

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RESVERATROL VE TANNİK ASİDİN, İNSAN MEME KANSER (MCF-7)
HÜCRE DİZİSİNDE APOPTOZ VE TELOMERAZ ENZİM AKTİVİTESİNE
ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AHU SOYOCAK

DANIŐMAN:

Prof. Dr. AYŞE BAŞARAN

Ocak 2008

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ahu SOYOCAK'ın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı 'Resveratrol ve Tannik Asidin, İnsan Meme Kanseri (MCF-7) Hücre Dizilerinde Apoptoz ve Telomeraz Enzim Aktivitesine Etkileri' başlıklı bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek 'KABUL' edilmiştir.

Tarih: 03.01.2008

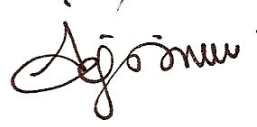
ÜYE: Prof.Dr.Ayşe BAŞARAN



ÜYE: Prof.Dr.Hasan Veysi GÜNEŞ



ÜYE: Prof.Dr.İrfan DEĞİRMENCI



ÜYE: Doç.Dr. Nilüfer ERKASAP



ÜYE: Yrd.Doç.Dr. Hülyam KURT



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Yönetim Kurulu'nun 10/01/2008 Tarih ve 926/2379 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr.Ferruh YÜCEL

Enstitü Müdürü

‘RESVERATROL VE TANNİK ASİDİN, İNSAN MEME KANSER (MCF-7) HÜCRE DİZİSİNDE APOPTOZ VE TELOMERAZ ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİLERİ’ başlıklı bu tez Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından **2007011014** nolu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	viii
SUMMARY.....	ix
ŞEKİL DİZİNİ.....	x
TABLO DİZİNİ.....	xv
SİMGE VE KISALTMALAR.....	xvi
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Resveratrol.....	5
2.2. Tannik Asit.....	11
2.3. Apoptoz.....	13
2.3.1. Apoptoz Mekanizması.....	13
2.4. Telomer ve Telomeraz Enzimi.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Gereç.....	29
3.1.1 Hücre Dizisi.....	29
3.1.2 Kimyasal Maddeler.....	29
3.1.3 Malzemeler.....	32
3.1.4 Aygıtlar.....	33
3.2 Yöntem.....	35
3.2.1 Hücre Kültürü.....	35
3.2.1.1 Sterilizasyon.....	35
3.2.1.2 Kullanılan Besiyeri ve Hazırlanışı.....	35
3.2.1.2.1 MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Dizisi.....	36
3.2.1.3 Kültür Aşaması ve Pasajlama.....	36
3.2.1.4. Tripan Blue Boyama Yöntemi.....	37
3.2.1.5. Hücrelerin Ölçümler için Hazırlanması.....	38

3.2.2. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) Yöntemiyle Apoptoz Tayini	40
3.2.2.1 Apoptotik İndeks.....	42
3.2.3. İmmunohistokimya Protokolü ile Bak belirlenmesi.....	43
3.2.3.1 İmmunohistokimyasal İndeks	45
3.2.4. TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) Yöntemi İle Telomeraz Aktivitesinin Ortaya Çıkarılması ve ELISA ile Aktivitenin Belirlenmesi.....	45
3.2.4.1. Kit İçeriği.....	46
3.2.4.2. Hücre Ekstraktının Hazırlanması.....	49
3.2.4.3. Negatif Kontrolün Hazırlanması	49
3.2.4.4. Pozitif Kontrolün Hazırlanması.....	49
3.2.4.5. TRAP (Telomerik Tekrarı Çoğaltma Yöntemi = Telomeric Repeat Amplification Protocol) Yöntemi.....	50
3.2.4.6. PCR'ın Kontrolü.....	52
3.2.4.6.1. Poliakrilamid Jel Hazırlanması için Gerekli Solüsyonlar.....	52
3.2.4.6.2. Poliakrilamid Jel Elektroforez Yöntemi.....	52
3.2.4.6.3. Gümüş Boyama Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar.....	53
3.2.4.6.4. Gümüş Boyama Yöntemi.....	53
3.2.4.7. Hibridizasyon ve ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi.....	54
3.2.4.8. Hesaplama.....	56
3.2.5. İstatistiksel Değerlendirme.....	57
4. BULGULAR.....	58
4.1. Apoptoz ile ilgili bulgular.....	59
4.2. Bak ile ilgili bulgular.....	67
4.3. Telomeraz Aktivitesi	75
5. TARTIŞMA.....	83
6. SONUÇ.....	90
KAYNAKLAR.....	91
ÖZGEÇMİŞ.....	99

ÖZET

Resveratrol (3,4',5 trihydroxystilbene); stilben fitoaleksindir. Resveratrol *Polygonum cuspidatum* (çoban değneği) bitkisinin kökü, kırmızı şarap ve yer fıstığı yanında, dut, çilek, böğürtlen gibi küçük yumuşak meyvelerde tesbit edilmiştir. Resveratrolün lipid metabolizmasını düzenleme, eikosanoid sentezini inhibe etme ve trombosit çökmesini baskılama gibi özellikleri yanında antioksidan, antikanserojen, antiinflamatuvar, antimutajen, antiproliferatif, antiviral, antibakteriyal, östrojenik ve damar gevşetici özellikler gibi biyolojik aktiviteleri de bulunmaktadır.

Taninler moleküler ağırlıkları 500-3000 Da. olan polifenolik bileşiklerdir. Taninler hidrolize ve kondanse taninler olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Yaygın olarak tannik asit olarak isimlendirilen hidrolize taninler, ya gallotanin ya da ellagiktanin içerirler. Tanin içeren polifenoller anti tümör, antiviral, antiHIV, lipid peroksidasyon inhibisyonu ve plazmin aktivitesi gibi biyolojik aktivitelere sahiptirler.

Bu çalışmada, MCF-7 hücre dizisinden oluşturulan gruplarda, resveratrol ve tannik asidin, apoptotik indekse, Bak proteinine ve telomeraz enzim aktivitesine olan etkileri incelenerek bu parametreler üzerine hangi maddenin daha etkili olduğu araştırıldı.

Bu çalışmada kullanılan MCF-7 hücre dizisinden, 24., 48. ve 72. saatlerde incelenmek üzere, madde verilmeyen, resveratrol ve tannik asidin 25, 50, 100 µM dozlarının verildiği gruplar oluşturuldu. Bu gruplarda, apoptoz Apop Taq peroxidase kiti (Chemicon) ile Bak proteini [Bak monoklonal antikor (Neomarkers)] immunohistokimyasal boyama yöntemi ile belirlendi. Telomeraz enzim aktivitesi ölçümü ise TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} (Roche) kiti ile belirlendi.

Çalışmamızın sonucunda, apoptotik indeks ve % Bak oranını artırmada ve telomeraz enzim aktivitesini düşürmede tannik asit resveratrole göre daha etkili bulundu.

Anahtar Sözcükler : Apoptoz, Bak, MCF-7, Resveratrol, Tannik Asit, Telomeraz

SUMMARY

Resveratrol (3,4',5 trihydroxystilbene); stilben is a member of the phytoalexin family. Resveratrol the root of *Polygonum cuspidatum* was determined in red wine and peanut, as well as in such soft small fruit as mulberry, strawberry and blackberry. Resveratrol is known to regulate metabolism of the lipid, inhibit eicosanoid synthesis and suppress platelet aggregation, apart from functioning as an antioxidant, anti-carcinogenic, anti-inflammatory, anti-mutagenic, anti-proliferative, antiviral, antibacterial, estrogenic and vasodilator agent.

Tannins are polyphenolic compounds with a molecular weight of 500-3000 Da. They split into two categories: hydrolysed and condense tannins. Generally known as tannic acid, hydrolysed tannins contain either gallotanin or ellagictanin. Polyphenols containing tannin can function as anti-tumour agents, apart from functioning as antiviral, anti-HIV and inhibiting agent for lipid peroxidation.

The present study aimed to investigate effects of resveratrol and tannic acid upon groups made up of MCF-7 cell line, apart from determining their effects upon apoptotic index, Bak protein and telomerase enzyme activities. The present study, therefore, aimed to determine whether resveratrol or tannic acid had more effects upon these parameters.

Using substance-free resveratrol and tannic acid with varying doses of 25, 50, 100 μ M, groups were established out of MCF-7 cell line to be examined at 24th, 48th and 72nd hours. For these groups, apoptosis was determined via Apop Taq peroxidase kit (Chemicon), while Bak protein [Bak monoclonal antibody (Neomarkers)] was determined via immunohistochemical stain method. Determination of Telomerase enzyme activity was achieved by means of the Telomerase ELISA measurement kit TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} (Roche).

The present study concluded that tannic acid was more effective in increasing percentage of Bak protein and decreasing telomerase activity than was Resveratrol.

Key words: Apoptosis, Bak, MCF-7, Resveratrol, Tannic Acid, Telomerase

ŞEKİL DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Trans- ve cis- resveratrolün kimyasal yapısı ve Endojen östrojen 17 β -estradiol ve sentetik östrojen diethylstilbestrol ün kimyasal yapısı	5
Şekil 2.2. Stilben, flavon, lignan ve isoflavon arasındaki ilişki.....	6
Şekil 2.3. Resveratrol apoptoza neden olan farklı yolları uyarır.....	9
Şekil 2.4. Fas sinyal iletimi yoluyla apoptoz	14
Şekil 2.5. TNF α sinyal yoluyla apoptoz	16
Şekil 2.6. Bcl-2 ailesi üyelerinin sınıflandırılması	17
Şekil 2.7. Aktifleşen Bid ile Bak aktivasyonu	19
Şekil 2.8. Aktifleşen Bid ile Bak ve Bax aktivasyonu	19
Şekil 2.9. Mitokondrial yolda Bad proteini ile apoptoz	20
Şekil 2.10. TNF ve Ras/Raf/ERK yoluyla hücre sağ kalımı.....	21
Şekil 2.11. PI3 kinaz/Akt(PKB)yoluyla hücre sağ kalımı.....	22
Şekil 2.12. Lineer kromozomda telomerler ve Kromozomlar telomerleri sayesinde nükleer laminaya tutunup belli bir pozisyonda kalırlar.....	23

Şekil 2.13. İnsan kromozumuna ait telomerinin sub ve esas telomerik bölgeleri.....	24
Şekil 2.14. Telomeraz enzim kompleksi	25
Şekil 2.15. Telomeraz enzim kompleksi modelive telomer DNA'sı ile telomeraz RNA'sı	26
Şekil 2.16. Çeşitli canlılarda TERT proteininin kısımları	27
Şekil 2.17. Normal somatik hücrelerin telomer boyuyla ilişkili olarak yaşlanması ve Telomeraz enziminin yeniden aktive olarak telomer boyunu uzatması ile ölümsüz kanser hücrelerinin oluşması.....	28
Şekil 3.1. Flask tabanına tutunmuş MCF-7 hücre dizisinin görüntüsü.....	39
Şekil 4.1. MCF-7 hücrelerinin boyanmamış görüntüsü	58
Şekil 4.2. MCF-7 hücre dizisinde apoptotik hücre görüntüleri.....	59
Şekil 4.3. MCF-7 hücre dizisine 25, 50 ve 100 µM resveratrolün 24., 48.ve 72. saatlerde kontrol grubuna göre apoptotik indeksleri.....	61
Şekil 4.4. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrolün 24., 48. ve 72. saatlerdeki apoptotik indeksleri.....	61
Şekil 4.5. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM tannik asidin 24., 48. ve 72. saatlerde kontrol grubuna göre apoptotik indeksleri.....	62

Şekil 4.6. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM tannik asidin 24., 48. ve 72. saatlerdeki apoptotik indeksleri.....	63
Şekil 4.7. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrol ve tannik asidin 24., 48. ve 72. saatlerdeki apoptotik indeksleri.....	64
Şekil 4.8. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrol 24., 48. ve 72. saatlerdeki apoptotik indeksleri.....	64
Şekil 4.9. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM tannik asidin 24., 48. ve 72. saatlerdeki apoptotik indeksleri.....	65
Şekil 4.10. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrol ve tannik asidin 24., 48. ve 72. saatlerdeki apoptotik indeksleri.....	66
Şekil 4.11. MCF-7 hücre dizisinde Bak proteininin immunohistokimyasal olarak belirlenen görüntüleri.	67
Şekil 4.12. MCF-7 hücre dizisine 25, 50 ve 100 µM resveratrolün 24., 48. ve 72. saatlerde kontrol grubuna göre % Bak oranları.....	69
Şekil 4.13. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrolün 24., 48. ve 72. saatlerdeki % Bak oranları.....	70
Şekil 4.14. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM tannik asidin 24., 48. ve 72. saatlerde kontrol grubuna göre % Bak oranı.....	70

Şekil 4.15. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM tannik asidin 24., 48. ve 72. saatlerdeki % Bak oranı.....	71
Şekil 4.16. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrol ve tannik asidin 24., 48. ve 72. saatlerdeki % Bak oranı.....	72
Şekil 4.17. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrol 24., 48. ve 72. saatlerdeki % Bak oranı.....	73
Şekil 4.18. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM tannik asidin 24., 48. ve 72. saatlerdeki % Bak oranı.....	73
Şekil 4.19. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrol ve tannik asidin 24., 48. ve 72. saatlerdeki % Bak oranı.....	74
Şekil 4.20. MCF-7 hücre dizisine 25, 50 ve 100 µM resveratrol uygulandıktan 24., 48. ve 72. saatlerde kontrol grubuna göre telomeraz enzim aktiviteleri.....	77
Şekil 4.21. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrolün 24., 48. ve 72. saatlerdeki telomeraz enzim aktiviteleri.....	77
Şekil 4.22. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM tannik asitin uygulandıktan 24., 48. ve 72. saatlerde, kontrol grubuna göre telomeraz enzim aktiviteleri.....	78

Şekil 4.23. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM tannik asidin 24., 48. ve 72. saatlerdeki telomeraz enzim aktiviteleri.....	79
Şekil 4.24. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrol ve tannik asidin 24., 48. ve 72. saatlerdeki telomeraz enzim aktiviteleri.....	80
Şekil 4.25. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrolün 24., 48. ve 72. saatlerdeki telomeraz enzim aktiviteleri.....	81
Şekil 4.26. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM tannik asitlerin 24., 48. ve 72. saatlerdeki telomeraz enzim aktiviteleri.....	81
Şekil 4.27. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrol ve tannik asidin 24., 48. ve 72. saatlerdeki telomeraz enzim aktivitesi.....	82

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1. TRAP kit içeriği ve kullanım amacı.....	46
Tablo 3.2. TRAP amplifikasyon ürünü elde etme programı.....	52
Tablo 4.1 MCF-7 hücre dizisine ait grupların saat ve dozlara göre apoptotik indeksleri.....	60
Tablo 4.2. MCF-7 hücre dizisine ait grupların saat ve dozlara göre % Bak oranları.....	68
Tablo 4.3 MCF-7 hücre dizisine ait grupların saat ve dozlara göre telomeraz enzim aktiviteleri.....	76

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde
Apaf-1	Apoptotik proteazı etkinleştiren faktör
Bak	Apoptozu uyaran protein
Bax	Apoptozu uyaran protein
Bcl-2	Apoptozu engelleyen protein
Bcl-X _L	Apoptozu engelleyen protein
BH	Bcl-2 Homoloji = Bcl-2'ye Benzer
BH1	Bcl-2 Homoloji domaini 1
BH2	Bcl-2 Homoloji domaini 2
BH3	Bcl-2 Homoloji domaini 3
BH4	Bcl-2 Homoloji domaini 4
Bid	Apoptozu uyaran protein
BRCA-1	Meme kanseri erken başlangıç-1
BRCA-2	Meme kanseri erken başlangıç-2
CaCo-2	Kolon kanser hücre dizisi
CAD	Kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz

CARD	Kaspazı aktive eden bölge
Ced	Caenorhabditis elegans hücre ölüm geni
DD	Ölüm bölgesi
DED	Ölüm oluşturan bölge
DISC	Ölümü başlatan sinyalleme yapısı
DNA	Deoksiribonükleik asit
DR	Ölüm reseptörü
ER	Östrojen reseptörü
ER-negatif	Östrojen reseptörü negatif
ER-pozitif	Östrojen reseptörü pozitif
FADD (CD95)	Fas'a bağlı ölüm bölgesi
FLICE	Prokaspaz-8
G	Guanin
GF	Büyüme faktörü
hsp90	Heat shock protein 90
hTERT	İnsan telomeraz RNA
hTR	İnsan telomeraz RNA
ICAD	Deoksiribonükleaz inhibitörünü
iNOS	İndüklenebilen nitrik oksit sentaz

kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LNCaP	Prostat kanser hücre dizisi
MCF-10	Meme fibroblastik hücre dizisi
MCF-7	Meme kanser hücre dizisi
MDA-MB-231	Meme kanser hücre dizisi
MKL-F	Meme kanser hücre dizisi
NF-kB	Çekirdek kappa B faktörü
NO	Nitrik oksit
PARP	Poli-ADP-riboz polimeraz
PI3K	Fosfoinositol 3 kinaz
PIP2	Fosfotidil inositol 4,5 bifosfat
PKB	PI3-Kinaz tarafından aktive edilen Akt
PKC	Protein Kinaz C
RES	Resveratrol (3,5,4' trihydroxystilbene)
RNA	Ribonükleik asit
RNP	Ribonükleoprotein
ROS	Reaktif oksijen türleri

Sit-c	Sitokrom-c
TA	Tannik asit
Tankyraz	TRF-1 interacting ankyrin-related ADP ribose polymerase
TERT	Telomeraz Revers Transkriptaz
TNF	Tümör nekroz faktör
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü
TPA	12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate
TRADD	TNFR'e bağlı ölüm bölgesi
TRAF	TNF reseptörü ile ilişkili faktör
TRAIL	TNF'yle ilişkili apoptozu uyaran bağ
TRF1	Telomere repeat binding factor 1
TRF2	Telomere repeat binding factor 2

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Resveratrol (3,5,4' trihydroxystilbene) (RES) bir stilben fitoaleksindir. Fitoaleksinler, çoğu bitkide bulunan, düşük moleküler ağırlıklı ve doğal bir bileşik olan, yapısal olarak östrojene benzeyen stilben ailesine ait moleküllerin sınırlı bir grubunu meydana getirirler. Fitoaleksinler, bitkilerin kendilerini biyotik ve abiyotik strese karşı koruyan, antifungal ve antimikrobiyal özellikleri olan sekonder bitki metabolitleridir (11,19,24, 55, 59, 63,68).

RES'ün lipid metabolizmasını düzenleme, eikosanoid sentezini inhibe etme ve trombosit çökmesini baskılama gibi özellikleri yanında antioksidan, antikanserojen, antiinflamatuvar, antimutajen, antiproliferatif, antiviral, antibakteriyal, östrojenik, ve damar gevşetici özellikler gibi biyolojik aktiviteleri de bulunmaktadır (3,12,23,24,28, 37,55,61,63,64).

RES, östrojenik aktivite sergiler. Anti-östrojenik mekanizma, meme kanser hücrelerinde RES'ün büyümeyi engelleyen etkileri için ana mekanizma değildir. Gerçekte RES, insan östrojen reseptör (ER) (-) meme kanser hücre dizilerinin büyümesini engeller. Nitekim çeşitli insan tümör hücre dizilerinde RES'ün doza bağlı olarak DNA sentezini ve hücre çoğalmasını inhibe ettiği tesbit edilmiştir (28,61).

RES'ün meme kanser hücre dizilerinin büyümesini baskıladığı, apoptozda ve hücre büyümesinde görevli çeşitli enzim ekspresyonu ve etkinliğini inhibe ettiği gösterilmiştir. RES'ün p21^{waf1} uyarılması ve kinaz aktivitesi yardımı ile hücre döngüsünü durdurduğu düşünülmektedir (12).

Tümör süpresör proteinlerden p53, kanser hücrelerinin apoptozunda, hücre döngüsünü dolayısıyla hücre çoğalmasını inhibe eder. Bu yolda RES-uyarılı p53 aktivasyonu ve apoptoz, ERK'lerin ve p38 kinaz aktivasyonu ile p53'ün fosforilasyonuna bağlıdır. P53 aracılı apoptoz temelde transkripsiyonal olarak bağımlı ve bağımsız mekanizmalar ile olur. Mitokondrial yol ile olan apoptozdan, bu yolla ilişkili proteinlerden Bax transkripsiyonu apoptozu uyarır (12).

RES, apoptotik Bax ve Bak'ın ekspresyonunu artırır ve MCF-7 hücrelerinde antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-X_L down regüle olur. Bax'ın Bcl-2'ye oranının artması, RES-muameleli MCF-7 hücrelerinde apoptozun uyarılmasına katkıda bulunabilir. Ekspresyonu artan Bax, Bcl-2 aktivitesini baskılayarak apoptozu uyarır. Bunun anlamı Bax ve Bcl-2 oranının kimyasal bir ajan tarafından uyarılmasının apoptoz için önemli olduğudur (12).

Hidrolize taninlerden olan TA, çay, yeşil çay, kahve, kırmızı şarap, fındık ve ceviz gibi kabuklu yemiş, meyve ve çoğu bitkide bulunur (10,15,33,39,43,49,67).

TA'ler antikarsinojenik, antioksidan, antimitojenik, antimikrobiyal, antiinflamatuar ve kanamayı durdurma gibi başlıca biyolojik aktivitelere sahiptir. TA, ayrıca kullanılan hücre tipine ve konsantrasyonuna bağlı olarak, antioksidan veya prooksidan olarak hizmet verebilir (15,42,43,45,49,66).

TA'in insan glioblastoma hücrelerinde, apoptozu uyaran bir prooksidan gibi davrandığı düşünülmektedir (43).

Son zamanlarda, (-)epigallocateşin-3-gallate gibi ester bağı içeren çay polifenollerinin, in vitro ve in vivo, güçlü ve belirli bir biçimde, proteozomun kemotripsin benzeri aktivitesini inhibe ettiği rapor edilmiştir. TA, 6'dan 9'a kadar ester bağı içerdiğinden proteozomal aktiviteyi ve seçici bir şekilde kemotripsin benzeri aktiviteyi inhibe eder. Jurkat T kanser hücrelerinde TA'in proteozom inhibisyonu, proapoptotik protein Bax ve siklin bağımlı kinaz inhibitörü p27^{Kip1} in birikmesi ile, apoptozun uyarılmasını ve hücre döngüsünün G₁ evresinde durdurulmasını sağlar (51).

TA malignant kolanjiositlerde hücre döngüsünün ilerlemesini geciktirir ve proteozomal kemotripsin benzeri aktiviteyi inhibe eder (49).

TA'ler sitotoksik özelliğe sahip olduklarından toksik etkilerin uyarılmasına katkıda bulunabilirler (42).

Programlı hücre ölümü olan apoptoz olayında, sinyal, reseptör ve apoptoz ilişkili çeşitli proteinler görev yapar (4).

Bu elemanların ışığı altında hücre, hücre dışı sinyaller aracılığı (sitoplazmik yol) ve hücre içi sinyaller aracılığı (mitokondrial yol) olmak üzere iki yolla apoptoza girer (7,65,69).

Sitoplazmik yolda, memeli hücrelerinde Fas ve TNF gibi sinyal proteinleri hedef hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanarak apoptoza giden yolu uyarırlar (4,47,53,62,65).

Mitokondrial yolda, kaspazlar ve Bcl-2 protein ailesi üyeleri mitokondri aracılığıyla hücrenin apoptoza girmesinde görev yaparlar (4,21,47,53,56,65).

Telomerler tüm ökaryotik canlıların, lineer yapıdaki kromozomlarının her iki ucunda bulunan DNA tekrar dizilerinden oluşan heterokromatik bölgelerdir. Heterokromatik yapıda olan telomerler kromozomları; füzyon (birleşme), degregasyon (yıkılma) ve rekombinasyon (birinden kopan parçanın diğerine yapışması) gibi olaylardan korurlar. Bu sayede kromozom bütünlüğünün sürdürülmesini ve kromozomların nükleus zarına tutunarak belirli bir pozisyonda kalmasını da sağlarlar (2,4,29).

Telomer boyu, hücre bölünmesi ve yaşlanması ile yakından ilişkilidir. Çünkü bir hücrenin belli sayıda bölündükten sonra, bölünme olayının sona ermesi, yaşlılık dönemine girmesi veya sonsuz bölünme özelliği kazanması bir noktada telomer boyuna bağlıdır. Normal somatik insan hücrelerinde her hücre bölünmesinde 50-200 nükleotidlik kayıp izlenmekte ve hücreler 40-70 hücre bölünmesi sonrasında yaşlanmaktadır. Bu nedenle hücre ve dolayısıyla organizma yaşlanmasında, ana nedenin bu telomerik kısalma olduğu ileri sürülür. Telomer boyunun belli bir uzunluğu koruması, uzaması veya kısalması ise telomer tek ve çift dalına bağlanan özel proteinler ve telomeraz enzimi sayesinde olmaktadır (4,18,20).

Telomeraz enzim kompleksi telomeraz RNA (TR, TER) 'sı ile temel ve yardımcı proteinlerden oluşan bir ribonükleoproteindir. İnsan telomeraz RNA (hTR, hTER)'sı 450 nükleotid boyundadır. Telomeraz temel proteini olan TERT (telomeraz revers transkriptaz) bir revers transkriptaz 'up RNA'dan DNA sentezlenmesinde katalitik görev yapar. Bu protein insanda hTERT olarak adlandırılır. İnsan hTERT geni

16 ekson ve 15 intron içerir. Yaklaşık 40 kb olup 5p15.33'de lokalizedir. Yardımcı proteinler, temel proteinlerde olduğu gibi canlı türüne göre değişir. Memelilerden insan ve kemirgenlerde telomeraz yardımcı proteinleri TEP1, p23 ve hsp90 (heat shock protein 90) proteinleridir (4,18).

Çoğalmakta olan hücrelerde izlenen düşük düzeydeki telomeraz ekspresyonunun, kök hücre popülasyonunun yenilenmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir. Telomer hipotezi ile uyumlu olarak, yaşlanmadan kaçarak ölümsüz olma özelliği kazanan tümör hücreleri, genetik kararlılığın ve telomer uzunluğunun sağlanabilmesi için telomeraz aktivitesine ihtiyaç duyar. Telomeraz enzimi tek başına normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesinde, yeterli olmamakla birlikte, hücrelerin sınırsız büyüme özelliği kazanıp ölümsüz hale geçebilmeleri, telomeraz enzimi sayesinde telomer uzunluklarını koruyarak olabilmektedir (18).

Bu çalışmada, in vitro koşullarda, meme kanser (MCF-7) hücre dizisinde son yıllarda oldukça güncel olan antioksidan ve antikanserojen etkili, resveratrol ile tannik asidin, apoptoz ve apoptoz ilişkili Bak proteini ayrıca telomeraz enzim aktivitesine olan etkileri ve bu etkilerinin karşılaştırılması amaçlandı.

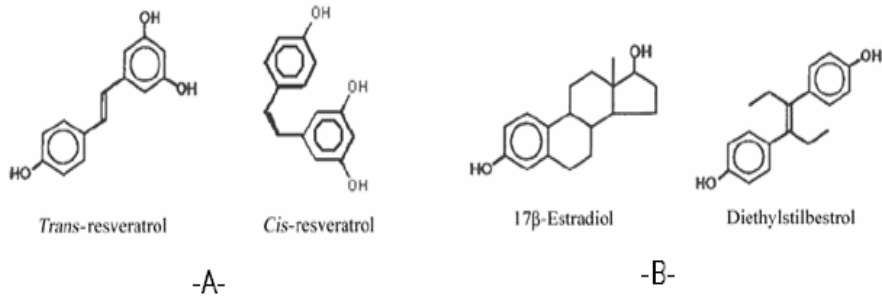
2.GENEL BİLGİLER

2.1. Resveratrol

Resveratrol (3,5,4' trihydroxystilbene) (RES) ilk olarak Langcake tarafından 1976'da üzümde keşfedilmiş, 1992'de Siemann ve Creasy tarafından şarapta varlığı gösterilmiştir. Bunları takiben de Japonyada Kojokon ismiyle geleneksel ilaç olarak kullanılan çoban değneği (*Polygonum cuspidatum*) bitkisinin kökü, kırmızı şarap ve yer fıstığı yanında, dut, çilek, böğürtlen gibi küçük yumuşak meyvelerde tesbit edilmiştir (3,12,13,23,24,28,37,55,63).

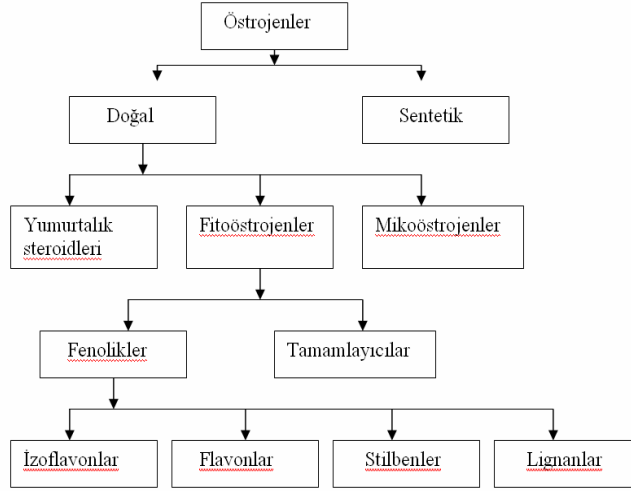
RES bir stilben fitoaleksindir. Fitoaleksinler, çoğu bitkide bulunan, düşük moleküler ağırlıklı ve doğal bir bileşik olan, yapısal olarak östrojene benzeyen stilben ailesine ait moleküllerin sınırlı bir grubunu meydana getirirler. Bunlar, bitkilerin kendilerini biyotik ve abiyotik strese karşı koruyan, antifungal ve antimikrobiyal özellikleri olan sekonder bitki metabolitleridir (11,19,24,55,59,63,68).

Stilben ailesinin özelliği nedeniyle bir fitoöstrojen olan RES, endojen östrojen 17- β -östradiol ve sentetik östrojen diethylstilbestrol ile yapı ve aktivite olarak benzerlik gösterir (8,12) (Şekil.2.1.B).



