

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HCT-116 KOLON KANSER HÜCRE HATTINDA
YEŞİL ÇAY ETKEN MADDESİ OLAN
(-)-EPİGALLOKATEKİN-3-GALLAT'IN
APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

ALİ BURAK ÖZKAYA

**BİYOKİMYA PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2009

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HCT-116 KOLON KANSER HÜCRE HATTINDA
YEŞİL ÇAY ETKEN MADDESİ OLAN
(-)-EPİGALLOKATEKİN-3-GALLAT'IN
APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**BİYOKİMYA PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ALİ BURAK ÖZKAYA

Tez Danışmanı PROF. DR. A. SEMRA KOÇTÜRK

Bu araştırma Tübitak Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından 108S088 sayılı proje desteği ile gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
KISALTMALAR	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. HÜCRE YAŞAM DÖNGÜSÜ VE KANSER	6
2.1.1. Hücre Yaşam Döngüsü	6
2.1.2. Hücre Yaşam Döngüsünün Regülasyonu	7
2.1.3. Hücre Yaşam Döngüsü ve Kanser	8
2.1.4. Kolon Kanseri	9
2.2. APOPTOZ	10
2.2.1. Kaspazlar ve Kaspaz Aktivasyonu	12
2.2.2. Cellat Kaspazların Aktivitesi	13
2.2.3. Apoptozun Tetiklenmesi: İntrensek Yolak	15
2.2.4. Apoptozun Tetiklenmesi: Ekstrensek Yolak	22
2.2.5. Kanser Terapisinde Apoptozun Önemi	24
2.3. YEŞİL ÇAY	25
2.3.1. Yeşil Çayın Antioksidan-Prooksidan Etkisi	26
2.3.2. Yeşil Çayın Anti-Anjiogenez Etkisi	27
2.3.3. Apoptoz ve Hücre Yaşam Döngüsü Regülasyonu	28
2.3.4. Kolon Kanserinde Yeşil Çayın Etkinliği	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM	32
3.1. Materyal	32
3.2. Yöntem	34
3.2.1. Hücre Kültürü	34
3.2.2. MTT Canlılık Testi (Roche)	38
3.2.3. Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} Kolorimetrik Apoptoz Tayini (Roche)	40
3.2.4. Akış Sitometrik Analizler	43
4. BULGULAR	49
4.1. MTT Canlılık Testi	49
4.1.1. Etopositin HCT-116 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	49
4.1.2. EGCG'nin HCT-116 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	50
4.1.3. EGCG'nin CCD18co Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	51
4.2. Apoptoz Analizleri	52
4.2.1. Kolorimetrik Apoptoz Tayini (Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} - Roche)	52
4.2.2. Akış Sitometrik Annexin-V Apoptoz/Nekroz Analizi	53
4.2.3. Akış Sitometrik Hücre Yaşam Döngüsü Regülasyon Analizi	55

5. TARTIŞMA VE SONUÇ	58
6. KAYNAKLAR	67

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları _____	32
Tablo 2. Çalışmada kullanılan sarf malzeme ve kullanım amaçları _____	33
Tablo 3. Çalışmada kullanılan ticari kitler ve kullanım amaçları _____	34

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Hücre yaşam döngüsü. _____	6
Şekil 2. Hücre yaşam döngüsünde kontrol noktaları. _____	7
Şekil 3. Hücre yaşam döngüsü ve p53. _____	8
Şekil 4. Kanser oluşum mekanizması. _____	9
Şekil 5. Apoptozun ana yolları ve apoptotik süreçte yer alan temel proteinler. _____	11
Şekil 6. Kaspaz-3 enziminin apoptoz sürecinde keserek aktifleştirdiği hücre içi hedeflerden bazıları _____	14
Şekil 7. Apoptozun intrinsek yolağı. _____	15
Şekil 8. Bcl-2 ailesi üyelerinin şematik gösterimi. _____	17
Şekil 9. İntrensek yolağın Bcl-2 ailesi proteinleri ile regülasyonu. _____	18
Şekil 10. Apoptozun diğer oyuncuları. _____	21
Şekil 11. Yeşil çay ekstraktlarından elde edilen katekin türevleri ve kimyasal yapıları. _____	25
Şekil 12. EGCG'nin p53 ve NF-κB yolları üzerinden apoptoz regülasyonu. _____	29
Şekil 13. MTT tuzunun süksinat dehidrogenaz aktivitesi ile formazan kristaline dönüşüm reaksiyonu. _____	38
Şekil 14. CDD yönteminin prensibinin şematik gösterimi. _____	40
Şekil 15. Annexin-V apoptoz analizi için akış sitometri diyagramı. _____	45
Şekil 16. Hücre yaşam döngüsü regülasyon analizi için akış sitometri diyagramı. _____	47
Şekil 17. Pozitif kontrol etopositin HCT-116 hücre canlılığı üzerine etkisi. _____	49
Şekil 18. EGCG'nin HCT-116 hücre canlılığı üzerine etkisi. _____	50
Şekil 19. EGCG'nin CCD18co hücre canlılığı üzerine etkisi. _____	51
Şekil 20. EGCG'nin HCT-116 hücrelerine apoptotik etkisi. _____	52
Şekil 21. Akış sitometresinden elde edilen hücre dağılımları. _____	54
Şekil 22. EGCG'nin HCT-116 hücrelerine apoptotik/nekrotik etkisi. _____	55
Şekil 23. Akış sitometresinden elde edilen faz pikleri ve hesaplanan hücre yüzdeleri. _____	56
Şekil 15. Şekil 24. EGCG'nin HCT-116 hücrelerinde yaşam döngüsü üzerine etkisi. _____	57

KISALTMALAR

EGCG	: (-)-Epigallokatekin-3-gallat
I	: İnterfaz
M	: Mitoz
S	: Sentez (DNA replikasyonu)
UV	: Mor ötesi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
CDK	: Siklin bağımlı kinaz (cyclin dependent kinase)
MPF	: Mitoz başlatıcı faktör (mitosis promoting factor -)
NuMA	: Nükleer/mitotik apparatus protein
CAD	: Kaspaz aracılığıyla aktifleşen endonükleaz (caspase-activated endonuclease)
ICAD	: CAD inhibitörü (inhibitor CAD)
Apaf-1	: Apoptotic protease activating factor-1
VDAC	: Voltaj-bağımlı anyon kanalları
ANT	: Adenin nükleozid translokatorü
PTP	: Permeability transition pore
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNFr	: TNF reseptörü
DD	: Ölüm bölgesi (death domain)
TRAIL	: TNFr-apoptoz-tetikleyici lingand (TNFr-apoptosis-inducing ligand)
DISC	: Ölüm-tetikleyici sinyal kompleksi (death-inducing signaling complex)
FADD	: Fas-ilişkili ölüm bölgesi (Fas-associated death domain)
DED	: Ölüm-efektör bölgesini (death-effector domain)
RIP	: Reseptör-etkileşim proteini (reseptor interaction protein)
FLIP	: FLICE inhibitör proteini
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
ECM	: Ekstraselüler matriks
MMP	: Matriks metalloproteinaz
FBS	: Fetal bovine serum
PBS	: Phosphate buffered saline
DMSO	: Dimetil sülfoksit
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
PI	: Propidyum iyodür
MTT	: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid
CDD	: Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} yöntemi
ABST	: 2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]- diammonium salt
FHC	: Fetal human colon

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilimsel anlayışımın, analitik düşünce kapasitemin ve laboratuvar tecrübemin gelişmesini sağlayan başta danışmanım Prof. Dr. Semra Koçtürk olmak üzere, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Banu Önvural'a, Enstitü Müdürümüz Prof. Dr. Gül Güner'e ve tüm Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarımda destek ve önerilerini esirgemeyen başta doktora öğrencisi Birce Akpınar olmak üzere tüm biyokimya lisansüstü öğrencilerine; bitmek bilmez sorularımı bıkmadan yanıtlayan Dilek Göktürk, Taylan Demirci ve Taylan Öztürk'e, akış sitometrik analizlerin gerçekleştirilebilmesi için üstün çaba gösteren Sayın Halil Ateş'e, hücre kültürü çalışmalarımızdaki desteğinden dolayı Yard. Doç. Dr. Zeynep Sercan'a, yaptığım bütün tercihlerde beni destekleyen aileme ve her zaman yanımda olan, hayat arkadaşım Feriha Toksöz'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

HCT-116 Kolon Kanser Hücre Hattında Yeşil Çay Etken Maddesi Olan (-)-Epigallokatekin-3 gallat'ın Apoptoz Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Ali Burak Özkaya

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı

İnciraltı, 35340, İzmir

burak.ozkaya@deu.edu.tr

Amaç: Günümüze kadar yapılan epidemiyolojik çalışmalar yeşil çay tüketiminin kolon kanser riskini azalttığını göstermektedir. Yeşil çayın antikanser özelliğinin katekin adı verilen polifenol bileşenlerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Yeşil çaydaki temel katekin olan (-)-epigallokatekin-3-gallat (EGCG), çeşitli kanser hücre hatlarında büyümeyi engelleyici etki göstermektedir. Bunun yanı sıra EGCG'nin kullanılan konsantrasyon ve inkübasyon süresine bağımlı olarak hücre döngüsünde duraksamayı, apoptozu ya da nekrozu tetikleyebildiği gösterilmiştir. Buna karşın EGCG'nin kolon kanser hücre hatları üzerine etkilerine odaklanmış çalışmaların sayısı oldukça kısıtlıdır ve etki şekli tam olarak belirlenmemiştir. Bu çalışmada; EGCG'nin kolon kanseri (HCT-116) ve normal kolon hücrelerinde (CCD18co) antiproliferatif etkisinin olup olmadığı, olası hücre ölüm tipinin (apoptoz/nekroz) belirlenmesi ve EGCG'nin hücrelerin yaşam döngüsü üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: EGCG'nin HCT-116 ve CCD18co hücre hatlarında antiproliferatif etkisi MTT hücre canlılık testi ile incelendi. Tetiklenen hücre ölümünün tipi, akış sitometresinde Annexin/PI boyaları ve Cell Death Detection ELISA^{PLUS} apoptoz tayin yöntemleri ile saptandı. EGCG'nin hücre yaşam döngüsüne etkisi akış sitometrik hücre yaşam döngüsü regülasyon analizi ile saptandı.

Bulgular ve Sonuç: Elde edilen veriler, EGCG'nin zaman ve konsantrasyona bağımlı olarak HCT-116 hücrelerinde hücre ölümüne neden olduğunu ancak 50µMdan düşük konsantrasyonlarda etkin olmadığını gösterdi. EGCG'nin, 50 ve 100µM konsantrasyonlarında %43 ile %72 arasında değişen oranlarda hücre ölümüne neden olduğu, aynı konsantrasyonların ise normal kolon hücre hattı CCD18co hücrelerinde ölüme neden olmadığını saptandı. Hücre ölüm tipi incelemelerinin sonucunda elde edilen bulgular, 50 ve 100µM EGCG ile muamele edilen HCT-116 hücrelerinde, sırasıyla %23 ve %42 oranında apoptotik hücre ölümünün gerçekleştiğini gösterdi. Bulgular ayrıca nekrozun ve hücre yaşam döngüsünde duraksamanın EGCG'nin temel etki mekanizması olmadığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: EGCG, yeşil çay, kolon kanseri, apoptoz.

ABSTRACT

Investigation of the Effect of (-)-Epigallocatechin-3 Gallate on Apoptosis in HCT-116 Colon Cancer Cell Line

Ali Burak Özkaya

Dokuz Eylül University, Health Science Institute, Biochemistry Programme

İnciraltı, 35340, İzmir /TURKEY

burak.ozkaya@deu.edu.tr

Objectives Epidemiologic studies which have been done until today have shown that the consumption of green tea lowers the risk of developing colon cancer. The anticancer effects of green tea have been attributed to the biological activities of its polyphenol components, catechins. The major catechin in green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), exhibits growth inhibitory activities against carcinogenesis in various cancer cell lines. Furthermore it has been shown that EGCG induces cell cycle arrest, apoptosis or necrosis depending on the concentration and incubation time used. However there are few studies focused on the effect of EGCG on colon cancer cell lines and the type of this effect has not been determined completely. In this study we aimed to observe antiproliferative effects of EGCG on HCT-116 colon cancer cells and on CCD18co normal colon cells, to determine the type of the cell death (apoptosis/necrosis) induced by EGCG and to determine the effect of EGCG treatment to the cell cycle.

Materials and Methods: To determine antiproliferative effects of EGCG on HCT-116 and CCD18co cell lines, MTT cell viability assay was carried out. The type of cell death induced in HCT-116 cells with EGCG was determined by flow cytometry, using Annexin/PI dyes and Cell Death Detection ELISA^{PLUS} apoptosis assay. The effect of EGCG on cell cycle was determined by flow cytometric cell cycle regulation assay.

Results and Conclusion:

Data obtained indicated that EGCG induced cell death in a time and concentration depended manner in HCT-116 cells but not at concentrations less than 50 μ M. 50 and 100 μ M concentrations of EGCG caused 43% to 72% cell death but these concentrations did not induce cell death in CCD19co cells. Our results on cell death type analysis showed that apoptotic cell death ratio was 23% and 42% in HCT-116 cells treated with 50 and 100 μ M EGCG, respectively. Our results also indicated that neither necrosis nor cell cycle arrest was the main type of effect induced in cells.

Key words: EGCG, colon cancer, green tea, apoptosis.

1. GİRİŞ VE AMAC

Kanser günümüzün en önemli sağlık problemlerinden biridir. Kanser türleri arasında özellikle kolon kanseri batı ülkelerinde yüksek mortalite ve insidans göstermektedir ve Dünya Sağlık Örgütünün verilerine göre yılda 600.000in üzerinde insan kolon kanseri nedeniyle ölmektedir. Kanser sağaltımında tümör hücrelerinin çevre dokuya minimum hasar vererek öldürülmesi hedeflenmektedir. Apoptoz (programlı hücre ölümü) hücrelerin enflamatuvar bir yanıt oluşturmadan öldürülmesini sağlayan fizyolojik bir süreçtir ve bu nedenle kanser sağaltımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğu ülkelerinde kolon kanserinin mortalitesi ve insidansı düşüktür. Epidemiyolojik çalışmalar bunun nedeninin beslenme alışkanlıkları ve özellikle yeşil çay tüketimi olduğunu göstermektedir. Yeşil çayın antikanser etkisi son yıllarda yaygın olarak çalışılmaktadır. Yeşil çayın antikanser etkisinin içerdiği katekin adı verilen polifenollere bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu katekin türevlerinden (-)-epigallokatekin-3-gallatın (EGCG) antikanser etkisi pek çok hücre hattında gösterilmiştir. Bu etki hücrelerde apoptoz ya da nekrozun tetiklenmesi veya hücrelerin yaşam döngüsünde duraksama şeklinde gerçekleşebilmektedir. Çalışmalar etkinin hücre tipine, konsantrasyona ve inkübasyon süresine göre değiştiğini göstermektedir. Buna karşın EGCG'nin kolon kanser hücrelerine etkisini gösteren çalışmalar oldukça kısıtlı sayıdadır ve bu etkinin tipi tam olarak belirlenmiş değildir. Bütün bu bilgiler ışığında çalışmamızda;

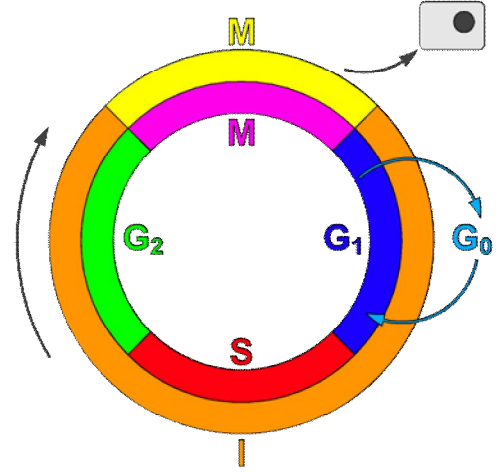
1. HCT-116 kolon karsinoma ve CCD18co normal kolon hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine EGCG'nin etkisinin belirlenmesi,
2. Hücrelerde farklı EGCG konsantrasyonlarında ve inkübasyon sürelerinde tetiklenen hücre ölümünün tipinin (apoptotik/nekrotik) belirlenmesi,
3. Hücrelerde EGCG etkisi ile hücre yaşam döngüsünde duraksamanın gerçekleşip, gerçekleşmediğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HÜCRE YAŞAM DÖNGÜSÜ VE KANSER

2.1.1. Hücre Yaşam Döngüsü

Hücrenin yaşam döngüsü, hücrelerin birbirini takip eden bölünme (mitoz) ve bölünmeye hazırlık (interfaz) sürecidir (Şekil 1.). Bu süreç G_1 , S (sentez), G_2 , ve M (mitoz) fazlarından meydana gelmektedir (1). İnterfaz sürecinin ilk fazı G_1 , mitozun (M) bitişi ile DNA sentezinin (S) başlangıcı arasında kalan sürece verilen isimdir. Bu faz DNA sentezine yani replikasyona hazırlık fazıdır. Hücre bu fazdayken replikasyon için gerekli olan çeşitli proteinlerin sentezini gerçekleştirir. S fazı DNA replikasyonunun gerçekleştiği fazdır. Kromozom sentezi bu fazda tamamlanır fakat kardeş kromatidler birbirinden ayrılmaz bu sayede hücre diploid özelliğini korumuş olur. Sentez tamamlandıktan sonra hücre G_2 fazına geçer. Bu faz mitoz hazırlık fazıdır. Mitoz sürecinde gerekli olan mikrotübüller bu fazda sentezlenir. Mitoz (M) fazında ise nükleusun (karyokinez) ve sitoplazmanın (sitokinez) bölünmesi gerçekleşir. Kardeş kromatidlerin birbirlerinden ayrılması ve mikrotübüller aracılığı ile hücrenin zıt kutuplarına taşınması bu fazda gerçekleşir. Bu faz sonucunda iki yeni hücre meydana gelmektedir (2).

