 µl Buffer TR pellet üzerine eklenir ve vortekslenir.
2. Karışım homojenizasyon kolonuna aktarılır. En yüksek devirde 2 dakika santrifüj edilir. Kolon içindeki örnek kullanılır.
3. Örneğin üzerine 350 µl %80'lik alkol eklenir, pipetaj yapılır ve RNA

bağlayıcı kolona aktarılır.

4. RNA bağlayıcı kolon 10.000 x g' de 1 dakika santrifüj edilir kolonun alt kısmında toplanan örnek atılır.
5. RNA bağlayıcı kolana 500 µl yıkama tamponu ilave edilir. En yüksek hızda 1 dakika santrifüj edilir. Kolonun alt kısmında toplanan örnek atılır.
6. 70 µl DNaz I parçalama karışımı RNA bağlayıcı kolona aktarılır ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletilir.
7. RNA bağlayıcı kolona 500 µl inhibitör removal tampon eklenir. En yüksek hızda 1 dakika santrifüj edildikten sonra kolonun alt kısmında toplanan örnek atılır.
8. RNA bağlayıcı kolana 500 µl yıkama tamponu ilave edilir. 10.000 x g' de 1 dakika santrifüj edilir. Kolonun alt kısmında toplanan örnek atılır. Bu işlem 2 defa tekrarlanır.
9. Kolon 10.000 x g' de 1 dakika santrifüj edilir. Kolonun alt kısmında toplanan örnek atılır.
10. Kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktırılarak membranın üzerine 40-60 µl RNAaz içermeyen su ilave edilir. 1 dakika bekletildikten sonra 10.000 x g' de 1 dakika santrifüj edilir. Mikrosantrifüj tüpünde toplanan RNA -20 °C veya -80 °C'de saklanır.

3.3.5. cDNA Eldesi

Elimizdeki RNA örneklerinden cDNA elde edebilmek için Applied Biosystems High- Capacity cDNA Reverse Transcription kiti kullanıldı. Revers transkripsiyon (RT) kit bileşenleri buz üzerinde çözdürüldükten sonra RT master mixi yine buz üzerinde hazırlandı. (Çizelge 1) cDNA revers transkripsiyon reaksiyonunu hazırlamak için 2xRT master mixten 10'ar mikro litre PCR tüplerine aktarıldı ve her tüpe pipetaj yapılarak 10 mikro litre RNA ilave edildi. Tüplerin üzerine RNA örneklerinin numaraları yazıldı. Numaralandırılan PCR tüpleri Thermal Cycler cihazına yerletirildi. cDNA reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için Çizelge 2'de belirtilen program kullanıldı.

Çizelge 1. 2xRT master mix bileşenleri ve miktarları.

2x RT Master Mix	Kullanılan miktar
10X RT Buffer	2.0 µl
25XdNTPkarışımı	0.8 µl
10X RT Random Primer	2.0 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0 µl
Nükleaz içermeyen Su	4.2 µl
1 reaksiyon için toplam hacim	10 µl

Çizelge 2. cDNA eldesi için Thermal Cycler’da kullanılan program

	1.Aşama	2.Aşama	3.Aşama	2.Aşama
Sıcaklık	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

3.3.6. Real Time RT- PCR

Real-time reverse-transkriptaz (RT) PCR; başlangıç miktarına göre oluşan, son PCR ürününün kuantifikasyonunun özgün, hassas ve diğer metodlara göre daha kolay tespit edilebildiği bir yöntemdir. Bu yöntemde; her bir PCR döngüsünde oluşan floresan ışınımı aracılığı ile son ürün miktarı tespit edilebilir⁸¹. Çalışmamızda Sox2 ve Sox4 genleri için tasarlanan FAM boyalı prob içeren TaqMan Gene Expression Assay kullanarak real-time RT- PCR reaksiyonunu gerçekleştirdik. TaqMan real-time PCR aşamasında üç çift primer kullanılır. 1. ve 2. primerler her bir DNA iplikciği üzerinden replikasyonu başlatır. 3. prob ise bu primerler arasından bir zincire bağlanır. Prob, iki modifiye edilmiş baz içerir; 5’ ucunda bulunan floresan reporter (R) ve 3’ucundaki floresan quencher (Q). Replikasyon esnasında 1. primer yönünde uzayan DNA iplikciği, probun 5’ucunu zincirden ayırır ve polimerazın eksonükleaz aktivitesi floresan reporter molekülünü probdan ayırır. Quencherden ayrılan reporter molekülü floresan ışımaya yapar.

Oluşan floresan ışınımın başlangıç miktarına göre oranı, her bir PCR döngüsünde ölçülür⁸¹.

Real Time PCR karışımı Çizelge 3’teki gibi hazırlandı. Hazırlanan PCR karışımı 96’lık plate’e 20’şer mikrolitre aktarıldı. Plate’in üstü şeffaf filmle kapatıldı ve üzerine koruyucu örtü yerleştirildi. Plate Applied Biosistem 7500 Real time- PCR cihazına yüklendi. Cihazın programı Çizelge 4’teki gibi ayarlandı.

Çizelge 3. Real Time RT- PCR reaksiyonunun bileşenleri ve miktarları

PCR Reaksiyon karışım bileşenleri	20 µl reaksiyon hacmi için
	Tek reaksiyon
20X TaqMan Gene Expression Assay	1.0 µl
2X TaqMan Gene Expression Master Mix	10.0 µl
cDNA örneği	4.0 µl
RNAaz- içermeyen su	5.0 µl

Çizelge 4. Applied Biosystems 7500 real -time RT-PCR için kullanılan Program

Isı Döngüsü Koşulları		
Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman(dd: ss)
Hold	50	2:00
Hold	95	10:00
Döngü (40 Döngü)	95	0:15
	60	1:00

3.3.7. Real Time RT- PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Ekspresyon düzeylerini belirlemek için Threshold Cycle (CT) veya crossing points (Cp) değerleri arasındaki farklılıklar llr⁸². Eşik-değer döngü (Threshold Cycle = C T) değeri bize; üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. CT; sistem başladığından itibaren, üstel oranda ürün oluşması ve logaritmik lineer faza geçiş noktasıdır⁸¹. Sox2 ve Sox4 genlerinin ekspresyon düzeylerini belirlemek için ΔC_p yöntemi kullanıldı. Sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak deęerlendirildi⁸³:

$$\Delta C_p = C_p \text{ hedef gen} - C_p \text{ referans gen}$$

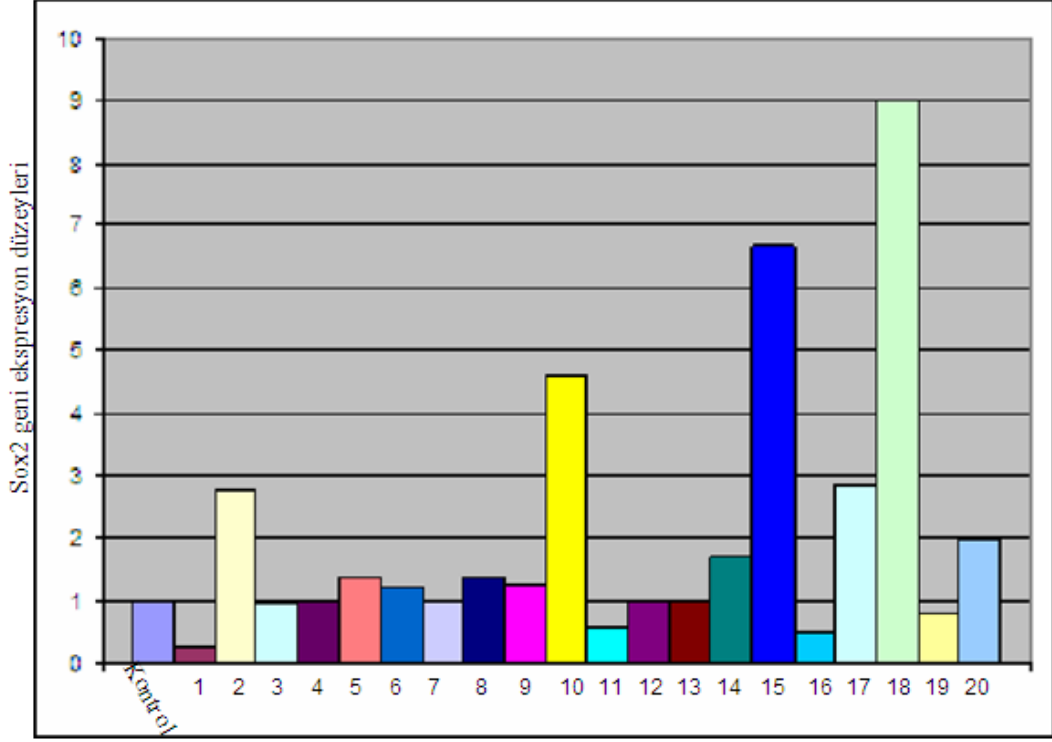
$$\Delta \Delta C_p = \Delta C_p \text{ muamele edilen} - \Delta C_p \text{ kontrol}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta \Delta C_p}$$