Şekil 2.1. Trans- ve cis- resveratrolün kimyasal yapısı (A) Endojen östrojen 17 β -estradiol ve sentetik östrojen diethylstilbestrol'ün kimyasal yapısı (B) (12).

Doğal östrojen grubundan olan fitoöstrojenler, kimyasal yapılarına göre, izoflavonlar, flavonlar, stilbenler ve lignanlar olarak sınıflandırılır (8) (Şekil.2.2).



Şekil 2.2. Stilben, flavon, lignan ve isoflavon arasındaki ilişki (8).

RES'ün kimyasal olarak trans- ve cis- olmak üzere iki izomerik formu bulunmaktadır (3,12,23,24,55) (Şekil.2.1.A).

RES'ün lipid metabolizmasını düzenleme, eikosanoid sentezini inhibe etme ve trombosit çökmesini baskılama gibi özellikleri yanında, antioksidan, antikanserojen, antiinflamatuvar, antimutajen, antiproliferatif, antiviral, antibakteriyel, östrojenik ve damar gevşetici özellikler gibi biyolojik aktiviteleri de bulunmaktadır (3,12,23,24,28, 37,55,61,63,64).

RES'ün doza bağlı olarak, normal karaciğer parenşimal hücrelerinde olduğu gibi, HepG2 (insan hepatokarsinom hücre dizisi) hücre dizileriyle yapılan çalışmalarda, kolesterol esterleri ve trigliserit salgılanma oranını azalttığı gösterilmiştir (24,64).

RES'ün sağlıklı insanlardan hazırlanan trombositlerdeki etkisine bakılmış ve doza bağlı olarak çökelmeyi inhibe ettiği bulunmuştur. RES'ün doza bağlı olarak, trombosit çökeltme hızını azaltma özelliği, onun kalp damar hastalıklarına karşı koruyucu etkisi olduğu fikrini desteklemektedir (24,55,64).

Doğal bir antioksidan olan RES, makromoleküllerin metabolizi sırasında oluşan, serbest radikal içeren reaktif oksijen türleri (ROS)'nin zararlı etkilerini geciktirme, önleme, sitotoksik etkilerini azaltma ve ROS nedeniyle oluşabilecek hücre zarı harabiyetini koruma özelliğine sahiptir (16,23,24,28,37,54,61).

RES'ün, insan düşük yoğunluklu lipoproteinine (LDL) eklendiğinde bakır katalizli oksidasyonu azalttığı gösterilmiştir (24).

RES, indüklenebilen nitrik oksit sentaz (iNOS)'ı inhibe ederek, nitrik oksit (NO)'in sitotoksik etkilerini engeller (37).

RES, karsinogenezin başlama, gelişme ve ilerleme aşamalarını engelleme yeteneğine sahiptir (3,28).

Yapılan alışmalar RES'ün, kanser hücrelerinde apoptozu tetikleyerek kanserden koruyucu aktiviteye katkıda bulunabileceğini göstermiştir. RES farklı tümör tiplerinde bulunan sitokrom P450 (CYP)-1B1 enzimi tarafından metabolize edilir. Bunun sonucu olarak da bir anti-lösemik ajan olarak şekillenir. Bütün bunlar RES'ün güçlü bir kimyasal kanser koruyucu özelliğine sahip olduğunu gösterir. RES'ün kolorektal kansere karşı çoğalma engelleyici ve kanser koruyucu özelliğine sahip olduğu gösterilmiştir. Bunun için RES'ün CaCo-2 insan kolon kanser hücre dizilerinde poliamin metabolizması ve büyüme üzerine olan etkileri araştırılmış, 25 µM RES ile tedavi edilen CaCo-2 hücrelerinde RES'ün hücre çoğalmasını S/G2 fazında durdurarak, çoğalmayı %70 inhibe ettiği bulunmuştur (3).

RES'ün fare meme hücre kültüründe preneoplastik lezyonların gelişimini, insan meme epitelyum hücreleri ve kolon kanser hücrelerinde de siklooksijenaz transkripsiyonu ve aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (3).

Bir başka çalışmada RES'ün, siklooksijenaz aktiviteyi baskılayarak ve transkripsiyon faktörü NF- κ B'yı uyararak anti-inflamatuar etki gösterdiği, CYP1A1'in inhibisyonuyla benzo(a)pyrene uyarılı karsinogenezisi azaltabildiği, fare modelinde 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) uyarılı karsinogenezisi inhibe ettiği ortaya konmuştur (61).

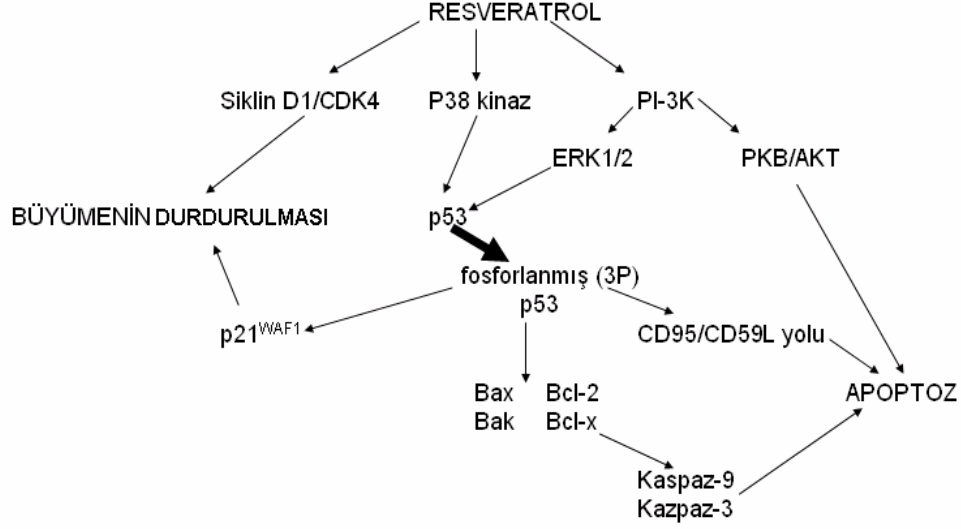
RES'ün insan kolonik adenokarsinoma CaCo-2 hücreleri üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, doza bağımlı olarak çoğalmayı ve büyümeyi inhibe ettiği bulunmuştur (3).

RES, östrojenik aktivite sergiler. Anti-östrojenik mekanizma, meme kanser hücrelerinde RES'ün büyümeyi engelleyen etkileri için ana mekanizma değildir. Gerçekte RES, insan östrojen reseptör (ER) (-) meme kanser hücre dizilerinin büyümesini engeller. Nitekim çeşitli insan tümör hücre dizilerinde RES'ün doza bağımlı olarak DNA sentezini ve hücre çoğalmasını inhibe ettiği tesbit edilmiştir (28,61).

RES'ün fare ve insan HL-60 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü uyardığı, hücre döngüsünü G₀/G₁ fazında beklettiği, böylece hücre çoğalmasını engellediği dolayısıyla anti-lösemik aktivite gösterdiği tesbit edilmiştir (28).

RES'ün çoğalmayı engelleyici etkisini, ER pozitif (MCF-7) ve ER negatif (MCF-10, MDAMB-231) meme kanser hücre dizilerinde apoptozu uyarıp büyümeyi inhibe ederek yaptığı tesbit edilmiştir (3).

Bir başka çalışmada da, RES'ün meme kanser hücre dizilerinin büyümesini baskıladığı, apoptoz ve hücre büyümesinde görevli çeşitli enzimlerin ekspresyon ve etkinliğini inhibe ettiği gösterilmiştir. RES'ün p21^{waf1} uyarılması ve kinaz aktivitesi yardımı ile hücre döngüsünü durdurduğu düşünülmektedir (12) (Şekil.2.3).



Şekil 2.3. Resveratrol apoptoza neden olan farklı yolları uyarır (12).

RES'ün etkinliği, dozuna ve hücre tipine bağlıdır. RES'ün yüksek dozlarda (15-100 μM) hücre çoğalmasını inhibe ettiği hücre ölümünü uyardığı, düşük konsantrasyonlarda ise (<10 μM) hücre çoğalmasını belirgin olarak etkilemediği gösterilmiştir. Hücre tipine bağlı etkisinin gösterildiği bir çalışmada, MCF7 (ER+) ve MDA-MB-231 (ER-) meme kanser hücre dizisinin her ikisinde de hücre canlılığı ve çoğalmasını azalttığı, ayrıca MCF-7 (ER+) dizisinde apoptotik yolla hücre ölümünü uyardığı tesbit edilmiştir (12).

RES, MCF-7 hücrelerinde, ER α -ilişkili fosfoinositol 3 kinaz (PI3K) aktivitesini düzenleyerek, PKB/AKT'ın fosforile olmasını ve bu yolla hücre yüzey proteinleri ile, büyüme, çoğalma ve apoptozu kontrol eden proteinlerin düzenlenmesini sağlar (12) (Şekil.2.3).

Tümör süpresör proteinlerden p53, kanser hücrelerinin apoptozunda, hücre döngüsünü dolayısıyla hücre çoğalmasını inhibe eder. Bu yolda RES-uyarılı p53 aktivasyonu ve apoptoz, ERK'lerin ve p38 kinaz aktivasyonu ile p53'ün fosforilasyonuna bağlıdır (12) (Şekil.2.3).

p53 aracılı apoptoz, temelde transkripsiyonal olarak bağımlı ve bağımsız mekanizmalar ile olur. p38 ve ERK1/2 yoluyla aktive olan p53, Bcl-2 yi down regüle ederek, anti apoptotik bir ajan gibi çalışır. Bcl-2 ailesi proteinleri (Bax, Bak, Bid, Bad ve Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1, Bcl-X_L) arasındaki etkileşimler, mitokondriden sitokrom-c (sit-c) salınımını uyararak apoptozu uyarır (12) (Şekil.2.3).

RES, apoptotik Bax ve Bak'ın ekspresyonunu artırır ve MCF-7 hücrelerinde antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-XL down regüle olur. Bax'ın Bcl-2'ye göre oranının artması, RES-muameleli MCF-7 hücrelerinde apoptozun uyarılmasına katkıda bulunabilir. Ekspresyonu artan Bax, Bcl-2 aktivitesini baskılayarak apoptozu uyarır. Bunun anlamı Bax ve Bcl-2 oranının kimyasal bir ajan tarafından uyarılmasının apoptoz için önemli olduğudur (12) (Şekil.2.3).

Kalabalık bir aile olan kaspaz ailesinden kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktive ederek apoptoz yoluyla olan hücre ölümünde önemli rol oynar. RES'ün MCF-7 hücre dizilerinden türetilmiş MKL-F meme kanser hücre dizilerinde, kaspaz 3'ü aktive ettiği tesbit edilmiştir. RES aynı zamanda kaspaz-3 geninin delesyonundan dolayı prokaspaz-3 eksikliği olan MCF-7 hücrelerinde kaspaz-9 aktivitesini uyarır (12) (Şekil.2.3).

p53 proteini, diğer etkili genleri de uyararak, örneğin, CD95 (FADD) gibi, hedef genlerin aracılığı ile ölüm reseptör yolunu aktive etmek suretiyle hücreyi apoptozu götürebilir. Nitekim T47D meme kanser hücre dizilerinde, RES (32 µM)'ün CD95/CD95L sinyal bağımlı apoptozu tetiklediği tesbit edilmiştir. Sonuç olarak, MKL-F, MCF-7 ve T47D meme kanser hücre dizilerinde RES'ün çoğalmayı engellemesi; hücre döngü kontrolünün bozulması, apoptozun uyarılması ve dolayısıyla hücrenin apoptoz yoluyla ölüme gitmesiyle gerçekleşir (12) (Şekil.2.3).

2.2. Tannik Asit

Taninler moleküler ağırlıkları 500-3000 Dalton (D) olan polifenolik bileşiklerdir. Taninler hidrolize ve kondanse taninler olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Yaygın olarak tannik asit (TA) olarak isimlendirilen hidrolize taninler, ya gallotanin ya da ellagiktanin içerirler. Gallotaninler hidrolize edildiklerinde glukoz ve gallik asit oluştururlar. Tanin içeren polifenoller antitümör, antiviral, antiHIV, lipid peroksidasyon inhibisyonu ve plazmin aktivitesi gibi biyolojik aktivitelere sahiptirler. Hidrolize taninlerden olan TA, çay, yeşil çay, kahve, kırmızı şarap, fındık, ceviz gibi kabuklu meyşlerle çoğu bitki ve meyvelerde bulunur (10,15,33,39,42,43,49,51,67).

TA'ler antikarsinojenik, antioksidan, antimitojenik, antimikrobiyal, antiallerjik ve antiinflamatuvar aktiviteleri yanında kanamayı durdurma gibi biyolojik aktivitelere sahiptirler. TA'ler, kullanılan hücre tipine ve konsantrasyonuna bağılı olarak, antioksidan veya prooksidan olarak da hizmet verebilir (15,42,43,45,49,66).

TA'in insan glioblastoma hücrelerinde, apoptozu uyaran bir prooksidan gibi davrandığı, in vitro ve in vivo olarak, aşırı kolanjiosit çoğalmasını azaltarak insan malign kolanjiositlerinin büyümesini inhibe ettiği tesbit edilmiştir (43,49,67).

TA'lerin in vitro olarak çeşitli kanser hücre dizilerinin çoğalmasını inhibe ettiği fare meme tümör virus promoterını inhibe edip kemokoruyucu etki olarak apoptozu indüklediği dolayısıyla hücre çoğalmasını baskıladığı tesbit edilmiştir (10).

Farklı TA konsantrasyonlarının apoptozu aktive ederek LNCaP (prostat kanser hücreleri) hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği, tip 2 diyabeti tedavi ve önlemede kullanılabildiği, kılsız farelerde UV-B ışınları tarafından uyarılan deri tümör ilerlemesini baskılayabildiği ortaya konmuştur (45,51,58).

Ubiquitin-proteozom sistemi hücrel proteinlerin yıkımında önemli rol oynar. Proteozomlar apoptozu karşı tümör hücrelerinin korunması ve tümör hücre çoğalmasının ilerlemesi gibi iki önemli fonksiyona sahiptir. Ubiquitin sistemi, tripsin benzeri olmayan kemotripsin benzeri proteozom aktivitesi tümör hücrelerinin yaşamını sürdürmesiyle ilişkili olduğunu gösterir. Hücrelerdeki ubiquitin proteozom aracılı yıkım

yolunda, p53, pRb, p21, p27^{Kip1}, IKB- α ve Bax gibi proteinler görev alarak hücre çoğalmasını ve hücre ölümünü düzenlerler (51).

C3H erkek farelere diyetle birlikte verilen düşük doz TA'in, kendiliğinden gelişen karaciğer tümörüne karşı doza bağlı olarak güçlü bir kimyasal koruyucu olduğu saptanmıştır. Son zamanlarda, (-)epigallokatesin-3-gallate gibi ester bağı içeren çay polifenollerinin, in vitro ve in vivo'da, güçlü ve belirli bir biçimde proteozomun kemotripsin benzeri aktivitesini inhibe ettiği rapor edilmiştir. TA, 6'dan 9'a kadar ester bağı içerdiğinden TA'in proteozomal aktiviteyi inhibe edebileceği görüşü hakimdir. Ester bağı içeren TA, güçlü ve seçici bir şekilde kemotripsin benzeri aktiviteyi inhibe eder. Jurkat T isimli kanser hücrelerinde TA'in proteozom inhibisyonu, proapoptotik protein Bax ve siklin bağımlı kinaz inhibitörü p27^{Kip1} in birikmesi ile apoptozun uyarılmasını ve hücre döngüsünün G₁ evresinde durdurulmasını sağlar (51).

TA malignant kolanjiositlerde hücre döngüsünün ilerlemesini geciktirir ve proteozomal kemotripsin benzeri aktiviteyi inhibe eder. TA, sıçan hepatositlerinde, 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA) uyarılı nitrik oksit (NO) üretiminin güçlü bir inhibitörüdür. TA ler sitotoksik özelliğe sahip olduklarından toksik etkilerin uyarılmasına katkıda bulunabilirler (42,49,66).

2.3 Apoptoz

2.3.1. Apoptozun Mekanizması

Programlı hücre ölümü olan apoptoz olayında, sinyal, reseptör ve apoptoz ilişkili çeşitli proteinler görev yapar (4).

Bu elemanların ışığı altında hücre iki yolla apoptoza girer (7,65,69):

1) Hücre dışı sinyaller aracılığı ile (sitoplazmik yol)

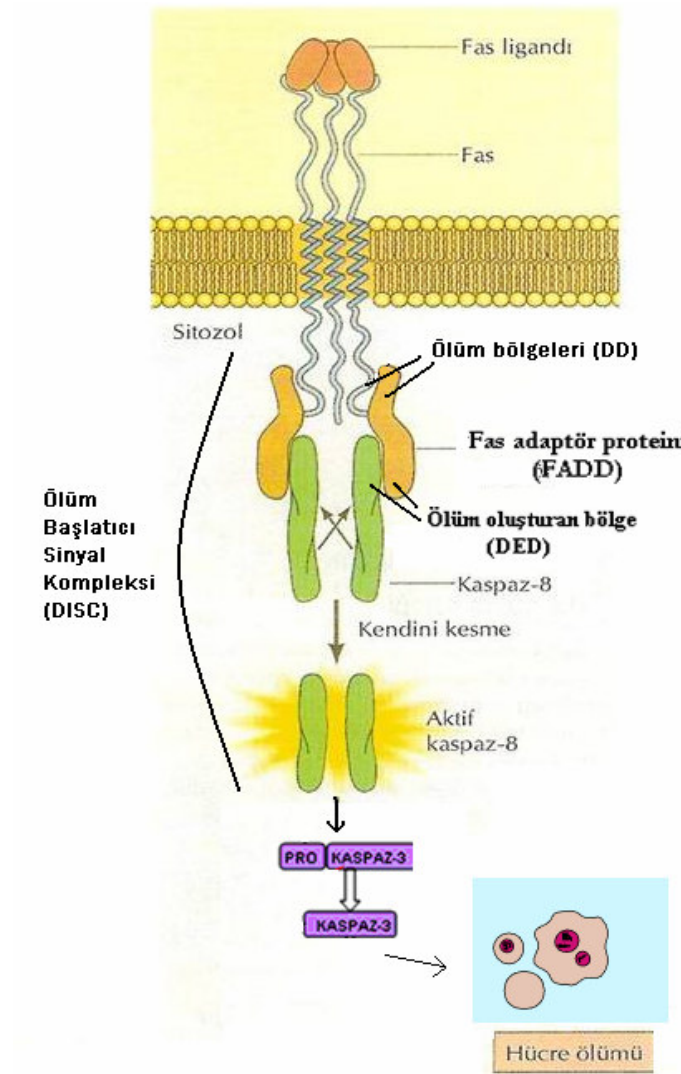
2) Hücre içi sinyaller aracılığı ile (mitokondrial yol)

1) Hücre dışı sinyaller aracılığı ile sitoplazmik yolda hücrenin apoptoza girmesi:

Memeli hücrelerinde Fas ve TNF gibi sinyal proteinleri hedef hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanarak apoptoza giden yolu uyarırlar. Bunları kısaca açıklarsak (4,29,47,53,62,65);

a- Fas sinyal iletimi yoluyla apoptoz:

Mutasyonlu bir hücrenin ortadan kalkması gerektiğinde, öldürücü T lenfositinin zarında bulunan ve molekül ağırlığı 43 kD olan Fas sinyal proteini (Fas ligandı= CD95L), hedef hücrenin Fas reseptörüne bağlanarak olay başlar. Fas reseptörü, tümör nekroz faktör reseptör (TNF-R1) ile aynı gruptandır. **Şekil 2.4.**'de görüldüğü gibi Fas reseptörü, hücre ölüm reseptörü olup, 3 aynı polipeptid zincir içerir. Fas sinyal proteini, reseptörün amino (NH₂) ucuna bağlandığında, bu 3 aynı polipeptid zincir Fas reseptörü trimer hale geçerek aktifleşir. Fas reseptörü, lenfoid hücreler dahil, hemen hemen tüm hücrelerin zarında transmembran olarak uzanır. Fas aktivasyonu ile uyarılan apoptoz; bağışıklık yanıtının sonunda artı kalan lenfositlerin, kanser hücrelerinin veya virus ile enfekte hücrelerin ölümü ve ortadan kaldırılmasından sorumludur (4,47,53, 62,65).



Şekil 2.4. Fas sinyal iletimi yoluyla apoptoz (14. literatürden uyarlanmıştır).

Fas yoluyla olan apoptoz belli bir sıra takip eder:

Oluşan Fas sinyal/reseptör kompleksindeki reseptörün sitozolde uzanan COOH ucundaki 80 amino asitlik ölüm bölgesi (DD) otofosforile olur. Otofosforile olan Fas reseptörü DD bölgesinde Fas adaptör proteini (FADD) kendi ölüm bölgesi (DD) ile bağlanır. FADD bağlantısını takiben, başlatıcı kaspazlardan inaktif prokaspaz-8 DED (Ölüm oluşturan bölge=Death Effector Domain) bölgesi ile adaptör proteine bağlanır. Oluşan bu kompleks DISC (Ölümü Başlatan Sinyalleme Yapısı=Death

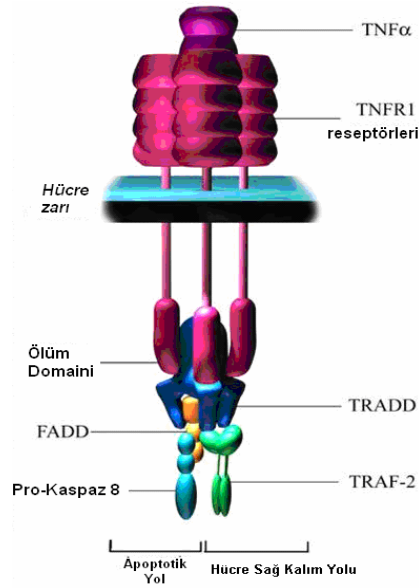
Inducing Signalling Complex) adını alır. Bu bağlantıların sonucunda prokaspaz-8 (FLICE), kendini keserek aktif kaspaz-8 haline geçer. Aktif kaspaz-8, kaspaz yolundaki sonlandırıcı (efektör) kaspazların aktivasyonunu başlatır. Son olarak sonlandırıcı kaspazlardan prokaspaz-3 kaspaz-3 olarak aktifleşir. Aktifleşen kaspaz-3, sitoplazmik inaktif ICAD/CAD (deoksiribonükleaz inhibitörünü/ kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz) kompleksine bağlanır. Bu bağlantı sonucu aktifleşen CAD kompleksten ayrılır ve nükleus zarını geçerek nükleozomlar arasında uzanan linker DNA'ya bağlanıp o bölgeyi keser ve böylece DNA fragmentasyonunu gerçekleştirir. Bunu takiben CAD kesim noktasından ayrılır. DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması, nükleer lamin A yıkılımla birlikte nükleer zarf da yıkılarak nükleus dağılır (4,47,53,62,65) (Şekil.2.4).

Kaspaz-3'ün CAD'ı aktifleştirip DNA fragmentasyonunu gerçekleştirdiği olayda;

Kaspaz-3'ün nükleusta yaptığı tahribat sitoplazmada da devam eder. Hücre iskeleti yıkılır, ER ve Golgi cisimciği bozulur, organeller bir araya toplanır. Hücre zar yapısı bozulduğundan komşu hücrelerle bağlantısı kaybolur, hücre zarı tomurcuklanır. Bunu takiben tomurcuklar, makrofaj gibi fagositoz yapan hücreler tarafından tanınarak fagosite edilir, apoptoz tamamlanır (4,27,29,53,56) (Şekil.2.4).

b- Tümör nekroz faktör (TNF) sinyal iletimi yoluyla apoptoz:

Sinyal görevi yapan ve bir sitokin olan TNF α proteini, hücre zarında bulunan TNFR-1 (Tümör Nekroz Faktör Reseptörü) ile kompleks oluşturur. Şekil.2.5 da görüldüğü gibi, TNFR-1 reseptörünün sitozole uzanan kısmındaki DD bölgesine, TRADD (TNFR'e bağlı Ölüm Bölgesi) proteini bağlanır. TRADD diğer kısmıyla da FADD (Fas Adaptör Ölüm Bölgesi) adaptör proteinine bağlanır. Bu bağlantılar sonucunda, prokaspaz-8 aktifleşir. Aktif kaspaz-8 de sonlandırıcı kaspaz üyelerini ve sonunda aynı gruptan prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3, Fas sinyal iletim yoluyla apoptozda olduğu gibi, hücrede gerekli morfolojik değişiklikleri sağlayarak hücre apoptoz yoluyla ölür (4,47,53,62,65).



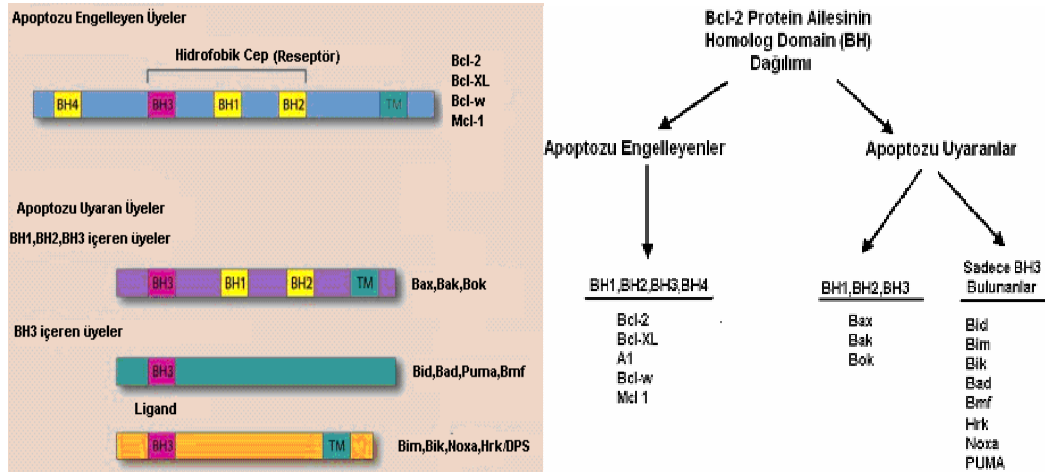
Şekil 2.5. TNF α sinyal yoluyla apoptoz (17)

2) Hücre içi sinyaller sonucu hücrenin apoptoza girmesi (Mitokondrial yol):

Mitokondri aracılığıyla hücrenin apoptoza girmesinde kaspazlar ve Bcl-2 proteinleri görev yapar (4).

Kaspaz (*caspase: cysteine-aspartic-acid-proteases) gen ailesi üyeleri hücreyi apoptoza götüren proteinleri kodlarlar. Kaspazlar, inaktif olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından, sistein proteazlar olarak adlandırılan enzimlerdendir. Fare ve insanda kaspaz ailesinden 14 kaspaz proteini tanımlanmıştır. Kaspazlar, başlatıcı ve sonlandırıcı (efektör) kaspazlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2,8,9,10), apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini, aşağı kaspazlar olan sonlandırıcı kaspazlara naklederler. Bu kaspazların uzun bir bağlanma bölgesi vardır. Bu bölgeler CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain = Kaspazı Aktive Eden Bölge) ve DED (Death Effector Domain = Ölüm Oluşturan Bölge) olarak adlandırılırlar. Bu uçlara bağlanacak özel moleküller yoluyla aktive olurlar. Sonlandırıcı (efektör) kaspazlar (kaspaz 3,6,7) ise 100 kadar farklı hedef proteini keserek apoptozu sonlandırırlar. Bu yüzden cellat kaspaz olarak da adlandırılırlar (4,26,29,47,56,65,69).*

Bcl-2 gen ailesi üyeleri, kendi içlerinde birbirlerine antagonist çalışarak apoptozu uyaran veya engelleyen bcl-2 proteinlerini kodlarlar. Bu proteinlerden Bcl-2, Bcl-X_L ve Mcl-1 apoptozu engellerken, Bax, Bad, Bid, Bak, Bcl-xs apoptozu uyarır. Bu apoptozu uyaran ve engelleyen proteinlerin işleyişi yapılarında bulunan iki bölgeye bağlıdır. Bu bölgeler bir reseptör gibi görev yapan hidrofobik cep ve bir ligand gibi görev yapan amfipatik α -heliks bölgeleridir. Bu proteinlerin her biri **Bcl-2 Homoloji bölgesi (BH1, BH2, BH3, BH4)** içerirler. Yapılarındaki BH1, BH2, BH3 bölgeleri hidrofobik cebi oluşturur. Amfipatik α -heliks BH3 bölgesinde yer alır. Hidrofobik cep sayesinde bir diğer proteinin BH3 bölgesine bağlanırlar. Apoptozu uyaran üyeler yapılarında BH1, BH2, BH3 bölgelerini içeren ve sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden oluşur. Apoptozu engelleyen üyelerde ise bu bölgelerin 4'ü de bulunmaktadır. Bcl-2 üyeleri BH3 bölgelerinden bağlanarak dimerize olur, homodimer ve heterodimer yapılar oluştururlar (5,7,53,69) (Şekil.2.6).