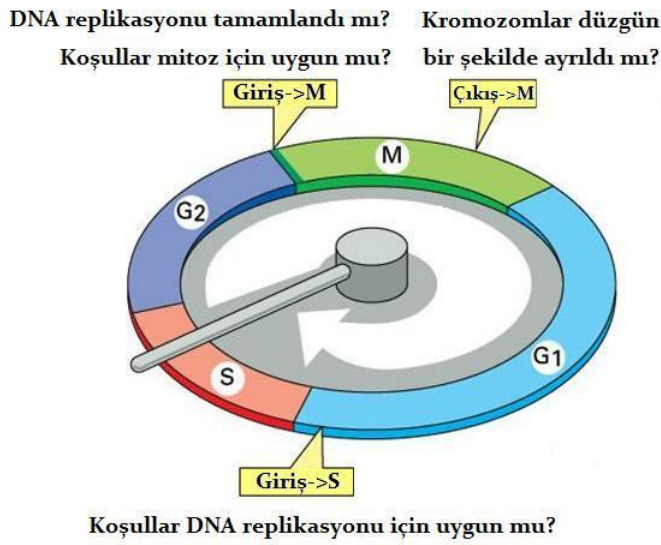


Şekil 1. Hücre yaşam döngüsü.

Turuncu	: I, interfaz
Sarı	: M, mitoz
Mavi	: G_1 , replikasyona hazırlık
Kırmızı	: S, sentez, DNA replikasyonu
Yeşil	: G_2 , mitoz hazırlık
Pembe	: M, mitoz

2.1.2. Hücre Yaşam Döngüsünün Regülasyonu

Hücrenin yaşam döngüsü siklinler ve siklin bağımlı kinazlar adı verilen çeşitli proteinler aracılığı ile kontrol edilir. Regülatör siklin proteinleri ve katalitik siklin bağımlı kinaz enzimleri bir arada heterodimer formunda aktivite gösterirler (3). Bu heterodimerin asıl görevi çeşitli hücre içi proteinlerin forforillenmesi ile hücre yaşam döngüsünün devamlılığının sağlanmasıdır. Siklinlerin baskılanması hücre yaşam döngüsünün duraksamasına neden olur (4).



Şekil 2. Hücre yaşam döngüsünde kontrol noktaları.

G₁-S kontrol noktasında hücrenin replikasyon için hazır olup olmadığı, G₂-M kontrol noktasında hücrenin mitoz için uygun olup olmadığı, M-G₁ kontrol noktasında ise kromozomların yerleşimi kontrol edilir (2).

bölünmeye devam sinyalini uyarırken, tümör baskılayıcı p16 ya da p21 proteinleri CDK4ü inhibe ederek hücrenin S fazına geçişini engeller ve böylece hücreler yaşam döngüsünün G₁ fazında duraksatılmış olur (6). Ayrıca hücre bu noktada G₀ dinlenme fazına geçişi de uyarabilir. Bu fazda hücrenin yaşam döngüsünün dışına çıkmıştır ve tekrar döngüye girene kadar bölünmez. Sinir hücreleri ve kalp kası hücreleri gibi hücreler normal koşullarda bu

Hücre yaşam döngüsünde kontrol noktaları hücrenin bir fazdan diğerine geçişi için çeşitli faktörlerin uygunluğunun kontrol edildiği süreçlerdir (Şekil 2). Hücrenin içerisinde bulunduğu fazın tamamlanıp tamamlanmadığı ve bir sonraki faza geçiş için koşulların uygun olup olmadığı bu kontrol noktalarında kontrol edilir (5).

G₁ fazındaki kontrol noktası (restriksiyon noktası olarak da adlandırılır) hücrenin bölünmeye devam edebilmek amacıyla S fazına geçip geçmeyeceğine karar verdiği noktadır. Hücre bu noktada bölünmeye ya da yaşam döngüsünde duraksamaya. CDK4 (siklin bağımlı kinaz 4) ve siklin D proteinlerinin oluşturduğu heterodimer

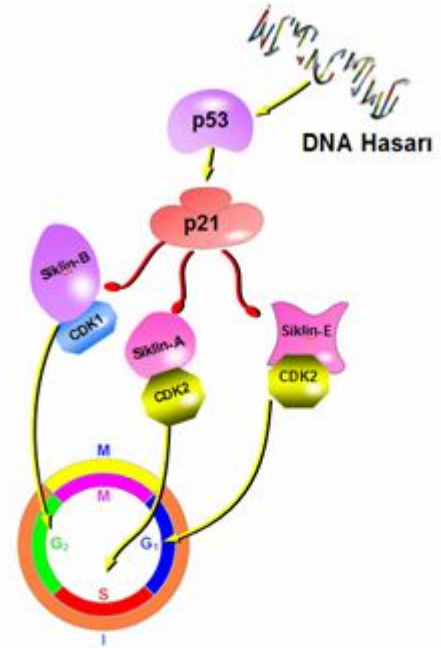
fazdadırlar ve bölünmediklerinden hücre yaşam döngüsüne devam etmezler. Hücre bu fazdayken siklinler ve siklin bağımlı kinazlar görülmez. G₀ fazındaki karaciğer ve böbrek parenşimal hücreleri gibi bazı hücreler özel durumlarda normal yaşam döngüsüne geri dönebilirler (7).

G₂ fazındaki kontrol noktasında ise hücrenin mitoz geçiş için uygunluğu kontrol edilir. Eğer hücrenin DNA'sı hasarlanmış ise siklin bağımlı kinazları aktifleştiren mitoz başlatıcı faktör (mitosis promoting factor - MPF) inhibe edilir ve böylece hücre döngüsü G₂ fazında duraksar (8). Benzer şekilde p21 proteini de G₁ fazında olduğu gibi G₂ fazında da p53 üzerinden DNA hasarı ile uyarılarak siklin/CDK kompleksini inhibe eder ve hücre döngüsünü duraksatır (Şekil 3.) (6).

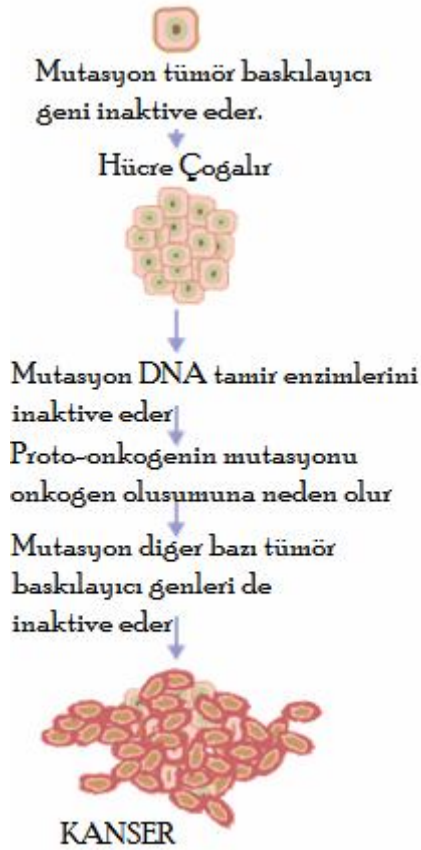
Metafazdaki kontrol noktasında ise kromozomların mitotik plak üzerine yerleşimleri kontrol edilir. Eğer kromozomlar düzgün bir şekilde yerleşmediyse hücre buna yanıt olarak siklin-B proteini yıkar. Böylece hücre metafazdan anafaza geçemez ve mitoz tamamlanamaz (9).

2.1.3. Hücre Yaşam Döngüsü ve Kanser

Hücre yaşam döngüsü ve kanser gelişimi yakından ilişkili konulardır. DNA hasarını algılayarak p21 proteinini aktifleştiren ve bu sayede hücre döngüsünün ilerlemesine engel olan p53 proteini katı tümörlerin %50'sinden fazlasında mutanttır (10). p53, p21 ya da p16 gibi tümör baskılayıcı proteinler hücre yaşam döngüsünü duraksatma aktivitesi gösterirken siklinler ve CDKlar hücreyi bölünmeye yönlendirdiklerinden onkogen olarak adlandırılır (Şekil 3). Çeşitli kanser türlerinde bu tümör baskılayıcı proteinlerin eksikliği, siklin ve CDKların ise aşırı ekspresyonu söz konusudur (11). Kanser karakteristk özelliklerinden en önemlisinin



Şekil 3. Hücre yaşam döngüsü ve p53. DNA hasarını algılayan p53 proteini p21 proteinini aktifleştirir. Aktifleşen p21 çeşitli siklin ve CDKları baskılayarak hücre yaşam döngüsünün G₁, S ya da G₂ fazında duraksamasına neden olur. (SABiosciences)



Şekil 4. Kanser oluşum mekanizması. Ardışık mutasyonlar normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesine neden olabilir. (wikipedia)

kontROLSÜZ hücre bölünmesi olduğu düşünüldüğünde protein ekspresyon profilindeki bu değişimin önemi anlaşılmaktadır. Benzer şekilde bir proto-onkogen olan RAS proteini aktifleştirdiğinde siklinD-CDK4 kompleksini aktifleştirerek hücre döngüsünün ilerlemesine neden olur. Tüm insan tümörlerinin %20-30unda RAS aktifleşmesi görülmektedir (12). Kanser oluşum mekanizmasında ardışık mutasyonlar sonucu hücre döngüsünün kontrolden çıkması gözlenmektedir (Şekil 4.). Bu mutasyonlar genellikle DNA tamir enzimlerinde (inaktifleşme), proto-onkogenlerde (aktifleşme-onkogene dönüşüm) ve tümör baskılayıcı genlerde aktifleşme görülmektedir (12).

2.1.4. Kolon Kanseri

Çeşitli kanser türleri tüm dünyadaki ölümlerin %13'ünden ve batı ülkelerinde ölümlerin %25inden sorumludur (13). Tümörün köken aldığı dokunun tipine göre beş farklı kanser türünden bahsedilebilir: karsinoma, sarkoma, lenfoma ve lösemi, kök hücre tümörleri ve blastoma. Karsinomalar epitelial hücrelerden türevlenen malin tümörlerdir ve tüm kanser türlerinin %85ini kapsarlar. En yaygın görülen karsinoma türleri meme, kolon, prostat ve akciğer kanseridir (14).

Kalın barsak; çekum, kolon, rektum ve anal kanal bölümlerinden meydana gelmektedir. Kolon ise çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolon adı verilen bölümlerden oluşmaktadır. Kolon; sigmoid kolon üzerinden rektuma, çekum aracılığıyla ise ince barsağın ileumuna bağlanır. Kolon kanseri ya da kolorektal kanser; kolon, rektum ve apandis bölgelerinde meydana gelen kanser oluşumlarının tamamını kapsar.

Tüm dünyada en yüksek üçüncü mortaliteye ve dördüncü insidansa sahip kanser türü olan kolon kanseri yılda 655.000 kişinin ölümünden sorumludur (13). Batı ülkelerinde kolon kanser mortalitesi akciğer kanserinden sonra ikinci sıradadır. Doğu ülkelerine kıyasla batı

ülkelerinde yüksek mortalite görülmesiyle batı beslenme alışkanlıkları arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Özellikle aşırı kırmızı et, işlenmiş et tüketimi ve düşük meyve-sebze tüketimi kolon kanseri için risk faktörü olarak kabul edilmektedir (15). Kolon kanserinde hücre tipi çoğunlukla salgı dokusu hücrelerinden türevlenen adenokarsinomadır. Adenokarsinomanın dışında, epitelyal doku hücrelerinden türevlenen karsinoma ve lenfositlerden türevlenen lenfoma da kolon kanserinde görülen tümör hücre tipleri arasındadır (16). Kolon kanserinde DNA replikasyon ve tamir enzimlerindeki mutasyonlarla birlikte; APC, K-Ras, NOD2 ve p53 genlerinde de mutasyon görülebilmektedir (17).

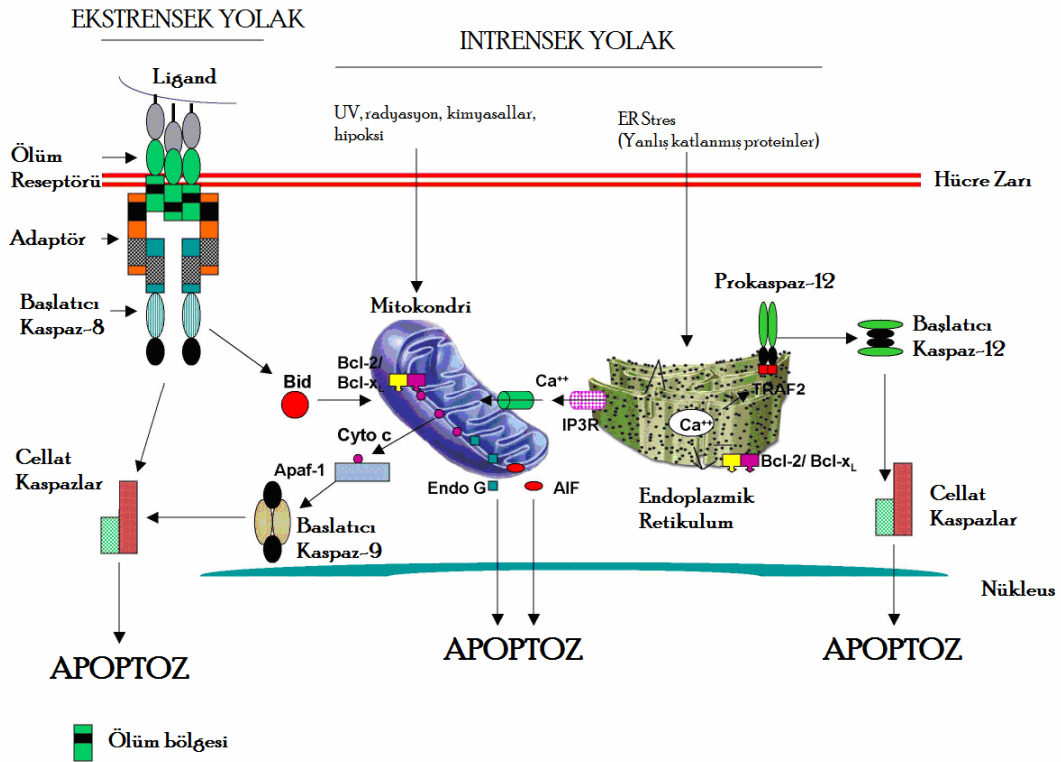
2.2. APOPTOZ

Apoptoz hücre-içi ve hücre-dışı pek çok sinyal tarafından iki temel yolak üzerinden aktifleşen ve pek çok protein tarafından regüle edilen, kontrollü ve programlı bir hücre ölüm sürecidir (18). Fizyolojik şartlardaki çok hücreli organizmalarda, hem gelişim esnasında hem de gelişimini tamamlamış organizmaların homeostazının sağlanmasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesi için evrimleşmiş en önemli mekanizmadır (19). Apoptoz mekanizması potansiyel zararlı hücrelerin yok edilmesi görevini üstlendiğinden pek çok hastalık ile yakın ilişkilidir. Aşırı apoptoz, fazla hücre kaybı nedeniyle iskemik ve nörodejeneratif hastalıklara sebep olurken, yetersiz apoptoz otoimmün hastalıklara ve kansere neden olabilmektedir. Fizyolojik süreçte büyüme faktörlerinin hücreye ulaşmaması veya hücrenin oksidatif stres, hipoksi, iyonize radyasyon, UV ya da ilaç uygulamaları gibi farklı etkenlerin etkisinde kalması sonucunda oluşan hasarlı hücrelerin yok edilebilmesi için apoptotik mekanizma tetiklenebilmektedir (20).