4. BULGULAR

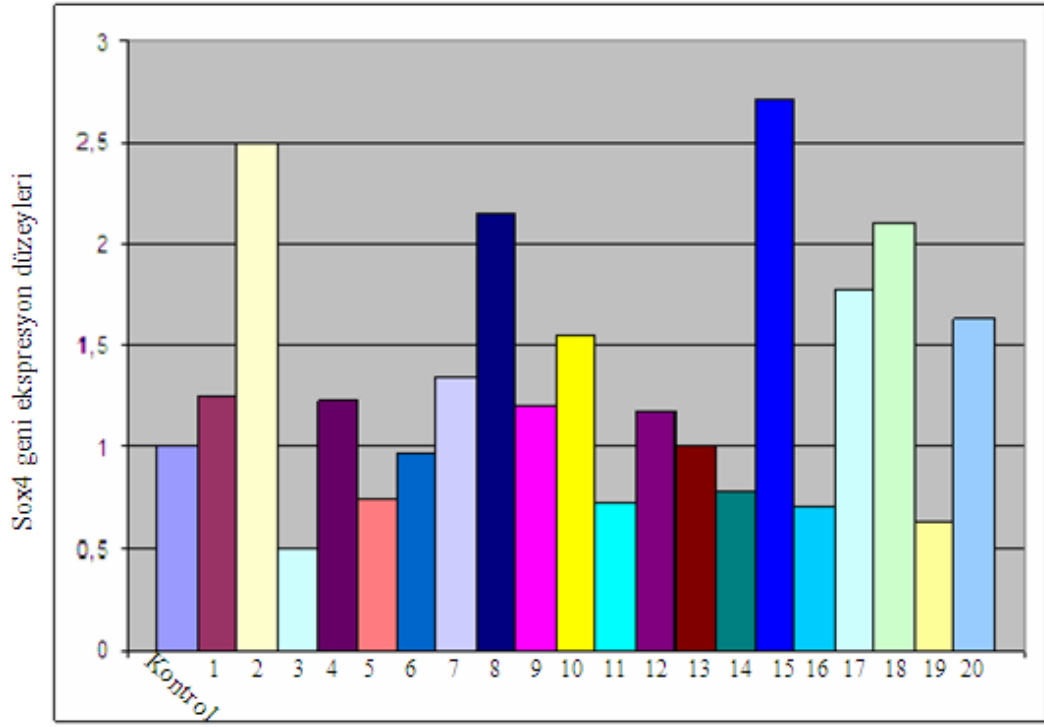
Çalışmamıza, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Doğum Anabilim Dalı polikliniğine başvuran amniyosentez yaptırması gerekli olan 20 hasta araştırmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen gebelerin yaş aralığı 25-35 olarak belirlenip gebelik sırasında sigara kullanmayan bireyler tercih edildi. Gebelik haftası 16-17 arasında olan gebelerin amniyon sıvısı kültüründen yaptırması zorunlu olan testler tamamlandıktan sonra elimizde kalan amniyotik hücre kültürleri araştırmamızda kullanıldı. Her hastanın hücre kültürü pasajlanarak 3 ayrı flaska aktarıldı. Flasklar yaptığımız işlemlere göre kontrol grubu, nikotin grubu ve nikotin + resveratrol grubu olarak isimlendirildi. RNA izolasyon kiti kullanılarak hücre kültürlerinden elde edilen RNA'lar cDNA kiti ile cDNA'ya dönüştürüldü. Sox2 ve Sox4 genleri için tasarlanan gen ekspresyon assay ile genlerin kontrol grubundaki, nikotin muamelesindeki ve nikotin + resveratrol muamelesindeki ekspresyon düzeylerine bakıldı. Ekspresyon düzeyleri Δ Cp yöntemi kullanılarak hesaplandı. Kontrol grubumuz her hasta grubunda Sox2 ve Sox4 genlerinin ekspresyon düzeyleri için 1 olarak belirlendi. Nikotin ve nikotin+resveratrol gruplarında Sox2 ve Sox4 genlerinin ekspresyon düzeyleri ise kontrol grubu ile referans gen olarak kullandığımız β aktin geninin ekspresyon düzeylerine bağlı olarak hesaplandı.

Nikotinin Sox2 ve Sox4 genlerinin ekspresyon düzeyi üzerindeki etkisi t testi ile hesaplandı. Nikotinin Sox2 ve Sox4 genlerinin ekspresyon seviyesi üzerinde etkili olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulundu. (Sox2 için $p=0,005$ - Sox4 için $p=0,000$) Nikotin hücre kültürlerinin %60'ında Sox2 geninin ekspresyonu artırırken % 30'unda ekspresyon seviyesinin düşmesine neden olmuştur. Amniyotik hücre kültürlerinin %10 'unda Sox2 geni ekspresyon düzeyi sabit kalmıştır. Şekil 8'de kontrol grubu Sox2 geni ekspresyon değeri ile nikotinle muamele edilen gruplara özgü Sox2 geni ekspresyon değerleri verilmiştir.



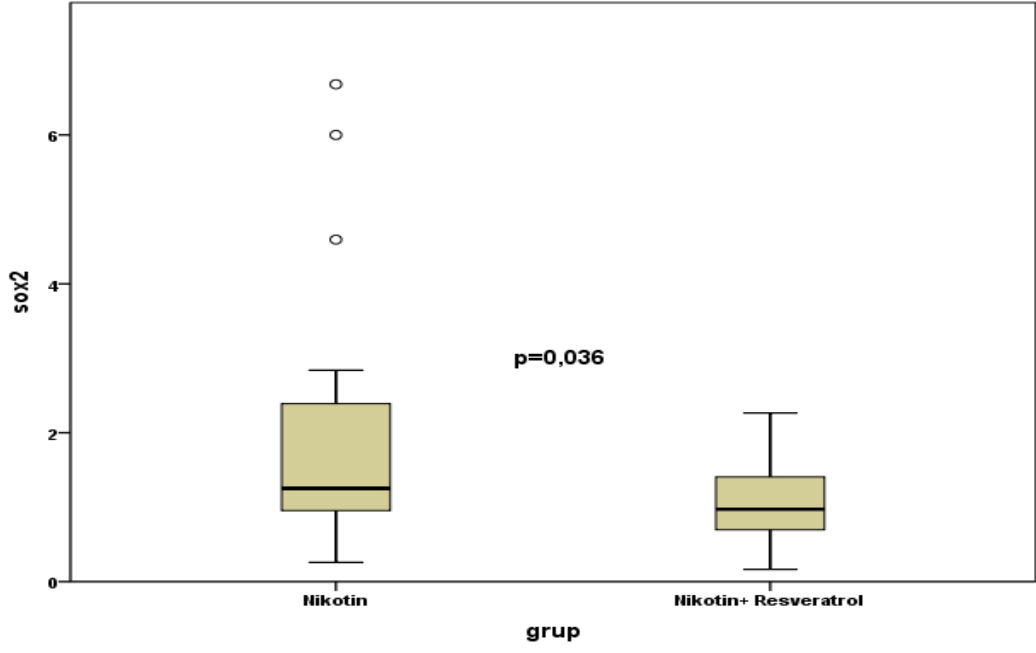
Şekil 8: Kontrol grubu ve 20 farklı hastaya ait nikotin gruplarında Sox2 ekspresyon değerlerini gösteren grafik.