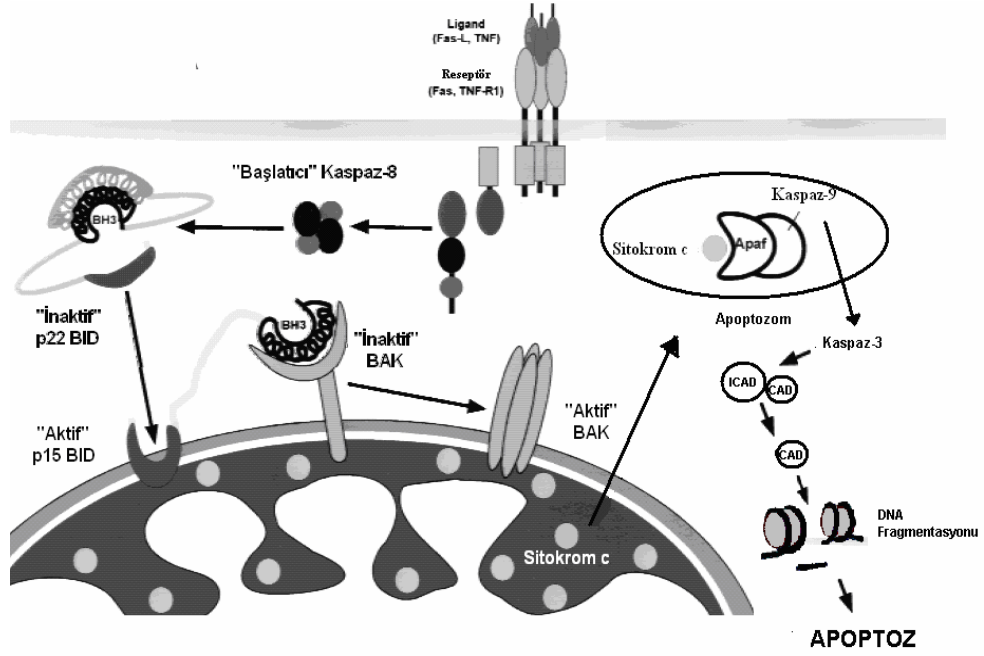


Şekil 2.6. Bcl-2 ailesi üyelerinin sınıflandırılması (5)

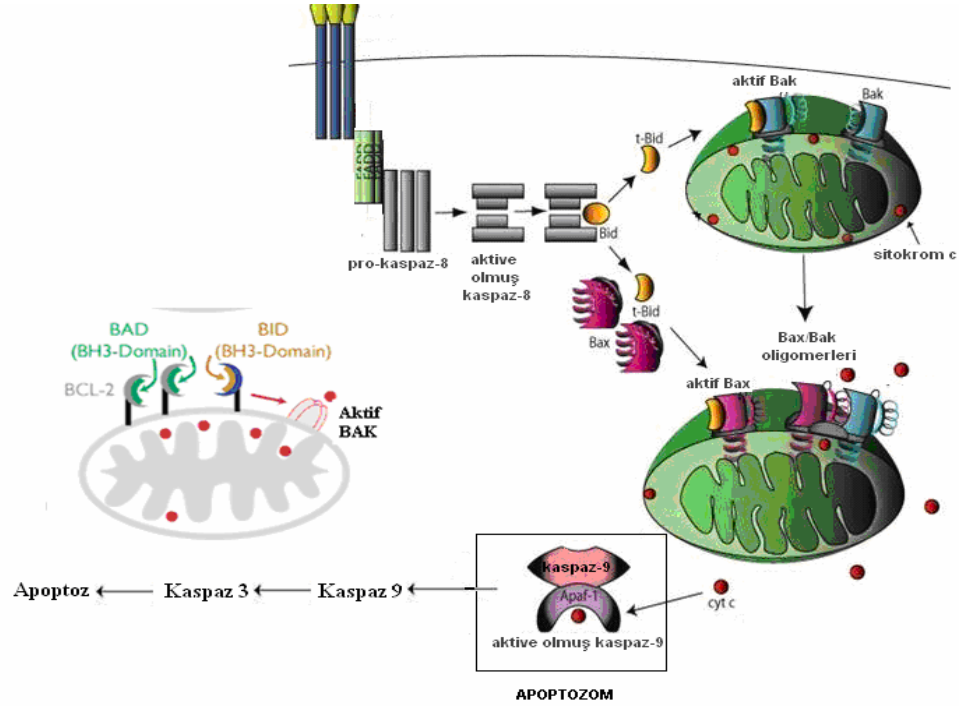
Bcl-2 ailesinden apoptozu uyaran proteinler, mitokondrial yolda mitokondri zarlarından sitokrom-c (sit-c) salınımını bunun devamında da kaspaz aktivasyonunu sağlayarak hücreyi apoptozu götürürler. DNA hasarı, büyüme faktörü (GF) eksikliği, ölüm reseptörlerinin uyarılması, radyasyon, kemoterapi vs. gibi apoptozu uyarıcı tüm ajanlar hücreyi mitokondriyal yolla apoptoza götürebilirler. Apoptozu uyaran bu ajanlar, sitozolde bulunan Bcl-2 ailesi üyelerinin görev yapmasını sağladıklarından mitokondrial yol, iç sinyal yoluyla apoptoz adımı alır. Mitokondrial yolda olan apoptozu açıklamada örnek olarak; Bcl-2 ailesi üyelerinden Bid ve Bad yoluyla aktifleşen Bak ve Bax proteinlerinin apoptoz etki mekanizması açıklanacaktır. Bu mekanizmalar arasındaki farklılık, sit-c salınımına kadar olan yolda görülür. Sit-c nin sitozole salınmasından sonraki adımlar birbirlerine benzer olarak devam ederek hücre apoptozla ölür (7,27,53) (Şekil.2.7-2.8).

i) Mitokondrial yolda Bid proteini ile aktifleşen Bak ve Bax proteinlerinin apoptotik yolu

Şekil.2.7 ve **2.8** de görüldüğü gibi, Fas sinyal-reseptör yolunda aktive olan kaspaz-8, sitozolde bulunan Bid (p22 Bid) proteinini keserek aktif tBid (p15 Bid) oluşturur. Aktif tBid, mitokondri dış zarına tutunur ve BH3 bölgesi ile mitokondri zarında bulunan Bak proteinine bağlanır. Bu bağlantı sonucu Bak proteini oligomerize olarak mitokondri zarında por oluşturur ve mitokondri iç ve dış zarları arasında yer alan sit-c nin sitozole salınmasına neden olur. Aynı yolu takibeden tBID sitozolde bulunan Bax proteinine bağlanarak Bax'ın aktifleşip mitokondri dış zarına bağlanmasını ve zar yapısının bozulup mitokondriden sitozole sit-c salınımını sağlar. Bundan sonraki olaylar, her iki yolda da devam eder. Şöyle ki; Sit-c, sitozolde Ced-4 a karşılık olan apaf-1 (Apoptotik Proteazı Etkinleştiren Faktör) ile kompleks (sit-c/apaf-1) oluşturur. Sit-c/apaf-1 kompleksi, prokaspaz-9'a bağlanarak apoptozom kompleksi oluşur. Apoptozom kompleksindeki prokaspaz-9 kesilerek aktifleşir. Aktif kaspaz-9, proteolitik kesim ile sonlandırıcı prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktive kaspaz-3, Fas ve TNF yolunda olduğu gibi, apoptozla ilgili hücresel bozuklukları sağlayarak hücre apoptoza gider (7,22,27,53) (Şekil.2.7- 2.8).



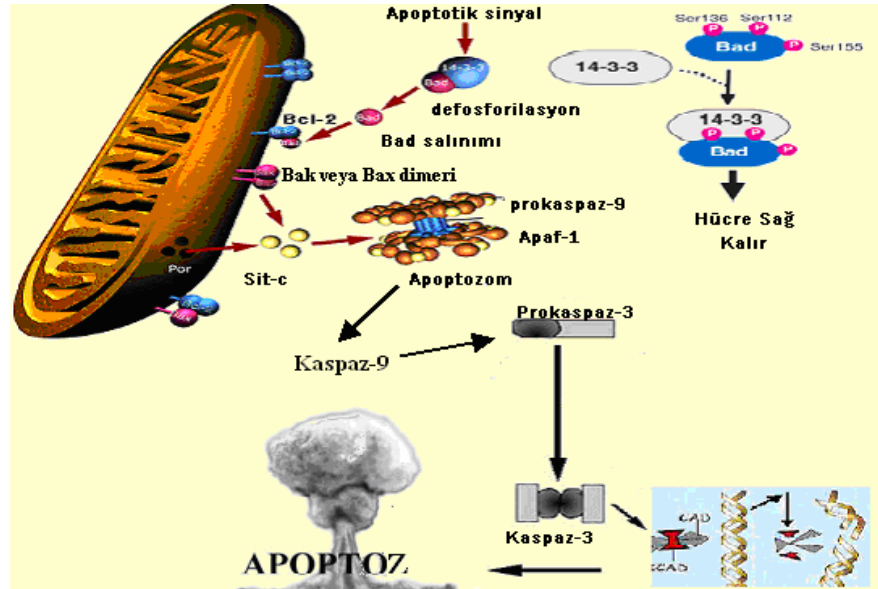
Şekil 2.7. Aktifleşen Bid ile Bak aktivasyonu (70.literatürden uyarlanmıştır).



Şekil 2.8. Aktifleşen Bid ile Bak ve Bax aktivasyonu (34. literatürden uyarlanmıştır).

ii) Mitokondrial yolda Bad proteini ile aktifleşen Bak ve Bax proteinlerinin apoptotik yolu

Şekil.2.9'da görüldüğü gibi, fosforile Bad proteini, sitozolde 14-3-3 şaperon proteini ile kompleks oluşturarak inaktif halde bulunur. Antijenler, GF ve diğer yaşam faktörlerinin eksikliği nedeniyle Bad proteini defosforile olursa, kompleksten ayrılarak BH3 bölgesi ile, mitokondri dış zarında bulunan ve apoptozu engelleyen, Bcl-2 veya Bcl-2/Bcl-xl proteinlerine bağlanmasi ile kompleks oluşturur. Bu durumda Bcl-2 ve Bcl-xl apoptozu engelleme görevini yapamaz, dolayısıyla bu kompleksler Bak ve Bax proteinlerinin oligomerize olarak, mitokondri dış zarında por oluşturup yapının bozulmasını sağlarlar. Oluşan bu porlardan sit-c sitozole salınır. Bundan sonraki olaylar Bid yolunda olduğu gibi cereyan eder. Şöyleki; sit-c/apaf-1 kompleksi oluşur. Buna prokaspaz-9 bağlanarak apoptozom kompleksi (sit-c/apaf-1/kaspaz-9) meydana gelir. Komplekste aktive olan kaspaz-9, prokaspaz-3'ü sonlandırıcı kaspaz-3 olarak aktive eder. Aktif kaspaz-3 nükelus ve sitoplazmada gerekli morfolojik değişikliklerin olmasını sağlayarak apoptozu sonlandırır (7,53) (Şekil 2.9).



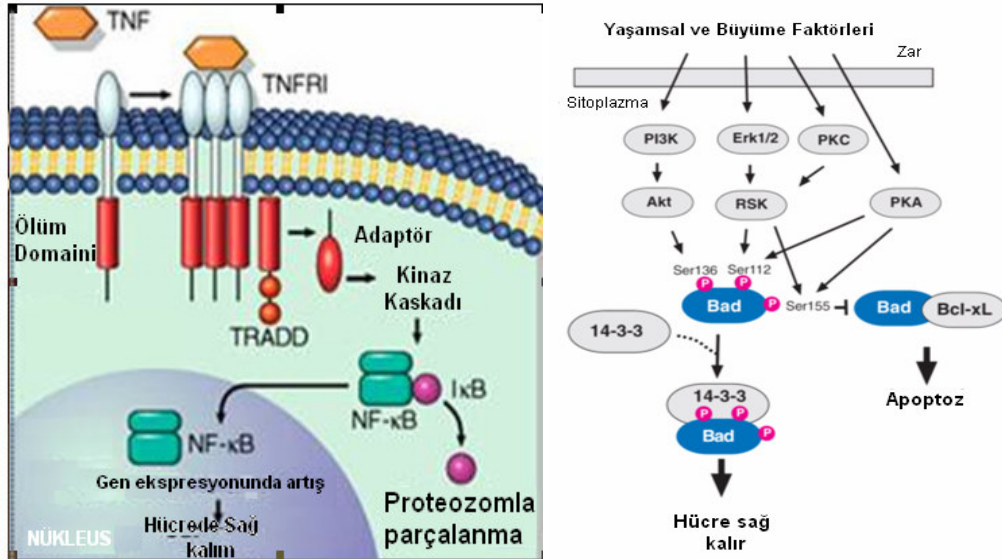
Şekil 2.9. Mitokondrial yolda Bad proteini ile apoptoz (17. literatürden uyarlanmıştır).

HÜCRE SAĞ KALIMI;

TNF, Ras/Raf/Erk, PI3-kinaz/Akt (PKB) gibi proteinler apoptozda görev yaptıkları gibi hücre sağ kalımında da görev yaparlar. Bu görevlerini de fosforilasyon ve defosforilasyon yoluyla yaparlar (14). Hücre sağ kalımına örnek olarak,

1-TNF yoluyla hücre sağ kalımı,

TNF yolunda bazı hücreler apoptoza giderken, bazıları da aynı yolda TRAF2 (Şekil.2.5) üzerinden kinaz aktivasyonu ile, yaşamları için gerekli protein sentezine yönelirler. Buna örnek olarak, **Şekil 2.10.A**'da görüldüğü gibi immün cevabın oluşumunda görev yapan NF- κ B transkripsiyon faktörünün aktifleşerek immün cevap için gerekli immün globülin gen ekspresyonu verilebilir. Bu olayda, TNF/TNFR-1 kompleksi oluşur. Komplekse adaptör proteinin bağlanmasıyla kinaz kaskadı aktifleşir. Aktif kinaz, NF- κ B kompleksini fosforile eder ve NF- κ B serbest kalır. Serbest kalan NF- κ B da nükleusa girerek hücre sağ kalımında gerekli IG protein sentezi için transkripsiyonu başlatır (14).



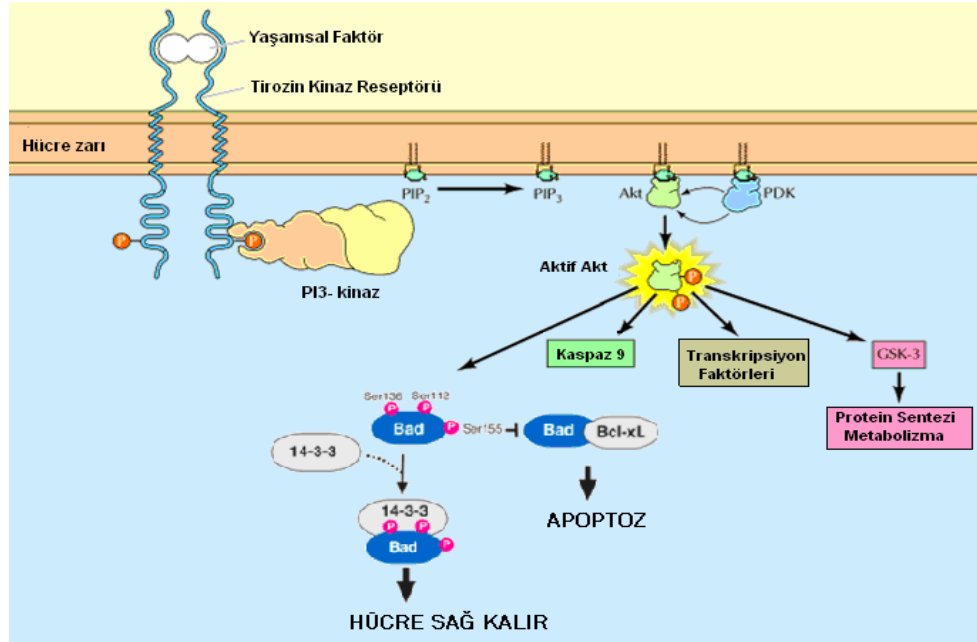
Şekil 2.10. TNF (A) ve Ras/Raf/ERK (B) yoluyla hücre sağ kalımı (31,35)

2-Ras/Raf/ERK yoluyla hücre sağ kalımı,

Bu yolda **Şekil.10.B**'de görüldüğü gibi RSK protein kinaz görev yapar. RSK, protein kinaz, ERK tarafından fosforile olarak aktifleşir. Aktif RSK, apoptozu uyaran Bad proteinini fosforile ederek 14-3-3 proteini ile kompleks oluşturmasını sağlar. Kompleks haldeki Bad proteini mitokondriden sit-c salınımını gerçekleştirmediğinden hücre apoptoza gidemez ve sağ kalır (14).

3-PI3-kinaz/Akt (PKB) yoluyla hücre sağ kalımı,

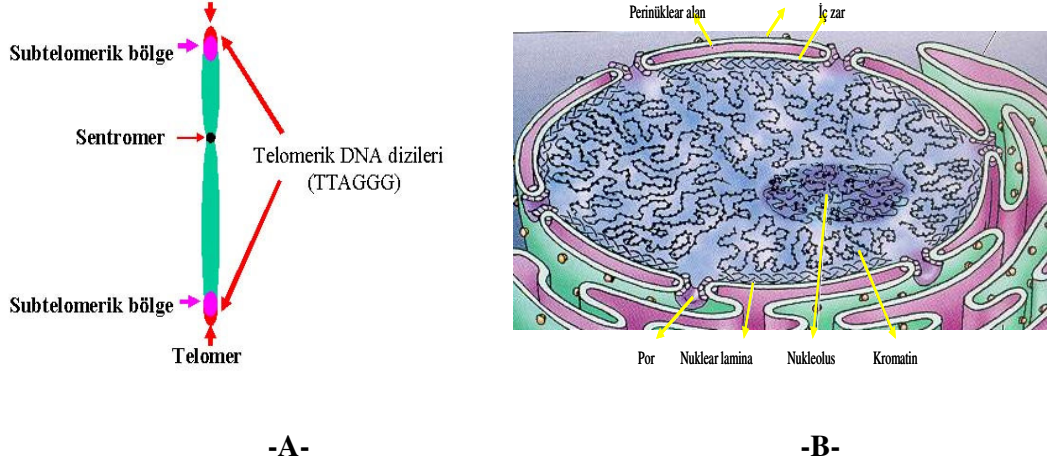
Bu yolda **Şekil 2.11**'da görüldüğü gibi büyüme faktörü/reseptör kompleksine bağlanan aracı (adaptör) protein PI3 kinaz, fosforile olarak aktifleşir. Aktif PI3 kinaz, PIP2(fosfotidil inositol 4,5 bifosfat)'yi hidrolize ederek PIP3 oluşturur. PIP3'de bir serin-treonin kinaz olan Akt'ı aktive eder. Aktif Akt, apoptozu uyaran Bad proteininin fosforilasyonunu ve dolayısıyla 14-3-3 proteini ile kompleks oluşturmasını sağlar. Kompleks haldeki Bad, apoptozu uyarma görevini yapamayacağından hücre sağ kalır (14).



Şekil 2.11. PI3 kinaz/Akt (PKB) yoluyla hücre sağ kalımı (14. literatürden uyarlanmıştır.).

2.4.Telomer ve Telomeraz Enzimi

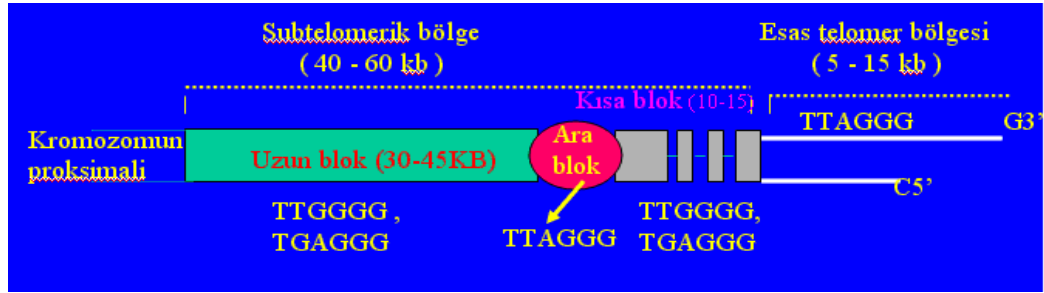
Telomerler tüm ökaryotik canlıların, lineer yapıdaki kromozomlarının her iki ucunda bulunan DNA tekrar dizilerinden oluşan heterokromatik bölgelerdir. Heterokromatik yapıda olan telomerler kromozomları; füzyon (birleşme), degradasyon (yıkılma) ve rekombinasyon (birinden kopan parçanın diğerine yapışması) gibi olaylardan korurlar. Bu sayede kromozom bütünlüğünün sürdürülmesini ve kromozomların nükleus zarına tutunarak belirli bir pozisyonda kalmasını sağlarlar (2,4,29) (Şekil 2.12 A, B).



Şekil 2.12. Lineer kromozomda telomerler (A). Kromozomlar telomerleri sayesinde nüklear laminaya tutunup belli bir pozisyonda kalırlar (B) (4).

Telomerik tekrar dizileri ilk olarak 1970'lerde Ciliat kromozomlarında fark edilmiştir. Lineer kromozomların uçlarında yer alan ve tekrarlayan DNA dizileri olan telomerler; telomer DNA'sı ve telomer bağlı proteinlerden oluşurlar (4).

Telomer DNA'sı, **Şekil.2.13**'de görüldüğü gibi subtelomerik ve esas telomerik bölge olmak üzere iki bölgeden oluşur. Subtelomerik bölge kromozomların devamı olup çift iplikcik halinde bulunur. Subtelomerik bölge uzun, ara ve kısa bloklardan oluşur. Subtelomerik bölgenin devamı olan esas telomerik bölge çift ve tek iplikcik halinde uzanır. Çift iplikciğin devamı guanince zengin ve tek dal halinde bulunmasından dolayı G' tek dalı (overhang) olarak da adlandırılır (18,29) (Şekil.2.13).

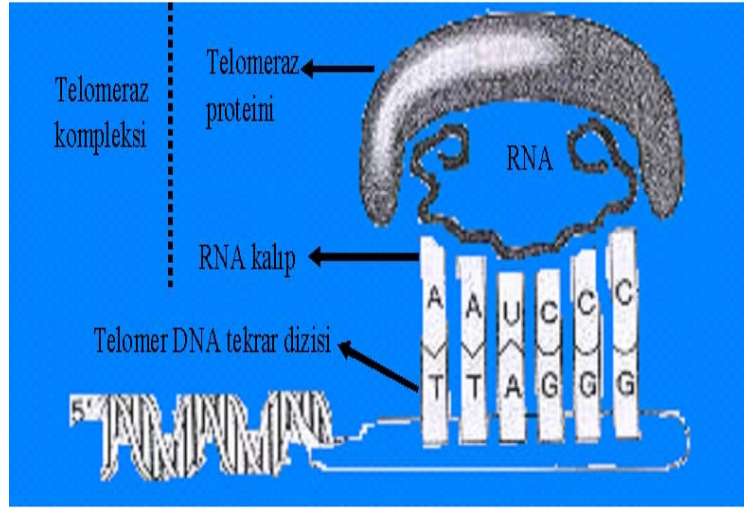


Şekil 2.13. İnsan kromozumuna ait telomerinin sub ve esas telomerik bölgeleri (4).

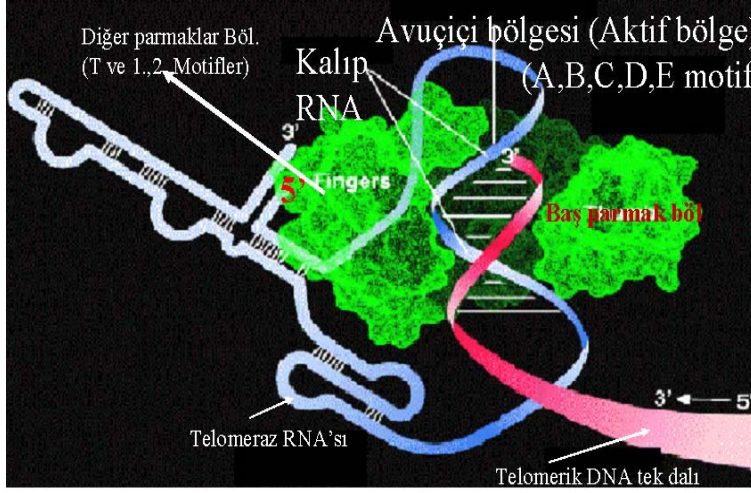
Telomer boyu, hücre bölünmesi ve yaşlanması ile yakından ilişkilidir. Çünkü bir hücrenin belli sayıda bölündükten sonra, bölünme olayının sona ermesi, yaşlılık dönemine girmesi veya sonsuz bölünme özelliği kazanması bir noktada telomer boyuna bağlıdır. Normal somatik insan hücrelerinde her hücre bölünmesinde 50-200 nükleotidlik kayıp izlenmekte ve hücreler 40-70 hücre bölünmesi sonrasında yaşlanmaktadır. Bu nedenle hücre ve dolayısıyla organizma yaşlanmasında ana nedenin bu telomerik kısalma olduğu ileri sürülür. Telomer boyunun belli bir uzunluğu koruması, uzaması veya kısalması ise, telomer tek ve çift dalına bağlanan özel proteinler ve telomeraz enzimi sayesinde olmaktadır (4,20,29,18).

Telomeraz enzimi Greider ve Blackburn tarafından 1985 yılında “Tetrahymena thermophila” da tanımlanmıştır. 550 kDa boyunda ve hücresel ribonükleoprotein yapısındadır. İnsanda telomeraz aktivitesine, ilk kez servikal kanser hücre dizisi olan HeLa'da rastlanmıştır (2,18).

Telomeraz reaktivasyonunun, hücrelerin sınırsız çoğalma özelliği kazanmasında rol oynayan en önemli mekanizmalardan biri olduğu ileri sürülmektedir. Telomer boyunun uzamasını sağlayan telomeraz enzimi, kendisine ait RNA ve proteinlerden oluşan bir komplekstir (4,18,29) (Şekil.2.14-2.15.)



Şekil 2.14. Telomeraz enzim kompleksi (4).

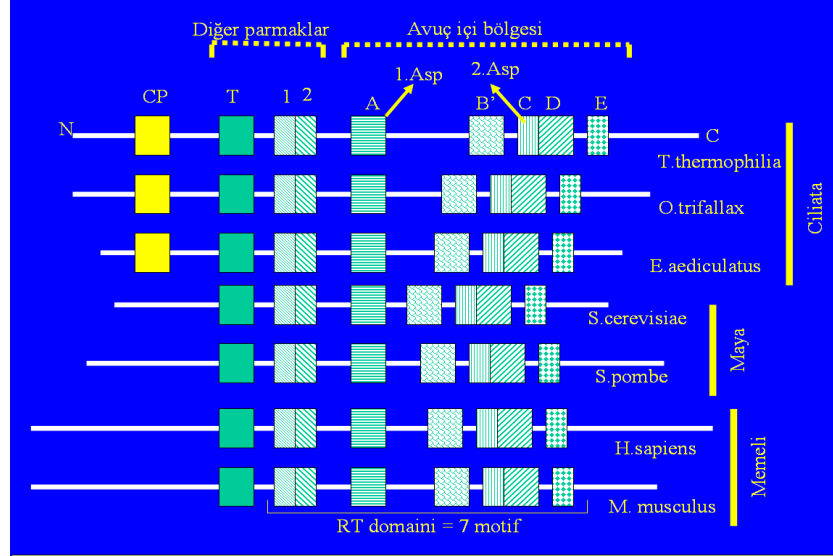


Şekil 2.15. Telomeraz enzim kompleksi modeli ve telomer DNA'sı ile telomeraz RNA'sı (4).

Telomeraz RNA'sını kodlayan DNA dizisi fare, insan, maya ve Ciliatların 20'den fazla türünde klonlanmıştır. İnsan telomeraz RNA (hTR, hTERT=Human Telomerase RNA)'sı 450 nükleotid boyundadır. Bu uzunlukta olan telomeraz RNA'sının 159 nükleotidlik kısmı, 5'→ 3' istikametinde 5'CUAACCCUA-3' tekrarlarından oluşur. Telomeraz enzim kompleksi proteinlerinin de yardımıyla telomeraz RNA'sı bu diziyi kullanarak telomer DNA tek dalının uzamasını sağlar. İnsan telomeraz RNA geni 3q21-28'e lokalizedir. TR ekspresyonunun, kanser hücrelerinde büyük oranda yapılması yanında, normal somatik hücrelerde de mevcudiyeti tesbit edilmiştir (4,18,29).

Telomeraz enzim kompleksi proteinleri, temel ve yardımcı proteinlerden meydana gelir. Telomeraz temel proteini olan TERT (Telomeraz Revers Transkriptaz) bir revers transkriptaz olup RNA'dan DNA sentezlenmesinde katalitik görev yapar. Bu protein insanda hTERT olarak adlandırılır. Yaklaşık olarak 40 kb olan insan hTERT geni 16 ekson ve 15 intron içermekte olup, 5p15.33'de lokalizedir. hTERT, 127 kDa ağırlığında büyük bir proteindir. **Şekil.2.16'**da görüldüğü gibi, TERT proteini, diğer proteinler gibi amino uç, orta bölge ve karboksil uç bölgesinden oluşur. Amino uç

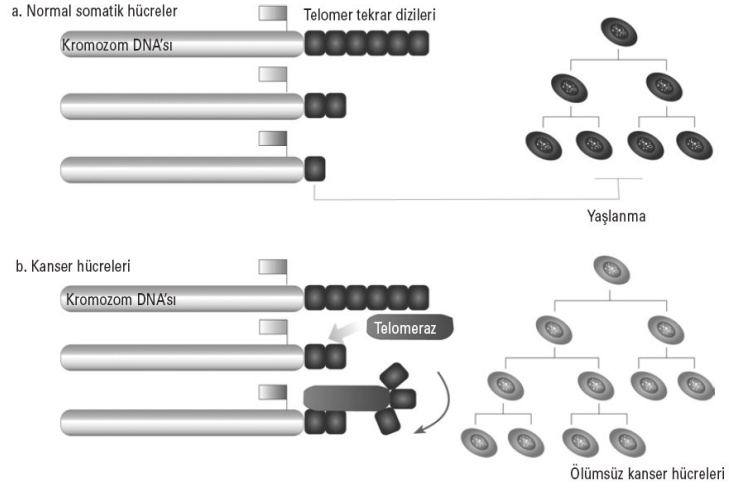
bölgede T motifi, bunu takiben orta bölgede RT domaini yer alır. RT domaini bir revers transkriptaz olup, E,D,C,B,A,2,1 olmak üzere 7 motiften oluşur (4,18,29)



Şekil 2.16. Çeşitli canlılarda TERT proteininin kısımları (4).