Morfolojik olarak apoptoz süreci; plazma membranının tomurcuklanması, fosfotidil serin kalıntılarının membranın dış yüzeyine yönelmesi, hücre büzülmesi, kromatin kondenzasyonu ve hücre içeriğinin çoklu membran kaplı parçacıklar halinde dağılarak komşu hücreler ve fagositler tarafından yutulmasını kapsayan bir süreçtir (21). Morfolojik değişimler, hücresel bütünlük ve canlılık için gerekli olan polipeptidlerin proteolitik yıkımı ile gerçekleşmektedir. Yıkım süreci spesifik sistein proteazlar olan kaspazların aktivitesi sayesinde meydana gelmektedir (22). Apoptotik hücre ölüm mekanizmasında hücre içi bileşenlerin membran ile çevrilmiş apoptotik parçacıklar halinde çevre dokuya dağılması oldukça önemlidir. Bu nedenle nekrotik hücre ölüm mekanizması ile hücre içi bileşenlerin

çevre dokuya dağılması sonucunda meydana gelen enflamasyon, apoptotik hücre ölüm mekanizmasında oluşmamaktadır. Hasarlanmış hücrelerin yok edilmesini hedefleyen terapilerde çoğunlukla spesifik olarak apoptozun tetiklenmesi tercih edilmektedir (21).

Pek çok farklı molekül tarafından hassas bir şekilde kontrol edilen apoptoz mekanizması, kaspazların bir kaskad oluşturacak şekilde aktifleşmelerini sağlayan iki yolak tarafından tetiklenmektedir: Hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerinin aktifleşmesi ile karakterize edilen ekstrinsek yolak ve mitokondri-apoptozom sisteminin aktifleşmesi ile karakterize edilen intrinsek yolak (Şekil 5). Her iki yolağın ayrıntılarına değinmeden önce apoptoz mekanizmasında kilit rolü oynayan kaspazlardan bahsetmek gerekmektedir. Kaspaz enzimlerinin aktivitesi apoptozun tetiklenmesinden DNA fragmentasyonuna, plazma membranının tomurcuklanmasından, fosfolipid asimetrisinin bozulmasına kadar tüm apoptoz sürecinde yer almaktadır.



Şekil 5. Apoptozun ana yolakları ve apoptotik süreçte yer alan temel proteinler (18).

2.2.1. Kaspazlar ve Kaspaz Aktivasyonu

Daha önce yapılan çalışmalarda, apoptoz mekanizması tetiklenen hücrelerde hücre içi polipeptidlerin çoğunun bütünlüğünü koruduğunu iddia etmiş olsa da; günümüzde apoptotik ölüm sürecinde 500'ün üzerinde polipeptidin seçici olarak yıkıldığı bilinmektedir (23). Proteolitik olaylarda kalpainler, katepsinler ve proteozom gibi pek çok proteazın etkisi bilinse de, asıl rol oynayanlar proteinleri aspartat kalıntılarından sonra kesen hücre içi sistein proteazlar yani kaspaz ailesi enzimleridir (22). İnsanlarda bilinen 12 kaspazdan 7'sinin (kaspaz -2, -3, -6, -7, -8 , -9 ve -10) apoptotik süreçte yer aldığı oynadığı saptanmıştır. Kaspazlar, öncül formlarında inaktif zimojenler olarak sentezlenmekte ve apoptoz sırasında aktifleşmektedirler (25). Kaspaz enzimleri hem aktivitelinde hem de regülasyonlarında önemli olan büyük ve küçük alt birimlerden oluşmaktadırlar (22).

Kaspaz enzimleri, apoptoz sürecindeki rolleri göz önünde bulundurularak iki ana grupta incelenebilir. Başlatıcı (*initiator*) kaspazlar, çeşitli hücre-içi ya da hücre-dışı sinyalleri proteolitik aktiviteye çevirerek kaspaz kaskadının başlatılmasından sorumlu olan kaspazlardır. Hücre dışı sinyaller ile aktifleşen başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8 gibi) ekstrensek yolağı, hücre içi sinyaller aracılığıyla aktifleşen başlatıcı kaspazlar ise (kaspaz-9 gibi) intrinsek yolağı başlatarak kaspaz kaskadını tetiklerler. Cellat (*executioner*) kaspazlar ise hücre içerisindeki spesifik polipeptid hedeflerini proteolitik olarak keserek apoptoz mekanizmasının tamamlanmasını sağlayan enzimlerdir (22).

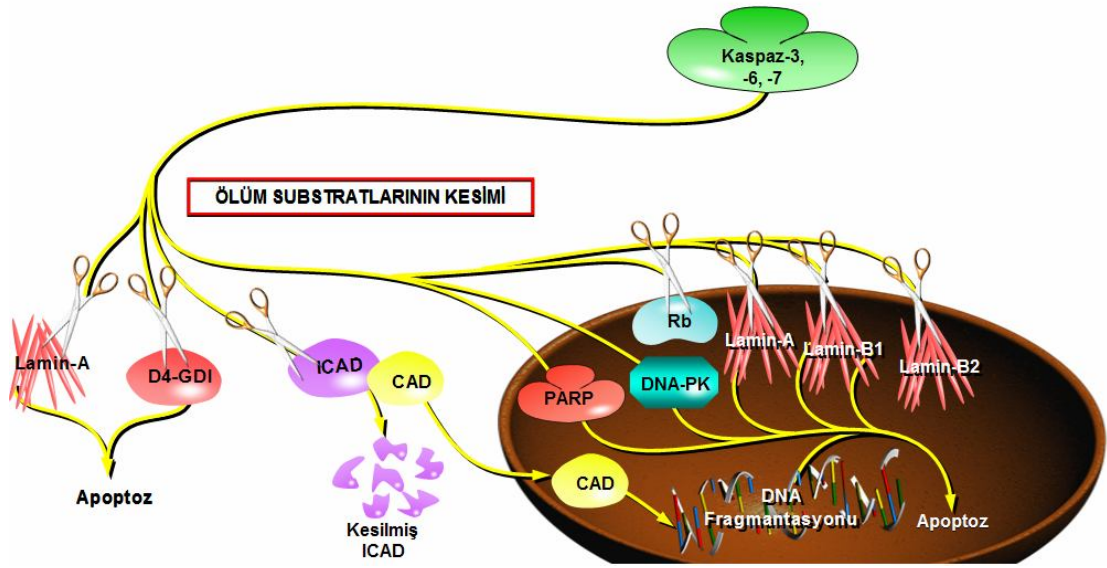
Son zamanlarda yapılan çalışmalar kaspaz aktivasyon sürecinin başlatıcı kaspazlar için (kaspaz-2, -8, -9 -10) ve cellat kaspazlar için (kaspaz-3, -6, -7) farklı olduğunu göstermektedir. Başlatıcı kaspaz aktivasyonuna model olarak intrinsek yolağın başlatıcısı olan prokaspaz-9 un aktifleşmesi kullanılabilir. Prokaspaz-9 ters yerleşmiş katalitik sistein ve histidin kalıntıları içeren ve bu nedenle substrat bağlama cebine substratın ulaşamadığı monomerik bir proteindir. Kaspaz-9'un dimerizasyonu sonucu gerçekleşen konformasyonel değişim sayesinde proteinin substrat bağlama cebi açılır ve katalitik kalıntılar aktivite gösterebilecekleri şekilde yerleşir (26). Böylece aktif kaspaz-9 cellat kaspazları keserek aktifleştirir ve intrinsek yolak üzerinden apoptoz süreci başlamış olur. Prokaspaz-8 ve prokaspaz-10 (ekstrensek yolak başlatıcı kaspazları) da benzer şekilde dimerizasyon ile

aktifleşen sitoplazmik monomerlerdir. Bu proteinlerin aktifleşmesinde de kaspaz-9 gibi proteolitik kesim söz konusu değildir (27).

Başlatıcı kaspazların aksine, cellat kaspazların zimojenleri fizyolojik koşullarda dimerik yapıdadır ve bu kaspazların aktivasyonu çeşitli aspartat kalıntılarından kesilmeleri ile gerçekleştirilmektedir (27). Spesifik kesim bölgelerinden biri küçük ve büyük alt birimler arasındaki aspartat kalıntısı, bir diğeri de öncül bölge ile büyük alt birim arasındaki aspartat kalıntısıdır (28). Bu kalıntılardan kesilmeleri cellat kaspazların aktifleşmelerini sağlar.

2.2.2. Cellat Kaspazların Aktivitesi

Başlatıcı kaspazlar, cellat kaspazları aktifleştirdiklerinde apoptotik süreç başlamış olur. Cellat kaspazlar pek çok hedef proteini proteolitik olarak keser ve böylece apoptoz sürecine özgün hücre içi olaylar gerçekleşir. Cellat kaspazların arasında fonksiyonu en iyi tanımlanmış olan kaspaz-3 proteininin aktifleştikten sonra yüzlerce substratı seçici olarak kestiği bilinmektedir (Şekil 2) (23). Bu proteolitik yıkım apoptoz sürecinde gerçekleşen pek çok morfolojik değişimin temelini oluşturmaktadır. Örneğin, kaspaz-3 aktin-kesici enzim gelsolin'i keserek aktifleştirir. Bu enzimin aktivasyonu apoptozun en karakteristik morfolojik değişimlerinden olan plazma membranında tomurcuklanmaya neden olmaktadır (29). Kaspaz-3 aynı zamanda lamin B, nükleer/mitotik aparat proteini (NuMA) ve sitokeratinler gibi hücre içi sito-iskelet elemanlarının kesiminden de sorumludur (23, 30). Bu proteinlerin temel fonksiyonunun hücrenin şeklinin korunması olduğu düşünüldüğünde, kaspaz-3 aktivitesi ile bu proteinlerin kesiminin apoptotik süreçteki morfolojik değişim açısından önemi anlaşılabilir.



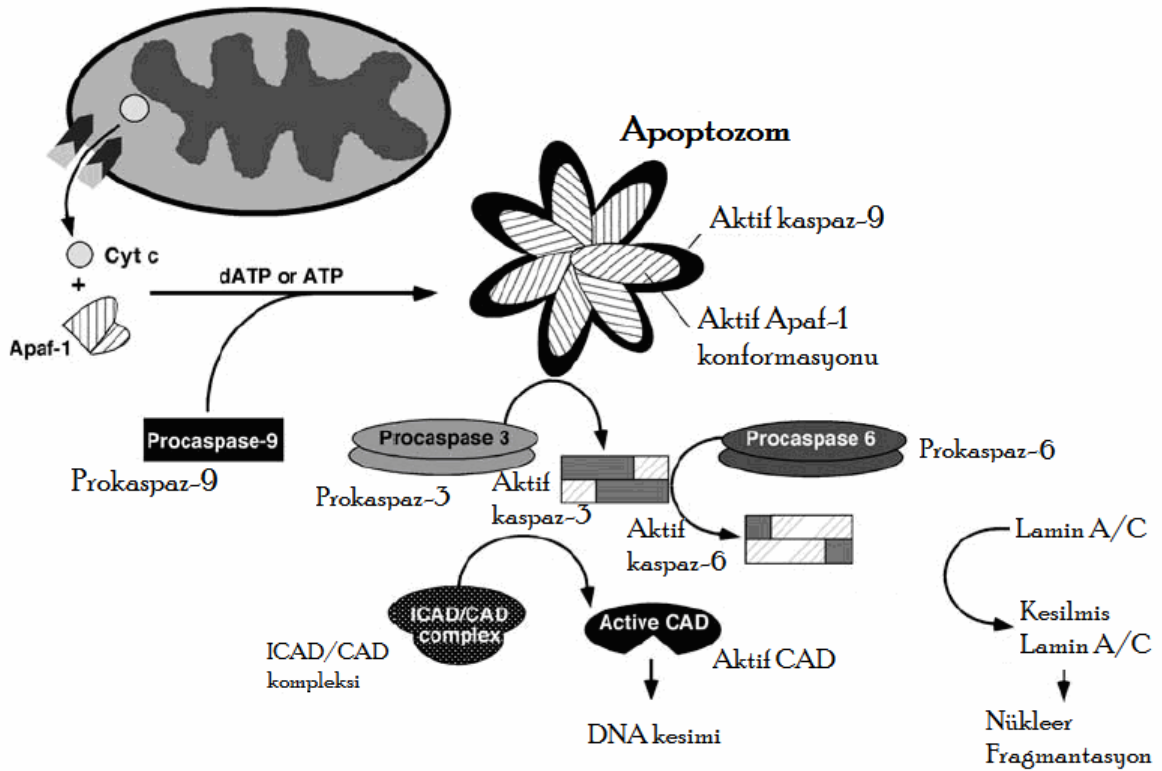
Şekil 6. Kaspaz-3 enziminin apoptoz sürecinde keserek aktifleştirdiği hücre içi hedeflerden bazıları. (SABiosciences)

Kaspaz aracılı protein yıkımı apoptotik hücrelerde gözlemlenen bazı biyokimyasal olayların da temelini oluşturmaktadır. Kaspaz-3, endonükleaz inhibitör proteinini (inhibitor of caspase-activated endonuclease, ICAD) keserek serbest kalan CAD enzimi (caspase-activated endonuclease) ile DNA'nın fragmentasyonunun gerçekleşmesine olanak sağlar (Şekil 6) (31). Bunun yanı sıra kaspaz-3 pek çok protein kinaz enzimini hedefler. Bu enzimlerin inhibitör bölgelerini keserek aktivasyonunu sağlamaktadır (23). Bu protein grubundan olan protein kinaz Cδ enziminin aktivasyonu ile fosfatidilserin fosfolipidinin normal koşullarda bulunduğu plazma membranının iç kısmından dış kısmına dönüşünü katalizleyen “*phospholipid scramblase*” enzimi aktifleşir (32, 33). Hücre membranının fosfolipid asimetrisindeki bu kayıp apoptozun karakteristik göstergelerinden biridir ve makrofajların yüzeylerinde bulunan fosfatidilserin reseptörleri tarafından apoptotik hücrelerin tanımlanması ile apoptotik hücrenin makrofajlar tarafından fagositozu gerçekleşebilir (34).