Nikotin hücre kültürlerinin %60'ında Sox4 geninin ekspresyonu artırırken % 35'inde ekspresyon seviyesinin düşmesine neden olmuştur. Kültürlerin %5'inde ise Sox4 geni ekspresyon düzeyi sabit kalmıştır. Şekil 9'da kontrol grubu Sox4 geni ekspresyon değeri ile nikotinle muamele edilen gruplara özgü Sox4 geni ekspresyon değerleri verilmiştir.

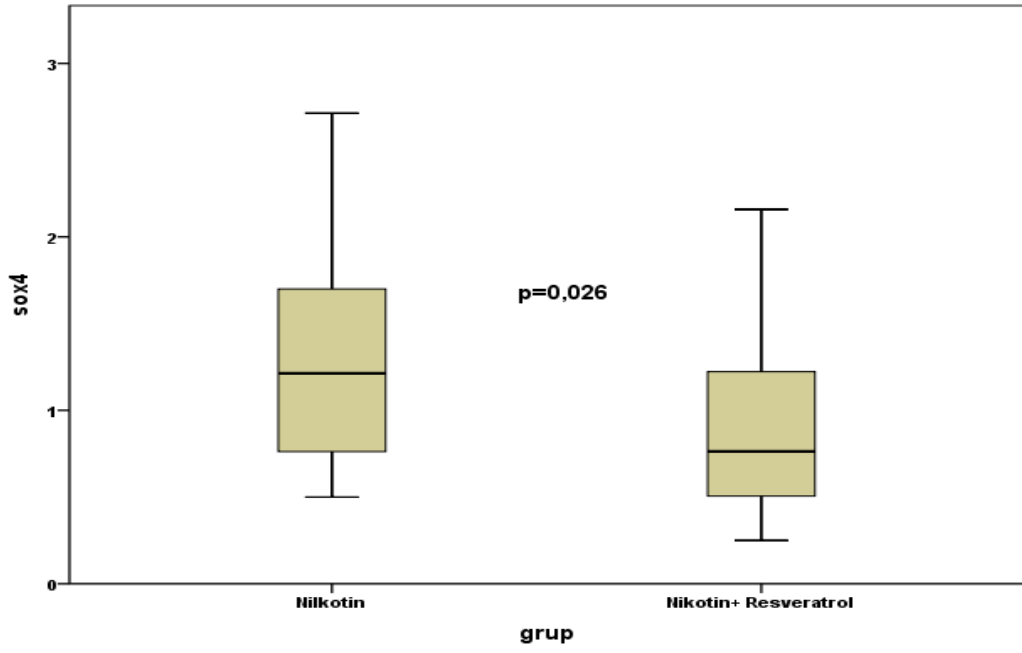


Şekil 9: Kontrol grubu ve 20 farklı hastaya ait nikotin gruplarında Sox4 ekspresyon değerlerini gösteren grafik.

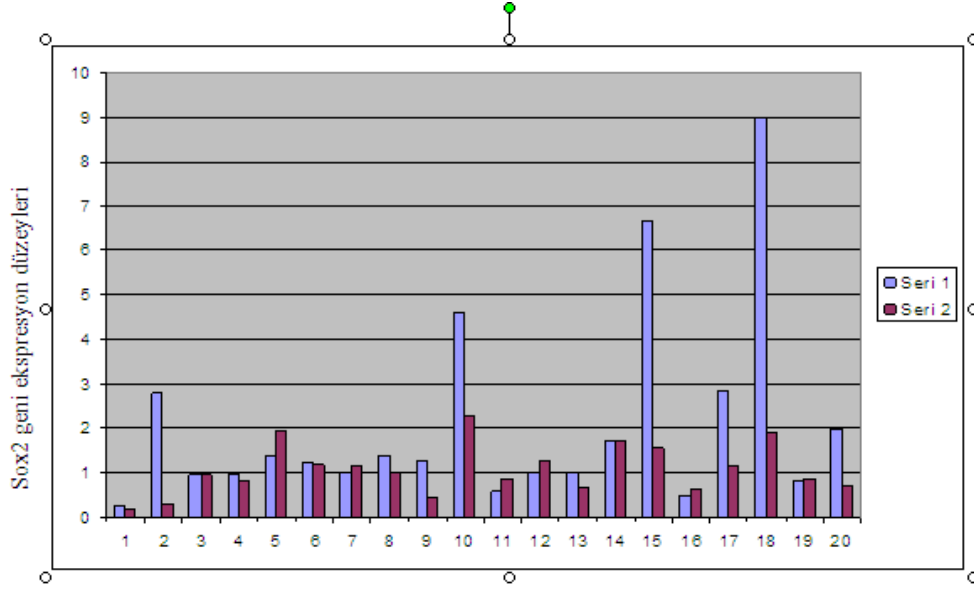
Resveratrolün; nikotinin uyardığı Sox2 ve Sox4 genleri ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi Wilcoxon testi ile hesaplandı ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.036$, $p=0.026$) (Şekil 10-11). Resveratrolün nikotinin uyardığı Sox2 ve Sox4 genlerinin ekspresyon düzeyini düşürdüğü belirlendi. Sox2 ve Sox4 genlerinin nikotin ve nikotin + resveratrol grubundaki ekspresyon düzeyleri Şekil 12-13’ de gösterilmiştir.



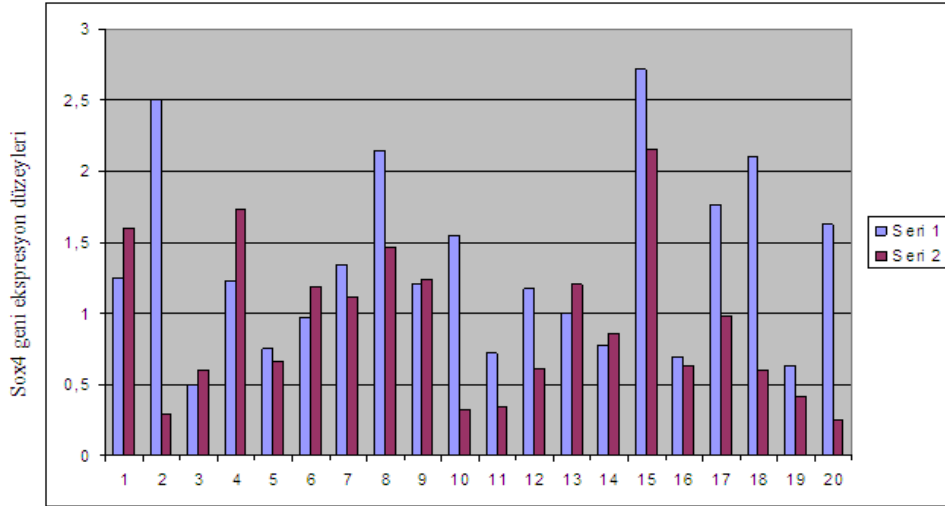
Şekil 10: Sox2 geni için wilcoxon analizi sonucu elde edilen p değeri



Şekil 11: Sox4 geni için wilcoxon analizi sonucu elde edilen p değeri



Şekil 12: 20 farklı hastaya ait nikotin ve nikotin+resveratrol gruplarında Sox2 ekspresyon değerlerini gösteren grafik (Seri 1: Nikotin grubu, Seri 2: Nikotin+Resveratrol grubu)



Şekil 13: 20 farklı hastaya ait nikotin ve nikotin+resveratrol gruplarında Sox4 ekspresyon değerlerini gösteren grafik (Seri 1: Nikotin grubu, Seri 2: Nikotin+Resveratrol grubu)

5. TARTIŞMA

Hamilelikte sigara içiminin fetus gelişiminde ve büyümesinde zararlı etkilerinin olduğuna dair kanıtlar bulunmasına rağmen her 3 kadından biri erken hamilelik döneminde sigara içmektedir¹². Hamilelik sırasında sigara kullanımı bebekte sağlık problemlerinin oluşma riskini artırmaktadır ve bu risk yetişkinlik döneminde de etkisini sürdürmektedir⁸⁴.