Telomeraz yardımcı proteinleri; Euplotes aediculatus'da p43 proteini, Tetrahymena thermophila'da p80 ve p95 proteinleri, S.cerevisiae'da Est1p ve Est3p (Ever shorter telomeraz 1 ve 3 protein) memelilerden insan ve kemirgenlerde TEPI, p23 ve hsp90 (heat shock protein 90) proteinleri olarak tanımlanmıştır. Bunların görevleri tam olarak bilinmemekle birlikte telomeraz enzim kompleksi elemanlarının doğru olarak bir araya gelmesinde rol oynadıkları düşünülür (4,18,29).

Çoğalmakta olan hücrelerde izlenen düşük düzeydeki telomeraz ekspresyonunun, kök hücre popülasyonunun yenilenmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir. Telomer hipotezi ile uyumlu olarak, yaşlanmadan kaçarak ölümsüz olma özelliği kazanan tümör hücreleri, genetik kararlılığın ve telomer uzunluğunun sağlanabilmesi için telomeraz aktivitesine ihtiyaç duymaktadır (Şekil.2.17). Telomeraz enzimi tek başına normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesinde yeterli olmamakla birlikte, hücrelerin sınırsız büyüme özelliği kazanıp ölümsüz hale geçebilmelerini sağlar, bunun sağlanması da telomeraz enzimi sayesinde telomer boyunun korunması ile olur (4,18,29).



Şekil 2.17. Normal somatik hücrelerin telomer boyuyla ilişkili olarak yaşlanması (A) ve telomerez enziminin yeniden aktive olarak telomer boyunu uzatması ile ölümsüz kanser hücrelerinin oluşması (B) (18).

MCF-7 hücre dizileriyle yapılan bir çalışmada, RES'ün telomerez aktivitesini down regüle ettiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada yüksek dozlardaki RES'ün hTERT proteininin nükleer ekspresyonunu azaltabildiği de gösterilmiştir (44).

Bcl-2 ekspresyonunun değişimiyle uyarılan apoptoza telomerazın rolünün araştırıldığı bir çalışmada, mitokondrial değişimlerin olduğu intrinsik apoptotik yolun erken aşamalarında, hTERT değişiminin direkt olarak zarar verdiği gösterilmiştir (6).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Hücre Dizileri

Çalışmamızda MCF-7 insan meme kanser hücre dizisi kullanıldı.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- %100'lük Paraformaldehit solusyonu (Riedel de Haen)
- Absolü Etanol (Riedel-de Haen)
- Acrilamide/bisacrilamide %30 solüsyon (29:1) (Sigma)
- Agaroz (peçLab)
- Amfoterisin –B(Biochrom)
- Amonyum persülfat [(NH₄)₂SO₈] (Sigma)
- Antikor dilution buffer (Lab Vision)
- Apop Taq Peroxidase Kit (Chemicon)
- Asetik asit (C₂H₄O₂) (Riedel-de Haen)
- Aseton (C₃H₆O) (Fluka)
- Bak monoklonal antikor (Neomarkers)
- Biotin işaretli sekonder antikor (Lab Vision)
- Borik asit (H₃PO₄) (Carlo Erba)
- Bovine İnsülin (Sigma)
- Cell freezing medium (Biological Industries)
- DimetilSülfoksit (DMSO)
- Disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) (Carlo Erba)
- Distile su

- dNTP (Larova)
- Eagle Minimum Essential Medium (EMEM) (Karbonatlı,L-glutaminli)
(Biowest)
- Ethidium bromid (Amresco)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Amresco)
- FBS (Fetal Bovine Serum) (Sigma)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Biological Industries)
- Fluid Thioglycollate Medium (FTM) (Fluka)
- Formaldehit (HCHO) (J.T. Baker)
- Glacial Asetik asit (C₂H₄O₂) (Riedel-de Haen)
- Gümüş nitrat (AgNO₃) (Carlo Erba)
- Hanks' Balanced Salt Solüsyonu (HBSS) (Gibco)
- Hemotoksilen (Sigma-Aldrich)
- Hidrojen Peroksit (Riedel de Haen)
- İsopropyl alkol (2-propanol) (Riedel de Haen)
- Ksilen (Carlo Erba)
- L-glutamin (Biological Industries)
- Loading buffer (Sigma)
- MCF-7 (1 flask) (Şap Ens.)
- Metanol (CH₄O) (Merck)
- Metil green (kristal violet free) (Himedia)
- Molecular Weight Marker (MBI Fermentas)
- Mounting Solüsyonu (Sigma)
- N'N'N'N'-Tetrametyhilenediamine (TEMED) (Amresco)

- n-butanol (1-butanol) (Fluka)
- Nötral Formalin (Richard- Allan Scientific)
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (Biochrom)
- Potasyum dihidrojen fosfat(KH_2PO_4) (Merck)
- Resveratrol (Sigma)
- RPMI 1640 Medium (Karbonatlı,L-glutaminli)(Biological Industries)
- Serum Bloking Solüsyonu (Lab Vision)
- Sodyum bikarbonat (NaHCO_3) (Merck)
- Sodyum fosfat monobazik (Sodyum dihidrojen fosfat) (NaH_2PO_4) (Himedia)
- Sodyum hidroksit (Reidel deHaen)
- Sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Merck)
- Sodyum klorür (NaCl) (Merck)
- Sodyum Piruvat (Biochrom)
- Steril distile su (Sigma)
- Streptavidin-peroksidaz konjugatı (Lab Vision)
- Substrat Kromojen(AEC) kiti (Lab Vision)
- Tannik asit (Acros Organic)
- Taq DNA polimeraz (Bioron)
- Telomeraz ELISA Ölçüm Kiti TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA PLUS Kit (Roche)
- Tripin Blue Solüsyonu (Biological Industries)
- Tripsin EDTA 1x (Biological Industries)
- Trizma base toz (Sigma)

- Tryptone Soya Broth (TSB) (Himedia)

3.1.3. Malzemeler

- Buharlı Sterilizatör Bandı (Grup Deltalar)
- Cam kalemi
- Cam uzun pastör pipeti (Isolab)
- Cryotüp (2mlt'lik) (TPP)
- Eldiven (Beybi)
- Enjektör (1ml) (MedSet)
- Filtre (150x0,22 µm milipor) (Orange Scientific)
- Gazlı bez
- İnkubatör dezenfektanı (Biological Industries)
- Kuru Sterilizatör Bandı (Sterilcin)
- Kurutma kağıdı
- Kültür plakası (6 kuyucuklu) (Orange Scientific)
- Mezür (50 ml'lik, 100ml'lik, 500ml'lik, 1000ml'lik) (Isolab)
- Mikropipet ucu (10µl- 100 µl) (96x10) (Corning)
- Mikropipet ucu (silikonlu 1, 200, 1000 ml) (Neptune)
- Neubauer lamı (Marienfeld)
- Otoklavlanabilen şişe (350ml, 500ml, 1000ml) (Witeg)
- Parafilm (Pechiney)
- Santrifüj tüpleri (Orange Scientific)
- Sıkı kapaklı besiyeri tüpü
- Slayta yapışık kapaklı 10 cm²lik kültür flaskı (tekli-dörtlü) (Lab-Tek)

- Steril kültür tüpü
- Steril plastik pipet (5ml-10ml) (Lp Italiana)
- Steril santrifüj tüpü
- Steril Őırınga tipi uç (combitips plus-eppendorf)
- Su banyosu dezenfektanı (Fermaclidal D2)
- Vial (Eppendorf)
- Vidalı Kapaklı Kültür Flaskı (25 cm²'lik) (Corning)

3.1.4. Aygıtlar

- Binoküler mikroskop (Olympus)
- Buharlı sterilizatör (Nüve)
- Buz makinası (Hoshizaki)
- Buzdolabı (Aręelik)
- CO₂'li Etüv (Sanyo)
- Derin dondurucu (-20°C) (Aręelik)
- Derin dondurucu (-80°C) (New Brunswick Scientific)
- Dijital fotoğraf makinası (Nicon)
- Elektroforez (Biorad)
- Etüv (Ecocell)
- Hassas terazi (Precisa-125A)
- İnverted mikroskop (Euromex)
- Kuru Otoklav (Ecocell)
- Laminar kabin (Steril Kabin) (Nuaire)
- Manyetik karıŐtırıcı (Nüve)

- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- Mikroplate okuyucu (ELISA) (LabSystems)
- Nitrojen tankı ve aktarma ünitesi (MVE)
- Otomatik pipetler (Gilson)
- PCR (Eppendorf)
- pH metre (NEL)
- Shaker (Heidolph Polymax 1040, Heidolph Titramax 100)
- Soğutmalı santrifüj (Heraeus Biofuge Stratos)
- Spektrofotometre (Shimadzu)
- Su banyosu (Nüve)
- Şarjlı Pipetör (Isolab)
- Vorteks (IKA)

3.2.YÖNTEM

Çalışmamızda MCF-7 insan meme kanser hücre dizisi kullanıldı. Deneye Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı ŞAP Enstitüsünden besiyeri ile birlikte birer flask halinde gelen hücrelerin pasajlanmasıyla başlandı ve ölçümlerde kullanılacak hücre miktarına ulaşabilmek için yeterli sayıda flask elde edilinceye kadar pasajlama işlemine devam edildi. Her bir hücre grubundan yeterli sayıda (64'er) flask elde edildikten sonra deneye başlandı.

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1 Sterilizasyon

Hücre kültüründe kullanılan tüm malzeme ve ajanlar sterilize edilerek kullanıldı. Radyasyona maruz bırakılan doku kültürü plastikleri (flasklar) ve kullanıma hazır durumdaki steril besiyerleri ticari firmalardan elde edildi. Çok yüksek ısıya dayanıksız materyaller, 8 kg basınç ve 115°C'de 20 dk, cam malzemeler ise 160 °C'de 60-90 dk otoklavlandı. Sıvı ajanlar por büyüklüğü 0.22 µm olan mikrobiyolojik filtreden geçilerek sterilize edildi. Pipet ve uçlar, kromat çözeltilisinde bekletilerek sterilize edildi. Zefiran, %75 alkol ve özel dezenfektanlarla çalışma ortamı ve steril kabinin temizliği yapıldı. Steril kabine alınacak malzemeler %70 alkolle silindi. Tüm işlemler sırasında steril eldiven kullanıldı.

3.2.1.2. Kullanılan Besiyeri ve Hazırlanışı

Kültürde kullanılan hücre tipine özel besiyerleri hazırlandı.

Besiyeri için kullanılan tüm malzemeler, steril bir şişede ve por büyüklüğü 0.22 µm olan filtreden geçilerek hazırlandı.

3.2.1.2.1. MCF-7 İnsan meme kanser hücre dizisi

Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı ŞAP Enstitüsünden 25 cm² lik flask içinde gelen MCF-7 hücre dizisi, 100 ml besiyeri içinde, 10 ml Fetal Bovine Serum (FBS), 1 ml Sodyum Piruvat (100mM), 1 ml Penisilin/Streptomisin, 1 ml Amfoterisin, 1 ml Gentamisin, 2.9 ml sodyum bikarbonat çözeltisi (%7.5), 1 ml bovine insülin ve 82.10 ml RPMI 1640 solüsyonu olacak şekilde %5 karbondioksitli ortamda yetiştirildi.

%7.5 sodyum bikarbonat (NaHCO₃) çözeltisinin hazırlanışı:

7.5 g NaHCO₃ tartıldı, 100 ml steril distile suda çözüldü, kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

3.2.1.3. Kültür Aşaması ve Pasajlama

MCF-7 hücre dizisi flaskları laboratuara geldiği gün, %5 CO₂'li etüvde 37°C'de 24 saat inkübe edildi. 24 saatin sonunda hücrelerin kontamine olup olmadığı inverted mikroskopta incelendi. 48 saat sonra da hücre yoğunluğu aynı mikroskopta kontrol edildi. Yeterli çoğalma olan flaskdaki besiyeri tek kullanımlık steril pipet yardımıyla çekildi. Besiyeri çekilmiş flaska, por büyüklüğü 0.22 µm olan filtreden geçilerek enjektör yardımıyla önceden 37°C su banyosunda ısıtılan 1X'lik Tripsin-EDTA'dan 1-2 ml (hücre yoğunluğuna göre) eklendi. Bir iki dakika beklenip, steril cam pastör pipet yardımıyla bu sıvı çekildi. Tripsini çekilen flasklara yine aynı miktarda Tripsin-EDTA eklendi. Flasklar %5 CO₂'li etüvde 37°C'de 5-7 dakika bekletilerek flask tabanına tutunmuş hücrelerin birbirlerinden ayrılmaları sağlandı ve inverted mikroskopta kontrol edildi. Flask tabanından ayrılan hücreler her flask için bir tane olmak üzere, içinde 3 ml besiyeri bulunan, önceden hazırlanmış santrifüj tüplerine steril cam pastör pipet yardımıyla aktarıldı. Oda ısısında 125 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpün dibinde kalan hücrelerle birlikte 0.5 ml sıvı da bırakılarak, üstte kalan süpernatant atıldı. Tüpün dibinde kalan hücreler steril cam pastör pipet yardımıyla alınarak, önceden içlerine 4 ml besi yeri konmuş, flasklara (hücrenin yoğunluk durumuna göre 2-4 flask) eşit miktarda dağıtıldı. Pasajlanan hücrelerin flask içindeki yoğunlukları her gün inverted mikroskopta gözlendi. Flask tabanını kaplayan hücreler tekrar pasajlanarak ölçümler için gerekli sayıda flask elde edildi. Ölçüme girecek flaskdaki hücreler

tripsinlenerek flask tabanından ayrılmaları sağlandı. Serbestleşen hücreler, önceden hazırlanmış, içinde hücreleri kaldırma işlemine kullanılan tripsin miktarının iki katı kadar besiyeri olan santrifüj tüplerine steril cam pastör pipeti ile aktarıldı. Santrifüj tüplerine aktarılan hücrelerin sayısı, Tripan blue boyama yöntemi yardımıyla Neubauer lamında sayılarak belirlendi. Hücre sayılarının belirlenmesiyle ölçümler için gerekli sayıda hücre elde edilmesi sağlandı.

3.2.1.4. Tripan Blue Boyama Yöntemi

Tripn Blue boyama yöntemi, hücre sayımı için tavsiye edilen çeşitli yöntemlerden biridir. Bu metoda göre canlı hücreler boyanmaz, ölü hücreler boyanır. Boyama işlemi aşağıda belirtilen sıra takip edilerek yapılır:

1. Bir tüpe 0.5 ml % 0.4 Tripn Blue solüsyonu, üzerine 0.3 ml Hank's Balanced Salts (HBSS) (Dilüsyon faktör= 5) ve son olarak da süpernatant eldesinin 5. basamağında tüpe alınan hücre süspansiyonundan 0.2 ml kondu.
2. Hazırlanan tüp 5-15 dk oda ısısında beklemeye bırakıldı.
3. Süre sonunda tüp içeriği pipetlenerek karıştırıldı, bu süspansiyondan pipetle bir damla alınarak Neubauer lamı üzerine kondu.
4. Neubauer lamının ortasındaki 1 mm alandaki karelerde bulunan tüm hücreler sayıldı.
5. Mavi boyanan cansız hücreler ile boyanmayan canlı hücreler ayrı ayrı sayıldı.

Not: Her bir karenin çevresinin orta hattının sol ve en üst tarafına dokunan hücreler sayıldı. Sağ ve alt alanın çevresindeki hücreler sayılmadı.

Not: Eğer hücrelerin kümeler halinde görülmesi %10'dan fazla ise, hücrelerin yayıldığından emin oluncaya kadar tüm prosedür tekrarlandı.

6. Neubauer laminının her bir karesi 0.1mm^3 ya da 10^{-4} cm^3 toplam hacmi gösterir. $1\text{cm}^3 \sim 1\text{ml}$ 'ye eşit olduğu için, her ml'deki hücre sayısı aşağıdaki formül ile hesaplandı: (36).

Her ml'de bulunan toplam hücre: Ortalama her karedeki sayım X dilüsyon faktör X 10^4 (sayılan 10 karedeki).

Örn. Eğer her karede sayılan hücre sayısı ortalama 45 ise $45 \times 5 \times 10^4 = 2.25 \times 10^6$ hücre/ml.

Toplam Hücre : Her ml'de bulunan toplam hücre X orjinal sıvı hacimde kalan hücre.

Örn: 2.25×10^6 (hücre/ml) x 10 ml (orjinal hacim) = 2.25×10^7 toplam hücre

7. Hücre canlılığı (%) = Toplam canlı hücreler (boyanmamış) / toplam hücreler (boyanmış ve boyanmamış) x 100

Not: Eğer boyanmamış (canlı) hücrelerin her karedeki ortalama sayısı 37.5 ise, Toplam canlı hücre = $[37.5 \times 5 \times 10^4]$ canlı hücre / ml x 10 ml (orjinal volüm) = 1.875×10^7 'dür.

Hücre canlılığı (%) = 1.875×10^7 (canlı hücre) / 2.25×10^7 (toplam hücre) x 100 = %83 oranında canlı hücre var demektir.

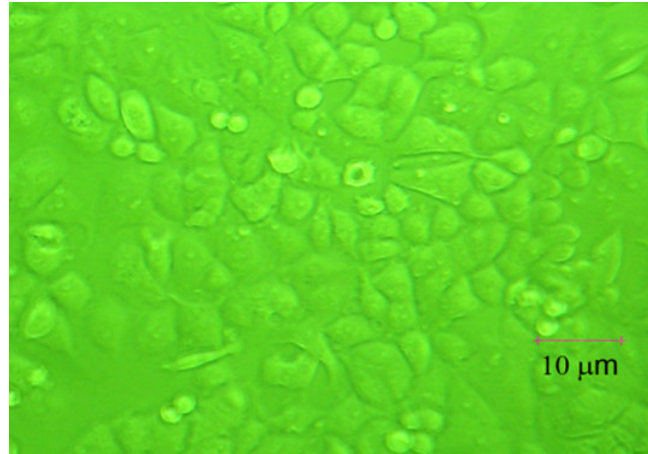
Buna göre canlı hücrelerin sayısı belirlenip hücre süspansiyonundan istenen miktar kadar alındı.

3.2.1.5. Hücrelerin Ölçümler için Hazırlanması

Hücreler ölçümler için flask içinde yeterli sayıya ulaştıklarında (Şekil 3.1) tripsinlenerek toplandı. Tripin Blue boyama yöntemi yardımıyla Neubauer lamında sayılarak, her bir ölçüm için gerekli sayıda hücre hazırlandı. Hücreler santrifüj edildi. MCF-7 hücre dizisinde madde verilmeyen (kontrol grubu) ve resveratrol ve tannik asidin

25, 50, 100 μM dozlarını uygulamak üzere, her grupta denenecek her üç doz, üç ayrı saat (24, 48 ve 72) için 3'er adet olmak üzere besiyerine ilave edildi. Bu işlem telomeraz aktivitesi için kültür flasklarına, apoptoz ve immunohistokimyasal boyama için ise 4 kuyucuklu chamber slaytlara uygulandı. Hücreler tutunmaları için 24 saat bekletildi. 24 saat sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri, kültür flasklarından steril bir kullanımlık pipet yardımıyla, 4 kuyucuklu chamber slaytlardan steril cam pastör pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Madde verilmeyen hücre gruplarına sadece taze besiyeri, madde verilen gruplara ise, resveratrol ve tannik asit dozlarını içeren taze besiyerleri verildi.

Madde verilen grupların besiyerlerinin her bir ml'sinde resveratrol ve tannik asit dozları 25, 50, 100 μM olacak şekilde hazırlandı. Hücreler, apoptoz ve immüno boyama için doz uygulamasının 24., 48. ve 72. saatlerinde buldukları 4 kuyucuklu chamber slaytlara fikse edilerek boyandı. Telomeraz aktivitesi ölçümü için hücreler tripsinle kaldırıldı, Tripkan Blue boyama yöntemi ile boyandı ve sayımları Neubauer lamında yapıldı. Tesbit edilen her üç zaman ve doz için gerekli hücre sayısının her hücre süspansiyonunun 1 ml'sinde 200.000 hücre içerecek şekilde sayımı yapıldı, viallere aktarıldı, sayımı yapılan hücre gruplarının telomeraz aktivitesi TeloTAGG^{PLUS} PCR ELISA kiti ile ölçüldü.



Şekil 3.1. Flask tabanına tutunmuş MCF-7 dizisinin görüntüsü (Filtreli)

3.2.2. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) Yöntemiyle Apoptoz Tayini

Apoptoz tayini için; 4 kuyucuklu chamber slaytlara ekilen hücrelerin 24 saat etüvde inkübe edilerek tutunmaları sağlandı. İnkübasyon sonunda steril cam pastör pipet yardımıyla besiyeri uzaklaştırıldı. İlk kuyucuğa kontrol grubu olduğu için sadece taze besiyeri, diğer kuyucuklara sırasıyla 25, 50, 100 µM dozlarda resveratrol ve tannik asit içeren 3'er ml besiyeri ilave edilerek 24 ,48 ve 72 saat 37 °C etüvde inkübe edildi. Apoptoz tayini için; örnekler in situ DNA uç işaretleme yöntemi kullanılarak boyandı. Bu boyama işlemi kit prosedürüne göre sırasıyla aşağıdaki gibi yapıldı:

1. Hücrelerin Sabitlenmesi: Hücreler %1 paraformaldehit (pH 7.4) de 10 dk fikse edildi.
2. Daha sonra hücreler 5 dk boyunca 2 kez PBS ile yıkandı.
3. Hücreler -20 °C de önceden soğutulmuş etanol:asetik asit (2:1) karışımında 5 dk bekletildi.
4. Hücreler tekrar 5 dk boyunca 2 kez PBS ile yıkandı.
5. Endojen Peroksidazın Bastırılması : Hücreler PBS ile hazırlanmış %3 H₂O₂ ile 5 dk muamele edildi.
6. Hücreler 10 dk boyunca 2 kez PBS ile yıkandı.
7. Dengeleme Tampon Çözeltisi : Hücre preparatlarındaki fazla sıvı temizlenip preparatlar iyice kurulandıktan sonra, kit içerisinde hazır halde bulunan tampon çözelti (Equilibration Buffer), 75 µl / 5cm² olacak şekilde 5 dk uygulandı.
8. TdT Enziminin Uygulanması : Hücre preparatlarındaki fazla sıvı temizlenip iyice kurulandıktan sonra 55 µl / 5cm² olacak şekilde TdT enzimi uygulandı. Preparatlar nemli bir ortamda 1 saat 37 °C'de inkübe edildi.
9. Durdurma/ Yıkama : Preparatlar durdurma/yıkama tamponu ile 10 dk yıkandı.
10. Preparatlar 3 dk boyunca 3 defa PBS ile yıkandı.

11. Anti-Digoksinin-Peroksidaz : Hücre preparatları üzerindeki fazla sıvı temizlenip iyice kurulandıktan sonra, 65 µl / 5cm² olacak şekilde Anti-Digoksinin-Peroksidaz 30 dk uygulandı.
12. Hücre preparatları 8 dk boyunca 2'şer dk olmak üzere 4' er kez yıkandı.
13. Renk Reaksiyonu : Hücre preparatları üzerindeki fazla sıvı temizlenip iyice kurulandıktan sonra DAB(diaminbenzidine) substrat solusyonu, örneği tamamen kaplayacak şekilde 10 dk uygulandı.
14. Örneklerin Yıkınması : Hücre preparatları 3 dk boyunca 1'er dk 3 kez dH₂O da yıkandı.
15. Hücre preparatları 5 dk dH₂O da yıkandı.
16. Zıt Boya Uygulaması : Hücre preparatları %0,5 metil grende 10 dk boyandı.
17. Hücre preparatları 3 dk dH₂O da yıkandı.
18. Hücre preparatları 3 dk boyunca 3 kez 100% N-BUTANOL da yıkandı.
19. Hücre preparatları dH₂O dan geçirildi.
20. Örneklerden suyu uzaklaştırmak için; 6 dk boyunca 2'şer dk 3 kez ksilolden geçirildi.
21. Hücre preparatları entellan ile kapatıldı, Euromex marka inverted mikroskop altında incelenerek, mikroskoba bağlı Nikon marka fotoğraf makinası ile görüntülendi.

Uygulama esnasında hazırlanması gerekli solüsyonlar :

%3 H₂O₂ : 4 ml H₂O₂ + 36 ml PBS = 40 ml

TdT Enzimi : 77 µl reaksiyon tamponu + 33 µl TdT Enzimi = 110 µl

DAB Substrat : 147 µl DAB solüsyonu + 3 µl DAB Substratı = 150 µl

Durdurma/Yıkama Tamponu : 1 ml yıkama solüsyonu + 34 ml distile su = 35 µl

3.2.2.1 Apoptotik İndeks

Apoptotik indeksin tesbiti Euromex marka inverted mikroskopta 3 ayrı preparatta her bir preparat için rastgele seçilen 10 alanda apoptotik nükleuslar sayılarak aşağıda verilen formüle göre yapıldı (25).

$$\text{Apoptotik İndeks (APOİ)} = (\text{Apoptotik nükleus sayısı} / \text{Toplam hücre sayısı}) \times 100$$

3.2.3.İmmunohistokimya Protokolü ile Bak proteinin belirlenmesi

Hücreler buldukları 4 kuyucuklu chamber slaytlarda fiske edildi. Daha sonra immunohistokimyasal boyama yönteminin aşamaları adım adım uygulandı. Bak için uygun primer antikorlar ile inkübe edildi. En son olarak chamber slaytlar kapatıldı ve interved mikroskop altında incelenerek çift kör olarak değerlendirildi.

Yapılan işlemler sırası ile;

1. Hücreler istendiğinde üst kısmı ayrılabilen immunohistokimyasal boyama için özel üretilmiş 4 kuyucuk chamber slaytlara ekildi. Hücrelerin flaska ekim işlemi pasajlama aşamasında anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.
2. Hücreler 24 saat chamber slayt içinde bekletildikten sonra hücrelere verilecek maddeyi içeren besiyerleri verildi. 24, 48 ve 72 saat bekletilen chamber slaytların içindeki besiyerinin tamamı steril cam pastör pipet yardımı ile çekildi.
3. Besiyeri alındıktan sonra, chamber slayt içine hücrelerin üzerini kaplayacak miktarda (yaklaşık 3 ml) fiksasyon solüsyonu pipetlendi ve 1 dk sonra bu solüsyon ortamdan pipet yardımı ile uzaklaştırıldı.
4. Özel flaskın üst kısmı ayrıldı ve işlemler bu aşamadan sonra ,üzeri hücrelerle kaplı olan lam üzerinde devam etti.
5. Hücrelerin yoğun olduğu bölümü kaplayacak kadar (1 damla) bloke edici serum damlatılarak 5-10 dk inkübe edildi.
6. Sonra hücrelerin yoğun olduğu bölümü kaplayacak kadar (1 damla) primer antikor damlatılarak, bir gece oda ısısında inkübe edildi.
7. Alanlara bir pipet yardımı ile PBS solüsyonu damlatıldıktan birkaç dakika sonra üzerindeki PBS solüsyonu lam silinerek uzaklaştırıldı.
8. Alanın üzerini kaplayacak kadar biotin işaretli sekonder antikor damlatılan preparatlar 10 dk inkübe edildi.
9. Alanlara bir pipet yardımı ile PBS solüsyonu damlatıldı ve preparatın üzerindeki PBS solüsyonu lam silinerek uzaklaştırıldı.

10. Alanın üzerini kaplayacak kadar streptavidin-peroksidaz konjugatı damlatılarak 10 dk inkübe edildi.
11. Alanlara bir pipet yardımı ile PBS solüsyonu damlatıldı ve preparatın üzerindeki PBS solüsyonu lam silinerek uzaklaştırıldı.
12. Alanın üzerini kaplayacak kadar substrat-kromojen solüsyonu (AEC) damlatılarak 1-10 dk inkübe edildi.
13. Mikroskopta gözlemleyerek, işaret alındıktan sonra distile suda çalkalandı.
14. Alanın üzerini kaplayacak kadar hematoksinen damlatılarak 2 dk çeşme suyunda 3 dk, PBS'de yaklaşık 30 saniye bekletildi.
15. Distile suda çalkalandı.
16. Preparat havada kurutulduktan sonra mounting solüsyonu ile kapatıldı.
17. Preparatlar Euromex marka inverted mikroskop altında incelenerek, mikroskoba bağlı Nikon marka fotoğraf makinası ile laboratuvarımızda görüntülendi.

Boyama işlemi sırasında kullanılan solüsyonların hazırlanışı ve inkübasyon işleminin tekniği aşağıda bildirilmiştir.

Fiksasyon Solüsyonu : 1:1 oranında Aseton:Metanol karışımı hazırlandı, kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklandı.

Fosfat Buffer (PBS) Solüsyonu : 7.20 g NaCl, 1.48 g Na₂HPO₄, 0.43 g NaH₂PO₄ tartıldıktan sonra, 0.5 ml tween20 eklenerek distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Primer Antikor : Bak boyanması için uygun Bak Ab-2 primer antikor kullanıldı.

Substrat-kromojen Solüsyonu : Kitin içinde bulunan AEC kromojeni konjugatından 20 µl ile AEC substratından 1 ml alınarak hazırlandı ve hemen kullanıldı.

İnkübasyon : Tüm boyama işlemi 37°C'ye ayarlanmış su banyosu üzerinde gerçekleştirildi.

3.2.3.1 İmmünohistokimyasal İndeks :

İmmünohistokimyasal indeks tesbiti Euromex marka inverted mikroskopta 3 ayrı preparatta her bir preparat için rastgele seçilen 10 ayrı alanda boyanan hücreler sayılarak aşağıda verilen formüle göre yapıldı.(46)

$$\text{İmmünohistokimyasal İndeks} = (\text{Boyanan hücre sayısı} / \text{Toplam hücre sayısı}) \times 100$$

3.2.4. TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) Yöntemi İle Telomeraz Aktivitesinin Ortaya Çıkarılması ve ELISA ile Aktivitenin Belirlenmesi

Örneklerde telomeraz aktivitesi, PCR ve ELISA teknikleri kullanılarak birkaç aşamada tayin edildi. Bu amaçla TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} (Roche) kiti kullanıldı.