Farklı proteinlerin kaspaz aracılı degradasyonu ile başta DNA tamir mekanizmaları ve protein translasyon sistemi olmak üzere hücresel sağ kalım için gerekli olan pek çok mekanizma inhibe edilerek hücre mutlak bir ölüm sürecine sürüklenir (35).

2.2.3. Apoptozun Tetiklenmesi: İntrensek Yolak

İntrensek yolak (mitokondriyal yolak); çeşitli sinyaller tarafından mitokondri dış membranının geçirgenliğinde değişim olması sonucunda kaspaz-9'un aktifleşmesi ile sonuçlanan apoptotik aktivasyon sürecidir. Bu süreçteki en kritik basamak, spesifik polipeptidlerin mitokondrideki membranlar arası alandan sitoplazmaya salınmalarıdır (35). Membranlar arası bölgeden salınan proteinler arasında en çok, elektron transport sisteminin bir bileşeni olan ve normal koşullarda mitokondri iç membranına zayıf bağlanmış konumda bulunan, sitokrom c araştırılmıştır. Apoptotik süreçte mitokondriden sitokrom c salınması hızlı, kantitatif bir süreçtir ve kaspaz-9 aktivasyonu üzerinden apoptozun tetiklenmesine neden olur (Şekil 7) (36).



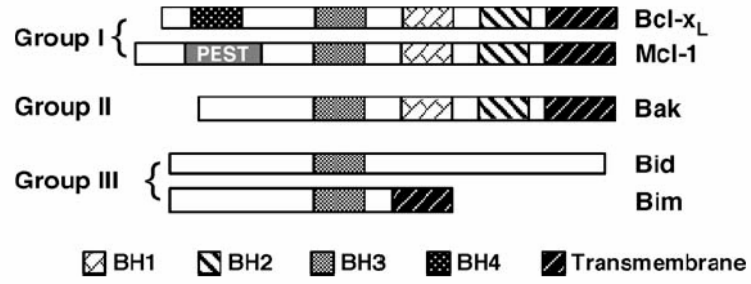
Şekil 7. Apoptozun intrensek yolağı. Mitokondriden sitoplazmaya salınan sitokrom c Apaf-1'e bağlanır ve bu proteinde ATP-bağımlı konformasyonel bir değişime neden olur. Bunun sonucunda oluşan apoptozom kaspaz-9'u aktifleştirerek apoptozu tetikler (23).

Sitokrom c sitoplazmaya geçtikten sonra öncelikle adaptör Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) proteinine bağlanır (37). Bu bağlanma sonucu protein kompleksinde ATP bağımlı bir konformasyonel değişim meydana gelir ve prokaspaz-9 yapıya katılır (38). Sonuçta oluşan 700 kDa büyüklüğündeki kompleks, çoklu Apaf-1 ve kaspaz-9 moleküllerini içerir ve “apoptozom” olarak adlandırılır (39). Bu kompleksin etkisiyle aktiveleşen kaspaz-9, kaspaz-3’ü aktiveleştirerek intrinsek yolak üzerinden apoptozun tetiklenmesine neden olur (Şekil 7).

Bu süreci başlatan sitokrom c’nin mitokondriden sitoplazmaya geçişinin biyokimyasal temelleri halen tartışma konusudur (40). Bazı modeller sitokrom c salınmasının voltaj-bağımlı anyon kanalları (VDAC) ve adenin nükleozid translokatorü (ANT) gibi mitokondriyal membran proteinleri ile mitokondri matriks proteini siklofilin D tarafından oluşturulan *permeability transition pore* (PTP) adı verilen porlar aracılığı ile gerçekleştiğini savunmaktadır (41). Ancak fareler üzerinde gerçekleştirilen denemeler apoptotik süreçte ANT’nin, VDAC’ın ve siklofilinin gerekliliğini kanıtlamayı başaramamıştır (42-44). Son zamanlarda yapılan çalışmalar daha çok Bcl-2 ailesi proteinlerinin sitokrom c salınmasındaki fonksiyonları üzerinde odaklanmaktadır. Elde edilen sonuçlar bu proteinlerin sitokrom c salınmasındaki en temel kontrol mekanizması olduğunu göstermektedir.

2.2.3.1. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondriden sitokrom c salınmasını kontrol eden bir protein ailesidir. Bu ailenin ilk keşfedilen üyesi olan Bcl-2’nin hücre ölümünü engelleyici bir rolü olduğu gösterilmiştir (45). Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda benzer homoloji gösteren 20 gen tanımlanmıştır. Bcl-2 ailesine ait proteinler, fonksiyonel ve yapısal kriterler göz önünde bulundurulduğunda, üç farklı grup halinde incelenebilir. Anti-apoptotik özellik gösteren grup I (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1, Boo/Diva, Nrf3 ve Bcl-B), pro-apoptotik gösteren grup II (Bax, Bak, Bok/Mtd) ve grup III (Bid, Bak, Bik, Bim, Blk, Bmf, Hrk, Bnip3, Nix, Noxa, PUMA ve Bcl-G) (Şekil 8) (47).

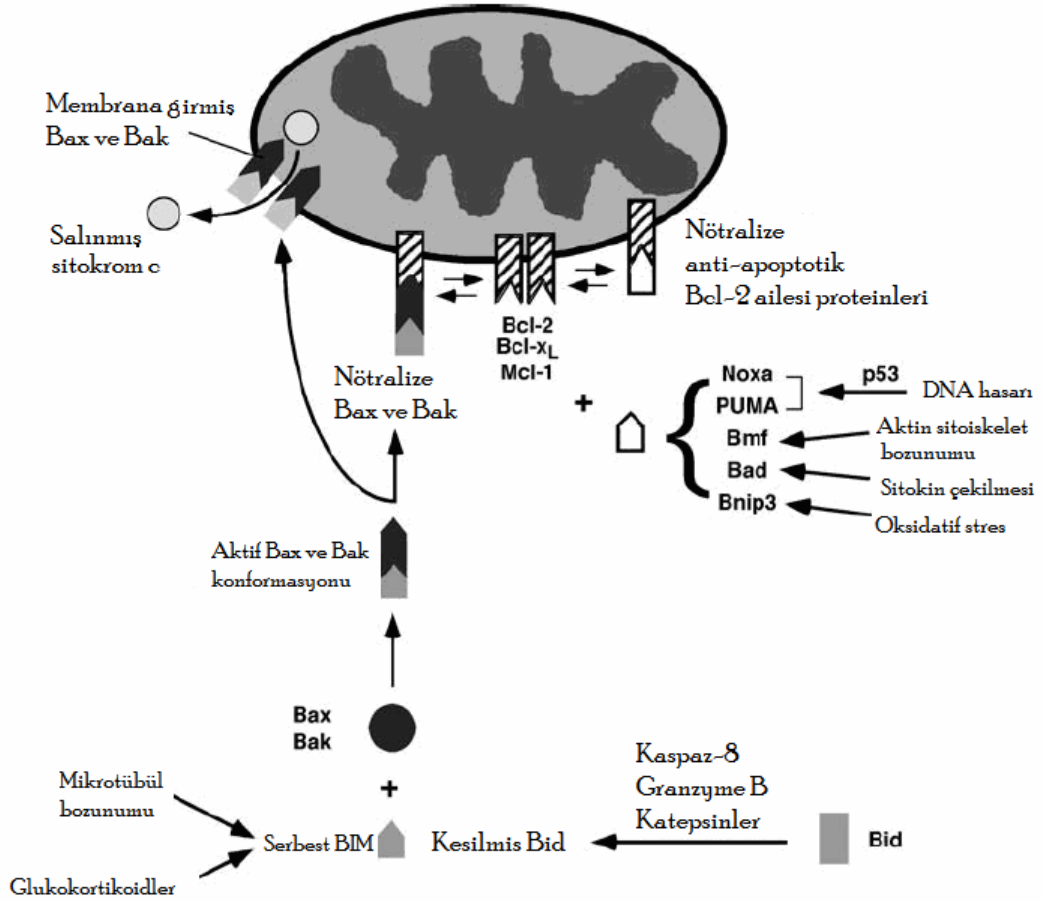


Şekil 8. Bcl-2 ailesi üyelerinin şematik gösterimi. Anti-apoptotik grup I üyeleri 4 BH bölgesini (Mcl-1 hariç) ve transmembran bölgeyi içerirler. Mcl-1’de ise BH4 yerine prolin/glutamat/serin/treonin amino asitlerinden zengin bölge (PEST) bulunmaktadır. Pro-apoptotik grup II üyeleri BH4 hariç tüm BH bölgelerini ve transmembran bölgeyi içermektedirler. Grup III üyelerinde ise sadece BH3 bölgesi ortaktır. Bu bölge dışında oldukça heterojen bir dağılım göstermektedirler (23).

Anti-apoptotik grup I üyeleri genellikle oldukça korunmuş dört BH bölgesini (Bcl-2 homolojisi) ve mitokondri dış membranı, endoplazmik retikulum membranı gibi çeşitli hücre içi membran yüzeylerine bağlanabilmelerine olanak sağlayan c terminal transmembran bölgesini içermektedirler. Pro-apoptotik grup II üyeleri ise N terminal BH4 bölgesi dışında tüm diğer BH bölgelerini ve transmembran bölgesini içermektedirler. Son olarak grup III üyeleri diğer gruplara göre oldukça heterojendir ve tek ortak homolojileri 15 amino asitlik BH3 bölgesidir. (Şekil 8) (47).

Grup II

Güncel bilgiler başta Bax ve Bak olmak üzere grup II üyelerinin doğrudan sitokrom c salınmasını sağladığını göstermektedir (Şekil 9.) (46). Bax ve Bad proteinlere ait genlerden her hangi birinin delesyonu apoptozu kısmen engellemektedir. Her iki proteine ait genlerin birlikte delesyonu ise apoptozun tamamen engellenmesine neden olmaktadır. Bu sonuçlar apoptozun intrensek yolağında bu iki proteinin bir arada gösterdikleri etkinin önemini ortaya koymaktadır (48).



Şekil 9. İntrensek yolağın Bcl-2 ailesi proteinleri ile regülasyonu. Bax ve/veya Bak proteinlerinin mitokondri dış membranına göçünün, başta sitokrom c olmak üzere apoptozun tetiklenmesinde önemli rol üstlenen çeşitli proteinlerin membranlar arası alandan sitoplazmaya salınmasında doğrudan etkili olduğu düşünülmektedir. Grup I üyelerinin ise grup II üyelerine bağlanarak sitokrom c salınmasını engelledikleri ortaya konulmuştur. Bim ve tBid gibi grup III üyelerinin Bax ve Bak proteinlerinin göçüne neden olan konformasyon değişimini doğrudan tetikledikleri, PUMA, Bmf ve Bad gibi diğer grup III üyelerinin ise grup I üyelerini etkisizleştirerek Bax ve Bak proteinlerinin etki göstermelerini sağladığı düşünülmektedir (23).

Bax proteini apoptotik olmayan hücrelerde sitoplazmada ya da mitokondri yüzeyine zayıf bağlı halde bulunmaktadır ancak apoptoz tetiklendiğinde Bax mitokondri dış membranına transloke olmaktadır (49). Mitokondri membranına geçiş Bax'ın konformasyonunda değişime ve oligomerizasyonuna neden olmaktadır (50).

Bak proteini ise normalde mitokondri dış membranında bulunurken apoptoz sırasında konformasyonel bir değişim geçirir ve membranın iç taraflarına göçmektedir (51). Bax ve/veya Bak proteinlerinin mitokondri dış membranında sitokrom c salınmasını sağlayacak porlar oluşturdukları düşünülmektedir. Buna karşın bu porun yapısı ve por oluşumunun ayrıntıları henüz aydınlatılmış değildir (52).

Grup III

Bax ve Bak proteinlerinin mitokondriye geçişi ve mitokondri membranında por oluşturmaları grup III proteinleri tarafından sağlanmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar grup III üyesi proteinlerin etkilerini iki temel mekanizma üzerinden gösterdiklerini ortaya koymaktadır (53). Bim ya da tBid gibi grup III üyeleri Bax ile doğrudan etkileşerek proteinin membrana göçünü sağlamaktadırlar. Bid proteinin ekstrensek yolak başlatıcısı kaspaz-8 tarafından kesilmesiyle tBid meydana gelir ve apoptozun intrinsek-ekstrensek yolları arasındaki ilişkinin ortaya konulması açısından Bid proteini önemlidir (54). PUMA, Bmf ve Bad gibi diğer grup III üyeleri ise anti-apoptotik grup I üyelerine bağlanıp onları etkisizleştirerek dolaylı yoldan apoptozun gerçekleşmesini sağlamaktadırlar (53).

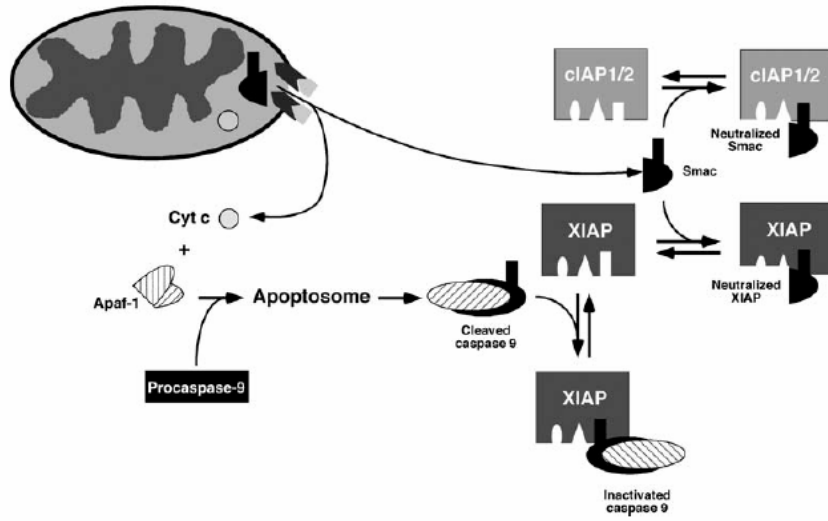
Grup I

Yıllar boyunca grup I proteinlerinin anti-apoptotik etkilerini açıklamaya yönelik pek çok mekanizma teorisi öne sürülmüştür. Bu konuda yapılan ilk çalışmalar grup I proteinlerinin Bax ve Bak proteinlerine bağlanarak bu proteinleri etkisizleştirdiklerini ve böylece sitokrom c salınmasını engellediklerini öne sürmüştür (Şekil 9) (55). Ancak Bax ve Bak proteinlere bağlanabilme özelliğini yitiren Bcl-x_L mutantının apoptozu inhibe edebilmesi bu teoriye gölge düşürmüştür (56). Bir diğer teori, Bcl-2 proteininin hücrelerdeki antioksidan kapasiteyi artırarak apoptozu engellediğini öne sürmektedir (57). Buna karşın reaktif oksijen türevlerinin kaspaz-3 aktivitesi sonucu arttığının belirlenmesi oksidatif stresin sitokrom c salınmasından sonra meydana gelmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar Bcl-2 proteininin antioksidan özelliğinin anti-apoptotik mekanizmada önemsiz olabileceğini ortaya koymaktadır (58).

Üçüncü teori Bcl-2 proteininin endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınmasını inhibe ederek apoptozu engellemesine dayanmaktadır (59). Bcl-2 tarafından inhibe edilen tüm apoptotik tetiklemelerde kalsiyum salınmasının söz konusu olmadığını belirlenmesi bu mekanizmanın da Bcl-2 proteininin anti-apoptotik fonksiyonunun açıklanması açısından tek başına yetersiz kalmasına neden olmuştur. Son olarak grup I üyelerinin grup III üyeleri ile etkileşerek sitokrom c salınmasını ve dolayısıyla da apoptozu engelledikleri hipotezi öne sürülmüştür. Yapılan çalışmalar grup I üyelerinin BH3 bölgesi üzerinden grup III üyelerine bağlanabildiklerini ortaya koymaktadır. Bunun grup I üyelerinin anti-apoptotik özelliklerini ne derece açıkladığı ise tartışma konusudur (60). Bu farklı teorilerin her birinin kısmen doğru olduğu söylenebilir fakat grup I proteinlerinin anti-apoptotik fonksiyonlarını tam olarak açıklayan bir model mevcut değildir.