Sigarada bulunan en önemli toksik bileşen olan nikotin; gelişen fetusun maruz kaldığı tehlikeli evrensel kimyasallardan biridir. Epidemiyolojik çalışmalar; hamilelik sırasında maternal sigara içiminin çocuklarda hipertansiyon, obezite, disglisemi ve dislipidemiye neden olduğunu göstermiştir. Prenatal nikotin maruziyeti kan damarlarının yapısının ve reaktivasyonun gelişiminin yanı sıra enerji dengesini, yağ depolanmasının kontrolünü ve pankreatik langerhans adacıkların gelişimini değiştirmektedir. Bu risk pasif içici gebeleri de kapsamaktadır⁸⁵. Nikotin antioksidan enzimleri engelleyerek lipid peroksidasyonuna sebep olduğundan serbest radikallerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır⁸⁶. Nikotin çeşitli faktörleri uyararak apoptoza engel olmaktadır⁴. Fetal ve neonatal nikotin maruziyetinin kanser gelişiminde uzun süreli etkisi iyi bir şekilde incelenmemiştir ancak bu durumun risk oluşturabileceğine dair bir olasılık kesinlikle vardır. Nikotin ve metabolitleri tümör büyümesine teşvik etme ve tümör büyümesine katkıda bulunan özellikleriyle bilinir. Fetus düşük detoksifikasyon yeteneği nedeniyle bu etkilere karşı savunmasız olabilir⁸⁷.

İnsan amniyotik hücre kültürlerinin kullanıldığı çalışmamızda düzenleyici ve master gen özellikleriyle seçilmiş olan Sox2 ve Sox4 genlerinin ekspresyon düzeyleri nikotin varlığında belirgin bir artış göstermiştir. Genel olarak bakıldığında hücre kültürlerinin yaklaşık olarak %60'ında nikotinin etkisinin ilgili iki genin gen ifade düzeylerini istatistikî olarak anlamlı derecede arttırmış olması beklentilerimize uygundur. Çünkü HMG- box ailesi içinde yer alan ve DNA bağlanma özelliği nedeniyle de güçlü bir transkripsiyon faktörü olan Sox2 ve Sox4 genleri özellikle erken embriyonik evrede çok aktif genler arasında yer almaktadır. Amniyotik hücreler her ne kadar erken embriyonik hücreler olmasa da farklılaşmış ve özelleşmiş hücrelere göre de bir geçiş grubu oluşturmaktadır. Zaten Sox2 ve Sox4 genlerinin bulunduğu doku, görev

ve fonksiyondan kaynaklanan bazal veya doğal olarak tanımlanabilecek bir ekspresyon düzeyleri bulunmaktadır. Bu nedenle nikotin ile muamele edilmiş amniyotik hücre kültürlerinde saptanan ilgili genlerin gen ifadesi artışının nikotinden kaynaklandığını söyleyebiliriz. Bu açıdan değerlendirdiğimizde çalışmamıza esas olan amniyotik hücre kültürlerinde nikotinin agonist etkisiyle Sox2 ve Sox4 ifadeleri büyük oranda artarken %30'luk bölümünde ise düşüş göstermiştir. Her ne kadar nikotinin bu genlerin ifadesine etkisi t-testi analizi ile anlamlı olduğu bulunmuşsa da bu etkinin gen ekspresyonunun artması mı yoksa azalması yönünde olduğunu kavramada sadece yüzde olarak bir açıklama yapabilmekteyiz. Nikotinin etkisiyle Sox2 ve Sox4 geni ifade düzeyinde beklenenin tersine meydana gelen düşüşün kullandığımız amniyotik hücre kültüründe yer alan heterojen hücre ve doku farklılığının yanı sıra çalışmada kullanılan kültür hücrelerinin senkronize olmamasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Genel olarak Sox2 ve Sox4 ile ilgili çalışmalar, bu genlerin artan ekspresyonunun apoptozu önleyerek hücre bölünmesini ve proliferasyonunu tetiklediğini ortaya çıkarmıştır.

Bareiss ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı bir çalışmada; Sox2 geni ve insan ovaryum kanseri ile arasında bir ilişki olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada; insan ovaryum kanser hücre serilerinde Sox2 geni ekspresyonunun, kanser kök hücre markerlarının ekspresyon düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. Buna ilaveten, Sox2 ekspresyonunun apoptozu azalttığı ve böylece kemoterapi uygulamalarına karşı direnç gösterdiği raporlanmıştır⁸⁸. Vamsidhar ve arkadaşlarının Sox2 genin akciğer skuamöz hücreli karsinom (SCC) ve akciğer adenokarsinomda (ADC) yüksek oranda ifade olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda Sox2 geninin ekspresyon düzeyinin SCC hücre hatlarında ADC hücre hatlarına göre daha yüksek olduğu bulunurken, Sox2 geninin ekspresyon düzeyinin doku ve hücre tipine göre farklılık gösterilebileceği belirtilmiştir⁸⁹. Gangemi ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptığı çalışmada ise gliyoblastom tümörü tetikleyen hücrelerde Sox2 geninin sessizleştirilmesiyle birlikte hücre proliferasyonunun ve tümörijenik yeneğin inhibe olduğu gösterilmiştir. Daha önceki çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da Sox2 geninin sessizleştirilmesi sonucunda apoptozun artmasının, hücre çoğalmasını ve hücrelerin tümör oluşturma yeteneğini azalttığı sonucuna varmışlardır⁹⁰. Hui ve Shaojun'un insan gliyoma hücre hatlarını arsenik trioksit ile muamele ederek Sox2 geninin ekspresyonunu azaltarak apoptozun indüklendiğini göstermişlerdir⁹¹. Tian ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada

ise gastrik kanserlerinde kök hücre benzeri hücrelerde Sox2 geninin siRNA'lar aracılığıyla sessizleştirilmesi sonucu apoptoz oranının arttığı ve tümör oluşumunun baskılandığı rapor edilmiştir⁹². Shabo ve arkadaşları çocukluk çağında en sık görülen ekstrakraniyal solid tümör nöroblastomla ilgili çalışmalarında Sox2'nin aşırı eksprese olduğunu göstermiştir⁹³. Bu çalışmalar Sox2 geninin hücrede; kendini yenileme, çoğalma ve apoptozda önemli rol oynadığını göstermektedir. Sox2 geni çoğu tümör tiplerinde aşırı ifade edilmektedir. Sox2'nin susturulmasının tümör oluşumunun kaybı ve çoğalmanın durması ile sonuçlanabileceği gösterilmiştir⁶⁶

Ruizhe ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; mide kanseri hücre hatlarında Sox4 geninin ekspresyon düzeyinin arttığını ve siRNA yoluyla Sox4 geninin sessizleştirilmesi sonucu apoptozun indüklendiği gözlenmiştir⁹⁴. Güneş ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, üroteliyal mesane kanserinde Sox4 ekspresyon seviyesinin immünohistokimyasal ve real-time PCR yöntemi ile belirlenmiş olup mesane tümörlerinde bu genin ekspresyon seviyesinin normal dokulara göre daha fazla olduğu bulunmuştur⁹⁵. Wonhee Hur ve arkadaşları hepatosellüler hücre hatlarında p53 yolağı üzerinde Sox4 etkisini ve etkileşimini değerlendirmiş; artan Sox4 ekspresyonunun p53 aracılıklı apoptozu inhibe ederek hepatokarsinogeneze katkıda bulunduğunu ileri sürmüşlerdir⁸. Pramoenjago ve arkadaşları yaptıkları çalışmada adenoid kistik karsinomda aşırı eksprese olan genlerden biri olan Sox4'ün RNA interferenz aracılıklı susturulmasının apoptozun artmasına yol açtığını göstermiş; böylelikle Sox4'ün hücre sağ kalımını teşvik ederek adenoid kistik karsinom hücrelerinin malign fenotipe katkıda bulunduğunu ileri sürmüştür⁹⁶. Sox4'ün hücre kaderindeki ve gelişimindeki anahtar rolü dikkate alındığında farklılaşmış hücrelerde bu genin yeniden ekspresyonu artan antiapoptotik özellikler ve kendini yenileme ile olgun hücrelerin farklılaşmasının bozulmasına sebep olabileceği hipotezi kurulabilir⁹⁷.

Bu tür çalışmalar bizim çalışmamızla direkt bağlantılı olmamakla beraber nikotinin genel anlamda genler üzerinde antiapoptotik etkisinin gösterilmiş olması artan Sox2 ve Sox4 gen ifadeleriyle ortak bir kesişim noktası oluşturmaktadır.