3.2.4.1. Kit İçeriği

Kit içeriği ve kullanım amacı **Tablo 3.1**'de verildiği gibidir.

Tablo 3.1: TRAP kit içeriği ve kullanım amacı

Solüsyon	Solüsyonun içeriği ve kullanım amacı
1-Lizis solüsyonu	<ul style="list-style-type: none">• 11 ml kullanıma hazır solüsyon.• Doku ve hücre kültüründen hücre ekstraktlarının hazırlanması için kullanılır.
2-Reaksiyon karışımı,	<ul style="list-style-type: none">• 2 x 900 µl kullanıma hazır solüsyon, 2X solüsyon.• Telomeraz substratı olan biotinle işaretlenmiş P1-TS primerini, optimize edilmiş bağlayıcı P2 primerini, nükleotidleri ve Taq polimerazı içerir.• Telomeraz aracılıklı uzama ve PCR amplifikasyonu için kullanılır.
3-İnternal standart [IS]	<ul style="list-style-type: none">• 350 µl kullanıma hazır solüsyon.• 216 bp'lik bir internal standart [IS] DNA, 0.001 amol/µl içerir.• İnternal amplifikasyon standardı olarak kullanılır.• Amplifikasyon sürecinin inhibitörlerini ortaya çıkarır.
4-Kontrol kalıp (template), düşük	<ul style="list-style-type: none">• 35 µl, 0.001 amol/µl kullanıma hazır solüsyon• 8 telomerik tekrarlı [TS8] bir telomeraz ürünü ile aynı diziye sahip pozitif kontrol kalıp DNA içerir.

5-Kontrol kalıp (template), yüksek	<ul style="list-style-type: none">• 35 µl, 0.1 amol/µl kullanıma hazır solüsyon.• 8 telomerik tekrarlı [TS8] bir telomeraz ürünü ile aynı diziyeye sahip pozitif kontrol kalıp DNA içerir.
6-Nükleazsız su	<ul style="list-style-type: none">• 2 x 1.1 ml iki kere distile edilmiş, nükleazsız su içerir.
7-Denatürasyon solüsyonu	<ul style="list-style-type: none">• 1.2 ml kullanıma hazır solüsyon.• %0.5'den daha az sodyum hidroksid içerir.• Amplifikasyon ürünlerini denatüre etmek için kullanılır.
8-Hibridizasyon solüsyonu	<ul style="list-style-type: none">• 7 ml kullanıma hazır solüsyon.• Telomerik tekrar dizilerine komplementer olan DIG (digoksinin) ile işaretlenmiş bir prob içerir• Telomeraz aracılıklı amplifikasyon ürünlerinin spesifik tayini için kullanılır.
9-Hibridizasyon solüsyonu	<ul style="list-style-type: none">• 3.5 ml kullanıma hazır solüsyon.• İnternal standarda komplementer olan DIG (digoksinin) ile işaretlenmiş bir prob içerir.• IS'li amplifikasyon ürünlerinin spesifik tayini için kullanılır.
10-Yıkama solüsyonu	<ul style="list-style-type: none">• 50 ml 10X konsantrasyonludur.

11-Anti-DIG-HRP solüsyonu (Anti-Digoksinin- Horseradish Peroksidaz)	<ul style="list-style-type: none">• 120 mU poliklonal koyun antikoru olup, liyofilize edilerek, stabil hale getirilmiştir.• Konjugat solüsyonunu hazırlamak için kullanılır.
12-Konjugat dilüsyon solüsyonu	<ul style="list-style-type: none">• 12 ml kullanıma hazır solüsyon.• Konjugat çalışma solüsyonunu hazırlamak için kullanılır.
13-TMB substrat solüsyonu	<ul style="list-style-type: none">• 12 ml kullanıma hazır solüsyon• 3,3',5,5'-tetrametil benzidin içerir.
14-Stop solüsyonu	<ul style="list-style-type: none">• 12 ml kullanıma hazır solüsyon.• %5'den daha az sülfirik asit içerir.
Mikrotiter plate	<ul style="list-style-type: none">• 1 plate 12x8 gözlüdür, kullanıma hazırdır.• Önceden streptavidin ile kaplanmıştır.
Yapıştırıcı band	<ul style="list-style-type: none">• 3 adet.• İnkübasyon esnasında MTP gözlerindeki buharlaşmayı engellemek için kullanılır.

3.2.4.2. Hücre Ekstraktının Hazırlanması

Tüm işlemler buz üzerinde yapıldı.

1. Her örnekten alınan 2×10^5 hücre eppendorf tüpüne kondu.
2. Hücreler $3000 \times g$ 'de 4°C 'de 5 dk santrifüj edildi.
3. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Dipte kalan pelet üzerine 200 μl PBS (fosfat buffer) ilave edildi.
4. $3000 \times g$ 'de 4°C 'de 5 dk santrifüj edildi.
5. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
6. Pelet üzerine 200 μl lizis solüsyonu (solüsyon 1) ilave edildi. En az 3 kez buz üzerinde pipetleme yapıldı. Sonra buz üzerinde 30 dk. inkübe edildi.
7. $16000 \times g$ 'de 4°C 'de 20 dk santrifüj edildi.
8. Hücre ekstraktının hemen üzerindeki süpernatantın 175 μl 'si yeni bir tüpe dikkatlice aktarıldı.

3.2.4.3. Negatif Kontrolün Hazırlanması

1. 5 μl hücre ekstraktı alındı.
2. Üzerine 10 μl DNaz'sız RNaz ilave edildi. Bu karışım 20 dk. 37°C 'de inkübe edildi.

3.2.4.4. Pozitif Kontrolün Hazırlanması

1. Pozitif kontrol olarak, kitte verilen kullanıma hazır solüsyon 5 kullanıldı (Solüsyon 4 de kullanılabilir).

3.2.4.5. TRAP (Telomerik Tekrarı Coğaltma Yöntemi=Telomeric Repeat Amplification Protocol) Yöntemi

Tüm işlemler buz üzerinde yapıldı.

1. Normal Örnek Tüpünün Hazırlanması:

- Uygun bir PCR tüpüne 25 µl reaksiyon karışımı (solüsyon 2) ve 5 µl internal standart (solüsyon 3) kondu.
- Hazırlanan bu karışıma 3 µl örnek ilave edildi.
- 17 µl nükleazsız su (solüsyon 6) ilave edildi.

2. Negatif Kontrol Tüpünün Hazırlanması:

- Uygun bir PCR tüpüne 25 µl reaksiyon karışımı (solüsyon 2) ve 5 µl internal standart (solüsyon 3) kondu.
- Hazırlanan bu karışıma 2 µl DNaz'sız RNaz ile muamele edilmiş örnek ilave edildi.
- 18 µl nükleazsız su (solüsyon 6) ilave edildi.

3. Pozitif Kontrol Örnek Tüpünün Hazırlanması:

- Uygun bir PCR tüpüne 25 µl reaksiyon karışımı (solüsyon 2) ve 5 µl internal standart (solüsyon 3) kondu.
- Hazırlanan bu karışıma 1 µl kontrol kalıp (solüsyon 5) ilave edildi.
- 19 µl nükleazsız su (solüsyon 6) ilave edildi.

4. Lizis Solüsyonlu Tüpün Hazırlanması:

- Uygun bir PCR tüpüne 25 µl reaksiyon karışımı (solüsyon 2) ve 5 µl internal standart (solüsyon 3) kondu.
- Hazırlanan bu karışıma 1 µl lizis solüsyonu (solüsyon 1) ilave edildi.
- 19 µl nükleazsız su (solüsyon 6) ilave edildi.

Yukarıda hazırlanan PCR tüplerinin hepsi thermal cyclera yerleştirilerek, **Tablo 3.2**'deki programa göre amplifikasyon ürünü (PCR ürünü) elde edildi.

Tablo 3.2 : TRAP amplifikasyon ürünü elde etme programı

Adım	Zaman	Sıcaklık (+)	Devir sayısı
1. Primer uzaması	30 dk.	25°C	
2. Telomeraz inaktivasyonu	5 dk.	94°C	
3. Amplifikasyon			30
Denatürasyon	30s	94°C	
Annealing	30s	50°C	
Polimerizasyon	90s	72°C	
4. Son Uzatma	10 dk.	72°C	
5. Bekletme		4°C	

3.2.4.6. PCR'ın Kontrolü

3.2.4.6.1. Poliakrilamid Jel Hazırlanması için Gerekli Solüsyonlar

10x Tris-Borat Tamponu (TBE)

50 g borik asit

108 g tris bazı

40 ml 0.5M EDTA (pH 8) (181.8 g Na₂EDTA.2H₂O + 20 g NaOH + 800ml

distile su olarak hazırlandığında pH 8 oluyor).

Distile su ile 1000ml'ye tamamlandı, manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.

%30 Poliakrilamid Jel

10 ml Acrilamid/Bisacrilamid 29:1

12.35 ml distile su

2.5 ml 10x TBE

175 µl %25 Amonyum persülfat

8.5 µl TEMED

Mezür içesine kondu.

3.2.4.6.2. Poliakrilamid Jel Elektroforez Yöntemi

1. %30 poliakrilamid jel çözeltisi dikey jel elektroforez düzeneğine dökülerek 12 dişli tarak yerleştirildi.
2. Jel donduktan sonra kurulan düzenek, içerisinde 1x TBE tamponu bulunan dikey elektroforez tankına yerleştirildi.

3. 10 µl PCR ürünü ve 2 µl loading buffer karıştırılarak kuyucuklara yüklendi (1 kuyucuğa 12 µl marker yüklendi).
4. Yükleme işleminden sonra elektrotlar yerleştirilerek 120V'da 4 saat yürütüldü.
5. Elektroforez işlemi bitince gümüş boyama ile bantlar görünür hale getirildi.

3.2.4.6.3. Gümüş Boyama Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar

%10 etanol çözeltisi

% 5 Asetik asit çözeltisi

% 0.1 AgNO₃ çözeltisi

%1.5 NaOH çözeltisi

150 µl stok formaldehit

% 0.75 Na₂CO₃

3.2.4.6.4. Gümüş Boyama Yöntemi

Elektroforez işleminin sonunda poliakrilamid jel aşağıda bildirilen solüsyon serilerinden geçirilerek boyandı.

%10 etanol + %5 asetik asit (v/v)	6 dk
% 0.1 AgNO ₃	15 dk
% 1.5 NaOH	30 dk
% 1.5 NaOH + formaldehit	Bantlar oluşuncaya kadar bekletildi.
% 0.75 Na ₂ CO ₃	Solüsyonunda yıkama işlemi yapıldı.

PCR ürünleri laboratuvarımızda Nikon marka dijital fotoğraf makinası ile görüntülendi.

3.2.4.7. Hibridizasyon ve ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi

1. Pozitif kontrol için 3 adet denatürasyon tüpü hazırlandı. Bu tüpler:
 - ◆ IS- pozitif kontrol
 - ◆ Normal- pozitif kontrol
 - ◆ Lizis solüsyonu-pozitif kontrol olarak etiketlendi.
2. Her bir örnek için 3 denatürasyon tüpü hazırlandı. Bu tüpler:
 - ◆ IS-örnek
 - ◆ Normal-örnek
 - ◆ Negatif kontrol-örnek olarak etiketlendi.
3. Her tüpe öncelikle 10 µl denatürasyon solüsyonu (solüsyon 7) ilave edildi.
4. Hazırlanan denatürasyon tüplerine sırasıyla;
 - ◆ IS'li pozitif kontrol için, hazırlanan denatürasyon tüpüne pozitif kontrolün amplifikasyon ürününden 2.5 µl kondu.
 - ◆ Normal pozitif kontrol için, hazırlanan denatürasyon tüpüne pozitif kontrolün amplifikasyon ürününden 2.5 µl kondu.
 - ◆ Lizis solüsyonu için, hazırlanan denatürasyon tüpüne lizis solüsyon amplifikasyon ürününden 2.5 µl kondu.
 - ◆ IS'li örnek için, hazırlanan denatürasyon tüpüne örneğin amplifikasyon ürününden 2.5 µl kondu.

- ◆ Örnek için, hazırlanan denatürasyon tüpüne örneğin amplifikasyon ürününden 2.5 µl kondu.
 - ◆ Negatif kontrol için, hazırlanan denatürasyon tüpüne negatif kontrol amplifikasyon ürününden 2.5 µl kondu.
5. Tüm tüpler oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
 6. Hazırlanan tüplerden, normal-pozitif kontrol, lizis solüsyonu-pozitif kontrol, normal-örnek ve negatif kontrol-örnek tüplerine 100 µl hibridizasyon solüsyonu T (solüsyon 8), IS-örnek ve IS-pozitif kontrol tüplerine ise 100 µl hibridizasyon solüsyonu IS (solüsyon 9) ilave edildi.
 7. Tüpler kısa süreli olarak vortekslendi.
 8. Tüplerdeki karışımlardan MTP'nin gözlerine tek tek 100 µl kondu ve buharlaşmayı önlemek için kendi yapışıcı bandı ile gözler kapatıldı.
 9. MTP 37⁰ C 'de shakerda 300 rpm'de 2 saat inkübe edildi.
 10. MTP'deki solüsyonların tamamı dökülerek uzaklaştırıldı, ters şekilde kurutma kağıdına kuvvetlice vurularak iyice kuruması sağlandı.
 11. Her bir göze 250 µl yıkama solüsyonu 1X (solüsyon 10) ilave edildi ve en az 30 sn sonra dökülerek uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 kez yapıldı.
 12. Her bir göze 100 µl Anti-DIG- HRP çalışma solüsyonu (solüsyon 11) ilave edildi.
 13. MTP gözleri kendi yapışıcı bandı ile örtüldü. Oda sıcaklığında 300 rpm'de 30 dk. shakerda inkübe edildi.
 14. MTP gözlerindeki solüsyonun tamamı uzaklaştırıldı.
 15. Her bir göze 250 µl yıkama solüsyonu 1X (solüsyon 10) ilave edildi ve en az 30 sn sonra dökülerek uzaklaştırıldı. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.

16. Her bir göze 100 µl TMB substrat solüsyonu (solüsyon 13) ilave edildi.
17. MTP gözleri kendi yapışıcı bandı ile örtüldü ve renk gelişimi için oda sıcaklığında 300 rpm'de 10-20 dk. shakerda inkübe edildi.
18. Substrat atılmaksızın renk gelişimini durdurmak için her bir göze 100 µl stop solüsyonu (solüsyon14) ilave edildi.
19. Stop solüsyonu ilave edilince HRP- substrat etkileşimi ile maviden sarıya doğru bir renk değişimi görüldü.
20. Bir mikrotiter plate okuyucu kullanarak, stop solüsyonunun (solüsyon 14) ilavesinden sonra 30 dk. içinde 450_{nm}'de (650_{nm} referans dalga boyunda) absorbans değeri her örnek için okundu.

3.2.4.8. Hesaplama

Örneklerin telomeraz aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$RTA = \frac{(A_s - A_{s,o}) / A_{s,IS}}{(A_{TS8} - A_{TS8,0}) / A_{TS8,IS}} \times 100$$

A_s = Örneğin Absorbansı

$A_{s,o}$ = Negatif Kontrolün Absorbansı

$A_{s,IS}$ = İnternal Standartlı Örneğin Absorbansı

A_{TS8} = Kontrol Kalıbın Absorbansı

$A_{TS8,0}$ = Lizis Solüsyonunun Absorbansı

$A_{TS8,IS}$ = İnternal Standartlı Kontrol Kalıbın Absorbansı

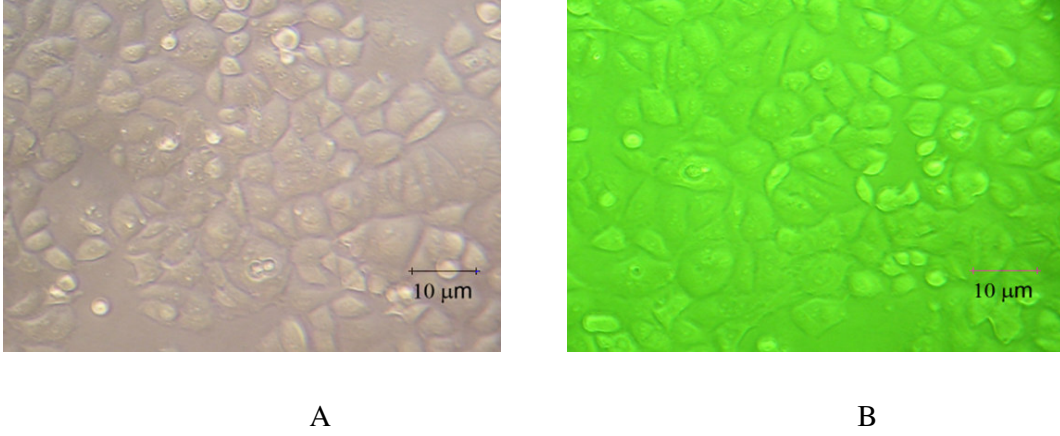
3.2.5. İstatistiksel Değerlendirme

Sonuçlar, ikili karşılaştırmalar için student-t testi, ikiden fazla karşılaştırmalar için tek yönlü varyans (Oneway ANOVA) analizi uygulanarak karşılaştırıldı. Çoklu karşılaştırmalar, Holm-Sidak oklu karşılaştırma metodu ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, MCF-7 hücre dizisinden oluşturulan gruplarda, resveratrol ve tannik asidin üç ayrı dozunun, belirlenen her üç zaman için, apoptotik indekse, Bak protein yüzdesine ve telomeraz enzim aktivitesine olan etkileri araştırılarak çalışma sonucunda elde edilen bulgular sırasıyla belirtildi.

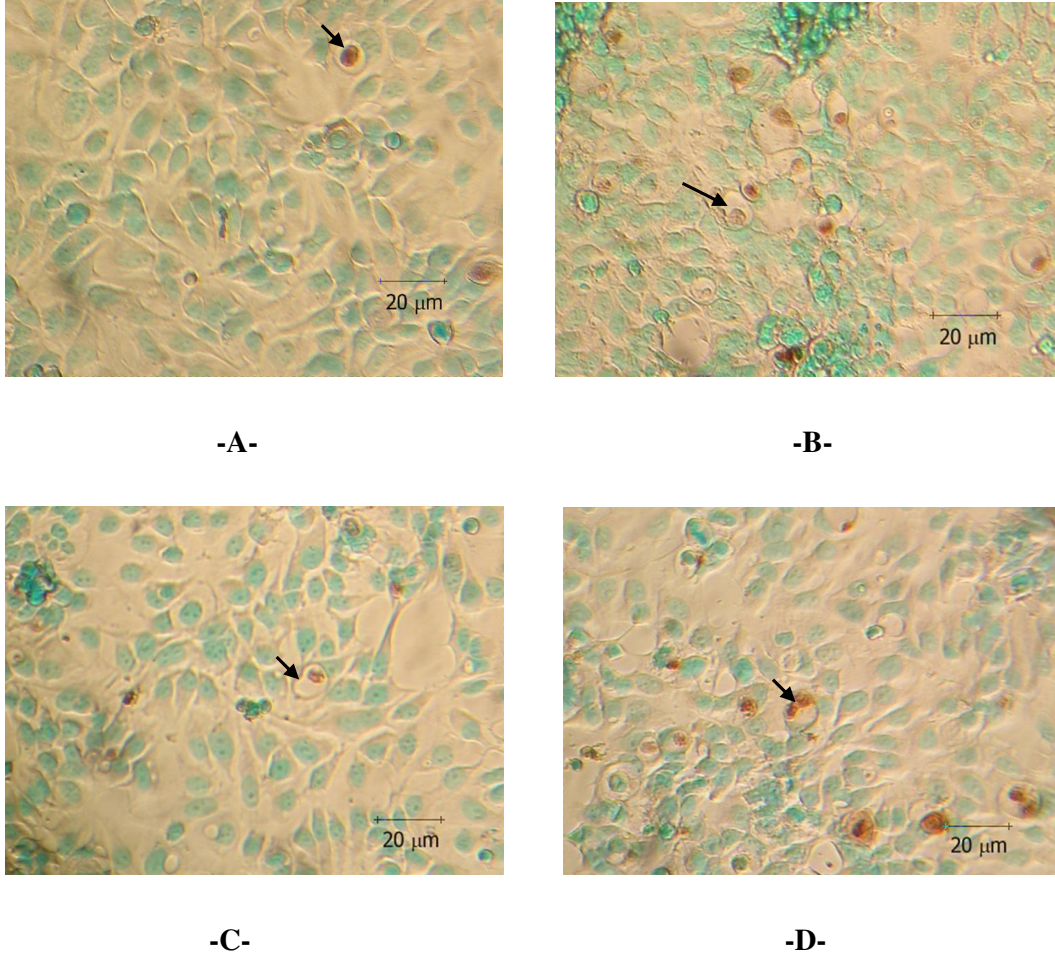
MCF-7 hücrelerinin boyanmamış görüntüleri **Şekil.4.1**'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. MCF-7 hücrelerinin boyanmamış görüntüsü (A-Filtresiz, B-Filtreli)

4.1. Apoptoz ile ilgili bulgular

Çalışmamızda, MCF-7 hücre dizisinde apoptoza uğrayan hücreler immunohistokimyasal boyamayla belirlendi. Boyama sonrasında hücreler görüntülendi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. MCF-7 hücre dizisinde apoptotik hücre görüntüleri. 24. saat kontrol grubu (A) 24. saat 50µM resveratrol grubu (B) 24. saat kontrol grubu (C) 24. saat 100µM tannik asit grubu (D).

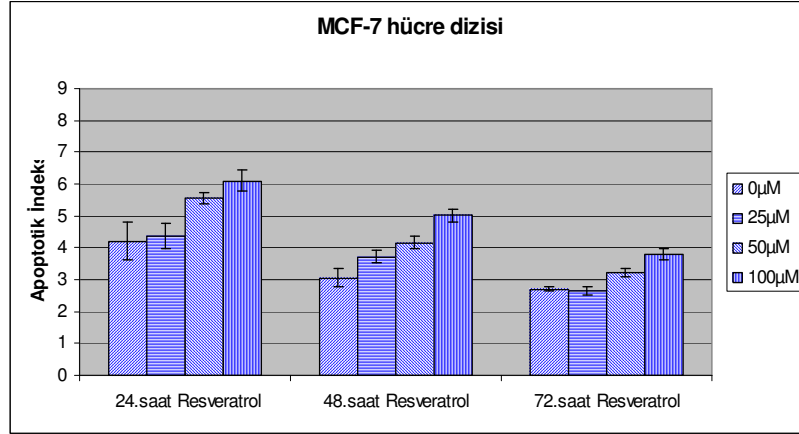
Resveratrol ve tannik asidin değişik dozlarının MCF-7 hücre dizisinde, apoptotik indekse olan etkileri **Tablo 4.1.** ve **Şekil 4.3.**'te görülmektedir.

Tablo 4.1 MCF-7 hücre dizisine ait grupların doz ve zamana göre apoptotik indeksleri

Gruplar ve Dozlar		Apoptotik indeks			Saatlere Göre İstatistik		
Gruplar	Doz(μ M)	24. saatte	48.saatte	72.saatte			
Kontrol Grubu (K)	0	4,210 \pm 0,583	3,057 \pm 0,295	2,708 \pm 0,081	K(24-48) n.s	K(24-72) n.s	K(48-72) n.s
Resveratrol (R)	25	4,376 \pm 0,391	3,726 \pm 0,217	2,642 \pm 0,119	R ₂₅ (24-48)n.s	R ₂₅ (24-72)*	R ₂₅ (48-72) n.s
	50	5,567 \pm 0,172	4,156 \pm 0,192	3,210 \pm 0,138	R ₅₀ (24-48)**	R ₅₀ (24-72)***	R ₅₀ (48-72) *
	100	6,109 \pm 0,342	5,022 \pm 0,199	3,791 \pm 0,160	R ₁₀₀ (24-48)n.s	R ₁₀₀ (24-72)**	R ₁₀₀ (48-72) *
Tannik Asit (T)	25	4,040 \pm 0,346	3,850 \pm 0,278	4,255 \pm 0,330	T ₂₅ (24-48)n.s	T ₂₅ (24-72)n.s	T ₂₅ (48-72)n.s
	50	6,778 \pm 0,300	4,949 \pm 0,077	5,032 \pm 0,302	T ₅₀ (24-48)**	T ₅₀ (24-72) **	T ₅₀ (48-72) n.s
	100	7,905 \pm 0,578	4,992 \pm 0,510	4,521 \pm 0,286	T ₁₀₀ (24-48) *	T ₁₀₀ (24-72)**	T ₁₀₀ (48-72)n.s
Dozlara Göre İstatistik		K-R ₂₅ n.s	K-R ₂₅ n.s	K-R ₂₅ n.s	Maddelere Göre İstatistik		
		K-R ₅₀ n.s	K-R ₅₀ n.s	K-R ₅₀ n.s			
		K-R ₁₀₀ n.s	K-R ₁₀₀ **	K-R ₁₀₀ **			
		R ₂₅ - R ₅₀ n.s	R ₂₅ - R ₅₀ n.s	R ₂₅ - R ₅₀ n.s	24.saat R ₂₅ - T ₂₅ n.s		
		R ₂₅ - R ₁₀₀ n.s	R ₂₅ - R ₁₀₀ *	R ₂₅ - R ₁₀₀ **	24.saat R ₅₀ - T ₅₀ *		
		R ₅₀ - R ₁₀₀ n.s	R ₅₀ - R ₁₀₀ n.s	R ₅₀ - R ₁₀₀ n.s	24.saat R ₁₀₀ -T ₁₀₀ n.s		
		K-T ₂₅ n.s	K-T ₂₅ n.s	K-T ₂₅ *	48.saat R ₂₅ - T ₂₅ n.s		
		K-T ₅₀ *	K-T ₅₀ *	K-T ₅₀ **	48.saat R ₅₀ - T ₅₀ *		
		K-T ₁₀₀ **	K-T ₁₀₀ *	K-T ₁₀₀ **	48.saat R ₁₀₀ -T ₁₀₀ n.s		
		T ₂₅ - T ₅₀ *	T ₂₅ - T ₅₀ n.s	T ₂₅ - T ₅₀ n.s	72.saat R ₂₅ - T ₂₅ *		
		T ₂₅ - T ₁₀₀ **	T ₂₅ - T ₁₀₀ n.s	T ₂₅ - T ₁₀₀ n.s	72.saat R ₅₀ - T ₅₀ **		
		T ₅₀ - T ₁₀₀ n.s	T ₅₀ - T ₁₀₀ n.s	T ₅₀ - T ₁₀₀ n.s	72.saat R ₁₀₀ -T ₁₀₀ n.s		

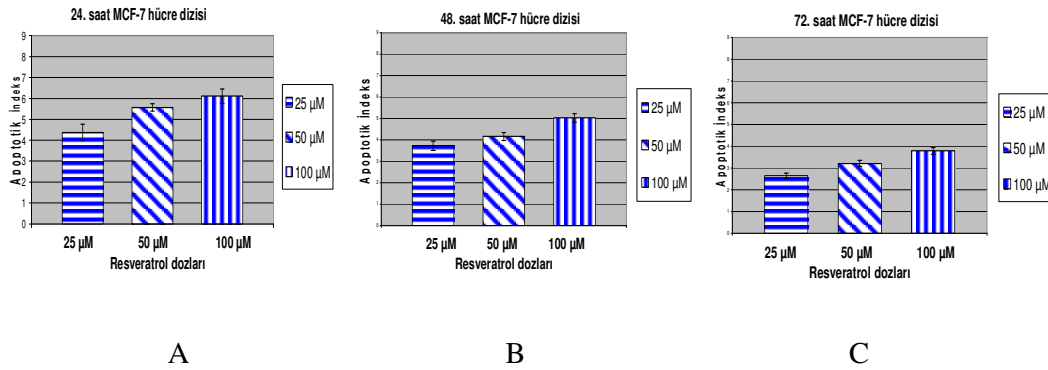
n.s. : önemli bir fark yok, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. (Ort. \pm sh.: Ortalamalar n=3 olarak (3 preparatta 30'ar alan sayılarak) hesaplanmıştır.)

100 µM resveratrol, 48. ve 72. saatlerde apoptotik indeksi kontrole göre, istatistiksel olarak önemli derecede artırdı ($p<0,01$). Diğer doz ve saatlerde ise kontrol grubuna göre bir farklılık görülmedi ($p>0,05$) (**Şekil.4.3**).



Şekil 4.3. MCF-7 hücre dizisine 25, 50 ve 100 µM resveratrolün 24., 48. ve 72. saatlerde kontrol grubuna göre apoptotik indeksleri.

Resveratrolün her üç dozu saatlere göre kendi aralarında karşılaştırıldığında, **Tablo 4.1.** ve **Şekil 4.4.**'de görüldüğü üzere, apoptotik indeksi, 100 µM resveratrol 25 µM resveratrole göre 48. saatte istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) (**Şekil 4.4. B**), 72. saatte ise önemli derecede artırdığı ($p<0,01$) (**Şekil 4.4. C**) görüldü. Diğer saatlerde dozlar arasında bir farklılık görülmedi ($p>0,05$) (**Şekil 4.4. A,B,C**).

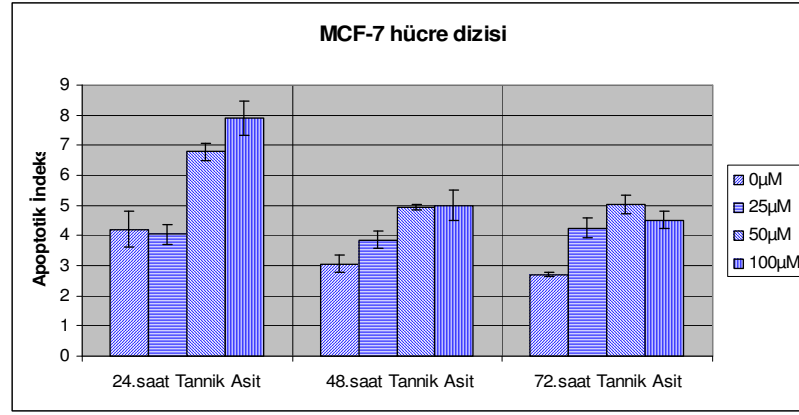


Şekil 4.4. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrolün 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) saatlerdeki apoptotik indeksleri.