2.2.3.2. İntrensek Yolakta Rol Alan Diğer Moleküller

Bcl-2 ailesine ait proteinler apoptozun erken sürecini regüle ederken; geç süreç apoptoz, apoptoz inhibitörleri (*inhibitor of apoptosis-IAP*) adı verilen bir protein ailesi tarafından regüle edilir (Şekil 10). Bu aileye ait olan XIAP hücrel IAP1/2, ve ML-IAP, proteinlerinin apoptoz regülasyonu ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (61). Özellikle XIAP proteininin kaspaz inhibisyon mekanizması üzerine çok çalışılma yapılmış ve XIAP'nin prokaspaz-9 proteinine bağlanarak aktifleşmesi için gerekli olan dimerizasyonu engellediği öne sürülmektedir (Şekil 10) (62, 63).



Şekil 10. Apoptozda yer alan diğer moleküller. IAP anti-apoptotik proteinleri (cIAP 1/2, XIAP) kaspazları inhibe ederek apoptozu geç süreçte inhibe ederler. Smac/DIABLO ve HtrA2 gibi pro-apoptotik proteinleri ise IAP proteinlerini inhibe ederek aktivite göstermelerini engellerler (23).

Kaspaz-9 dışında XIAP; kaspaz-3 ve kaspaz-7 proteinlerinin aktif merkezlerine bağlanarak bu proteinlerin proteaz aktivitesi göstermelerini engellemektedir (64). Bu bulgular XIAP proteininin intrinsek yolağı farklı basamaklardan inhibe edebildiğini göstermektedir. XIAP ekspresyonunun ise sağ kalım ile ilişkili bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B aktivitesi ile arttığı belirtilmiştir (35).

Apoptoz sırasında mitokondriden sitokrom c dışında pek çok protein sitoplazmaya geçmektedir (65). Bunlardan endonükleaz G proteininin CDA-bağımsız internükleozomal DNA degradasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Smac/DIABLO ve HtrA2/Omi proteinleri de apoptoz sırasında mitokondriden salınmaktadır ve bu proteinlerin XIAP, cIAP1 ve cIAP2 proteinleri ile etkileşerek kaspaz inhibisyonunu engelledikleri ortaya konulmuştur (Şekil 10) (66).

2.2.4. Apoptozun Tetiklenmesi: Ekstresek Yolak

Apoptozun ekstresek yolağı aynı zamanda ölüm reseptörleri (death receptor) yolağı olarak da bilinmektedir ve hücre dışı bir sinyalin plazma membranına bağlı reseptörler aracılığıyla apoptotik aktiviteye dönüşmesi olarak tanımlanmaktadır (18). Ekstresek yolak ilk olarak bazı hastalarda meydana gelen bakteriyel enfeksiyonun tümör gerilemesine neden olduğunun belirlenmesi ile ortaya çıkmıştır (67). Daha sonraları izole tümör nekroz faktörü (TNF) ve lenfotoksin proteinlerinin kültüre tümör hücrelerinin ölümüne neden olduğu ortaya konulmuştur (68, 69). Bu faktörler klonlandıktan sonra yapılarının birbiri ile yüksek homoloji gösterdiği ortaya konulmuştur (70, 71). Otomatize DNA sekanslama teknolojisi sayesinde önceden bilinmeyen pek çok homolog mRNA transkripti tanımlanmış ve sonuçta homolog TNF protein ailesi keşfedilmiştir (72).

TNF ailesi, reseptör proteinlerin hücre dışı bölgelerine bağlanarak etki göstermektedir. TNF ailesinde 19 farklı ligand bulunmaktadır ve bu ligandlar TNF reseptör (TNFr) ailesine ait 29 farklı reseptöre bağlanmaktadır (73). TNF ailesinin her bir üyesi TNFr ailesine ait bir ya da daha fazla reseptöre ve bazı reseptörler de bir ya da daha fazla liganda bağlanabilmektedir. TNFr ailesinin apoptozu tetikleyebilen alt sınıfına ait proteinler ölüm bölgesi (*Death Domain-DD*) adı verilen oldukça korunmuş 80 amino asitlik bir sekansı içermektedirler ve bu bölgeyi içeren reseptörlere ölüm reseptörleri adı verilmektedir. Apoptozun ekstresek yolağında önemli rol üstlenen ölüm reseptörleri, TNF'nin bağlandığı (TNF- α , TNFSF2), FasL'ın bağlandığı ve TNFr-apoptoz-tetikleyici ligandın (TNFr-apoptosis-inducing ligand-TRAIL) bağlandığı reseptörlerdir. Diğer dört TNFr üyeleri ise (NGFR, EDAR, DR3 ve DR6) DD içermelerine rağmen apoptoza neden olmazlar (69). Apoptoz tetikleyebilen TNFr üyeleri ekstresek yolak başlatıcı kaspazlarını (kaspaz-8, -10) bağlayarak kaspaz kaskadını tetiklerler. Ligandın ölüm reseptörüne bağlanmasından sonra reseptörün yapısında meydana gelen konformasyonel değişim, ölüm-tetikleyici sinyal kompleksi (*death-inducing signaling complex-DISC*) adı verilen protein kompleksinin oluşmasını sağlar. DISC ilk olarak FasL-Fas apoptoz sinyalinde tanımlanmıştır (74). TRAIL ligandının ölüm reseptörlerine bağlanması da benzer şekilde gerçekleşmektedir. Ligand bağlı Fas reseptörüne ya da TRAIL bağlı ölüm reseptörüne Fas-ilişkili DD (*Fas-associated death domain-FADD*) adı verilen adaptör protein komplementer DD üzerinden bağlanır (75). FADD, DD dışında ölüm-efektör bölgesini de

içermektedir (*death-effector domain-DED*) ve insan genomunda hem DED hem DD içeren tek proteindir. Bağlı FADD başlatıcı kaspazlara (kaspaz-8, -10) komplementer DED bölgesi üzerinden bağlanır (76). DISC kompleksinin oluşumu tamamlandıktan sonra kaspaz-8, -10 oto-proteolitik aktivite ile aktifleşir ve kompleksten ayrılarak sitoplazmaya geçer (77). Aktifleşmiş kaspaz-8 ve -10 cellat kaspazları (kaspaz-3 ve -7) keserek aktifleştirir. Tip I adı verilen bazı hücrelerde bu cellat kaspazların aktivasyonu apoptozun tetiklenebilmesi için yeterlidir (78). Tip II adı verilen diğer bazı hücrelerde ise kaspaz-8 ve -10 apoptozun intrinsek yolağını da aktifleştirerek apoptozu tetikler. Kaspaz-8 ve -10 ekstrinsek ve intrinsek yolakları Bcl-2 ailesinin grup III proteinlerinden Bid proteinini keserek birbirine bağlar. Kesilerek aktifleşen Bid (tBid) mitokondri dışı membranının geçirgenliğini tetikleyerek apoptozun intrinsek yolağını aktifleştirir (bakınız bölüm 2.2.3. Apoptozun Tetiklenmesi: İntrensek Yolak).

TNF ligandının etki mekanizması ise biraz farklıdır. TNF, TNF-R1 reseptörüne bağlanır ve oluşan kompleksin yapısına TNFr ile ilişkili DD proteini (TNFr *associated death domain-TRADD*), reseptör-etkileşim proteini (*reseptor interaction protein-RIP*) ve TNFr ile ilişkili faktör 2 proteini (TNFr *associated factor 2-TRAF2*) katılarak kompleks 1 oluşturulur (79). Kompleks 1 nükleer faktör inhibitör kinaz kompleksini (NF- κ B-I κ B) keserek NF- κ B yolağının aktifleşmesine neden olur. Bu yolak başta FLICE inhibitör proteini (FLIP) ve cIAP1/2 olmak üzere çeşitli anti-apoptotik moleküllerin ekspresyonunda artışa neden olur (80). Mekanizma kompleks 1 reseptörün yapısından ayrılması FADD ve kaspaz-8 ile kompleks 2'yi oluşturması ile devam etmektedir. Ortamda yeterli miktarda FLIP proteini varsa apoptotik süreç engellenebilir, yoksa kompleks 2 kaspaz-8 proteinini aktifleştirerek apoptozu tetikler (81). Sonuç olarak hücrede kompleks 2 tarafından tetiklenecek olan apoptoz, kompleks 1 aktivitesi ile engellenmektedir. Bu denge bozulduğunda ise apoptozun intrinsek yolağı aktifleşmiş olur.

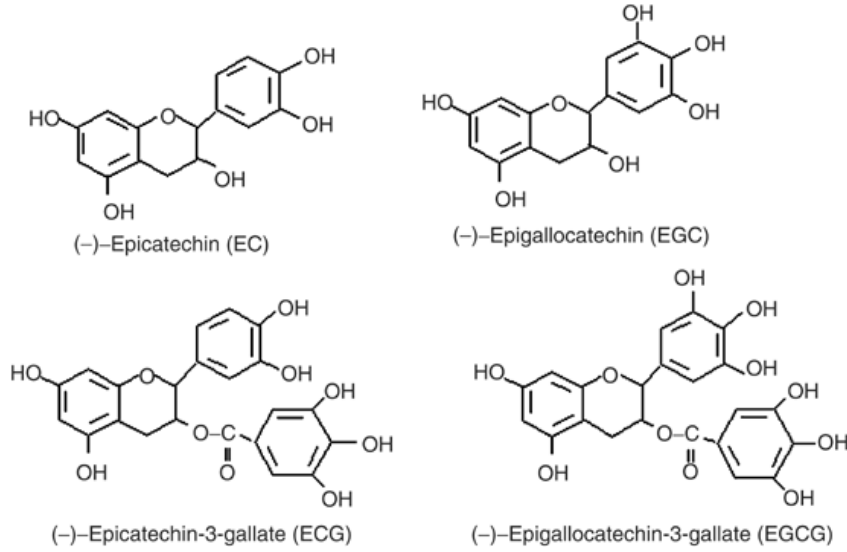
2.2.5. Kanser Terapisinde Apoptozun Önemi

15 yıldır devam eden çalışmalar, kanser tedavisinde kullanılan tüm ilaçların apoptozu tetikleyebildiğini göstermektedir. Apoptotik yolların aktifleştirilmesi kanser terapisinin temel ilkelerinden biridir. Çoğu kanser ilacı neden oldukları DNA hasarı üzerinden etki göstermektedir ve kanser hücrelerinin DNA tamir mekanizmalarındaki yetersizlikten yararlanarak hücreleri apoptotik sürece sürüklemektedir (82). Kanser ilaçlarının etkinliğini arttırabilmek ve olası direnç mekanizmalarının önüne geçebilmek amacıyla antineoplastik ajanların aktifleştirdikleri apoptotik yolların tanımlanması güncel araştırma konusudur. *Doxorubicin*, *etoposide*, *teniposide*, *methotrexate*, *cisplatin* ve *bleomycin* gibi pek çok ajan NF-κB ve AP-1 yolları üzerinden FasL sentezini tetikler (83). Ayrıca DNA hasarına neden olan ajanlar p53 yolu üzerinden Fas reseptör ekspresyonunun artışına neden olmaktadır (84). Her ne kadar bu bulgular ekstrinsek yolu işaret etse de, çeşitli gözlemler FasL ve Fas etkileşiminin ilaç ile tetiklenen apoptozda hücrelerin öldürülebilmesi için şart olmadığını ortaya koymaktadır (85). Bunun ötesinde anti-Fas antikollarının daha önceden bahsedilen ilaçlarla tetiklenen apoptozu engelleyemediği ortaya konmuştur (86).

Sonuç olarak bazı istisnalar dışında (5-fluorouracil, proteozom inhibitörleri, *trans*-restinoik asit ve fenretinide gibi) çoğu anti-kanser ilaç tarafından tetiklenen apoptoz Fas/FasL sisteminden bağımsız olarak işlemektedir (87-90). Bunun yanı sıra, çoğu ilaç ile tetiklenen apoptotik süreçte sitokrom c salınması (57, 91, 82) ve beraberinde gerçekleşen Bax translokasyonu gösterilmiştir (93, 94). Bu çalışmayı destekleyen diğer bir çalışmada ise Bax ve Bak proteinlerinin birlikte delesyonunun, ilaç ile tetiklenen apoptozun inhibisyonuna neden olduğu saptanmıştır (95). Son olarak dominant negatif kaspaz-9 proteininin ve anti-apoptotik Bcl-2 üyelerinin ilaç ile tetiklenen apoptoz sürecini inhibe etmesi intrinsek yolğun önemini vurgulaması açısından önemli verilerdir (96-98).

2.3. YEŞİL ÇAY

Camellia sinensis bitkisinden 5000 yıldır çay ürünleri üretilmektedir (99). Çay bitkisinden üretim tekniklerindeki farklılıklara göre çay; siyah çay (%75), yeşil çay (%23) ve oolong (%2) çayı elde edilmektedir (100). Siyah çay üretiminde yapraklar ezilerek çay polifenollerinin kondenzasyonuna sebep olan enzimatik oksidasyon ve fermentasyon işlemleri gerçekleştirilmektedir. Yeşil çay üretiminde ise taze yapraklar ısıtılarak enzimlerin inaktivasyonu sağlanmakta böylece polifenoller oksidasyondan korunmuş olmaktadır. Oolong çayı ise yeşil yaprakların kısmi-fermantasyonu ile üretilmektedir. Böylece yeşil ve siyah çay karışımı elde edilmektedir. Her biri "*Camellia sinensis*" bitkisinden elde edilse de farklı üretim teknikleri bu çayların farklı bir kimyasal bileşime sahip olmasına neden olmaktadır. Siyah çayın temel antioksidan kapasitesini teafavinler ve tearubiginler gibi kompleks antioksidanlar oluştururken yeşil çay'ın temel oksidan kapasitesini kimyasal olarak daha basit bir yapıya sahip olan katekinler oluşturur (Şekil 11) (101).



Şekil 11. Yeşil çay ekstraktlarından elde edilen katekin türevleri ve kimyasal yapıları (100).

Yeşil çay ekstraktları geleneksel Çin tıbbında kronik hastalıkların tedavisinde ve engellenmesinde yüz yıllardır kullanılmaktadır (102). Yeşil çay ekstraktından elde edilen temel katekin, toplam polifenollerin %50-80'ini oluşturan (-)-epigallokatekin-3-gallatdır (EGCG). Bir bardak demlenmiş yeşil çayda (200mL suda kaynatılan 2g çay yaprağı) 200-300mg EGCG bulunmaktadır (103). Her ne kadar EGCG'nin moleküler hedefleri ve EGCG tarafından regüle edilen hücre içi sinyal yolları tamamen belirlenmemiş olsa da EGCG'nin anti-kanser etkisinde birden fazla mekanizmanın geçerli olduğu öne sürülmektedir. EGCG'nin pek çok kanser türünde hücre büyümesini inhibe ettiği, hücre yaşam döngüsünde duraksamaya yol açtığı ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (104).

Yeşil çayın anti karsinogenik etkileri üç temel başlık altında incelenebilir:

- Antioksidan-prooksidan etki
- Anti-anjiyogenez etki
- Apoptotik-hücre yaşam döngüsünü düzenleyici etki

2.3.1. Yeşil Çayın Antioksidan-Prooksidan Etkisi

Günümüzde kanserin DNA, lipid ya da proteinlerin; UV ışık, kanserojenler ve serbest radikallerin etkisi ile oksidatif stres sonucunda hasar görmesine bağlı olarak gelişebildiği bilimektedir. EGCG'nin oksidatif lipid ve DNA hasarını anlamlı ölçüde düşürdüğü gösterilmiştir (105). Katiyar ve ark. 40µM EGCG'nin UVB'ye maruz kalan insan normal keratinosit hücrelerinde (NHEK) H₂O₂ üretimini %66 ile %80 arasında inhibe edebildiğini ve UVB ile tetiklenen ERK1/2, JNK ve p38 fosforilasyonunu engellediğini göstermişlerdir (106). Ayrıca EGCG'nin lipid peroksidasyonunu engelleyerek oksidatif hasara karşı koruyucu bir molekül olarak davrandığı öne sürülmektedir (107).