Bizim hipotezimizi destekler nitelikte yapılan birçok çalışmada nikotinin kanserleşme sürecinde etkili olduğu ve apoptozu engel olduğu gösterilmiştir. Susan ve arkadaşları nikotinin apoptoz üzerindeki etkisini göstermek için yaptığı çalışmada nikotinin, tümör nekrozis faktör ve UV- uyarılı apoptozu engellediğini belirtmiştir⁵.

Akciğer karsinom hücrelerinde ise nikotinin, antiapoptotik olarak görev yapan protoonkogen Bcl-2'nin fosforilasyonunu uyardığı Haiqiang ve arkadaşları tarafından gözlenmiştir³⁹. Naoya ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kanser kök hücre işaretleyicisi aldehit dehidrogenazla (ALDH) flow sitometre kullanarak MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde nikotinin, kanser kök hücreleri populasyonu üzerine etkisini incelemiş ve nikotinin ALDH pozitif hücre populasyonunu artırdığını bulmuşlardır⁹⁸. Heeschen ve arkadaşları umbilikal ven toplardamar endotel hücrelerinde ve kroner atar damar endotel hücrelerinde nikotinin doza bağlı olarak hücre sayısını artırdığını fakat 24 saat boyunca düşük oksijen konsantrasyonuna (%3 oksijen) maruz kalan hücrelerde nikotinin apoptotik hücre sayısını azalttığını saptamıştır³².

Bu nedendir ki tümörögenезis ile ilgili yapılan çalışmalarda Sox2 ve Sox4 genlerinin hedef olarak seçilmesi anti- apoptotik özellikleri nedeniyle hücre ve genom hasarının kümülatif olarak birikmesi ile ilişkilidir. Nikotin de tek başına ele alındığında tümöröjenik etkisi benzer şekilde antiapoptotik özelliğinden kaynaklanmaktadır.

Bu bilgiler ışığında nikotin etkisi ile apoptozun engellenmesinin, hasarlı hücre birikimine sebep olarak bebeğin doğum öncesinde veya ilerleyen yaşlarda çeşitli hastalıklara yakalanma riskinin artmasına neden olabileceğini söyleyebiliriz. Gelişimin kontrolünde yer alan master düzenleyici gen ailelerinden biri Sox gen ailesidir⁹⁹. Sox2 ve Sox4 genlerinin master genler olduğu dikkate alınrsa nikotin muamelesi ile bu genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimin; maternal sigara içimi etkisi ile bebekte oluşabilecek çeşitli biyolojik komplikasyonların genetik temeli ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Bu da çalışmanın çok önemli sonuçlarından biri olması nedeniyle dikkat çekicidir.

Nikotin ile muamele edilen amniyotik hücre kültürü grupları ile nikotin + resveratrol ile muamele edilen hücre kültürü gruplarında; Sox2 ve Sox4 genlerinin ekspresyon düzeyleri wilcoxon testi ile analiz edildi. Resveratrol muamelesi sonucunda her iki genin ekspresyon düzeyinde anlamlı bir düşüş gözlemlendi. Resveratrolün nikotin aktivitesinin tersi yönde etki göstermesi daha önce yapılan çalışmalarla tutarlılık göstermiştir. Serbest radikallerin etkisizleştirilmesinde çok önemli rolü olan resveratrol, bu özelliği nedeniyle nikotinin hücre üzerinde oluşturduğu etkiyle antagonist etkileşimde bulunur. Ancak nikotinin Sox2 ve Sox4 genleri üzerindeki antiapoptotik özelliği arttırıcı etkileşiminde, resveratrolün bu etkiyi kaldıran ve apoptozu tetikleyen

özelliğın ortaya çıkması, Sox genlerinin çalışma ritmini bozabilme ihtimalini de beraberinde getirmektedir. Bu nedenle resveratrol tehlikelidir sonucuna ulaşmamak için resveratrolün erken embriyonik hücrelerde Sox genleri üzerindeki etkisini net gösterebilecek bir deney düzeneğine ihtiyaç vardır.

Yapılan çeşitli çalışmalarda resveratrolün apoptozu uyardığına ve kanser gelişimini engellediğine dair veriler mevcuttur. Hongqiao ve arkadaşları insan bronşiyal hücre dizileri ile yaptıkları çalışmada resveratrol muamelesinin kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesini arttırarak sigara dumanı özünün neden olduğu kaspaz aktivitesinin kaybını önlemede etkili olduğunu göstermiş resveratrolün bu hücre dizilerinde apoptozu arttırdığını belirtmiştir¹⁰. Nihal ve arkadaşları insan epidermoid karsinom A431 hücrelerine resveratrolün apoptoz üzerinde doza bağlı olarak arttırıcı etkisi olduğunu göstermiş apoptozun en yüksek olduğu konsantrasyonu 25 mM olarak belirlemiştir¹⁰⁰. Dixan ve arkadaşları LNCaP ve PC-3 prostat kanseri hücre serilerinin her ikisinde de resveratrolün; kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesini etkileyerek apoptozu arttırdığını saptamıştır¹⁰¹. Ferry-Dumazet ve arkadaşları çeşitli insan lösemi hücre dizilerinde resveratrolün apoptoz üzerine etkisini incelemiş ve resveratrolün bu hücre dizilerinde apoptozu uyardığını gözlemlemiştir¹⁰².

Bu veriler doğrultusunda resveratrolün nikotinin inhibitörü gibi davranarak nikotin muamelesi ile artan Sox2 ve Sox4 genlerinin ekspresyon düzeylerini azalttığını ve anti-apoptotik aktiviteye karşı hücreleri koruduğunu söyleyebiliriz. Elde ettiğimiz sonuçlar hamilelik sırasında çevresel sigara dumanı maruziyetinin etkilerini kısmen de olsa azaltabilmek için resveratrol içeriği yüksek gıdalar tüketmenin önemini vurgulamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Doğum Anabilim Dalı polikliniğine başvuran amniyosentez yaptırması gerekli olan 20 hasta araştırmaya dahil edildi. Hastaların yaptırması gerekli olan testler tamamlandıktan sonra hücre kültürleri pasajlanarak her hasta için kontrol grubu, nikotin ile muamele edilen grup ve nikotin+ resveratrol ile muamele edilen hücre kültürü grupları oluşturuldu. Grupların her biri moleküler biyolojik yönden değerlendirilmiş ve aşağıda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir

1. Nikotin ile muamele edilen insan amniyotik hücre kültürü gruplarında Sox2 geni ekspresyon seviyesinde anlamlı bir fark gözlenmiştir. ($p=0,005$)

2. Nikotin ile muamele edilen insan amniyotik hücre kültürü gruplarında Sox4 geni ekspresyon seviyesinde anlamlı bir fark gözlenmiştir. ($p=0,000$)

3. Nikotin ile muamele edilen grup ile nikotin+resveratrol ile muamele edilen grup kıyaslanığında Sox2 geninin ekspresyon düzeyinde anlamlı bir fark gözlenmiş ($p=0,036$); resveratrolün, nikotin etkisi ile artan Sox2 geni ekspresyonunu azatlığı belirlenmiştir.

4. Nikotin ile muamele edilen grup ile nikotin+resveratrol ile muamele edilen grup kıyaslanığında Sox4 geninin ekspresyon düzeyinde anlamlı bir fark gözlenmiş ($p=0,026$); resveratrolün, nikotin etkisi ile artan Sox4 geni ekspresyonunu azatlığı belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada farklı tipte hücreler içeren amniyotik hücre kültürü kullanılması ve bireysel farklılıklar nedeniyle nikotinin, Sox2 ve Sox4 genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi farklı hastalara ait hücre kültürlerinde değişkenlik göstermiştir. Nikotin ile Sox2 ve Sox4 genlerinin ekspresyon düzeyi arasındaki ilişkinin araştırıldığı ulusal bir yayına rastlanmaması nedeniyle elde ettiğimiz bulgular ulusal verilerle karşılaştırılamamıştır. Sonuç olarak nikotinin hücre üzerindeki Sox2 ve Sox4'ün genler üzerindeki örtüşen antiapoptotik etkisinin belirli spesifik hücre hatlarında çalışılarak etkileşimin net olarak ortaya konması sağlanabilir.