Sonuç olarak, 100 µM resveratrolün kontrole göre, istatistiksel olarak 48. ve 72. saatte aynı önemde ve diğerlerinden daha fazla etkili olduğu, 48. saatte

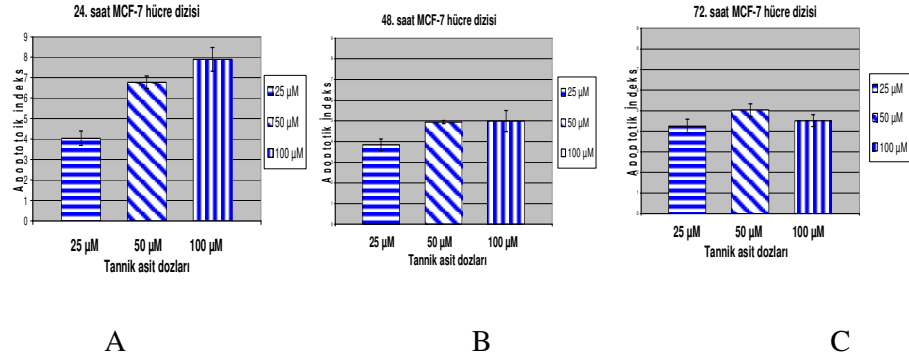
ise 72. saate göre apoptozun daha fazla uyarıldığı gözlemlendi. Resveratrol dozları kendi aralarında karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak en etkili dozun 72. saatte 25 µM göre 100 µM olduğu tesbit edildi.

Tannik asidin apoptotik indekse etkisi **Tablo.4.1.** ve **Şekil.4.5.**'te görülmektedir. Apoptotik indeksi kontrol grubuna göre, 50 µM tannik asit 24. ve 48. saatlerde anlamlı ($p<0,05$), 72. saatte önemli ($p<0,01$), 100 µM tannik asit 48. saatte anlamlı ($p<0,05$), 24. ve 72. saatlerde de önemli derecede ($p<0,01$) artırdı. Diğer doz ve saatlerde ise kontrol grubuna göre bir farklılık görülmedi ($p>0,05$) (**Şekil.4.5.**).



Şekil 4.5. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM tannik asidin 24., 48. ve 72. saatlerde kontrol grubuna göre apoptotik indeksleri.

Tannik asitin her üç dozu saatlere göre kendi aralarında karşılaştırıldığında, **Tablo 4.1.** ve **Şekil 4.6.**'da görüldüğü gibi, apoptotik indeksi, 50 µM tannik asit 25 µM tannik aside göre 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) (**Şekil 4.5. A**), 100 µM tannik asit, yine 24. saatte 25 µM tannik aside göre önemli derecede artırdı ($p<0,01$) (**Şekil 4.5. A**). Diğer saatlerde dozlar arasında bir farklılık görülmedi ($p>0,05$) (**Şekil 4.5. A,B,C**).



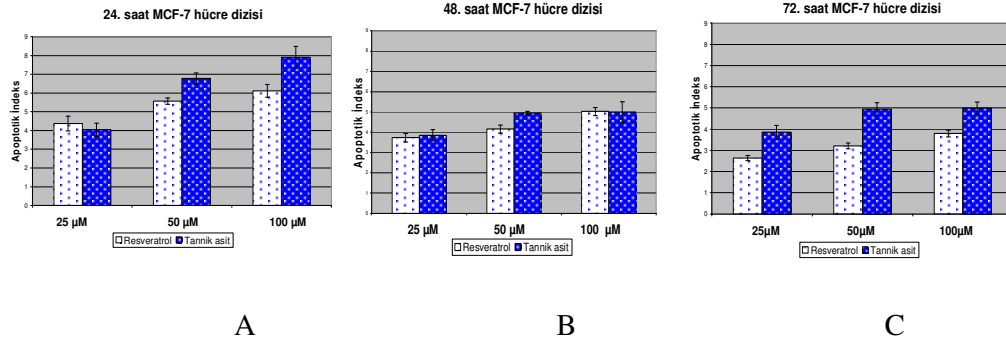
Şekil 4.6. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM tannik asidin 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) saatlerdeki apoptotik indeksleri.

Sonuç olarak, kontrole göre, 50 µM ve 100 µM tannik asidin 72. saatte, 100 µM tannik asidin 24. saatte istatistiksel olarak aynı önemde ve diğerlerinden daha fazla etkili olduğu, bunlar arasında da 100 µM tannik asidin 24. saatte apoptozu daha fazla uyardığı gözlemlendi. Tannik asit dozları kendi aralarında karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak en etkili dozun 24. saatte 25 µM göre 100 µM olduğu tesbit edildi.

Resveratrol ve tannik asidin doz ve saatlere göre apoptotik indekse olan etkilerinin birbirleri ile karşılaştırılması sonucu elde edilen değerler **Tablo 4.1.** ve **Şekil 4.7.**'de görülmektedir.

Elde edilen bu değerlere göre, 25 µM resveratrole göre, 25 µM tannik asit 72. saatte, 50µM resveratrole göre 50 µM tannik asit, hem 24. hem de 48. saatte, apoptotik indeksi istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdı ($p < 0,05$) (**Şekil 4.7. A,B,C**). 50µM resveratrole göre 50 µM tannik asit, 72. saatte apoptotik indeksi istatistiksel olarak önemli derecede artırdı ($p < 0,01$) (**Şekil 4.7.C**). Diğerlerinde ise istatistiksel olarak bir farklılık görülmedi ($p > 0,05$) (**Şekil 4.7. A,B,C**).

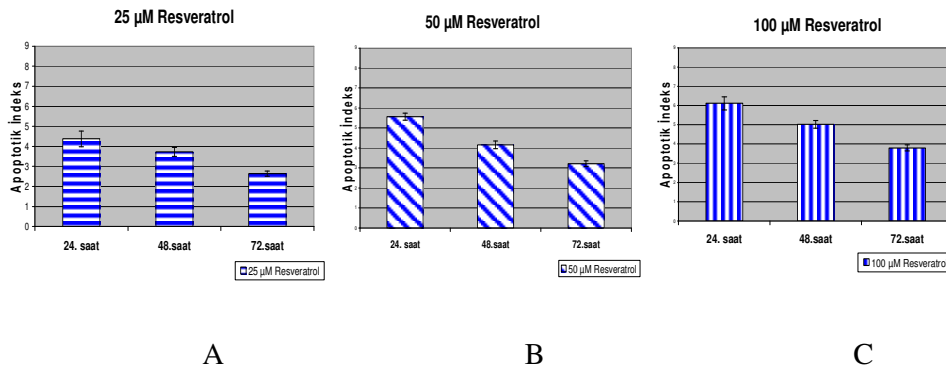
Resveratrol ve tannik asidin doz ve saatlere göre apoptotik indekse olan etkilerinin birbirleri ile karşılaştırılması sonucunda, istatistiksel olarak 72. saatte 100 µM tanik asidin, 100 µM resveratrole göre en etkili doz olduğu, tüm doz karşılaştırmaları genel olarak incelendiğinde de tannik asidin apoptozu daha fazla etkilediği tesbit edildi.



Şekil 4.7. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrol ve tannik asidin 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) saatlerdeki apoptotik indeksleri.

Her iki maddenin dozlarının ayrı ayrı kendi içlerinde saatlere göre karşılaştırılmasıyla elde edilen apoptotik indeks değerleri **Tablo.4.1.** ve **Şekil 4.8.-4.9.**'da görüldüğü gibidir.

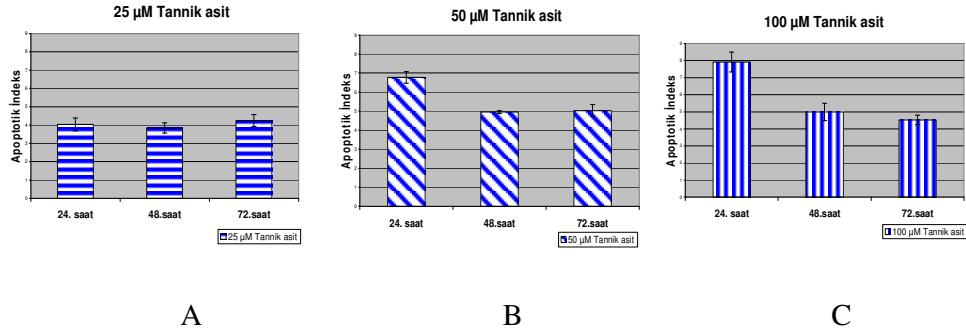
Resveratrol dozlarının 24., 48. ve 72. saatlerde apoptotik indekse olan etkilerine bakıldığında, apoptotik indeksi istatistiksel olarak, 25 µM resveratrolün, 72. saate göre 24. saatte, 50 ve 100 µM resveratrolün 72. saate göre 48. saatte anlamlı ($p < 0,05$), 50 µM resveratrolün 48. saate göre 24. saatte, 100 µM resveratrolün 72. saate göre 24. saatte önemli ($p < 0,01$), 50 µM resveratrolün 72. saate göre 24. saatte ileri derecede anlamlı ($p < 0,001$) şekilde artırdığı, diğer dozlarının ise saatler arasında bir farklılık göstermediği ($p > 0,05$) tesbit edildi (**Şekil 4.8. A,B,C**).



Şekil 4.8. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrol 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) saatlerdeki apoptotik indeksleri.

Sonuç olarak, istatistiksel olarak 50 μ M resveratrol 72. saate göre 24. saatte en etkili resveratrol dozu olarak belirlendi, genel olarak incelendiğinde, resveratrolün her 3 dozunun 24. saatte diğer saatlere göre apoptozu en fazla uyardığı ortaya kondu.

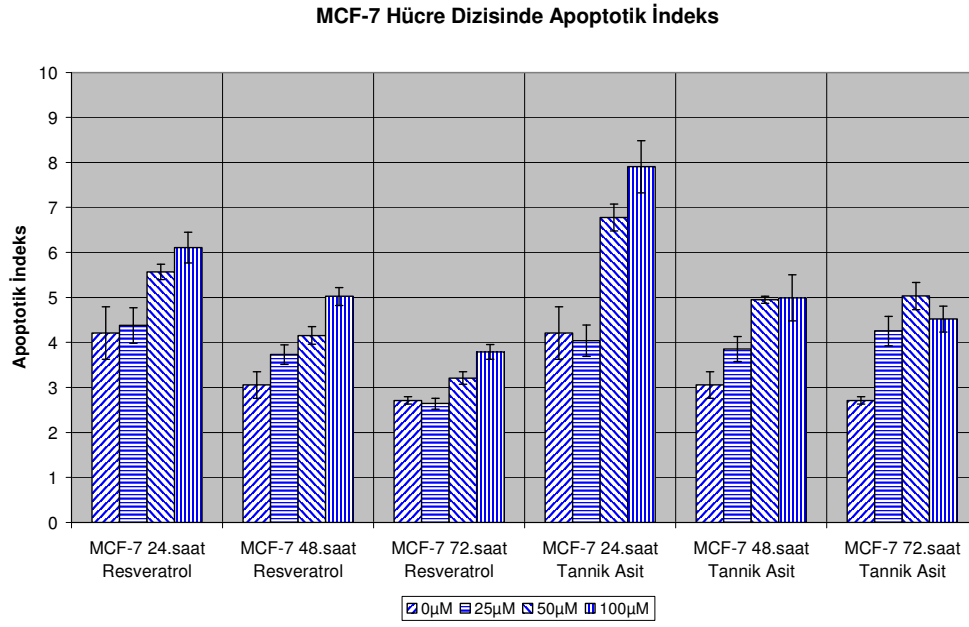
Tannik asit dozlarının 24., 48. ve 72. saatlerde apoptotik indekse olan etkilerine bakıldığında, apoptotik indeksi, istatistiksel olarak, 100 μ M tannik asidin 48. saate göre 24. saatte anlamlı ($p<0,05$), 50 μ M tannik asidin 48. ve 72.saatlere göre 24. saatte ve 100 μ M tannik asidin 72. saate göre 24. saatte önemli derecede artırdığı ($p<0,01$), diğer dozlarının ise saatler arasında bir farklılık göstermediği ($p>0,05$) tesbit edildi (Şekil 4.9.A,B,C).



Şekil 4.9. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 μ M tannik asidin 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) saatlerdeki apoptotik indeksleri.

Sonuç olarak, istatistiksel olarak 50 μ M tannik asit 48. ve 72. saate göre 24. saatte, 100 μ M tannik asit 72. saate göre 24. saatte, en etkili tannik asit dozları olarak belirlendi, genel olarak incelendiğinde, tannik asidin her 3 dozunun 48. ve 72. saate göre 24. saatte apoptozu en fazla uyardığı ortaya kondu.

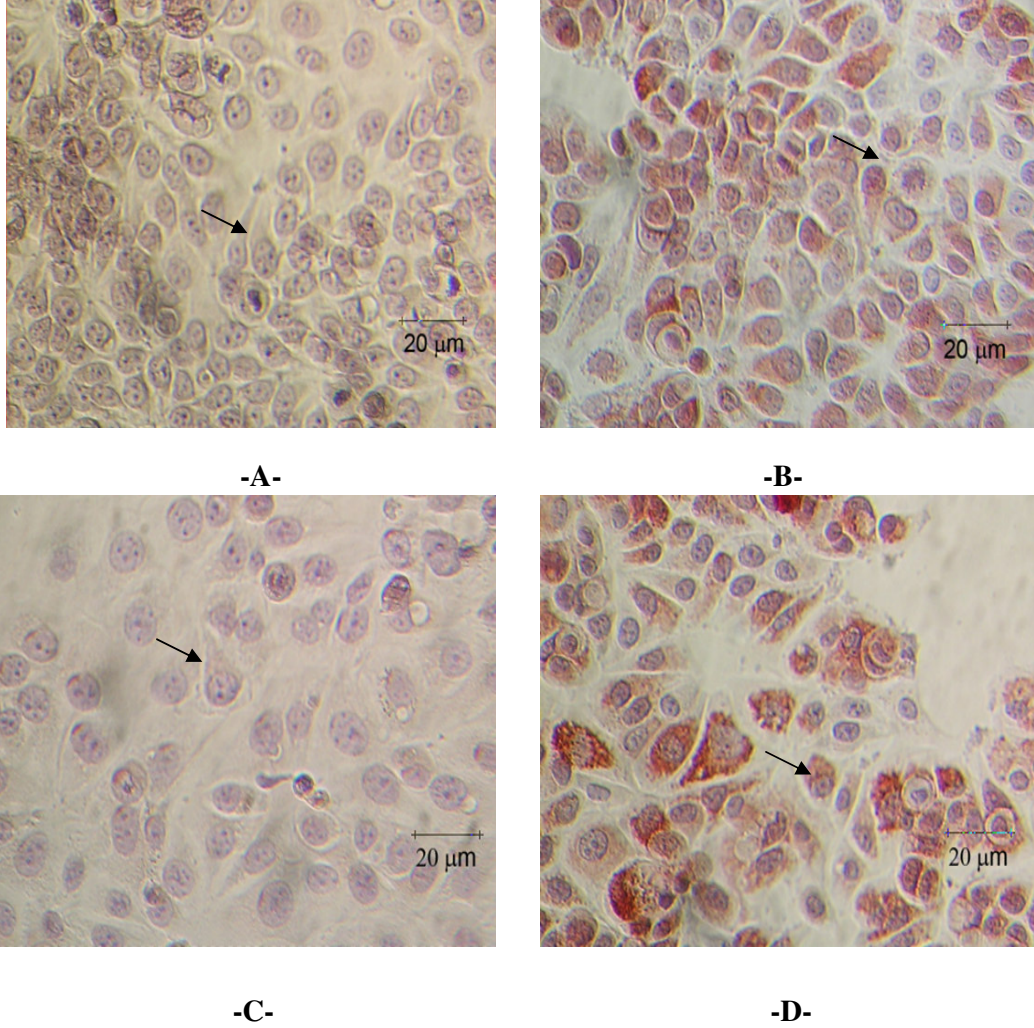
MCF-7 hücre dizisinde 25, 50, 100 μ M resveratrol ve tannik asit dozlarının 24., 48. ve 72. saatlerdeki apoptotik indekse etkileri kontrol gruplarıyla birlikte Şekil.4.10.'da görüldüğü gibidir.



Şekil 4.10. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 μ M resveratrol ve tannik asidin 24., 48. ve 72. saatlerdeki apoptotik indeksleri.

4.2. Bak ile ilgili bulgular

Çalışmamızda, MCF-7 hücre dizisinde Bak proteini immunohistokimyasal boyamayla belirlendi. Boyama sonrasında hücreler görüntüledi (**Şekil 4.11**).



Şekil 4.11. MCF-7 hücre dizisinde Bak proteinin immunohistokimyasal olarak belirlenen görüntüleri. 72. saat kontrol grubu (A) 72. saat 100 µM resveratrol grubu (B) 72. saat kontrol grubu (C) 72. saat 100 µM tannik asit grubu (D).

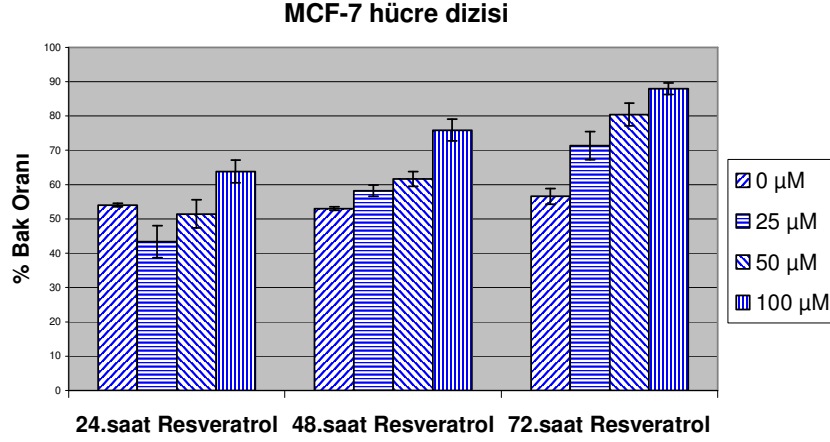
Resveratrol ve tannik asidin değişik dozlarının MCF-7 hücre dizisinde, % Bak oranına olan etkileri **Tablo 4.2.** ve **Şekil 4.12.**'te görülmektedir.

Tablo 4.2. MCF-7 hücre dizisine ait grupların doz ve zamana göre % Bak oranları

Gruplar ve Dozlar		% Bak Oranı			Saatlere Göre İstatistik		
Gruplar	Doz(μ M)	24. saatte	48.saatte	72.saatte			
Kontrol Grubu (K)	0	54,012 \pm 0,503	52,984 \pm 0 ,551	56,580 \pm 2,248	K(24-48)n.s	K(24-72) n.s	K(48-72) n.s
Resveratrol (R)	25	43,366 \pm 4,706	58,231 \pm 1,648	71,350 \pm 4,065	R ₂₅ (24-48)n.s	R ₂₅ (24-72)**	R ₂₅ (48-72) n.s
	50	51,468 \pm 4,076	61,629 \pm 2,105	80,452 \pm 3,268	R ₅₀ (24-48) n.s	R ₅₀ (24-72) **	R ₅₀ (48-72) *
	100	63,798 \pm 3,309	75,909 \pm 3,130	87,917 \pm 1,667	R ₁₀₀ (24-48)n.s	R ₁₀₀ (24-72)**	R ₁₀₀ (48-72) n.s
Tannik Asit (T)	25	60,376 \pm 2,993	67,714 \pm 3,704	62,414 \pm 0,770	T ₂₅ (24-48) n.s	T ₂₅ (24-72)n.s	T ₂₅ (48-72)n.s
	50	61,511 \pm 0,673	68,797 \pm 2,524	68,913 \pm 1,079	T ₅₀ (24-48) *	T ₅₀ (24-72) n.s	T ₅₀ (48-72)n.s
	100	74,084 \pm 0,615	76,962 \pm 1,670	74,922 \pm 0,688	T ₁₀₀ (24-48)n.s	T ₁₀₀ (24-72) n.s	T ₁₀₀ (48-72) n.s
Dozlara Göre İstatistik		K-R ₂₅ n.s	K-R ₂₅ n.s	K-R ₂₅ *	Maddelere Göre İstatistik		
		K-R ₅₀ n.s	K-R ₅₀ n.s	K-R ₅₀ **			
		K-R ₁₀₀ n.s	K-R ₁₀₀ ***	K-R ₁₀₀ ***			
		R ₂₅ . R ₅₀ n.s	R ₂₅ . R ₅₀ n.s	R ₂₅ . R ₅₀ n.s	24.saat R ₂₅ . T ₂₅ *		
		R ₂₅ . R ₁₀₀ *	R ₂₅ . R ₁₀₀ **	R ₂₅ . R ₁₀₀ *	24.saat R ₅₀ . T ₅₀ n.s		
		R ₅₀ . R ₁₀₀ n.s	R ₅₀ . R ₁₀₀ **	R ₅₀ . R ₁₀₀ n.s	24.saat R ₁₀₀ .T ₁₀₀ n.s		
		K-T ₂₅ n.s.	K-T ₂₅ *	K-T ₂₅ n.s	48.saat R ₂₅ . T ₂₅ n.s		
		K-T ₅₀ n.s	K-T ₅₀ *	K-T ₅₀ **	48.saat R ₅₀ . T ₅₀ n.s		
		K-T ₁₀₀ ***	K-T ₁₀₀ **	K-T ₁₀₀ ***	48.saat R ₁₀₀ .T ₁₀₀ n.s		
		T ₂₅ . T ₅₀ n.s	T ₂₅ . T ₅₀ n.s	T ₂₅ . T ₅₀ n.s	72.saat R ₂₅ . T ₂₅ n.s		
		T ₂₅ . T ₁₀₀ **	T ₂₅ . T ₁₀₀ n.s	T ₂₅ . T ₁₀₀ **	72.saat R ₅₀ . T ₅₀ *		
		T ₅₀ . T ₁₀₀ **	T ₅₀ . T ₁₀₀ n.s	T ₅₀ . T ₁₀₀ n.s	72.saat R ₁₀₀ .T ₁₀₀ **		

n.s. : önemli bir fark yok, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. (Ort. \pm sh.: Ortalamalar n=3 olarak (3 preparatta 30'ar alan sayılarak) hesaplanmıştır.)

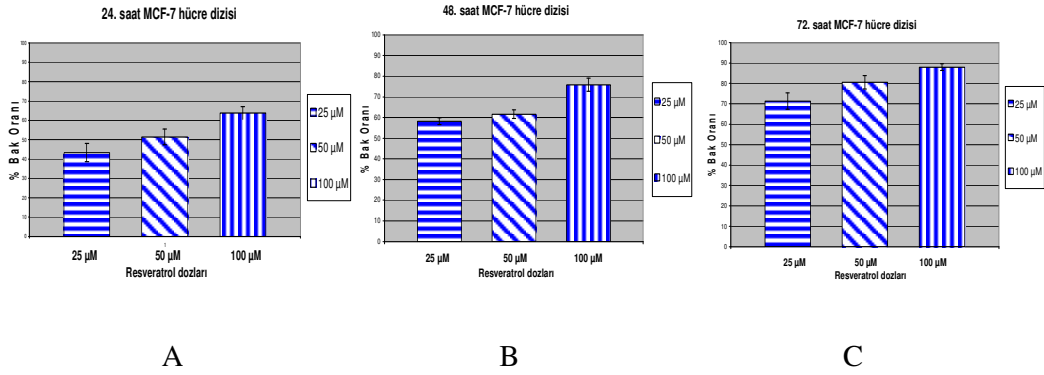
% Bak oranını, kontrole göre, resveratrolün 100 µM dozu 48. ve 72. saatlerde istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı ($p<0,001$), 50 µM dozu 72. saatte önemli ($p<0,01$) ve 25 µM dozu 72. saatte anlamlı ($p<0,05$) olarak artırdı. Diğer doz ve saatlerde ise kontrol grubuna göre bir farklılık görülmedi ($p>0,05$) (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. MCF-7 hücre dizisine 25, 50 ve 100 µM resveratrolün 24., 48. ve 72. saatlerde kontrol grubuna göre % Bak oranları.

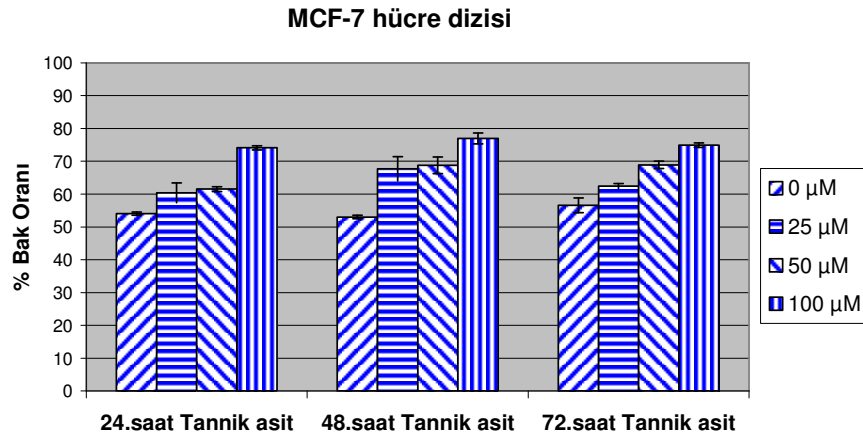
Resveratrolün her üç dozu saatlere göre kendi aralarında karşılaştırıldığında, **Tablo.4.2.** ve **Şekil 4.13.**'de görüldüğü gibi % Bak oranını, istatistiksel olarak resveratrolün 100 µM dozu 25 µM doza göre 24. saatte anlamlı ($p<0,05$) (**Şekil 4.13.A**), 100 µM dozu 25 ve 50 µM dozlara göre 48. saatte önemli ($p<0,01$) (**Şekil 4.13.B**) ve 100 µM dozu 25 µM doza göre 72. saatte anlamlı ($p<0,05$) şekilde artırdığı görüldü (**Şekil 4.13.C**). Diğer saatlerde dozlar arasında bir farklılık görülmedi ($p>0,05$) (**Şekil 4.13. A,B,C**)

Sonuç olarak, istatistiksel olarak 100 µM resveratrolün kontrole göre, 48. ve 72. saatlerde Bak oranına etkisinin aynı önemde ve diğerlerinden daha fazla olduğu, 48. saatte 72. saate göre % Bak oranının daha fazla olduğu gözlemlendi. Resveratrol dozları kendi aralarında karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak, % Bak oranına en etkili dozun 48. saatte 25 ve 50 µM göre 100 µM doz olduğu tesbit edildi.



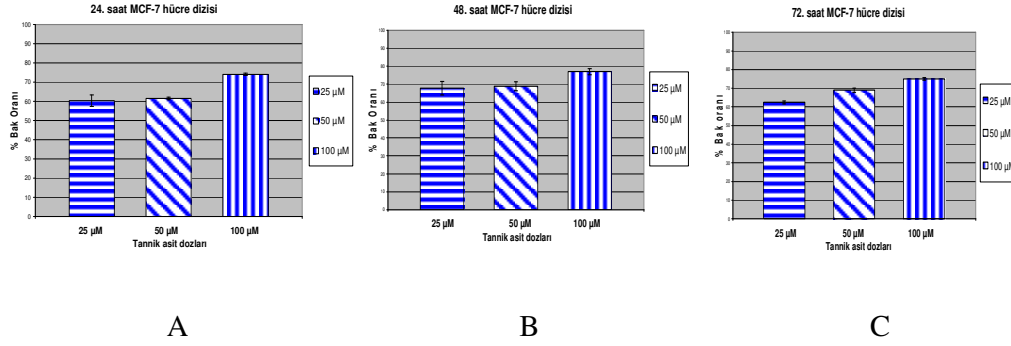
Şekil 4.13. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrolün 24.(A), 48. (B) ve 72. (C) saatlerdeki % Bak oranları.

Tannik asidin etkisi **Tablo 4.2.** ve **Şekil 4.14.**'te görülmektedir. % Bak oranını, istatistiksel olarak, kontrol grubuna göre, tannik asidin 100 µM dozu 24. ve 72. saatlerde ileri derecede anlamlı ($p < 0,001$), 50 ve 100 µM dozları 72. saatte önemli ($p < 0,01$), 25 ve 50 µM dozları 48.saatte anlamlı ($p < 0,05$) olarak artırdı. Diğer doz ve saatlerde ise kontrol grubuna göre bir farklılık görülmedi ($p > 0,05$) (**Şekil 4.14.**).



Şekil 4.14. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM tannik asidin 24., 48. ve 72. saatlerde kontrol grubuna göre % Bak oranı

Tannik asitin her üç dozu saatlere göre kendi aralarında karşılaştırıldığında, **Tablo 4.2.** ve **Şekil 4.15.**'de görüldüğü gibi, % Bak oranını, istatistiksel olarak, tannik asidin 100 µM dozu 25 ve 50 µM dozlara göre 24. saatte, 100 µM dozu 25 µM tannik aside göre 72. saatte önemli ($p<0,01$) (**Şekil 4.15.A,C**) derecede artırdı. Diğer saatlerde dozlar arasında bir farklılık görülmedi ($p>0,05$) (**Şekil 4.15.A,B,C**).