EGCG ve diğer polifenol türevi antioksidanlar oksidatif hasarı çeşitli mekanizmalar aracılığı ile engeller. Öncelikle antioksidanlar; reaktif azot ve oksijen türevlerini hücre bileşenlerine zarar vermeden nötralize ederek, buldukları ortamdaki serbest radikalleri temizlerler. Bunun ötesinde bazı metal iyonlarına karşı yüksek afiniteye sahip olduklarından metal şelatlayıcı olarak davranırlar ve serbest radikal oluşumunu tetikleyecek redoks-aktif geçiş metallerini inaktive ederler. Yapılan çalışmalar EGCG'nin; peroksidaz aktiviteleri nedeniyle oksidatif hasara neden olabilecek lipoksigenaz, siklooksigenaz ve ksantin oksidaz enzimlerini inhibe ederek oksidatif hasarı engellediğini öne sürmektedir (101).

Bazı durumlarda antioksidan moleküller metal iyonlarını indirgeyerek hidrojen peroksit oluşumuna neden olabilir (108). Benzer şekilde EGCG'nin, Cu(II) ve Fe(III) komplekslerinin varlığında pro-oksidan olarak davranarak DNA hasarına neden olduğu savunulmaktadır (109). EGCG'nin hücre ölümünü tetikleme özelliğinin, en azından in-vitro koşullarda, bu pro-oksidan aktiviteye bağlı olduğu düşünülmektedir (110). Yang ve ark. EGCG ile H661 akciğer kanseri ve Ras-transforme insan bronşiyal hücrelerinde tetiklenen apoptozun ortama katalaz ilavesi ile kısmen engellendiğini göstermişlerdir. Fakat katalaz ilavesinin büyüme inhibisyonu üzerine her hangi bir etkisi gözlenmemiştir (111). EGCG'nin insan özafagal skuamöz hücre karsinoma hücre hatlarında (KYSE 510 ve 150) ve lösemi hücre hattında (HL-60) DNA hasarına neden olduğu belirtilmektedir (112). Sağlıklı insan lenfositlerinde Kanadzu ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada, EGCG'nin 10µM ve daha düşük konsantrasyonlarda DNA kırıklarını engellediği, 1000µM ve daha yüksek konsantrasyonlarda DNA kırıklarının oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir (113). Bütün bu çalışmalar yeşil çayın hücrelerde prooksidan özellik göstererek hücre ölümünü tetikleyebileceğini göstermektedir. Ancak bu etkisi hücre tipine ve EGCG konsantrasyonuna göre farklılık göstermektedir.

2.3.2. Yeşil Çayın Anti-Anjiogenez Etkisi

Katı tümör gelişimi için çok önemli olan anjiogenez, yeni kan damarlarının oluşturulduğu bir süreçtir. Kanser tedavisinde gelecek vaat eden çalışma alanlarından biri de anjiogenez inhibisyonunun kullanımıdır. İlk oluşumu sırasında tümör ihtiyaç duyduğu besin ve suyu difüzyon ile alabilir fakat 0,5mm çapından büyük bir tümörde çoğalan tümör hücrelerinin oksijen ve besin ile "beslenebilmesi" için kan damarlarına gerek vardır. Anjiogenez, bu süreci aktive ya da inhibe eden proteinlerin görev aldığı kompleks bir seri biyokimyasal tepkimeden meydana gelmektedir. Kanser hücrelerinde bu aktivatör ve inhibitör proteinler arasındaki denge bozulur (114). EGCG'nin son yıllarda araştırılan özelliklerinden biri de anti-anjiogenez özelliğidir. Çeşitli çalışmalar EGCG'nin HNSCC, meme ve kolon kanser hücre hatlarında VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü) ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermektedir. VEGF en önemli anjiogenez aktivatörlerinden biridir ve inhibisyonu çoğunlukla anjiyogenezin engellenmesi anlamına gelmektedir (115-117). Maiti ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada EGCG'nin anjiogenezin aracılı anjiogenezini

engelleyebildiği gösterilmiştir. EGCG gibi anti-anjiogenik ajanların, farklı fazlardaki tümörlerin tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir (118).

Tümör invazyonu ve metastaz; ECM (ekstraselüler matriks) bileşenlerinin proteolitik degradasyonu, hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimlerinin minimize edilmesi ve de hücrenin bazal membrana göçünü kapsayan bir süreçtir. MMP ailesi (matriks metalloproteinazlar) ECM bileşenlerinin parçalanmasında görev alan bir protein ailesidir ve tümör invazyonundan sorumlu oldukları bilinmektedir. EGCG'nin çeşitli MMP'leri inhibe ettiğini gösteren pek çok çalışma mevcuttur (119-124).

2.3.3. Apoptoz ve Hücre Yaşam Döngüsü Regülasyonu

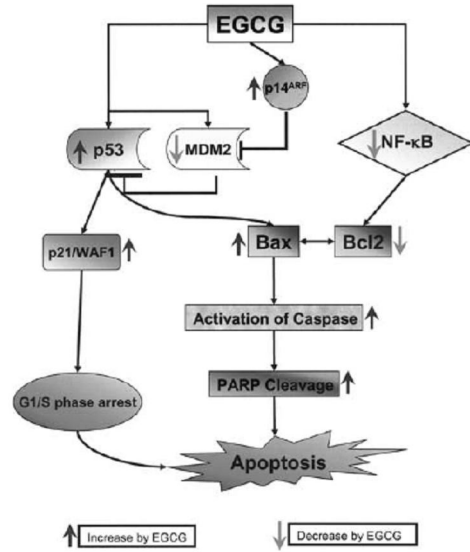
Kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerinden biri de programlı hücre ölümünden kaçabilmeleridir. Apoptoz kompleks genetik olaylar ile regüle edilen bir süreçtir. Bu süreçteki en önemli transkripsiyon faktörlerinden biri de p53'tür. Genomun gardiyanı olarak adlandırılan p53 hücre yaşam döngüsünün regülasyonunda, apoptozun tetiklenmesinde ve DNA tamir mekanizmalarının işleminde kritik öneme sahiptir. p53 proteini DNA hasarını belirleyerek ve hücre yaşam döngüsünde duraksamanın gerçekleşmesini sağlamak ve redoks potansiyel değişikliklerine cevap olarak apoptozu tetiklemektedir. Katı tümörlerin %50'den fazlasında p53 delesyonu ya da nokta mutasyonu mevcuttur (125).

Çay polifenollerinin p53 aktivasyonuna neden olduğu belirtilmektedir (126). EGCG normal hücreleri etkilemeden farklı kanser hücre hatlarında p53 aktivasyonu üzerinden apoptoz tetikleyebilmekte ve hücre yaşam döngüsünde duraksamaya neden olmaktadır (127). Çeşitli çalışmalar sonucunda akciğer, kolon, pankreas, deri ve prostat kanserlerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (128). Prostat kanseri hücre hattında (LNCaP) gerçekleştirilen bir çalışmada, p53 aktivasyonunun p21 ve Bax ekspresyon artışına, NF-κB inhibisyonunun Bcl-2 ailesi proteinlerinde ekspresyon azalışına ve böylece Bax/Bcl-2 oranındaki artışa bağlı olarak apoptozun tetiklendiği ve hücrelerin G0/G1 fazında duraksadığı gösterilmiştir (Şekil 12). p53 aktivasyon mekanizmasında p53'ün kritik serin kalıntılarının fosforilasyonu söz konusudur bu nedenle molekülün yarı-ömrü artmaktadır (129). Hatsak ve ark. LNCaP hücre hattında 20-80µM EGCG ile tetiklenen apoptozun p53-bağımlı olduğunu ve p53-/- mutasyonu olan hücrelerde apoptozun gerçekleşmediğini göstermiştir. Bax ve p21'in siRNA ile susturulması

ile apoptozun önlenebildiği aynı çalışmada gösterilmiştir (130). EGCG ile tetiklenen apoptozda p53 bağımlılığını gösteren başka çalışmalar da mevcuttur (131, 132).

NMR spektroskopisi ile gerçekleştirilen bir çalışmada EGCG'nin anti-apoptotik Bcl-2 ailesinin BH3 bölgesine doğrudan bağlanabildiği gösterilmiştir. Bu bağlanma, EGCG'nin anti-apoptotik Bcl-2 üyelerini inhibe etme mekanizmasının temelini oluşturduğu düşünülmektedir (133).

Islam ve ark.'nın yaptığı çalışmada insan kondrosarkoma (HTB-94) hücre hattında EGCG'nin düşük konsantrasyonlarda dahi (5µM) hücrelerde DNA fragmentasyonu ile belirlenen apoptoz tetiklenmesine ve kaspaz-3 aktivasyonuna sebep olduğunu gösterilmiştir. Aynı çalışmada genel kaspaz inhibitörü (Z-VAD-FMK) ve spesifik kaspaz-3 inhibitörü (DEVD-CHO) kullanılarak apoptozun engellendiği de belirlenmiştir (134). Buna karşın, EGCG ile gerçekleştirilen çalışmaların çoğunda apoptoz EGCG'nin 50µM'dan yüksek konsantrasyonlarında gözlemlenmiştir (128). Qanungo ve ark.'nın yaptıkları çalışmada çeşitli pankreatik kanser hücre hatlarında 100µM EGCG ile 24 saat inkübasyon sonucu apoptoz tetiklendiğinde; mitokondriden sitokrom c salınması, aktif kaspaz-3 ve kaspaz-9 immüno-flouresan mikroskopisi ve western blot yöntemleri ile belirlenmiştir (135). Gupta ve ark.'nın yaptıkları çalışmada da epidermoid karsinoma (A431) hücre hattında EGCG ile apoptoz tetiklendiğinde kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 ekspresyonlarında artış olduğu western blot analizi ile belirlenmiştir. Aynı çalışmada genel kaspaz inhibitörü (zVDAC) veya spesifik kaspaz-3 inhibitörü (Z-VAD-FMK) kullanılarak apoptozun engellendiği gösterilmiştir (136). EGCG'nin Kaspaz-9 aktivasyonunu ve sitokrom c salınmasını sağladığına dair çalışmalar mevcuttur (128). Roy ve ark.'nın 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada (20-60µg/ml) EGCG'nin insan meme kanser hücre hattında (MDA-MB-468) Bcl-2 anti-apoptotik proteininin ekspresyonunda azalmaya sebep olduğu ve



Şekil 12. EGCG'nin p53 ve NF-κB yolları üzerinden apoptoz regülasyonu. EGCG p53 ve NF-κB üzerinden apoptozu ya da hücre döngüsünde duraksamayı tetikleyebilir. (129).

Bax pro-apoptotik proteinin ekspresyonunda da artışa yol açtığı belirlenmiştir (131). Qin ve ark. tarafından 2007’de yapılmış bir çalışmada da benzer şekilde insan mesane kanser hücre hattında (T24) EGCG’nin, Bcl-2 ve Bcl-xL anti-apoptotik protein konsantrasyonlarında azalmaya, Bax ve Bad pro-apoptotik protein konsantrasyonlarında ise artışa neden olduğu gösterilmiştir (137). Bu sonuçlar; EGCG’nin apoptotik etki mekanizmasında intrinsek yolağın temel olduğunu ifade etmektedir. Anti-kanser ilaçlarının çoğunun da aynı yolağı kullandığı düşünüldüğünde bu beklenen bir sonuçtur (bakınız bölüm 2.2.5. Kanser Terapisinde Apoptozun Önemi).

Buna karşın sayıları daha az olmakla beraber EGCG’nin ekstrinsek yolak üzerinden apoptoz tetikleyebildiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Das ve ark.’nın yaptıkları bir çalışmada 50µM EGCG ile malin nöroblastoma hücre hattında (SH-SY5Y) tetiklenen apoptozun mekanizmasında kaspaz-9 ve kaspaz-3’ün yanı sıra kaspaz-8 aktivasyonunun da yer aldığı ve bu enzimlerin inhibitörleri kullanılarak hücre ölümünün engellendiği saptanmıştır (138). İnsan lenfoma hücre hattında (U937) yapılan bir çalışmada ise EGCG’nin FAS reseptörüne bağlanarak kaspaz-8 aktivasyonuna sebep olduğu belirtilmiştir (139).

EGCG’nin apoptotik mekanizması ile ilgili çalışmalar incelendiğinde; etkisinin hücre hattına ve kullanılan katekin konsantrasyonuna göre farklılık gösterdiği görülmektedir. HPV-16 ile ilişkili servikal kanser hücre hattında (CaSki) Ahn ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada 24 saatte 35µM EGCG konsantrasyonunda hücre yaşam döngüsünün G1 fazında duraksaması belirlenmiştir. Apoptoz ise aynı sürede ancak 100µM konsantrasyonda gözlemlenmiştir (140). MCF7 meme kanseri hücre hattında yapılan bir çalışmada 24 saat 30µM EGCG ile muamele edilen hücrelerde akış sitometrik DNA analizi ile G0/G1 duraksaması gösterilmiştir (141). Hsuuw ve ark.’nın yaptıkları bir çalışmada ise, insan meme kanser hücre hattında (MCF-7) 50µM EGCG konsantrasyonunda apoptozun, 100µM’in üzerinde konsantrasyonlarda ise nekrozun tetiklendiği gösterilmiştir (142). Bu çalışmalar EGCG’nin anti-kanser mekanizmasında apoptoz kadar hücre yaşam döngüsünde duraksamanın ve nekrozun da etkin olabileceğini göstermektedir. Bunun dışında, EGCG’nin lipid sentezinden sorumlu olan yağ asidi sentaz enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu enzim normal hücrelerde düşük düzeylerde eksprese edilirken pek çok kanser tipinde (prostat, meme, yumurtalık, endometriyum, akciğer ve kolon) bu enzimin ekspresyonu artmaktadır.

EGCG hem sağlıklı hücrelerde hem de kanser hücrelerinde enzim inhibisyonuna neden olmaktadır ancak sadece kanser hücrelerinde apoptozu tetiklemektedir. Bu durumun, malonil-CoA gibi toksik özellik gösteren lipid öncüllerinin birikmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (143). Bütün çalışmalar göz önüne alındığında EGCG'nin anti-kanser mekanizması halen tam olarak aydınlatılamamıştır ve dolayısıyla güncel araştırma konusudur.

2.3.4. Kolon Kanserinde Yeşil Çayın Etkinliği

Doğu ülkelerinde görülen düşük kolon kanser insidansı ile beslenme alışkanlıklarının, özellikle de yeşil çay tüketiminin ilişkili olduğu düşünülmektedir (16). Japonyada 8552 olgu ile gerçekleştirilen prospektif bir çalışmada yeşil çay tüketiminin akciğer, kolon ve karaciğer kanserine karşı koruyucu etkisi olduğu savunulmaktadır (144). Çin toplumunda yapılan bir çalışmada ise yeşil çay tüketenlerde kolon kanserinin ortaya çıkma riskinin tüketmeyenlere oranla daha düşük olduğu gösterilmiştir (145). Bu çalışma, Sun ve arkadaşlarının 2005 yılına kadar yapılan 21 çalışmanın verileri ile gerçekleştirdikleri meta analiz sonuçları ile desteklenmektedir (146).