KAYNAKLAR

1. **Robinson DM, Peebles KC, Kwok H, Adams BM, Clarke LL, Woollard GA, Funk GD.** Prenatal nicotine exposure increases apnoea and reduces nicotinic potentiation of hypoglossal inspiratory output in mice. *Journal of Physiology*. **2002**; 53 (pt3):957–973.
2. **Bruchova H, Vasikova A, Merkerova M, Milcova A, Topinka J, Balascak I, Pastorkova A, Sram RJ, Brdicka R.** Effect of Maternal Tobacco Smoke Exposure on the Placental Transcriptome. *Placenta*, **2010**; 31(3):186–191.
3. **Rogers JM.** Tobacco and Pregnancy: Overview of Exposures and Effects. *Birth Defects Research*, **2008**; 84:1–15.
4. **Catassi A, Servent D, Paleari L, Cesario A, Russo P.** Multiple roles of nicotine on cell proliferation and inhibition of apoptosis: implications on lung carcinogenesis. *Mutation research*, **2008**; 659: 221–231.
5. **Wright SC, Zhong J, Zheng H, Larrick JW.** Nicotine Inhibition On Apoptosis Suggest A Role in Tumor Promotion. *FASEB Journal*, **1993**; 7(11):1045-51.
6. Sox2 SRY (Sex determining region Y)-box2 [homo sapiens]. Erişim: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6657>) 2012. Erişim Tarihi: 02.01.2012
7. **Cimpean AM, Encica S, Raica M, Ribatti D.** SOX2 gene expression in normal human thymus and thymoma. *Clin Exp Med*, **2011**; 11:251–254.
8. **Hur W, Rhim H, Jung CK, Kim JD, Bae SH, Jang JW, Yang JM, Oh ST, Kim DG, Wang HJ, Lee SB, Yoon SK.** SOX4 overexpression regulates the p53-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma: clinical implication and functional analysis in vitro. *Carcinogenesis*, **2010**; 31:1298–1307.
9. Sox4 SRY (Sex determining region Y)-box4 [homo sapiens]. Erişim: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6659>) 2012. Erişim Tarihi: 02.01.2012
10. **Zhang H, Shih A, Rinna A, Forman HJ.** Exacerbation of tobacco smoke mediated apoptosis by resveratrol: an unexpected consequence of its antioxidant action. *Int J Biochem Cell Biol*, **2011**; 43(7):1059–1064.
11. **Csiszar A, Labinskyy N, Podlutzky A, Kaminski PM, Wolin MS, Zhang C, Mukhopadhyay P, Pacher P, Hu F, de Cabo R, Ballabh P, Ungvari Z.** Vasoprotective effects of resveratrol and SIRT1: attenuation of cigarette smoke-induced oxidative stress and proinflammatory phenotypic alterations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2008**; 294(6):H2721–H2735.
12. **Hylkema MN, Blacquièrre MJ.** Intrauterine effects of maternal smoking on sensitization, asthma, and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, **2009**; 6(8):660-2.
13. **Votavova H, Merkerova MD, Fejglova K, Vasikova A, Krejcik Z, Pastorkova A, Tabashidze N, Topinka J, Veleminsky MJ, Sram RJ, Brdicka TR.** Transcriptome alterations in maternal and fetal cells induced by tobacco smoke. *Placenta*, **2011**; 32(10):763-70.
14. **Narin F, Yavaşcan S, Narin N, Akgün H, Baykan A, Üzüm K, Saraymen Y.** Yenidoğan Ratlarda Nikotin İle Oluşturulan Miyokardiyal Hasarın Biyokimyasal ve Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, **2006**; 4(2): 49-57.

15. **Sütçü R, Doğuç D, Aktürk O, Altuntaş İ, Delibaş N.** Subkronik nikotin uygulamasının, ratlarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitelerine etkisi. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg*, **2006**; 13(3):17-20.
16. **Hukkanen J, Jacob P 3rd, Benowitz NL.** Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. *Pharmacol Rev.* **2005**; 57(1):79–115.
17. **Üneri Ö, Tural Ü, Çakın N.** Şizofreni ve Sigara İçimi: Biyolojik Bağlantı Nerede? *Türk Psikiyatri Dergisi*, **2006**; 17(1):55-64.
18. Tütün kullanımının tarihçesi. Erişim: (<http://www.toraks.org.tr/userfiles/file/TütünKullanımınınTarihçesi>) 2013. Erişim tarihi: 05.06.2013
19. Nicotine. Erişim: (<https://en.wikipedia.org/wiki/Nicotine>) 2013. Erişim tarihi: 05.06.2013
20. The history of nicotine. Erişim: (<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/nicotine/E-historique.html>) 2013. Erişim tarihi: 05.06.2013
21. Nicotine: The Masked Killer Erişim: (<http://www.healthcare.uiowa.edu/corefacilities/esr/education/2001/4/WangM-paper4.pdf>) 2013. Erişim tarihi: 08.06.2013
22. **Yıldız D.** Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol*, 2004; 43(6):619–632.
23. The Metabolism of nicotine Erişim: (<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/nicotine/E-metabolisme.html>) Erişim Tarihi: 06.06. 2013
24. **Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P.** Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. *Handb.Exp Pharmacol*, **2009**; (192):29–60.
25. **Cashman JR, Park SB, Yang ZC, Wrighton SA, Jacob P 3rd, Benowitz NL.** Metabolism of Nicotine by Human Liver Microsomes: Stereoselective Formation of trans-Nicotine Oxide. *Chem. Res. Toxicol*, **1992**; 5:639-646
26. **Li D, Huang X, Han K, Zhan CG.** Catalytic Mechanism of Cytochrome P450 for 50-Hydroxylation of Nicotine: Fundamental Reaction Pathways and Stereoselectivity. *J. Am. Chem. Soc*, **2011**; 133:7416–7427.
27. Nicotine Erişim : (<http://onlinebildiri.com/ubk2012/uploaddoc/349.pdf>) 2013. Erişim Tarihi: 10.06. 2013
28. Glucuronidation Erişim: (<http://en.wikipedia.org/wiki/Glucuronidation>) 2013. Erişim Tarihi: 10.06.2013
29. **Kalaycıyan A, Serdaroğlu S.** Nikotin ve Deri. *Dermatose*, **2005**; 3:127-133
30. Cholinesterase Inhibitors: Including Pesticides and Chemical Warfare Nerve Agents Erişim: (<http://www.atsdr.cdc.gov/csem/cholinesterase/docs/cholinesterase.pdf>) 2013.Erişim Tarihi: 12.06.2013.
31. **Uğur M.** Sigara Bağımlılığı ve Kadın, Türkiye’de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar *Sempozyum Dizisi* **2008**; S:127-142.