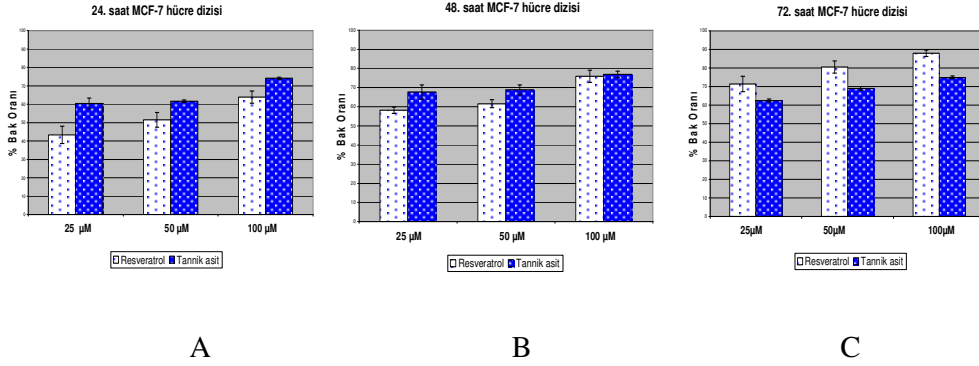
Şekil 4.15. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM tannik asidin 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) saatlerdeki % Bak oranı

Sonuç olarak, kontrole göre, Bak oranını artırmada, 100 µM tannik asidin 24. ve 72. saatlerde aynı önemde ve diğerlerinden daha fazla etkili olduğu, 72. saatte ise 24. saate göre bu oranı daha fazla artırdığı gözlemlendi. Tannik asit dozları kendi aralarında karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak en etkili dozun 24. ve 72. saatlerde 100 µM olduğu tesbit edildi.

Resveratrol ve tannik asidin doz ve saatlere göre % Bak oranına olan etkilerinin birbirleri ile karşılaştırılması sonucu elde edilen değerler **Tablo 4.2.** ve **Şekil 4.16.**'de görülmektedir.

Elde edilen bu değerlere göre, % Bak oranını istatistiksel olarak, resveratrolün 25 µM dozuna göre, tannik asidin 25 µM dozu 24. saatte, tannik asidin 50µM dozuna göre resveratrolün 50 µM dozu 72. saatte anlamlı ($p<0,05$) (**Şekil 4.16.A,C**), tannik asidin 100 µM dozuna göre resveratrolün 100 µM dozu 72. saatte önemli derecede artırdığı ($p<0,01$) görüldü (**Şekil 4.16.C**). Diğerlerinde ise istatistiksel olarak bir farklılık görülmedi ($p>0,05$) (**Şekil 4.16.A,B,C**).

Resveratrol ve tannik asidin doz ve saatlere göre % Bak oranlarına etkilerinin birbirleri ile karşılaştırılması sonucunda, istatistiksel olarak 72. saatte 100 µM resveratrolün 100 µM tannik aside göre en etkili doz olduğu tesbit edildi.

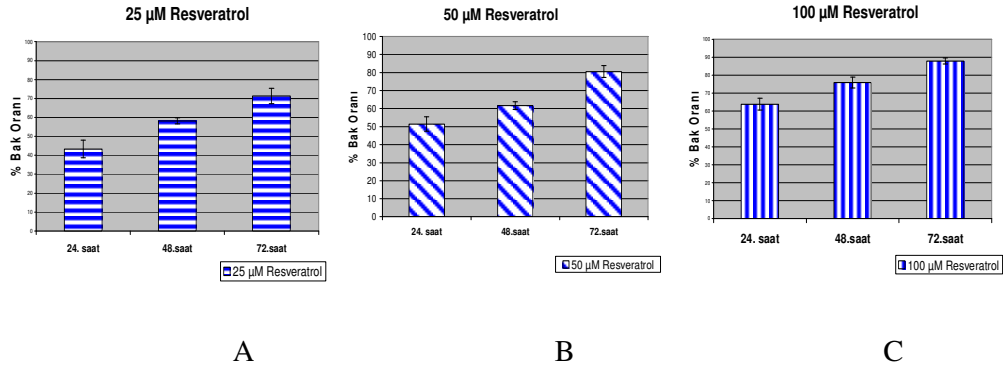


Şekil 4.16. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrol ve tannik asidin 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) saatlerdeki % Bak oranı.

Her iki maddenin dozlarının ayrı ayrı kendi içlerinde saatlere göre karşılaştırılmasıyla elde edilen % Bak oranları **Tablo 4.2.** ve **Şekil 4.17** ve **4.18.**'de görüldüğü gibidir.

Resveratrol dozlarının 24., 48. ve 72. saatlerde % Bak oranlarına etkilerine bakıldığında, % Bak oranını, istatistiksel olarak, resveratrolün 25 ve 50 µM dozları, 24. saate göre 72.saatte önemli ($p<0,01$), 50 µM dozun 48. saate göre 72. saate anlamlı ($p<0,05$), 100 µM dozun 24. saate göre 72.saatte önemli ($p<0,01$) şekilde artırdığı, diğer dozlarının ise saatler arasında bir farklılık göstermediği ($p>0,05$) tesbit edildi (**Şekil 4.17.A,B,C**).

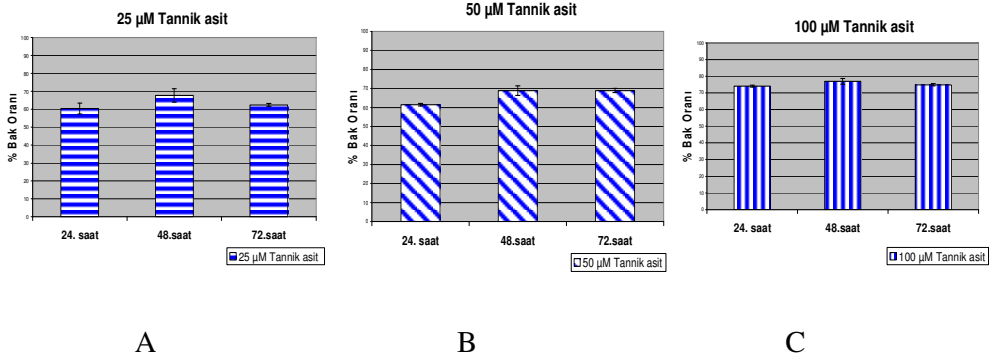
Sonuç olarak, 25,50 ve 100 µM resveratrol dozlarının her üçünün de istatistiksel olarak 24. saate göre 72. saate etkili doz oldukları belirlendi.



Şekil 4.17. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM resveratrol dozlarının 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) saatlerde % Bak oranına etkileri.

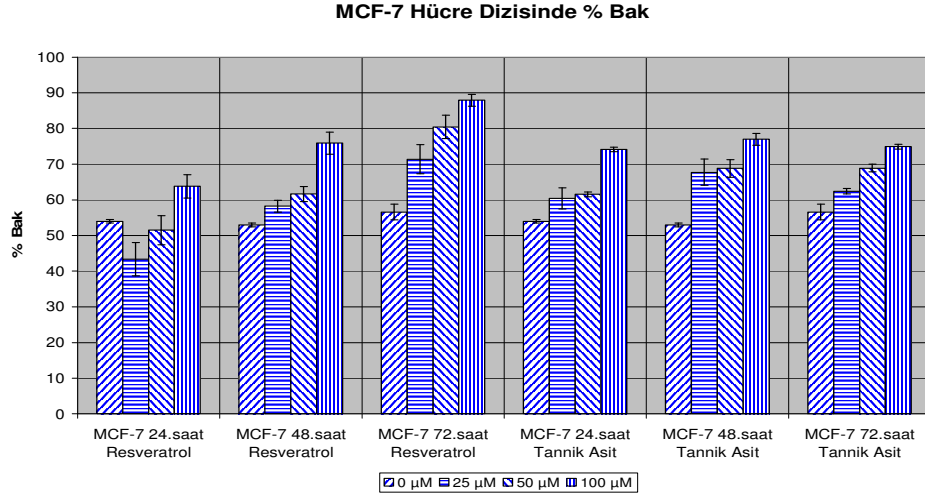
Tannik asit dozlarının 24., 48. ve 72. saatlerde % Bak oranına etkilerine bakıldığında, % Bak oranını, istatistiksel olarak, tannik asidin 50 µM dozunun 24. saate göre 48. saatte anlamlı ($p < 0,05$) olarak artırdığı, diğer dozlarının ise saatler arasında bir farklılık göstermediği ($p > 0,05$) tesbit edildi (Şekil 4.18.A,B,C).

Sonuç olarak, % Bak oranını 50 µM tannik asit dozu istatistiksel olarak, 24. saate göre 48. saatte önemli derecede artırdı.



Şekil 4.18. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 µM tannik asidin 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) saatlerdeki % Bak oranı

MCF-7 hücre dizisinde 25, 50, 100 μ M resveratrol ve tannik asit dozlarının 24., 48. ve 72. saatlerdeki % Bak oranına etkileri kontrol gruplarıyla birlikte **Şekil.4.19'**da görüldüğü gibidir.



Şekil 4.19. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 μ M resveratrol ve tannik asit dozlarının 24., 48. ve 72. saatlerdeki % Bak oranına etkileri.

4.3. Telomeraz Aktivitesi ile bulgular

Çalışmamızda, MCF-7 hücre dizisinden elde edilen hücre ekstraktlarında, TELOTAGGG^{PLUS} PCR-ELİSA kit prosedürüne uygun olarak telomeraz aktivitesine bakıldı.

Tablo 4.3.'de MCF-7 hücre dizisine ait gruplarda, resveratrol ve tannik asidin değişik dozlarının, telomeraz enzim aktivitesine olan etkileri görülmektedir.

Resveratrolün telomeraz enzim aktivitesine etkileri **Tablo 4.3.** ve **Şekil 4.20.**' de görülmektedir.

Tablo 4.3. MCF-7 hücre dizisine ait grupların saat ve dozlara göre telomeraz enzim aktiviteleri

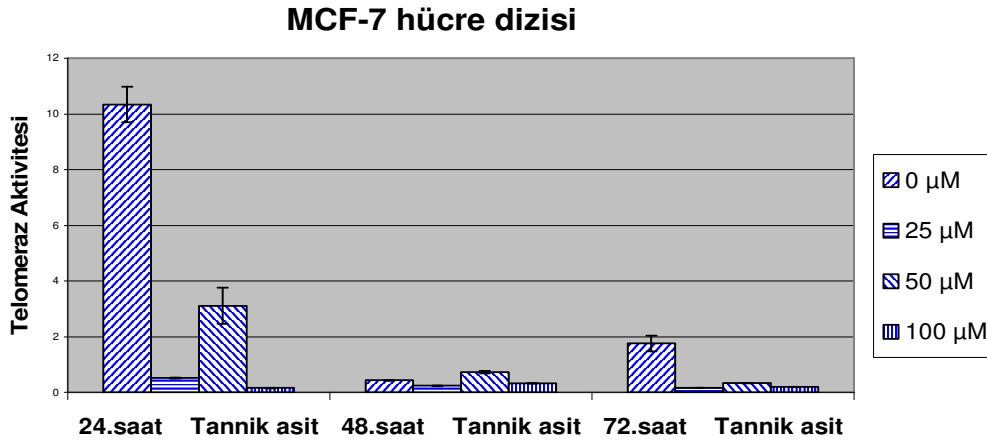
Gruplar ve Dozlar		Telomeraz enzim aktivitesi			Saatlere Göre İstatistik		
Gruplar	Doz(μM)	24. saatte	48.saatte	72.saatte			
Kontrol Grubu (K)	0	10,334 ± 0,639	0,432 ± 0,003	1,760 ± 0,280	K(24-48)***	K(24-72)***	K(48-72) n.s
Resveratrol (R)	25	4,183 ± 0,710	0,040 ± 0,007	1,624 ± 0,223	R ₂₅ (24-48)**	R ₂₅ (24-72)*	R ₂₅ (48-72) n.s
	50	4,186 ± 0,918	0,004 ± 0,000	3,801 ± 0,819	R ₅₀ (24-48) *	R ₅₀ (24-72) n.s	R ₅₀ (48-72)*
	100	4,624 ± 0,181	0,004 ± 0,001	0,018 ± 0,005	R ₁₀₀ (24-48)***	R ₁₀₀ (24-72)***	R ₁₀₀ (48-72)n.s
Tannik Asit (T)	25	0,018 ± 0,010	0,137 ± 0,012	0,165 ± 0,002	T ₂₅ (24-48)***	T ₂₅ (24-72)***	T ₂₅ (48-72) n.s
	50	3,105 ± 0,650	0,735 ± 0,049	0,332 ± 0,002	T ₅₀ (24-48)*	T ₅₀ (24-72)**	T ₅₀ (48-72) n.s
	100	0,006 ± 0,002	0,320 ± 0,002	0,013 ± ,0000	T ₁₀₀ (24-48)***	T ₁₀₀ (24-72)n.s	T ₁₀₀ (48-72)***
Dozlara Göre İstatistik		K-R ₂₅ **	K-R ₂₅ ***	K-R ₂₅ n.s	Maddelere Göre İstatistik		
		K-R ₅₀ **	K-R ₅₀ ***	K-R ₅₀ n.s			
		K-R ₁₀₀ **	K-R ₁₀₀ ***	K-R ₁₀₀ n.s			
		R ₂₅ - R ₅₀ n.s	R ₂₅ - R ₅₀ **	R ₂₅ - R ₅₀ n.s	24.saat R ₂₅ - T ₂₅ *		
		R ₂₅ - R ₁₀₀ n.s	R ₂₅ - R ₁₀₀ **	R ₂₅ - R ₁₀₀ n.s	24.saat R ₅₀ - T ₅₀ n.s		
		R ₅₀ - R ₁₀₀ n.s	R ₅₀ - R ₁₀₀ n.s	R ₅₀ - R ₁₀₀ **	24.saat R ₁₀₀ -T ₁₀₀ ***		
		K-T ₂₅ ***	K-T ₂₅ ***	K-T ₂₅ ***	48.saat R ₂₅ - T ₂₅ **		
		K-T ₅₀ ***	K-T ₅₀ ***	K-T ₅₀ **	48.saat R ₅₀ - T ₅₀ **		
		K-T ₁₀₀ ***	K-T ₁₀₀ n.s	K-T ₁₀₀ ***	48.saat R ₁₀₀ -T ₁₀₀ ***		
		T ₂₅ - T ₅₀ **	T ₂₅ - T ₅₀ ***	T ₂₅ - T ₅₀ n.s	72.saat R ₂₅ - T ₂₅ *		
		T ₂₅ - T ₁₀₀ n.s	T ₂₅ - T ₁₀₀ **	T ₂₅ - T ₁₀₀ n.s	72.saat R ₅₀ - T ₅₀ n.s		
		T ₅₀ - T ₁₀₀ **	T ₅₀ - T ₁₀₀ ***	T ₅₀ - T ₁₀₀ n.s	72.saat R ₁₀₀ -T ₁₀₀ n.s		

n.s önemli bir fark yok,*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (Ort.± sh.: Ortalamalar, yapılan üç ölçüm (n=3) sonucunda hesaplanmıştır.)

Şekil 4.21. MCF-7 hücre dizisine uygulanan 25, 50 ve 100 µM resveratrol dozlarının 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) saatlerdeki telomeraz enzim aktivitesine olan etkileri.

Sonuç olarak, 25, 50 ve 100 µM resveratrol dozlarının kontrole göre, istatistiksel olarak 48. saatte aynı önemde ve diğerlerinden daha fazla etkili olduğu, bu dozlar arasından da 50 ve 100 µM ün telomeraz enzim aktivitesini aynı derecede ve de diğer doz ve saatlerden daha fazla uyarıldığı gözlemlendi. Resveratrol dozları kendi aralarında karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak en etkili dozların yine 48. saatte 25 µM göre 50 ve 100 µM olduğu tesbit edildi.

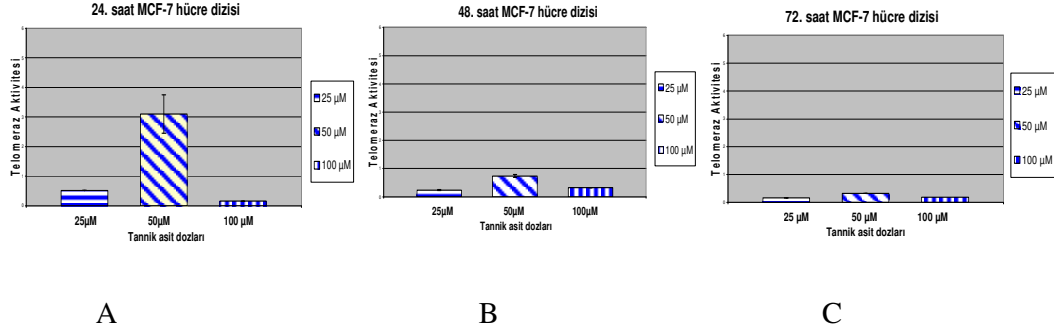
Tannik asitin 25, 50 ve 100 µM dozlarının her üçünün de, telomeraz enzim aktivitesini, kontrole göre, istatistiksel olarak 24. saatte ileri derecede anlamlı ($p < 0,001$), 25 ve 50 µM dozlarının 48. saatte ileri derecede anlamlı ($p < 0,001$), 50 µM dozun 72. saatte önemli derecede ($p < 0,01$), 25 ve 100 µM dozlarının yine 72. saatte fakat ileri derecede anlamlı ($p < 0,001$) olarak düşürdüğü, diğer doz ve saatlerde ise bir farklılık görülmediği ($p > 0,05$) tesbit edildi (Şekil 4.22.).



Şekil 4.22. MCF-7 hücre dizisine uygulanan 25, 50 ve 100 µM tannik asidin dozlarından uygulandıktan 24., 48. ve 72. saatlerde, kontrol grubuna göre telomeraz aktivitesine etkileri

Tannik asit grupları telomeraz enzim aktivitesi açısından kendi aralarında karşılaştırıldığında, **Tablo.4.3.** ve **Şekil 4.22.**'de görüldüğü gibi, bu aktiviteyi,

istatistiksel olarak 25 ve 100 μM dozların 24. saatte 50 μM doza göre önemli ($p<0,01$) (Şekil 4.22. A), 25 ve 100 μM dozların 48. saatte 50 μM doza göre ileri derecede anlamlı ($p<0,001$) (Şekil 4.22. B) , 25 μM dozun 48. saatte 100 μM doza göre önemli derecede düşürdüğü ($p<0,01$). (Şekil 4.22. B), diğerlerinde ise bir farklılık görülmediği ($p>0,05$) (Şekil 4.22. A,B,C) tesbit edildi.



Şekil 4.23. MCF-7 hücre dizisine uygulanan 25, 50 ve 100 μM tannik asidin 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) saatlerdeki telomeraz enzim aktiviteleri.

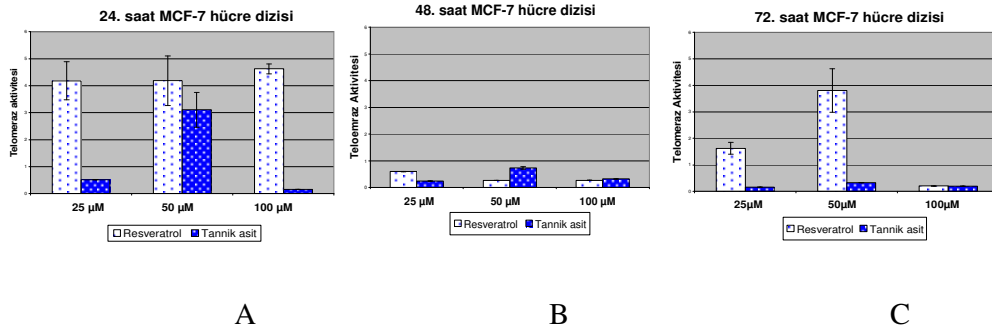
Sonuç olarak, kontrole göre, 24. saatte 25, 50 ve 100 μM tannik asit dozlarının, 48. saatte 25 ve 50 μM dozlarının, 72. saatte 25 ve 100 μM dozlarının istatistiksel olarak aynı önemde ve diğerlerinden daha fazla etkili olduğu, bu dozlar arasından da 24. saatte 100 μM ün telomeraz enzim aktivitesini daha fazla düşürdüğü gözlemlendi. Tannik asit dozları kendi aralarında karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak en etkili dozların 48. saatte 50 μM göre 25 ve 100 μM olduğu tesbit edildi.

Resveratrol ve tannik asidin doz ve saatlere göre telomeraz enzim aktivitesine olan etkilerinin birbirleri ile karşılaştırılması sonucu elde edilen değerler Tablo 4.3. ve Şekil 4.23.'de görülmektedir.

Elde edilen bu değerlere göre, telomeraz enzim aktivitesini, istatistiksel olarak, 25 μM resveratrole göre 25 μM tannik asit 24. saatte anlamlı ($p<0,05$) (Şekil 4.23.A), 100 μM resveratrole göre 100 μM tannik asit 24. saatte ileri derecede anlamlı ($p<0,001$) (Şekil 4.23.A), 25 μM resveratrole göre 25 μM tannik asit 72. saatte anlamlı şekilde düşürdü ($p<0,05$) (Şekil 4.23. C). Buna karşın, telomeraz enzim aktivitesini,

istatistiksel olarak, 25 μM tannik aside göre 25 μM resveratrol ve 50 μM tannik aside göre 50 μM resveratrol 48. saatte önemli ($p<0,01$) (**Şekil 4.23. B**), 100 μM tannik aside göre 100 μM resveratrol 48. saatte ileri derecede anlamlı ($p<0,001$) şekilde düşürdü (**Şekil 4.23. B**). Diğerlerinde ise bir farklılık görülmedi ($p>0,05$) (**Şekil 4.23. A,B,C**).

Resveratrol ve tannik asidin doz ve saatlere göre telomeraz enzim aktivitesine olan etkilerinin birbirleri ile karşılaştırılması sonucunda, 100 μM tannik asit 24. saatte, 100 μM resveratrol ise 48. saatte telomeraz enzimini en fazla düşürmüşlerdir. Tüm doz ve saatler göz önüne alındığında genel anlamda resveratrol, tannik aside göre daha etkin görülmektedir.

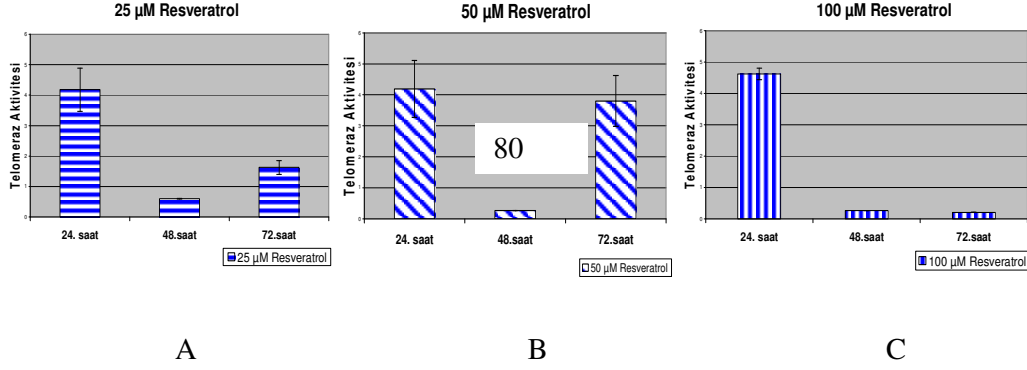


Şekil 4.24. MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 μM resveratrol ve tannik asidin 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) saatlerdeki telomeraz enzim aktivite değerleri.

Her iki maddenin dozlarının ayrı ayrı kendi içlerinde saatlere göre karşılaştırılmasıyla elde edilen telomeraz enzim aktivite değerleri **Tablo 4.3.** ve **Şekil 4.24 ve 4.25'**de görüldüğü gibidir.

Resveratrol dozlarının telomeraz enzim aktivitesine etkileri yönünden saatlere göre, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; 25 μM dozun 48. saatte 24. saate göre önemli ($p<0,01$), 25 μM dozun 72. saatte 24. saate göre anlamlı ($p<0,05$), 50 μM dozun 48. saatte 24. ve 72. saatlere göre anlamlı ($p<0,05$), 100 μM dozun 48. ve 72. saatte 24. saate göre ileri derecede anlamlı ($p<0,001$), olarak telomeraz enzim aktivitesini düşürdükleri tesbit edildi (**Şekil 4.24. A,B,C**).

Sonuç olarak, 100 μM resveratrolün 48. ve 72. saatlerde telomeraz enzim aktivitesini, diğerlerine göre en fazla düşürdüğü ortaya konmuştur.

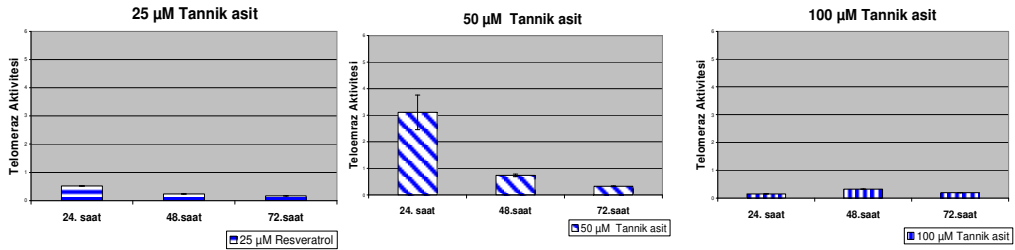


Şekil 4.25. MCF-7 hücre dizisine uygulanan 25, 50 ve 100 μM resveratrol dozlarının 24. (A), 48. (B) ve 72. (C) saatlerde telomeraz enzim aktivitesine etkileri.

Tannik asit dozları telomeraz enzim aktivitesi yönünden istatistiksel olarak değerlendirildiğinde;

25 μM dozun 24. saatte 48. ve 72. saate göre ileri derecede anlamlı ($p < 0,001$), 50 μM dozun 48. saatte 24. saate göre anlamlı ($p < 0,05$), 50 μM dozun 72. saatte 24. saate göre önemli ($p < 0,01$), 100 μM dozun 24. ve 72. saatlerde 48. saate göre ileri derecede anlamlı olarak telomeraz enzim aktivitesini düşürdüğü ($p < 0,001$), diğerlerinde ise bir farklılık görülmediği ($p > 0,05$) tesbit edildi (Şekil 4.25. A,B,C).

Sonuç olarak, telomeraz enzim aktivitesini düşürmede, 25 μM ve 100 μM tannik asit 24. saatte etkili doz olarak bulundu.



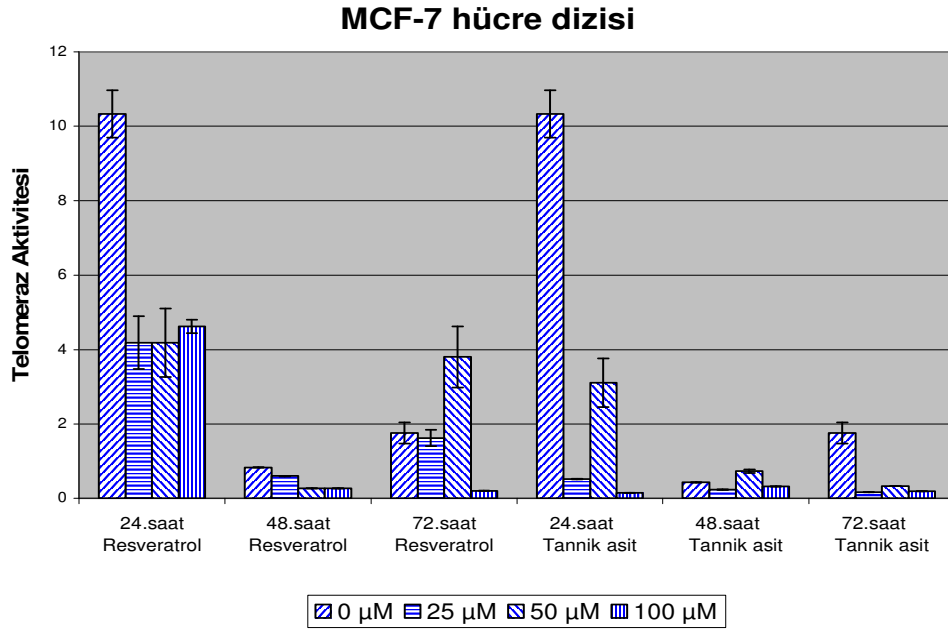
A

B

C

Şekil 4.26. MCF-7 hücre dizisine uygulanan 25, 50 ve 100 μM tannik asit dozlarının 24., 48. ve 72. saatlerde telomeraz enzim aktivitesine etkileri.

MCF-7 hücre dizisinde 25, 50 ve 100 μM resveratrol ve tannik asit dozlarının 24., 48. ve 72. saatlerdeki telomeraz enzim aktivitesine etkileri kontrol gruplarıyla birlikte **Şekil.4.27'**de görüldüğü gibidir.



Şekil 4.27. MCF-7 hücre dizisine uygulanan 25, 50 ve 100 μM resveratrol ve tannik asit dozlarının 24., 48. ve 72. saatlerde telomeraz enzim aktivitesine etkileri.

5. TARTIŞMA

Resveratrol ve tannik asidin, meme kanser hücre dizisi MCF-7'ye olan etkileri apoptotik indeks, Bak protein oranı ve telomeraz enzim aktivitesi yönünden araştırılmış olup, elde edilen bulgular sırası ile tartışılacaktır.

Resveratrolün apoptotik indekse etkisi ile ilişkili yapılan çalışmalardan, insan gastrik adenokarsinoma (SNU-1) hücre dizisi ile yapılan bir çalışmada, 100 µM resveratrolün 24. saatte (30), akut premyelositik lösemi (NB4) hücre dizisi ile yapılan başka bir çalışmada da, 25 ve 50 µmol/l resveratrolün yine 24. saatte (9) apoptozu önemli derecede artırdığı belirtilmiştir.

İnsan özafagus skuamöz kanser (HCE7), özafagus adenokarsinoma (Bic-1 ve Seg-1), kolon adenokarsinoma (SW480), meme adeno karsinoma (MCF-7) ve promiyelositik lösemi (HL60) hücre dizilerinde resveratrolün etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, 30, 50, 100, 200 ve 300 µM resveratrol dozlarının doza bağlı olarak, en fazla da 300 µM resveratrol dozunda 48. saatte apoptozu uyardığı gösterilmiştir (38). MCF-7 hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada da yine 48. saatte resveratrolün 12.5 µM dozunun apoptotik indeksde etkin olmadığı, bunun yanında 50 µM dozun apoptotik indeksi uyardığı belirtilmiştir (40).

MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücre dizilerinde yapılan bir çalışmada, 10, 50, 100 ve 200 µM resveratrol dozlarının 36. saatteki etkilerine bakılmıştır. MDA-MB-231 de apoptozun indüklenmediği görülmüştür. MCF-7'de ise doza bağlı olarak apoptozun arttığı, bunlardan 200 µM dozun en fazla etki göstererek apoptozu %40 oranlarına yaklaştırdığı tesbit edilmiştir (57).

İnsan akut lenfoblastik (HSB-2) ve kronik myeloid (K562) lösemi hücre dizilerine 25 µM resveratrol uygulanan bir çalışmada, 24., 48. ve 72. saatlerde apoptotik indekslerine bakılmıştır. Apoptotik indeksin, HSB-2'de 48. saatte, K562'de ise 72. saatte daha fazla olduğu gözlenmiştir (48).

Resveratrolün apoptotik indekse etkilerinin incelendiği bu çalışmalar, bizim çalışmamızla uyumlu olmakla beraber resveratrolün farklı hücre dizilerinde farklı saatlerde etkin olabileceğini gösterdi. MCF-7 hücresinde yaptığımız çalışmamızda da resveratrolün artan dozlarının apoptotik indeksi artırdığını, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, kontrole göre, 100 µM dozun 24. saatte en etkin doz olduğu tesbit edildi.

Tannik asidin apoptotik indeks üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalardan, kırmızı şarap polifenollerinin (gallik asit, tannik asit, kesretin, morin, rutin) prostat kanser hücre dizisine (LNCaP) etkilerinin incelendiği bir çalışmada, tannik asidin 5 ve 10 µmol/L dozlarının 72. saatte, apoptotik indeksi kontrole göre önemli derecede artırdığı ortaya konmuştur (58).

İnsan Jurkat T hücrelerinde yapılan bir diğer çalışmada, tannik asidin 50 ve 100 µg/ml dozlarının 24. saatte apoptotik hücre ölümünü doza bağlı olarak artırdığı gösterilmiştir (51).

İncelenen bu çalışmalarda, çalışmamızda olduğu gibi tannik asidin apoptozu uyardığı görüldü. Çalışmamızda tannik asidin 24. saatte 100 µM dozunun apoptotik indeks artışında en fazla etkide olduğu görüldü.

Polifenollerden tannik, ellagik ve gallik asitlerin biyolojik aktivitelerinin daha iyi anlaşılması için, taze su midyesi *Unio tumidus*' un sindirim bezi hücrelerinde yapılan bir çalışmada, bu maddelerin 1, 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240 µM dozları uygulandıktan 1 saat sonra yapılan ölçümlerde bu polifenolik asitlerin 15 µM'den yukarı dozlarının DNA ve oksidatif protein hasarına neden olabileceği dolayısıyla apoptoz ve nekrozu uyardıkları gösterilmiştir (43).

İnsan kolanjio karsinom hücre dizileri olan Mz-ChA-1, TFK-1 ve CC-LP-1 ile yapılan bir çalışmada, Mz-ChA-1 dizisinde tannik asidin doğrudan apoptozu indüklediği, apoptozu indükleyen 5-fluorouracil ve mitomycin C maddeleriyle birlikte uygulandığında apoptozun indüklendiği belirtilmiştir. Bunun için, Mz-ChA-1'den 4 grup oluşturulmuştur. 1. gruba 5 µM mitomycin C, 2. gruba 30 µM 5-

fluorouracil, 3. gruba 5 µM mitomycin C ile 5 µM tannik asit ve 4. gruba 30 µM 5-fluorouracil ile 5 µM tannik asit uygulanmıştır. 6 saat sonra bu gruplardan tannik asitli gruplarda, apoptoz miktarının diğerlerine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (52).

Taninlerden tannik asit ile ellagik ve gallik asitlerin etkilerinin incelendiği bir çalışmada, Chinese hamster hücre dizisi B14'e, bu maddelerin 15, 30, 60, 120, 180 ve 240 µM dozları uygulanmıştır. 1 saat sonra kontrole göre, 15 µM'den 60 µM doğru DNA dal kırıklarında bir artış olduğu, bu artışın 60 µM'de en fazla olduğu belirlenmiştir. Hücre canlılığı incelendiğinde de, hücre ölümünün en fazla 60 µM de olduğu ve ölüm oranının % 50'ye vardığı, 120 µM'den 240 µM doğru da hücre ölümünün daha az olduğu tesbit edilmiştir (42).

İncelenen bu çalışmalarda, çalışmamızdan farklı olarak, uyguladığımız tannik asit dozlarından farklı dozların etkileri daha kısa süre içinde incelenmiş ve yine tannik asidin apoptotik indeksi artırdığı belirtilmiştir.

Yapılan literatür taramalarında resveratrol ile tannik asidin birlikte apoptotik indekse olan etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanılmadı. Yaptığımız çalışmada, resveratrol ve tannik asit birlikte apoptotik indeksi, 24., 48. ve 72. saatlerde, doza bağlı olarak artırdı. Sadece tannik asidin 72.saatte doza bağlı olarak etkili değildi. Apoptotik indekse, her iki maddenin de 24. saatte 100 µM dozunun en etkili doz olduğu, bu maddelerden de en etkilisinin tannik asit olduğu belirlendi.

Çeşitli kanser hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda, Bcl-2 aile üyelerinden Bak proteinin apoptozu indüklemedeki rolü araştırılmıştır. Bu çalışmalardan HCT116 kolon kanser hücre dizisinde yapılan bir çalışmada, resveratrolün Bak ve Bax'ın üç boyutlu yapısının değişimini tetiklediği ve hücreleri apoptoza götürdüğü gösterilmiştir (50).

EC-9706 özafogus kanser hücre dizisinde yapılan bir çalışmada, resveratrolün 0.1, 1, 10 ve 100 mmolL⁻¹ dozlarının 24., 48., 72. ve 96. saatlerde doz ve zamana bağlı olarak hücre büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Yine bu çalışmada 24., 48., 72. ve 96. saatlerde 10 mmolL⁻¹ resveratrol dozunun hücre gruplarında, zamana bağlı olarak, Bcl-2 ekspresyonunu azalttığı, Bak ile birlikte çalıştığı bilinen Bax ekspresyonunu arttırdığı Bcl-2 /Bax oranı azalarak apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (71).

Nakagava ve ark.'ları yaptıkları bir çalışmada, resveratrolün düşük dozlarının (KPL-1, $\leq 22 \mu\text{M}$; MCF-7, $\leq 4 \mu\text{M}$) ER-pozitif insan meme kanser hücre dizilerinde hücre proliferasyonuna sebep olduğunu, yüksek dozlarının ise ($\geq 44 \mu\text{M}$) hücre büyümesini baskıladığını buldular. Büyümenin baskılanmasının, sub G1 faz fraksiyonu, Bak ve Bax proteinlerinin up-regülasyonu, Bcl-XL protein down regülasyonu ve kaspaz 3'ün aktivasyonunun görülmesi ile indüklenen apoptoz nedeniyle olduğunu göstermişlerdir (1).

Delmas ve ark.'ları yaptıkları çalışmada, SW480 kolon kanser hücrelerinde resveratrolün 10-100 μM dozlarının kaspazları aktive ettiği, bu aktivasyonun da Bak ve Bax gibi proapoptotik proteinlerin birikmesi ile ilişkili olduğunu gösterdiler (1).

Yapılan bu çalışmalarla birlikte, bizde yaptığımız çalışmada, resveratrolün 25-100 μM dozlarının apoptozu uyardığını, bu uyarılmanın da proapoptik protein Bak ile ilişkili olabileceği görüldü. Resveratrolün artan dozlarında % Bak oranının arttığı, 72. saatte 100 μM dozda bu artışın en fazla olduğu tesbit edildi.

Yaptığımız çalışmada MCF-7 hücre dizisine uyguladığımız tannik asit ile Bak proteinin birlikte bakıldığı bir literatüre rastlanılmamıştır. Fakat HepG2 karaciğer hücre dizisinde yapılan bir çalışmada, tannik asit gibi bir çay polifenolu olan epigallocatechin-3- gallate (EGCG)'ın 50, 100 ve 200 μM dozlarının 6., 12., 24. ve 48. saatlerde doza bağlı olarak Bak proteini ile birlikte çalışan Bax protein miktarını arttığı gösterilmiştir (41). Bizim çalışmamızda da tannik asit uyguladığımız hücre gruplarında Bax ile birlikte çalışan Bak protein yüzdesinin 24., 48. ve 72. saatlerde doza bağlı olarak arttığı bulundu.

Yapılan literatür taramalarında resveratrol ile tannik asidin birlikte Bak protein oranına olan etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanılmadı. Çalışmamızda % Bak oranının, her iki maddenin de uygulandığı gruplarda, 24., 48. ve 72. saatlerde, doza bağlı olarak bir artış gösterdiği görüldü. % Bak oranı üzerine, resveratrolün 72. saatte 100 µM dozunun, tannik asidin 48. saatte 100 µM dozunun en etkili doz olduğu, bu maddelerden de en etkilisinin tannik asit olduğu belirlendi.

Yaptığımız çalışmada, apoptotik indeks ve % Bak oranları genel olarak birlikte değerlendirildiğinde, her ikisinde de doza bağlı olarak bir artış görüldü. Bunun sonucunda, bu maddelerin artan dozlarının apoptotik hücre sayısını ve Bak protein miktarını artırdığı tesbit edildi. Bütün bunlar apoptotik hücre ve Bak proteini miktarı arasında bir ilişki olabileceğini göstermektedir.

Yapılan literatür taramalarında resveratrolün doza bağlı olarak telomeraz enzim aktivitesini azalttığı (44) bir çalışmaya rastlanırken, tannik asidin telomeraz enzim aktivitesine olan etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanılmadı. Yaptığımız çalışmada MCF-7 hücre dizisinde resveratrol ve tannik asit telomeraz enzim aktivitesini 24., 48. ve 72. saatlerde, düzensiz bir şekilde düşürdü. Telomeraz enzim aktivitesini düşürmede resveratrol 48. saat 100 µM dozda, tannik asit 24. saat 100 µM dozda en etkili oldu. 24. ve 72. saatlerde tannik asit, 48. saatte ise resveratrol telomeraz enzim aktivitesini düşürmede daha etkili olduğundan tannik asidin resveratrole göre daha etkin olduğu tesbit edildi.

Yapılan çalışmalarda resveratrol ve tannik asidin apoptoz ve telomeraz aktivitesine olan etkileri gösterilmiştir;

Yapılan bir çalışmada, MCF-7 hücre dizisine resveratrolün 5, 10, 20 ve 40 µg/ml dozları uygulanarak bunların apoptoz ve telomeraz aktivitesine 24., 48. ve 72. saatlerde olan etkilerine bakılmıştır. Sonuçta, apoptozun doza bağlı olarak bir artış gösterdiği ve bu artışın 10, 20 ve 40 µg/ml dozlarda 24. ve 48. saatlerde olduğu, 72. saatte ise apoptozun azalarak kontrol grubuna yakın değerlere ulaştığı gözlenmiştir. Apoptotik hücre ölümü induksiyonunda gözlenen, kromatin yoğunlaşması, nükleer fragmentasyon ve hücre zarına bağlı apoptotik cisimciklerin yıkımı gibi yapısal değişikliklerin, 10 ve 20 µg/ml resveratrol muameleli hücrelerde gözlendiği ve apoptozun arttığı, kontrol grubu ve 5 µg/ml resveratrol ile muamele edilen hücrelerde ise apoptozun indüklenmediği gösterilmiştir. 10 ve 20 µg/ml resveratrol verilen hücre gruplarının 24. ve 48. saatlerde G1 fazında olan hücre sayısının azaldığı dolayısıyla, S fazında biriktiği, 72. saatte ise fazlar arasında bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Yine bu çalışmada, telomeraz aktivitesini 40 µg/ml resveratrolün 24. saatte, kontrole göre, %67 oranında inhibe ettiği, 5, 10, 20 µg/ml gibi düşük dozların ise bir etkisi olmadığı, 48. saatte 5, 10, 20 ve 40 µg/ml dozların, doza bağlı olarak, kontrole göre, aktivitede bir azalmaya neden olduğu, özellikle 48. saatte 5 ve 10 µg/ml resveratrolün marjinal olarak %13,9 ve %19,3 gibi bir aktivite azalması sağladığını, 20 ve 40µg/ml dozların ise telomeraz aktivitesini %63,7 ve %93 gibi yüksek oranlarda azalttığı tesbit edilmiştir (44). Bu çalışmayla ilişkili olarak bizim bulgularımıza göre, resveratrolün apoptotik indekse ve telomeraz enzim aktivitesine olan etkileri birlikte değerlendirildiğin de, kontrol gruplarına göre, 24. ve 48. saatlerde apoptotik indeksin artışı ile yine aynı saatlerdeki telomeraz enzim aktivitesinin düşüşü bir paralellik göstermiştir.

MCF-7 hücrelerine tannik asidin etkisi ile ilgili olarak apoptoz ve telomeraz enzim aktivitesine birlikte bakılan bir çalışmaya rastlanılmadı. Fakat ilaca dirençli ve duyarlı küçük akciğer karsinoma (SCLC) hücre dizilerinde (H69VP, H69), tannik asit gibi bir çay polifenolü olan EGCG'nin, apoptoz ve telomeraz enzim aktivitesine olan etkisinin incelendiği bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada her iki hücre dizisinde, 70 µM EGCG'nin, 24. saatte telomeraz aktivitesini doza bağlı olarak azalttığı, 36. saatte

apoptozu indüklediği gösterilmiştir (60). Bizim çalışmamızda tannik asidin telomeraz enzim aktivitesini düzensiz olarak düşürdüğü belirlendi. Dozlara bağlı olmadan, kontrole göre, 24. ve 72. saatlerde telomeraz enzim aktivitesinin düştüğü tesbit edildi. 48. saatte ise kontrole göre 25 ve 100 μM doz telomeraz enzim aktivitesini düşürdü. Çalışmamızda tannik asit apoptotik indeksi, kontrole göre, 24. saatte 50 ve 100 μM dozlarda, 48. saatte her 3 dozda ve 72. saatte 25 ve 50 μM dozlarda artırdı. Tannik asidin apoptotik indekse ve telomeraz enzim aktivitesine etkileri birlikte ele alındığında tannik asit grupları arasında bir ilişki kurulamadı.

6.SONUÇ

1. Reveratrolün en fazla, apoptotik indeksi 100 µM dozda 24. saatte, % Bak oranını 100 µM dozda 72. saatte doza bağlı olarak artırdığı, telomeraz enzim aktivitesini 50 ve 100 µM dozlarda 48. saatte düşürdüğü belirlendi.
2. Tannik asidin en fazla, apoptotik indeksi 100 µM dozda 24. saatte, % Bak oranını 100 µM dozda 48. saatte artırdığı, telomeraz enzim aktivitesini 100 µM dozda 24. saatte düşürdüğü belirlendi.
3. Bu parametreler arasında apoptotik indeks ile % Bak oranını artırmada ve telomeraz enzim aktivitesini düşürmede tannik asidin daha etkili olduğu belirlendi.

Bununla birlikte, antioksidan ve antikanser özelliklere sahip olduğu ileri sürülen resveratrol ve tannik asidin, apoptozu uyarması, % Bak oranını artırması ve telomeraz enzim aktivitesini düşürmesi, diğer incelediğimiz çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da belirlenmiş olsa da, her iki maddenin etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılması için daha çok çalışmaya ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Aggarwal, B.B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R.S., Seram, N.P., Shishodia, S. and Takada, Y., 2004, Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies, *Anticancer Research*, 24, 3-60 p.
2. Atlı, K. ve Bozcuk, A.N., 2002, Telomer ve hücrenel yaşlanma, *Geriatri*, 5(3), 111-114 s.
3. Azız, M.H., Kumar, R. and Ahmad, N., 2003, Cancer chemoprevention by resveratrol: In vitro and in vivo studies and the underlying mechanisms, *International Journal Of Oncology*, 23, 17-28 p.
4. Başaran, A., 2005, Tıbbi biyoloji ders kitabı, Güneş & Nobel Tıp Kitapevi, Eskişehir, 543 s.
5. Bras, M., Queenan, B. and Susin, S.A., 2005, Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying, *Biochemistry (Moscow)*, 70, 2, 231-239 p.
6. Bufalo, D.D., Rizzo, A., Trisciuglio, D., Cardinali, G., Torrisi, M.R., Zangemeister-Wittke, U., Zupi, G. and Biroccio, A., 2005, Involvement of hTERT in apoptosis induced by interference with Bcl-2 expression and function, *Cell Death and Differentiation*, 12, 1429–1438 p.
7. Burlacu, A., 2003, Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins, *J. Cell. Mol. Med.*, 7, 3, 249-257 p.
8. Büyüktuncer, Z. and Başaran, A.A., 2005, Fitoöstrojenler ve sağlıklı yaşamdaki önemleri, *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 25, 2, 79-94 s.
9. Cao, Y., Wang, F., Liu, H.Y., Fu, Z.D., and Han, R., 2005, Resveratrol induces apoptosis and differentiation in acute promyelocytic leukemia (NB4) cells, *Journal of Asian Natural Products Research*, 7, 9, 633–641 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

10. Chen, X., Beutler, J.A., McCloud, T.G., Loehfelm, A., Yang, L., Dong, H.F., Chertov, O.Y., Salcedo, R., Oppenheim, J.J. and Howard, O.M.Z., 2003, Tannic acid is an inhibitor of CXCL12 (SDF-1 α)/CXCR4 with antiangiogenic activity, *Clinical Cancer Research*, 9, 3115-3123 p.
11. Commun, K., Mauro, M.C., Chupeau, Y., Boulay, M., Burrus, M. and Jeandet, P., 2003, *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 317-323 s.
12. Corre, L.L., Chalabi, N., Delort, L., Bingon, Y.J. and Bernard-Gallon, D.J., 2005, Resveratrol and breast cancer chemoprevention: Molecular mechanisms, *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 462-471 p.
13. Corre, L.L., Fustier, P., Chalabi, N., Bingon, Y.J. and Bernard-Gallon D., 2004, Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with the BRCA1 oncosuppressor in human breast cell lines, *Clinica Chimica Acta*, 344, 115–121 p.
14. Cooper, G.M. and Hausman, R.E., 2006, *Hücre Moleküler Yaklaşım*, İzmir Tıp Kitapevi, İzmir, 699 s.
15. Cowan, M.M., 1999, Plant products as antimicrobial agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 4, 564-582 p.
16. Çavdar, C., Sifil, A. ve Çamsarı, T., 1997, Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma, *Türk Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3, 4, 92-95 s. (res 122)
17. Dash, P., Apoptosis, 1-6 p.
18. Dikmen, Z.G., Dikmen, E. ve Doğan, P., 2006, Kanserde telomeraza yönelik tedavi stratejileri, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 37, 49-55 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

19. Dixon, R.A., 2001, Natural products and plant disease resistance, *Nature*, 411, 843-847 s.
20. Durusoy, M., 2003, Telomeraz aktivitesini değerlendirmede kullanılan yöntemler ve dayandıkları esaslar, *Türk Biyokimya Dergisi*, 28(1), 25-29 s.
21. Erdoğan, B.B. and Uzaslan E.K., 2003, Apoptosis mekanizmaları:Tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis, *Akciğer Arşivi*, 4, 165-174 s.
22. Esposti, M.D. and Dive, C., 2003, Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304, 455-461 p.
23. Filip, V., Plockova, M., Smidrkal, J., Spickova, Z., Melzoch, K., Schmidt, S., 2003, Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness, *Food Chemistry*, 83, 585-593 p.
24. Fremont, L., 2000, Biological effects of resveratrol, *Life Sciences*, 66, 8, 663-673 p. Garvin, S., Öllinger, K. and Dabrosin, C., 2006, Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo, *Cancer Letters*, 231, 113-122 p.
25. Garvin, S., Öllinger, K. and Dabrosin, C., 2006, Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo, *Cancer Letters*, 231, 113-122 p. (142)
26. Guimaraes, C.A. and Linden, R., 2004, Programmed cell death apoptosis and alternative deathstyles, *Eur. J. Biochem.*, 271, 1638-1650 p.
27. Gulbins, E., Dreschers, S. and Bock, J., 2003, Role of mitochondria in apoptosis, *Experimental Physiology*, 88.1, 85-90 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

28. Gusman, J., Malonne, H. and Atassi, G., 2001, A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol, *Carcinogenesis*, 22, 8, 1111-1117 p.
29. Güneş, H.V., 2006, *Moleküler Hücre Biyolojisi*, Kaan Kitapevi, Eskişehir, 479 s.
30. Holian, O., Wahid, S., Atten, M.J. and Atar, B.M., 2002, Inhibition of gastric cancer cell proliferation by resveratrol: role of nitric oxide, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282, 809-816 p.
31. <http://140.116.60.1/lin5612/microimm/95semi/chseng1.htm>
32. http://focus.hms.harvard.edu/2002/Sep27_2002/research_briefs.html
33. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Tanen>
34. <http://white.cabm.rutgers.edu/research.html>
35. <http://www.rit.edu/~japfaa/tnf.jpg>
36. <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/datasheet/Z359629dat.pdf>
37. Ignatowicz, E. and Baer-Dubowska, W., 2001, Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases, *Pol. J. Pharmacol*, 53, 557-569 p.
38. Joe, A.K., Liu, H., Suzui, M., Vural, M.E., Xiao, D. and Weinstein, I.B., 2002, Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines, *Clinical Cancer Research*, 8, 893-903 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

39. Keil, C., Petermann, E. and Oei, S.L., 2004, Tannins elevate the level of poly(ADP-ribose) in HeLa cell extracts, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 425, 115-121 p.
40. Kim, Y.A., Choi, B.T., Lee, Y.T., Park, D.I., Rhee, S.H., Park, K.Y. and Choi, Y.H., 2004, Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells, *Oncology Reports*, 11, 441-446 p.
41. Kuo, P.L. and Lin, C.C., 2003, Green tea constituent (-)- epigallocatechin-3-gallate inhibits Hep G2 cell proliferation and induces apoptosis through p53-dependent and Fas-mediated pathways, *J Biomed Sci.*, 10, 219-227 p.
42. Labieniec, M. and Gabryelak, T., 2003, Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14, *Mutation Research*, 539, 127-135 p.
43. Labieniec, M. and Gabryelak, T., 2006, Oxidatively modified proteins and DNA in digestive gland cells of the fresh-water mussel *Unio tumidus* in the presence of tannic acid and its derivatives, *Mutation Research*, 603, 48-55 p.
44. Lanzilli, G., Fuggetta, M., Tricarico, M., Cottarelli, A., Serafino, A., Falchetti, R., Ravagnan, G., Turriziani, M., Adamo, R., Franzese, O. And Bonmassar, E., 2006, Resveratrol down-regulates the growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro, *International Journal of Oncology*, 28, 641-648 p.
45. Liu, X., Kim, J., Li, Y., Li, J., Liu, F. and Chen, X., 2005, Tannic acid stimulates glucose transport and inhibits adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells, *J. Nutr.*, 135, 165-171 p.
46. Liu, K.X., Yamamoto, F., Sekine, S., Goto, Y., Seki, K., Kondoh, K. and Fu, Y., 1999, Inhibitory effect of methylene blue-induced photooxidation on intimal thickening of vein graft, *Annals of Thoracic Surgery*, 68, 1, 84-88 p.
47. Los, M. and Walczak, H., 2002, Caspases-their role in cell death and cell survival, *Molecular Biology Intelligence*, Unit 24, 155-174, 221-235 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

48. Luzi, C., Brisdelli, F., Cinque, B., Cifone, G. and Bozzi, A., 2004, Differential sensitivity to resveratrol-induced apoptosis of human chronic myeloid (K562) and acute lymphoblastic (HSB-2) leukemia cells, *Biochemical Pharmacology*, 68, 2019-2030 p.
49. Marienfeld, C., Tadlock, L., Yamagiwa, Y. and Patel, T., 2003, Inhibition of cholangiocarcinoma growth by tannic acid, *Hepatology*, 37, 1097-1104 p.
50. Mohan, J.M., Gandhi, A.A., Bhavya, B.C., Rashmi, R., Karunagaran, D., Indu, R. and Santhoshkumar, T.R., 2006, Caspase-2 triggers Bax-Bak-dependent and-independent cell death in colon cancer cells treated with resveratrol, *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 26, 17599-17611 p.
51. Nam, S., Smith, D.M. and Dou, Q.P., 2001, Tannic acid potently inhibits tumor cell proteasome activity, increases p27 and Bax expression, and induces G1 arrest and apoptosis, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 10, 1083-1088 p.
52. Naus, P.J., Henson, R., Bleeker, G., Wehbe, H., Meng, F. and Patel, T., 2007, Tannic acid synergizes the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in human cholangiocarcinoma by modulating drug efflux pathways, *Journal of Hepatology*, 46, 222-229 p.
53. Pagliari, L.J., Pinkoski, M.J. and Gren D.R., 2003, Apoptosis signaling: a means to an End, *Handbook of Cell Signaling*, 3, 331, 431-439 p.
54. Percival, M., 1998, Antioxidants, *Clinical Nutrition Insights*, 1-4 p.
55. Pervaiz, S., 2003, Resveratrol: from grapevines to mammalian biology, *The FASEB Journal*, 17, 1975-1985 p.
56. Philchenkov, A., 2004, Caspases: potential targets for regulating cell death, *J.Cell. Mol. Med.*, 8, 4, 432-444 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

57. Pozo-Guisado, E., Alvarez-Barrientos, A., Mulero-Navarro, S., Santiago-Josefat, B. and Fernandez-Salguero, P.M., 2002, The proliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle, *Biochemical Pharmacology*, 64, 1375-1386 p.
58. Romero, I., Paez, A., Ferruelo, A., Lujan, M. and Berenguer, A., 2002, Polyphenols in red wine inhibit the proliferation and induce apoptosis of LNCaP cells, *BJU International*, 89, 950-954 p.
59. Roupe, K.A., Remsberg, C.M., Yáñez, J.A. and Davies, N.M., 2006, Pharmacometrics of stilbenes: Seguing towards the clinic, *Current Clinical Pharmacology*, 1, 81-101 p.
60. Sadava, D., Whitlock, E. and Kane, S.E., 2007, The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate inhibits telomerase and induce apoptosis in drug-resistant lung cancer cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360, 233-237 p.
61. Schmitt, E., Lehmann, L., Metzler, M. and Stoper, H., 2002, Hormonal and genotoxic activity of resveratrol, *Toxicology Letters*, 136, 133-142 p.
62. Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. and Peter, M.E., 1998, apoptosis signaling by death receptors, *Eur. J. Biochem.*, 254, 439-459 p.
63. Shimizu, T., Nakazato, T., Xian, M.J., Sagawa, M., Ikeda, Y. and Kizaki, M., 2006, Resveratrol induces apoptosis of human malignant B cells by activation of caspase-3 and p38 MAP kinase pathways, *Biochemical Pharmacology*, 71, 742-750 p.
64. Soleas, G.J., Diamandis, E. and Goldberg, D.M., 1997, Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone?, *Clinical Biochemistry*, 30, 2, 91-113 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

65. Sprick, M.R. and Walczak, H., 2004, The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1644, 125-132 p.
66. Srivastava, R.C., Husain, M.M., Hasan, S.K. and Atharb, M., 2000, Green tea polyphenols and tannic acid act as potent inhibitors of phorbol ester-induced nitric oxide generation in rat hepatocytes independent of their antioxidant properties, *Cancer Letters*, 153, 1-5 p.
67. Taffetani, S., Ueno, Y., Meng, F., Venter, J., Francis, H., Glaser, S., Alpini, G. and Patel, T., 2005, Tannic acid inhibits cholangiocyte proliferation after bile duct ligation via a cyclic adenosine 5',3'- monophosphate-dependent pathway, *American Journal of Pathology*, 166, 6, 1671-1679 p.
68. Tegos, G., Stermitz, F.R., Lomovskaya, O., and Lewis K., 2002, Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 46, 10, 3133-3141 s.
69. Twomey, C. and McCarthy, J.V., 2005, Pathways of apoptosis and importance in development, *J.Cell. Mol. Med.*, 9, 2, 345-359 p.
70. Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B. and Korsmeyer, S.J., 2000, tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c, *Genes & Development*, 14, 2060-2071 p.
71. Zhou, H., Yan, Y., Sun, Y. and Zhu J., 2003, Resveratrol induces apoptosis in human esophageal carcinoma cells, *World Journal of Gastroenterology*, 9, 3, 408-411 p.

ÖZGEÇMİŞ

- Adı-Soyadı : Ahu SOYOCAK
- Doğum tarihi ve yeri : 04/01/1982-ÇORUM
- Uyruğu : T.C.
- Medeni durumu : Bekar
- İletişim adresleri : Atatürk Bulvarı Damla Sitesi A Blok No:207 Kat:9/18 26020
ESKİŞEHİR - a_soyocak@yahoo.com
- İlköğretim : Çorum Albayrak İlkokulu
- Orta öğretim : Çorum Bahçelievler Ortaokulu
- Lise : Çorum Atatürk Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı)
- Lisans : ESOGÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
- Yüksek Lisans : ESOGÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
- ÜDS sonucu : 70.00
- Projeler : ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen 'Resveratrol ve Tannik Asidin, İnsan Göğüs Kanseri (MCF-7) ve İnsan Kolon Adenokarsinoma (Caco-2) Hücre Dizilerinde Apoptoz ve Telomeraz Enzim Aktivitesine Etkileri' başlıklı 2007011014 nolu proje halen devam etmektedir.

Üye olunan Bilimsel Kuruluşlar : Araştırmacı Bilgi Sistemi(ARBİS)

Katılan kurs ve eğitim

programları

: '11. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi' 2004

IV. Deneysel Hayvan Çalışmaları Temel Eğitim

Günleri' 2005

'10. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi'

2007

Tıbbi Biyoloji ABD'nda sunulan

seminerler

: 'Hücre Organelleri'

'RNA splicing'

'Meme Kanseri ve Apoptoz'

'Kolon Kanseri ve Apoptoz'