EGCG'nin kolon kanseri üzerine etkisini araştıran in-vitro çalışmalarda çoğunlukla kolon adenokarsinoma hücre hatları kullanılmıştır ancak kolorektal karsinoma hücre hatlarındaki etkisini inceleyen çalışma sayısı oldukça kısıtlı sayıdadır. Jung ve ark.'nın çeşitli kolon kanser hücre hatlarına etkisini araştırdıkları çalışmada EGCG'nin HCT-116 hücrelerinde sadece hücre canlılığı üzerine olan etkisi incelenmiştir (147). Useato ve ark.'nın çalışmasında ise benzer şekilde EGCG'nin ve diğer yeşil çay polifenollerinin (EGC ve EC) büyüme inhibisyonu üzerinde etkisi incelenmiştir (148). EGCG'nin apoptotik etki mekanizması kanser hücre hatlarına göre farklılık göstermektedir. Ancak HCT-116 kolorektal karsinoma hücre hattında EGCG'nin apoptotik etkisini inceleyen tek çalışma 2008 yılında Inaba ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, EGCG'nin hücre canlılığı, apoptoz ve hücre yaşam döngüsü üzerine etkisi araştırılmıştır (149). Çalışmanın sonuçları EGCG'nin hücrelerde DNA fragmantasyonuna neden olduğunu göstermesine karşın, apoptotik mekanizmasının belirlenmesine yönelik bir veri sağlamamaktadır. Bu nedenle EGCG'nin HCT-116 kolorektal karsinoma hücre hatlarındaki apoptotik etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar halen güncel araştırma konuları arasındadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmamızda kullanılan cihazlar, sarf malzeme ve kitler ilgili tablolarda listelenmiştir (Tablo 1, Tablo 2, Tablo 3).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Adı/Modeli	Çalışmada Kullanım Amacı
Laminer Flow (Holten Lamin Air Biosafe 1.2)	Hücre kültürü çalışmalarında steril ortamın sağlanması
CO ₂ inkübatör (Nuair Us Autoflow NU-4750)	Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin inkübasyonu
Ters-faz Mikroskop (Nikon Eclipse TS-100)	Hücre kültürü çalışmalarında hücre sayımı, hücrelerin izlenmesi
Santrifüj (Eppendorf 5810 R)	Çöktürmenin gerekli olduğu tüm denemelerde
Akış Sitometre (Beckman Coulter –Epics XL.MCL)	Hücre yaşam döngüsü regülasyonu ve Annexin-V apoptoz/nekroz analizleri
Derin Dondurucu -80°C (Thermo Forma Model 705)	Hücrelerin kısa süre saklanması
Derin Dondurucu -20°C (Vestel RT 455)	Örneklerin ve kimyasalların saklanması
Azot tankı (MVE Cryogenics cryosystem 4000)	Hücrelerin uzun süre saklanması
Plak okuyucu (BioTek ELX 800)	96 kuyulu plakların absorbanslarının okunması
Buz makinası (Scotsman AF-100)	Deneylerde soğuk zincirin sağlanması için gereken buzun elde edilmesi
Otoklav (Hirayama HICLAVE HV-50)	Hücre kültüründe gerekli tüm malzemenin sterilizasyonu
Etüv (Thermo Heraeus)	Gereken tüm malzemelerin istenen sıcaklığa getirilmesi

Tablo 2. Çalışmada kullanılan sarf malzeme ve kullanım amaçları

Adı	Katalog Bilgileri	Çalışmada Kullanım Amacı
HCT-116 hücre hattı	Prof. Dr. Henning Walczak tarafından hediye edilmiştir (German Cancer Research Centre-Heidelberg-Almanya)	Tüm denemelerde kullanılan kolon karsinoma hücre hattı
CCD18co hücre hattı	American Type Culture Collection, ATCC	Çeşitli denemelerde kullanılan normal kolon hücre hattı
EGCG	Sigma E4243-50mg	Hücrelerde etkisi araştırılan ajan
Etoposide	Ebewe 20mg/mL	Pozitif kontrol, hücrelerde apoptoz tetikleyici ajan
McCoy's 5A ortam	Biochrom F1015	HCT-116 hücrelerinin büyüme ortamı
DMEM ortam	Biochrom F 0475	CCD18co hücrelerinin büyüme ortamı
Penisilin/Streptomisin	Biochrom A2212	Hücrelerinin büyüme ortamı bileşeni
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom S0113	Hücrelerinin büyüme ortamı bileşeni
L-Glutamin	Biochrom K0282	Hücrelerinin büyüme ortamı bileşeni
PBS (phosphate buffered saline)	Biochrom L1815	Hücrelerin yıkanması
Tripan mavisi	Biochrome L6323	Hücre sayımında, canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilebilmesi
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma D2650	Hücrelerinin dondurma ortamının hazırlanması
Tripsin/EDTA çözeltisi	Biochrom L2143	Pasaj ve ekimlerde hücrelerinin kaldırılması
HEPES	Sigma H7006	Akış sitometri analizlerinde kullanılan tampon
Formaldehit	Sigma F8775	Akış sitometrik hücre yaşam döngüsü regülasyon analizinde fiksasyon çözelti bileşeni
Sodyum klorür	Sigma S9625	Akış sitometrik analizlerde tampon bileşeni
Kalsiyum klorür	Sigma C8106	Akış sitometrik analizlerde tampon bileşeni
Potasyum klorür	Sigma P9541	Akış sitometrik analizlerde tampon bileşeni
Propidyum iyodür (PI)	Alexis 400-043-M001	Akış sitometrik analizlerde flüoresan DNA boyası
Annexin V-FITC	BD Pharmingen 556419	Akış sitometrik Annexin-V apoptoz/nekroz analizinde flüoresan fosfatidil serin boyası
RNAz	Sigma R4875	Akış sitometrik hücre yaşam döngüsü regülasyon analizinde RNA bileşenlerinin parçalanması
Mutlak etanol		Akış sitometrik hücre yaşam döngüsü regülasyon analizi bileşeni

Tablo 3. Çalışmada kullanılan ticari kitler ve kullanım amaçları

Adı	Katalog Bilgileri	Çalışmada Kullanım Amacı
MTT Canlılık Testi	Roche 11 465 007 001	Hücre canlılığının değerlendirilmesi
Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	Roche 11 774 425 001	Hücrelerde apoptozun değerlendirilmesi

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmaları denemelerde kullanılmak üzere HCT-116 ve CCD18co hücrelerinin çoğaltılmasını, pasajlanmasını, dondurulmasını, çözülmesini ve sayılarak istenen flask ya da plaklara ekilmesini kapsamaktadır.

3.2.1.1 Kullanılan Cihazlar

Laminer Flow	(Holten Lamin Air Biosafe 1.2)
CO ₂ inkübatör	(Nuair Us Autoflow NU-4750)
Ters-faz Mikroskop	(Nikon Eclipse TS-100)
Santrifüj	(Eppendorf 5810 R)
Derin Dondurucu -80°C	(Thermo Forma Model 705)
Derin Dondurucu -20°C	(Vestel RT 455)
Azot tankı	(MVE Cryogenics cryosystem 4000)
Etüv	(Thermo Heraeus)

3.2.1.2 Kullanılan Malzemeler

HCT-116 hücre hattı	(German Cancer Research Centre, Heidelberg-Almanya)
CCD18co hücre hattı	(ATCC)
McCoy's 5A	(Biochrom)
DMEM	(Biochrom)
Penisilin/Streptomisin	(Biochrom)
Fetal Bovine Serum	(Biochrom)
L-Glutamin	(Biochrom)
PBS	(Biochrom)
Tripan mavisi	(Biochrom)
Dimetil sülfoksit	(Sigma)
Tripsin/EDTA çözeltisi	(Biochrom)

3.2.1.3. Hücre Hatları

3.2.1.3.1. HCT-116 kolon karsinoma hücre hattı

Kaynağı : Yetişkin erkekte elde edilen kolon karsinoma primer kültürü.

Özellikleri : Hücreler 13. kodonlarında RAS mutasyonu taşımaktadır ve bağışıklık sistemi baskılanmış farelerde tümörojeniktir. Hücreler nemli atmosferde %5 CO₂ basıncı altında 37°C de inkübe edilir. Kültür ortamında tek tabakalı, adheran, epitel benzeri küçük hücreler şeklinde çoğalırlar ve 24 saatte dublike olurlar. Hücrelerde büyüme ortamı olarak %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin içeren McCoy's 5A ortamı kullanılmıştır.

3.2.1.3.2. CCD18co normal kolon hücre hattı

Kaynağı : 2,5 aylık infandan elde edilen kolon primer kültürü.

Özellikleri : Hücreler nemli atmosferde %5 CO₂ basıncı altında 37°Cde inkübe edilirler. Kültür ortamında tek tabakalı, adheran, fibroblast benzeri hücreler şeklinde çoğalırlar. Hücrelerde büyüme ortamı olarak %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM ortamı kullanılmıştır.

3.2.1.4. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması

İlk kez çözülen hücreler 25cm² flasklara 5mL büyüme ortamı içerisinde ekilmiştir. Hücreler konfluent olduktan sonra 75cm² flasklara 13mL büyüme ortamı içerisinde pasajlanmış ve denemeler için bu flasklarda çoğaltılmıştır. Tüm deneyler 6 ya da 96 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin büyüme ortamı üç dört günde bir yeni büyüme ortamı ile değiştirilmiştir. Hücreler konfluent olduklarında 1:4 ya da 1:5 oranında seyreltilerek pasajlanmıştır. Hücreler 4-5 pasajda bir dondurularak (%40 FBS, %10 DMSO, %50 büyüme ortamı) 3-4 hafta içerisinde çözülecekse -80°C'de ya da uzun süre saklanacaksa sıvı nitrojende saklanmıştır. Hücreler EGCG ya da etoposid ile muamele edilirken, hücrelerin yaşam döngüsünün aynı fazına geçmelerini sağlamak amacı ile FBS düzeyi %1e düşürülmüştür.

Deney Basamakları:

1. Flaskın içerisindeki ortam atılır.
2. Flask steril PBS ile yıkanır.
3. Flasklara; 25cm² flask için 1-2mL, 75cm² flask için 3-5mL önceden 37°Cye ısıtılmış tripsin/EDTA ilave edilir.
4. Flask inkübatörde 4-5 dakika bekletilir.
5. Flask yüzeyinden ayrılan hücreler 15 mLlik tüplere toplanır.
6. Tüplere 5'er mL büyüme ortamı ilave edilir.
7. Tüpler 1300 rpm de 5 dakika santrifüj edilir.
8. Süpernatant atılır.
9. Pellet istenen miktarda, önceden 37°Cye getirilmiş büyüme ortamı içerisinde süspanse edilir.
10. Hücre süspanسیونu sayılabilir, seyreltilerek flasklara ya da plaklara pasajlanabilir veya dondurulabilir.
11. Dondurulacak hücre süspanسیونuna 1:1 oranında soğuk %80 FBS %20 DMSO ilave edilir. Bu şekilde tüpteki son konsantrasyonlar: %40 FBS, %10 DMSO, %50 büyüme ortamı olmaktadır. Elde edilen süspanسیون cryo tüplere paylaşılırak -20°C'ye kaldırılır.
12. -20°Cde bir saat bekletildikten sonra cryo tüpler 3-4 hafta içerisinde çözülecekse -80°Cye, uzun süre saklanacaksa sıvı nitrojene kaldırılır.

3.2.1.5. Hücrelerin Çözülmesi

Sıvı nitrojende bekletilen hücreler gerekli olduğunda çözümlenerek kullanılır.

Deney basamakları:

1. Sıvı nitrojen ya da -80°Cden alınan cryo tüpler hızla 37°C'de çözülür.
2. Tüp içerisindeki süspanسیون 15 mLlik tüplere aktarılır ve üzerine 10mL önceden 37°C'ye getirilmiş büyüme ortamı ilave edilir.
3. Tüp 1300 rpm de 5 dakika santrifüj edilir.
4. Süpernatant atılır.
5. Pellet 6 mL büyüme ortamında süspanse edilir ve 2 adet 25cm² flaska paylaşılır.

3.2.1.6. Hücrelerin Sayılması

Yapılacak tüm denemelerde belirli sayıda hücrenin flasklara ekilmesi için hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Yöntemin prensibi, membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin Tripan mavisi boyasını hücre içine almaları ve ölü hücre olarak değerlendirilmeleri veya membran bütünlüğünü koruyan hücrelerin ise membrandan boya geçişine izin vermemelerine dayanmaktadır (150).

Deney Basamakları:

Hücrelerin pasajlanması ve dondurulması (3.2.4.1. bölüm) 10. basamaktan itibaren;

1. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 20µL alınır ve 96 kuyulu plak kuyucuklarından birine aktarılır.
2. Hücre süspansiyonunun üzerine 30µL büyüme ortamı ilave edilir.
3. Bir mikrosantrifüj tüpüne 1:1 tripan mavisi PBS karışımı hazırlanır.
4. Hazırlanan karışımdan 50µL hücre süspansiyonunun üzerine ilave edilir. Bu noktada hücre süspansiyonu 5 kat seyrelmiş olur.
5. Neubauer lamı ve lamel arasındaki boşluğa, hazırlanan boyalı hücre süspansiyonundan 10µL eklenir.
6. Ters-faz ışık mikroskopunda 10x büyütmede sayım yapılır. Mavi boyayı alan hücreler ölü, boyayı dışlayan hücreler canlı olarak değerlendirilerek Neubauer lamının herbiri 16 küçük kare içeren 4 farklı alanı sayılarak ortalaması alınır.

3.2.1.6.1 Hesaplama

$$\text{Hücre sayısı/ml} = \text{Ortalama sayım değeri} \times \text{seyreltme faktörü} \times 10^4$$

formülünden bir hücre süspansiyonunun bir mililitresindeki hücre sayısı belirlenir. Hücre süspansiyonu seyreltilerek istenen konsantrasyonda hücre süspansiyonu elde edilerek ekim yapılır.

3.2.1.7. Etoposit ve EGCG Solüsyonlarının Hazırlanması

Kemoterapide kullanılan ve topoizomeraz II inhibitörü olan etoposit (Ebewe), denemelerde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 20mg/mL konsantrasyondaki stok etoposit (33,98mM) deneme ortamı ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 20, 50, 100, 500 ve 1000µM) etoposit içeren ortamlar hazırlanmıştır.

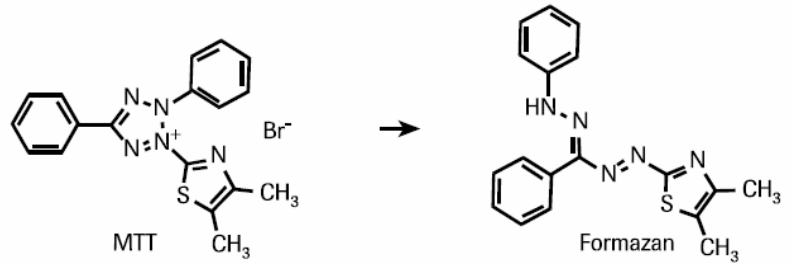
Yeşil çay polifenollerinden EGCG (Sigma) çalışmalarımızda etkisi araştırılan maddedir. 4,6mg EGCG 10mL steril saf su içerisinde çözülür. Elde edilen 1000µM (0,46mg/mL) konsantrasyonundaki çözelti deneme ortamı ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 50, 100µM) EGCG içeren ortamlar hazırlanmıştır.

3.2.2. MTT Canlılık Testi (Roche)

Farklı konsantrasyonlardaki EGCG'nin ve pozitif kontrol olarak kullanılan etopositin farklı inkübasyon sürelerinde HCT-116 ve CCD18co hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.2.2.1. Yöntemin Prensibi

Yöntem metabolik aktif hücrelerde mitokondriyel süksinat dehidrogenaz aktivitesi sonucunda sarı renkli MTT tuzunun (3-[4,5-dimethylthiazol-



2-yl]-2,5-diphenyl

tetrazolium bromid) kolorimetrik olarak tayin edilebilen, mor renkli formazan kristallerine

dönüştürülmesi prensibine dayanır (Şekil 13.). Her bir örnekten elde edilen absorbans değerleri, örnekteki canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır (151).