32. **Zeidler R, Albermann K, Lang S.** Nicotine and apoptosis. *Apoptosis.*, **2007**; 12:1927–1943.
33. **Qiao D, Seidler FJ, Slotkin TA.** Oxidative mechanisms contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2005**; 206(1): 17– 26.
34. **Maritz GS.** Are nicotine replacement therapy, varenicline or bupropion options for pregnant mothers to quit smoking? Effects on the respiratory system of the offspring. *Ther Adv Respir Dis*, **2009**; 3(4):193-210.
35. **Jain A, Flora SJ.** Related effects of nicotine on oxidative injury in young, adult and old rats. *J. Environ. Biol*, **2012**; 33:233-238.
36. **Dey SK, Roy S.** Role of Reduced Glutathione in the Amelioration of Nicotine-Induced Oxidative Stress. *Bull. Environ Contam Toxicol*, **2010**; 84:385–389.
37. **Dennery PA.** Oxidative stress in development: Nature or nurture? *Free Radical Biology and Medicine*, **2010**; 49:1147–1151.
38. **Lüleyap H. Ü,** *Moleküler Genetiğin Esasları.* Birinci basım, Nobel Kitabevi, **2008**
39. **Mai H, May WS, Gao F, Jin Z, Deng X.** A Functional Role for Nicotine in Bcl2 Phosphorylation and Suppression of Apoptosis. *J. Biol. Chem*, **2003**; 278(3):1886–1891.
40. **Dasgupta P, Rizwani W, Pillai S, Kinkade R, Kovacs M, Rastogi S, Banerjee S, Carless M, Kim E, Coppola D, Haura E, Chellappan S.** Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *Int J Cancer*, **2009**; 124(1): 36–45.
41. **Lee HJ, Guo HY, Lee SK, Jeon BH, Jun CD, Lee SK, Park MH, Kim EC.** Effects of nicotine on proliferation, cell cycle, and differentiation in immortalized and malignant oral keratinocytes. *J Oral Pathol Med*, **2005**; 34:436–43.
42. **Argentin G, Cicchetti R.** Genotoxic and Antiapoptotic Effect of Nicotine on Human Gingival Fibroblasts. *Toxicological Sciences*, **2004**; 79:75–81.
43. **Attia SM.** The genotoxic and cytotoxic effects of nicotine in the mouse bone marrow. *Mutation Research*, **2007**; 632:29–36.
44. **Demirhan O, Demir C, Tunç E, İnandıkhoğlu N, Sütcü E, Sadıkoğlu N, Özcan B.** The genotoxic effect of nicotine on chromosomes of human fetal cells: The first report described as an important study. *Inhalation Toxicology*, **2011**; 23(13): 829–834.
45. **Dunckley T, Lukas RJ.** Nicotine Modulates the Expression of a Diverse Set of Genes in the Neuronal SH-SY5Y Cell Line. *The Journal of Biological Chemistry*, **2003**; 278(18):15633–640.
46. **Gozen O, Balkan B, Yildirim E, Koylu EO, Pogun S.** The Epigenetic Effect of Nicotine on Dopamine D1 Receptor Expression in Rat Prefrontal Cortex. *SYNAPSE*, 2013; 67(9):545–52.
47. **Thum T, Erpenbeck VJ, Moeller J, Hohlfeld JM, Krug N, Borlak J.** Expression of Xenobiotic Metabolizing Enzymes in Different Lung Compartments of Smokers and Nonsmokers. *Environmental Health Perspectives*, **2006**; 114(11):1655-61
48. **Genedani S, Bernardi M, Bertolini A.** Sex-Linked Differences in Avoidance Learning in the Offspring of Rats Treated with Nicotine during Pregnancy. *Psychopharmacology*, **1983**; 80:93-95.

49. **Wickström R.** Effects of Nicotine During Pregnancy: Human and Experimental Evidence. *Current Neuropharmacology*, **2007**; 5:213-22.
50. **Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y.** Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer Research*, **2004**; 24:2783-840
51. **Alkan R.** Natural Plant Antibiotics: Resveratrol. *Gıda*, **2007**; 32(5):259-262.
52. **Evren M, Koca İ.** Resveratrol ve Sağlık Üzerine Etkisi. Türkiye 10. Gıda Kongresi. Erzurum-Türkiye, 21-23 Mayıs 2008:1099-1102
53. **Sayın O, Arslan N, Güner G.** Resveratrol ve Kardiyovasküler Sistem. *Türk Biyokimya Dergisi*, **2008**; 33 (3):117–121.
54. **Delmas D, Lançon A, Colin D, Jannin B, Latruffe N.** Resveratrol as a Chemopreventive Agent: A Promising Molecule for Fighting Cancer. *Current Drug Targets*, **2006**;7(4):423-42.
55. Resveratrol. Erişim: (<http://en.wikipedia.org/wiki/Resveratrol>) 2013. Erişim tarihi: 15.06. 2013.
56. **Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C.** Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *Journal of Controlled Release*, **2012**; 158:182–193.
57. **Cottart CH, Niyet-Antoine V, Beaudoux JL.** Review of recent data on the metabolism, biological effects, and toxicity of resveratrol in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**; 1–15.
58. **Keskin N, Noyan T, Kunter B.** Resveratrol ile Üzümden Gelen Sağlık. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, **2009**; 29(5):1273-9.
59. **Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T.** Reactive oxygen particles and antioxidant defence. *Journal of the Turkish Nephrology Association*, **1997**; 3-4:92-95.
60. **Bishayee A.** Cancer Prevention and Treatment with Resveratrol: From Rodent Studies to Clinical Trials. *Cancer Prev Res.* **2009**; 2:409-418.
61. **Haimovitz-Friedman A, Kolesnick RN, Fuks Z.** Ceramide signaling in apoptosis. *Br Med Bull*, **1997**; 53(3):539-53.
62. **Wegner M.** From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Research*, **1999**; 27(6):1409–1420.
63. **Alatzoglou KS, Kelberman D, Dattani MT.** The role of SOX proteins in normal pituitary development. *Journal of Endocrinology*, **2009**; 200:245–258.
64. Sox Proteins and Neurogenesis. Erişim: (<http://publications.ki.se/xmlui/bitstream/handle/10616/39734/thesis.pdf?sequence=1>) 2013.Erişim tarihi: 18.06. 2013.
65. **Hunt SM, Clarke CL.** Expression and Hormonal Regulation of the Sox4 Gene in Mouse Female Reproductive Tissues. *Biology of Reproduction*, **1999**; 61:476–481.
66. **Lin F, Lin P, Zhao D, Chen Y, Xiao L, Qin W, Li D, Chen H, Zhao B, Zou H, Zheng X and Yu X.** Sox2 targets cyclinE, p27 and survivin to regulate androgen-independent human prostate cancer cell proliferation and apoptosis. *Cell Prolif*, **2012**; 45:207–216.
67. **Liu K, Lin B, Zhao M, Yang X, Chen M, Gao A, Que FLJ, Lan X.** The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cellular Signalling*, **2013**; 25:1264–1271

68. Sox2. Erişim: (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SOX2>) 2013. Erişim tarihi: 20.06. 2013
69. **Drakulic D, Krstic A and Stevanovic M.** Establishment and initial characterization of *SOX2*-overexpressing NT2/D1 cell clones. *Genetics and Molecular Research*, **2012**; 11(2):1385-1400.
70. Function of Sox2 as a transcriptional repressor Erişim: (http://etheses.nottingham.ac.uk/2229/1/Thesis_1015.pdf) 2013. Erişim Tarihi: 18.06. 2013.
71. **Lodato MA, Ng CW, Wamstad JA, Cheng AW, Thai KK, Fraenkel E, Jaenisch R, Boyer LA.** SOX2 Co-Occupies Distal Enhancer Elements with Distinct POU Factors in ESCs and NPCs to Specify Cell State. *PLOS Genetics*, **2013**; 9(2):1-19
72. **Wu J.** New players in apoptosis. *Journal of Molecular Cell Biology*, **2011**; 3(4):203.
73. **Xiang R, Liao D, Cheng T, Zhou H, Shi Q, Chuang TS, Markowitz D, Reisfeld RA, Luo Y..** Downregulation of transcription factor SOX2 in cancer stem cells suppresses growth and metastasis of lung cancer. *British Journal of Cancer*, **2011**; 104:1410 –1417.
74. **Huang J, Arsenault M, Kann M, Lopez-Mendez C, Saleh M, Wadowska D, Taglienti M, Ho J, Miao Y, Sims D, Spears J, Lopez A, Wright G, Hartwig S.** The Transcription Factor Sry-Related HMG Box-4 (SOX4) is Required for Normal Renal Development. *In Vivo Developmental Dynamics*, **2013**; 242:790–799.
75. **Scharer CD, McCabe CD, Ali-Seyed M, Berger MF, Bulyk ML, Moreno CS.** Genome-Wide Promoter Analysis of the SOX4 Transcriptional Network in Prostate Cancer Cells. *Cancer Res*, **2009**; 69(2): 709-17
76. Sox4 Genecards Erişim:(<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SOX4>) 2013. Erişim Tarihi: 18.06.2013.
77. **Lin CM, Fang CL, Hseu YC, Chen CL, Wang JW, Hsu SL, Tu MD, Hung ST, Tai C, Uen YH, Lin KY.** Clinical and Prognostic Implications of Transcription Factor SOX4 in Patients with Colon Cancer. *PLoS One*, **2013**; 8(6):e67128.
78. **Pan X, Zhao J, Zhang WN, Li HY, Mu R, Zhou T, Zhang HY, Gong WL, Yu M, Man JH, Zhang PJ, Li AL, Zhang XM.** Induction of SOX4 by DNA damage is critical for p53stabilization and function. *PNAS*, **2009**;106(10): 3788–3793.
79. **Lai YH, Cheng J, Cheng D, Feasel ME, Beste KD, Peng J, Nusrat A, Moreno CS.** SOX4 interacts with plakoglobin in a Wnt3a dependent manner in prostate cancer cells. *BMC Cell Biology*, **2011**; 12:50.
80. **Aue G, Du Y, Cleveland SM, Smith SB, Davé UP, Liu D, Weniger MA, Metais JY, Jenkins NA, Copeland NG, Dunbar CE.** Sox4 cooperates with PU.1 haploinsufficiency in murine myeloid leukemia. *Blood*, **2011**; 118(17):4674-81.
81. Real Time PCR. Erişim: (<http://www.belgeler.com/blg/2bjg/taqman>) 2013. Erişim Tarihi: 28.06.2013.
82. **Michael W.** Relative quantification International University Line. Erişim: (<http://www.gene-quantification.eu/pfaffl-rel-quant-book-ch3.pdf>) 2013.Erişim Tarihi: 22.05.2013
83. **Pfaffl M.** Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung BIO spektrum.Erişim: (<http://physio.wzw.tum.de/fileadmin/Forschung/2004/Pfaffl-04fa04-02.pdf>) 2013. Erişim Tarihi: 22.05.2013
84. Maternal smoking and human fetal development Erişim:(<http://www.gla.ac.uk>) 2013. Erişim Tarihi:18.06.2013.

85. **Somm E, Schwitzgebel VM, Vauthay DM, Aubert ML, Hüppi PS.** Prenatal nicotine exposure and the programming of metabolic and cardiovascular disorders. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2009**; 304:69–77.
86. **Asadi E, Jahanshahi M, Golalipour MJ.** Effect of Vitamin E on Oocytes Apoptosis in Nicotine-Treated Mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, **2012**; 15(3):880-884.
87. **Bruin JE, Gerstein HC, Holloway AC.** Long-Term Consequences of Fetal and Neonatal Nicotine Exposure: A Critical Review. *Toxicological Sciences*, **2010**; 116(2):364–374.
88. **Bareiss PM, Paczulla A, Wang H, Schairer R, Wiehr S, Kohlhofer U, Rothfuss OC, Fischer A, Perner S, Staebler A, Wallwiener D, Fend F, Fehm T, Pichler B, Kanz L, Quintanilla-Martinez L, Schulze-Osthoff K, Essmann F, Lengerke C.** SOX2 expression associates with stem cell state in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* **2013**; 73(17):5544-55
89. **Velcheti V, Schalper K, Yao X, Cheng H, Kocoglu M, Dhodapkar K, Deng Y, Gettinger S, Rimm DL.** High SOX2 Levels Predict Better Outcome in Non-Small Cell Lung Carcinomas. *Plos One*, **2013**; 8(4):e61427.
90. **Gangemi RM, Griffero F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, Ravetti GL, Zona GL, Daga A, Corte G.** SOX2 Silencing in Glioblastoma Tumor-Initiating Cells Causes Stop of Proliferation and Loss of Tumorigenicity. *Stem Cells*, **2009**; 27:40–48.
91. **Sun H, Zhang S.** Arsenic trioxide regulates the apoptosis of glioma cell and glioma stem cell via down regulation of stem cell marker Sox2. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011; 410(3):692-697.
92. **Tian T, Zhang Y, Wang S, Zhou J, Xu S.** Sox2 enhances the tumorigenicity and chemoresistance of cancer stem-like cells derived from gastric cancer. *J Biomed Res*, **2012**; 26(5):336-45.
93. **Yang S, Zheng J, Ma Y, Zhu H, Xu T, Dong K , Xiao X.** Oct4 and Sox2 are overexpressed in human neuroblastoma and inhibited by chemotherapy. *Oncology Reports*, **2012**; 28:186-192.
94. **Shen R, Pan S, Qi S, Lin X, Cheng S.** Epigenetic repression of microRNA-129-2 leads to overexpression of SOX4 in gastric cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2010**; 394(4):1047-1052.
95. **Gunes S, Yegin Z, Sulu Y, Buyukalpelli R, Bagci H.** SOX4 expression levels in urothelial bladder carcinoma. *Pathology – Research and Practice*, **2011**; 207(7) :423–427.
96. **Pramoonjago P, Baras AS and Moskaluk CA.** Knockdown of Sox4 expression by RNAi induces apoptosis in ACC3cells. *Oncogene*, **2006**; 25:5626–5639.
97. **Sandoval S, Kraus C, Cho EC, Cho M, Bies J, Manara E, Accordi B, Landaw EM, Wolff L, Pigazzi M, Sakamoto KM.** Sox4 cooperates with CREB in myeloid transformation. *Blood*, **2012**; 120(1):155-65
98. **Hirata N, Sekino Y, Kanda Y.** Nicotine increases cancer stem cell population in MCF-7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2010**; 403:138–143.
99. **Prior HM, Walter MA.** Sox genes: Architects of Development. *Molecular Medicine*, **1996**; 2(4):405-12.
100. **Ahmad N, Adhami VM, Afaq F, Feyes DK, Mukhtar H.** Resveratrol Causes WAF-1/p21-mediated G1-phase Arrest of Cell Cycle and Induction of Apoptosis in Human Epidermoid Carcinoma A431 Cells. *Clin Cancer Res*, 2001; 7:1466-1473.

101. Benitez DA, Pozo-Guisado E, Alvarez-Barrientos A, Fernandez-Salguero PM, Castellón EA. **Mechanisms Involved in Resveratrol-Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Prostate Cancer-Derived Cell Lines.** *Journal of Andrology*, 2007; **28(2):282-93**
102. Ferry-Dumazet H, Garnier O, Mamani-Matsuda M, Vercauteren J, Belloc F, Billiard C, Dupouy M, Thiolat D, Kolb JP, Marit G, Reiffers J, Mossalayi MD. **Resveratrol inhibits the growth and induces the apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells.** *Carcinogenesis*, 2002; **23(8):1327-1333.**

EKLER

EK-1 Hasta Rıza Formu

AMNİYOTİK HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMASI ONAM FORMU

İnsan Amniyotik Hücre Kültürlerinde Nikotin ve Resveratrolün Sox2 ve Sox4 Genlerinin Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisinin Real Time PCR Yöntemi ile İncelenmesi

Prof. Dr. Ümit Lüleyap danışmanlığında, Yüksek Lisans Öğrencisi Gamze Cömertpay tarafından yüksek lisans tez çalışması olarak sürdürülecek olan çalışmamızda nikotin ve resveratrolün amniyotik hücre kültürlerinde belirli genlerin ekspresyon profili üzerine etkisi araştırılacaktır.

Çalışmamız çerçevesinde Ç.Ü.T.F. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü Sitogenetik Laboratuvarına gelen hastaların yaptıkları test sonucu artan amniyotik sivilarından yararlanılacaktır. Sonuçlar sadece bilimsel amaçlı kullanılacak, kişisel bilgileriniz gizli tutulacaktır. Parasal bir ödeme yapmanızı gerektirmeyen ve size bir ödeme yapılmasının söz konusu olmadığı çalışmaya katılmama hakkınız ve istediğiniz zaman çalışmadan çekilme hakkınız bulunmaktadır.

Araştırmaya katılmayı kabul ettiğiniz takdirde bölümümüzde yaptığınız test sonrası arta kalan amniyotik sivilarınız kullanılacaktır.

Bu çalışmayla ilgili ek bilgi talebiniz olursa sözlü olarak karşılanacaktır. Aşağıda isimleri ve telefon numaraları bulunan araştırmacılar tarafından gerekli bilgilendirmeler yapılacaktır.

Bio. Gamze Cömertpay: Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı: (0322) 338 60 60 / 3498

YUKARIDA BELİRTİLEN KOŞULLARI OKUDUM, KANIMDAN GENETİK İNCELEME YAPILMASINI KABUL EDİYORUM.

Hasta veya hukuksal olarak sorumlu kişi	şahit Kişi	Amniyotik Sivisi Kullanılan kişi
Adı-Soyadı:	Adı-Soyadı:	Adı-Soyadı:
İmza:	İmza:	İmza:
Tarih:	Hastaya Yakınlığı:	

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Adana’da doğdu. İlk, orta ve lisans öğrenimini burada tamamladı. 2004 yılında Adana Ticaret Odası Anadolu Lisesi’nden mezun oldu ve Çukurova Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nü kazandı. 2010 yılında lisans eğitimini tamamladı ve aynı yıl Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans programına başladı.