Şekil 13. MTT tuzunun süksinat dehidrogenaz aktivitesi ile formazan kristaline dönüşüm reaksiyonu. (Roche)

3.2.2.2. Kit İçeriği

- ❖ 5x5mL MTT işaretleme çözeltisi
- ❖ 3x90mL çözücü çözeltisi (%10 SDS, 0,01M HCl içerisinde)

3.2.2.3. Kullanılan Cihazlar

Hücre kültürü cihazlarına ek olarak,

❖ Plak okuyucu (BioTek ELX 800).

3.2.2.4. Deney Basamakları

1. 75cm² flasklarda çoğaltılan HCT-116 ve CCD18co hücreleri tripsinize edilir ve hücreler Neubauer lamında sayılır .
2. 5x10³ HCT-116 hücresi 100µL süspansiyon içinde 96 kuyulu plaklara ekilir. Her bir parametre için üç ekim yapılır.
3. 10x10³ CCD18co hücresi 100µL süspansiyon içinde 96 kuyulu plaklara ekilir. Her bir parametre için üç ekim yapılır.
4. Plaklar HCT-116 hücrelerinin yapışması ve hücre sayısının dublikasyonu için 24 saat, CCD18co hücrelerinin yapışması için ise gece boyu inkübatörde bekletilir.
5. Kuyucuklardaki ortamlar atılır ve yerine 0, 10, 20, 50, 100µM EGCG ya da Etoposid içeren deney ortamları ilave edilir. 0µM EGCG içeren kuyucuklar kontrol, hücre içermeyen sadece deney ortamı içeren kuyucuklar kör olarak değerlendirilmektedir.
6. Plaklar 24, 48 ve 72 saat inkübatörde bekletilir.
7. Plak kuyucuklarına 10ar µL MTT işaretleme çözeltisi ilave edilir.
8. Plaklar inkübatörde 4 saat bekletilir.
9. Plak kuyucuklarına 100er µL çözücü çözeltisi ilave edilir.
10. Plaklar gece boyu inkübatörde bekletilir.
11. Plak kuyucuklarının absorbans değerleri plak okuyucuda 550nm dalga boyuna karşı okunur.
12. 0µL EGCG içeren kuyucuklardan (kontrol hücreleri) okunan absorbans değeri %100 kabul edilir ve diğer örneklerin absorbanslarından rölatif canlılık değerleri hesaplanır.

3.2.2.5. Hesaplama ve İstatistiksel Analiz

Tüm absorbans değerlerinden köre ait absorbans değerlerinin ortalaması çıkartılarak asıl absorbans değerleri elde edilir. Her örnek için üç ekim yapılmıştır. Elde edilen üçlü asıl absorbans değerlerinin ortalaması alınarak ortalama absorbans değerleri (ABS_{ortalama}) elde edilir. Örneklerin ortalama absorbans değerleri, kontrol hücrelerinden elde edilen ortalama absorbans değerine bölünür ve böylece kontrol hücrelerine karşı rölatif absorbans oranı elde

edilir. Bu oran 100 ile çarpılarak her bir örnek için yüzde canlılık değeri hesaplanır. Sonuçlar ortalama değer +/- standart sapma olarak ifade edilmektedir.

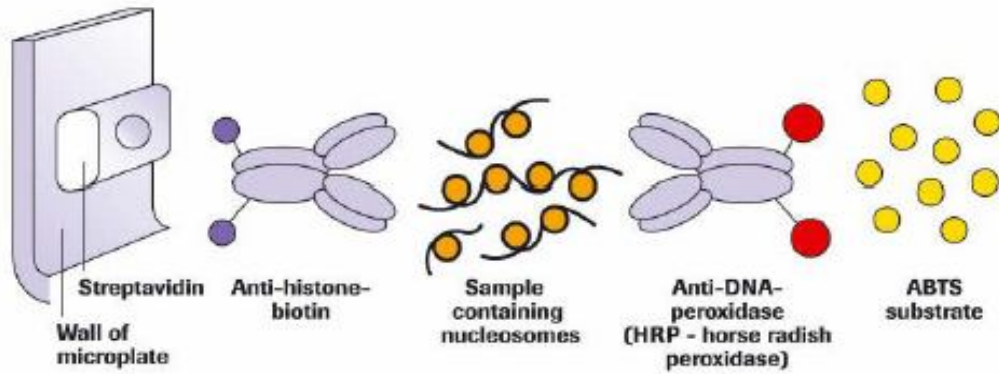
$$\text{Yüzde Canlılık} = \left[\frac{\text{Örnek ABS}_{\text{ortalama}}}{\text{Kontrol ABS}_{\text{ortalama}}} \right] \times 100$$

3.2.3. Cell Death Detection ELISA^{PLUS} Kolorimetrik Apoptoz Tayini (Roche)

Farklı konsantrasyonlardaki EGCG'nin HCT-116 hücrelerinde neden olduğu hücre ölüm tipinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.2.3.1. Yöntemin Prensipleri

CDD (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}) kiti hücrelerin sitoplazmik lizatlarındaki mono- ve oligo-nükleozom içeriklerini karşılaştırarak örnekler arası oransal apoptoz değerlendirmesine olanak sağlar. Kitin içeriğindeki Anti-Histon-Biyotin antikoru histon proteinleri üzerinden, apoptoz sırasında oluşan, sitoplazmadaki fragmente DNA parçalarına ve streptavidin kaplı plağa bağlanır. Böylece mono- ve oligo-nükleozomlar plak yüzeyine bağlanmış olur. Anti-DNA-Peroksidaz antikoru ise plağa bağlanan fragmente DNA'ya bağlanır. ABST (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt) substratı aracılığıyla Anti-DNA-Peroksidaz aktivitesi kolorimetrik olarak tayin edilebilir böylece her bir örnekteki mono-, oligo-nükleozom miktarı belirlenmiş olur (152) (Şekil 14).



Şekil 14. CDD yönteminin prensibinin şematik gösterimi. Anti-histon biyotin, streptavidin kaplı plak ile hücre lizatındaki fragmente DNA parçalarının histon proteinleri arasında bir köprü oluşturarak mono-, oligo-nükleozomları plak yüzeyine bağlar. Anti-DNA-peroksidaz ise yüzeye sabitlenmiş DNA'ya bağlanır. ABST substratı ise peroksidaz aktivitesinin kolorimetrik olarak tayinine olanak sağlar (Roche).

3.2.3.2. Kit içeriği

- ❖ Anti-Histon-Biyotin (immünoreaktif bileşeni): liyofilizat 450µL bidistile su içerisinde 10 dakika boyunca karıştırılarak çözülür.
- ❖ Anti-DNA-POD (immünoreaktif bileşeni): liyofilizat 450µL bidistile su içerisinde 10 dakika boyunca karıştırılarak çözülür.
- ❖ Pozitif kontrol: liyofilizat 450µL bidistile su içerisinde 10 dakika boyunca karıştırılarak çözülür.
- ❖ ABTS tabletleri (substrat): Örnek sayısına göre 1, 2 ya da 3 tablet; 5, 10 ya da 15 mL substrat tamponu içerisinde çözülür.
- ❖ ABTS stop solüsyonu (kolorimetrik tepkimenin durdurulması): solüsyon berrak hale gelene kadar karıştırılarak 37C'ye kadar ısıtılır.
- ❖ İnkübasyon tamponu (antikor bağlanmalarının gerçekleştiği ortam): kullanıma hazır.
- ❖ Lizis tamponu (sitoplazmik hücre lizatının eldesi): kullanıma hazır
- ❖ Substrat tamponu (substrat çözgeni): kullanıma hazır.

3.2.3.3. Kullanılan Cihazlar

- ❖ Hücre kültürü cihazları
- ❖ Plak okuyucu (BioTek ELX 800).

3.2.3.4. Ön İşlemler

İmmünoreaktifin hazırlanması: İmmünoreaktif, 1:20 hacimde Anti-DNA-POD, 1:20 hacminde Anti-Histon-Biyotin ve 18:20 hacminde inkübasyon tamponunun karıştırılması ile elde edilir. Elde edilen solüsyon saklanmaz denemeden önce hazırlanır.

3.2.3.5. Deney Basamakları

1. 75cm² flasklarda çoğaltılan hücreler tripsinize edilir ve hücreler Neubauer lamında sayılır.
2. Her bir kuyucuğa 5x10³ /100µL hücre ekilir. Her bir parametre için üç ekim yapılır.
3. Hücrelerin yapışması ve hücre sayısının dublikasyonu için plak 24 saat boyunca inkübatörde bekletilir.
4. Kuyucuklardaki ortamlar atılır ve yerine 0, 10, 20, 50, 100µM EGCG ve 100µM Etoposit içeren deney ortamları ilave edilir.

5. Plak inkübatörde 24 saat bekletilir.
6. Plak 200gde 10 dakika santrifüj edilir.
7. Süpernatant dikkatlice atılır.
8. Pelletler 200er μL lizis tamponunda süpanse edilir.
9. Lizisin gerçekleşebilmesi için plak oda sıcaklığında 30 dakika bekletilir.
10. Plak 200g de 10 dakika santrifüj edilir.
11. Sitoplazmik fraksiyonu içeren süpernatandan 20 μL dikkatlice streptavidin kaplı plağa aktarılır. Bu aşamada plak sarsılmamalıdır ve örnek derhal analiz edilmelidir (örneğin saklanması absorban değerlerinin düşmesine neden olmaktadır).
12. 20şer μL pozitif kontrol (kit içeriğinde mevcuttur), negatif kontrol ($0\mu\text{M}$ EGCG içeren kuyucuklardan elde edilmiş hücre lizatlarının süpernatantları) ve kör (inkübasyon tamponu) streptavidin kaplı plağa aktarılır. Düşük hacim nedeniyle örnekler kuyucuğun tam ortasına pipetlenmelidir.
13. Her bir kuyucuğa 80'er μL immünoreaktif ilave edilir.
14. Plak yapışkan koruyucu ile kaplanır.
15. Plak oda sıcaklığında 300rpmde plak karıştırıcıda 2 saat inkübe edilir.
16. Kuyucukların içerisindeki solüsyon dikkatlice çekilip atılır.
17. Kuyucuklar 250-300 μL inkübasyon tamponu ile üçer kez yıkanır.
18. Kuyucukların içerisindeki solüsyon dikkatlice çekilip atılır.
19. Her bir kuyucuğa 100'er μL ABST solüsyonundan ilave edilir.
20. Plak, spektrofotometrik analiz için yeterli renk oluşumu sağlanana kadar (yaklaşık 10-20 dakika) 250rpmde plak karıştırıcıda inkübe edilir.
21. Her bir kuyucuğa 100'er μL ABSR stop solüsyonundan ilave edilir.
22. Plak kuyucuklarının absorban değerleri plak okuyucuda 450nm dalga boyuna karşı okunur.
23. Negatif kontrolün zenginleşme faktörü 1 olarak kabul edilir ve diğer örneklerin zenginleşme faktörü absorban değerlerinden rölatif olarak hesaplanır.

3.2.3.6. Hesaplama ve İstatistiksel Analiz

Tüm absorban değerlerinden köre ait absorban değerlerinin ortalaması çıkartılarak asıl absorban değerleri elde edilir. Her örnek için üç ekim yapılmıştır. Elde edilen üçlü asıl absorban değerlerinin ortalaması alınarak ortalama absorban değerleri (ABSortalama) elde

edilir. Örneklerin ortalama absorbans değerleri, negatif kontrol hücrelerinden elde edilen ortalama absorbans değerine bölünür ve böylece negatif kontrol hücrelerine karşı oransal absorbans oranları elde edilir. Bu rölatif absorbans değeri zenginleştirme faktörü olarak adlandırılır ve her bir örnekteki mono-, oligo-nükleozom miktarının kontroldekine oranını ifade eder. Sonuçlar ortalama değer +/- standart sapma olarak ifade edilmektedir.

$$\text{Zenginleşme Faktörü} = \text{ABS}_{\text{ortalama}} (\text{her bir örnek}) / \text{ABS}_{\text{ortalama}} (\text{kontrol})$$

3.2.4. Akış Sitometrik Analizler

Akış sitometri hücrelerin sıvı içerisinde süspansiyon formunda incelenmelerine olanak sağlayan bir yöntemdir. Yöntem süspansiyondaki her bir hücrenin ayrı ayrı ve farklı belirleme araçları sayesinde pek çok parametre açısından eşzamanlı olarak incelenmesini sağlar. Yöntemin prensibi hücrelerin sıvı içerisinde tekli akışının sağlanması ve ardından her bir hücrenin lazer ile uyarılıp eksitasyonun ölçülmesidir. Hücrelerin tek tek düşebilmesi için basınçlı laminar akış sistemi kullanılır. Hücreler akış zarfı adı verilen ve akış odasının içerisinde bulunan sıvının ortasına enjekte edilir. Bu iki sıvı arasında akış hızı ve yoğunluk farkı olduğundan, enjekte edilen süspansiyon sıvı zarf içerisinde bir tünel oluşturmaktadır. Oluşan bu iki fazlı sabit akış sisteminde ortadaki, hücre süspansiyon sıvısının oluşturduğu, silindirin çapı 50-300µm civarındadır ve hücrelerin tek sıra halinde dizilmelerine olanak sağlar. Akış içerisinde ilerleyen hücreler istenen dalga boylarında lazer ışığı ile uyarılırlar (emisyon). Bunun ardından uyarılan her bir hücrenin eksitasyonu ölçülür ve kaydedilir. Cihazın özelliğine göre aynı anda pek çok emisyon/eksitasyon sağlanabilmektedir. Bu sayede farklı flüoresan boyaların kullanıldığı ölçümler eş zamanlı olarak gerçekleştirilebilmektedir.

3.2.4.1. Akış Sitometrik Annexin-V Apoptoz/Nekroz Analizi

Akış sitometrik yöntemler kantitatif apoptoz tayininde kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan Annexin-V apoptoz analizi EGCG etkisi ile hücrelerde tetiklenen apoptozun ve nekrozun kantitatif tayini amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Annexin-V apoptoz analizinde kullanılan FITC ile konjüge Annexin-V lektini, apoptotik hücrelerin hücre membranının dış yüzeyinde bulunan fosfatidil serin fosfolipidine bağlanır. FITC, Annexin-V bağlanan hücrelerin flüoresan (FL1 detektörü; eksitasyon= 488nm, emisyon=535nm) ışımaya neden olmaktadır. Hücrelerdeki bu flüoresan ışımaya akış sitometrideki FL1 dedektörü ile belirlenebilir. Işımanın şiddetine göre hücreler sınıflandırılır

ve bir diyagrama yerleştirilir. Nekrotik hücreler ise nükleik asitlere bağlanabilen flüoresan PI (FL2 detektörü, eksitasyon= 488nm, emisyon=562-588nm) boyası ile belirlenir. PI nekrotik hücrelerin zarar görmüş hücre membranından geçerek DNA'larını boyar. DNA'ları boyanan hücrelerdeki flüoresan ışımaya akış sitometrideki FL2 dedektörü ile belirlenir. Işımanın şiddetine göre hücreler sınıflandırılır ve bir diyagrama yerleştirilir (153).

3.2.4.1.1. Kullanılan Reaktifler

- ❖ FITC ile konjüge Annexin-V (BD)
- ❖ 50µg/mL PI (Alexis), PBS (Biochrom) içerisinde
- ❖ Bağlama tamponu: 100mM HEPES (Sigma) (pH: 7,4), 1,5M NaCl (Sigma), 50mM KCl (Sigma), 18mM CaCl₂ (Sigma)
- ❖ Fluoresan Reaktif: 100µL bağlama tamponu, 5µL Annexin-V, 10µL PI

3.2.4.1.2. Kullanılan Cihazlar

- ❖ Hücre kültürü cihazları
- ❖ Akış Sitometre (Beckman Coulter –epics XL.MCL).

3.2.4.1.3. Deney Basamakları

1. 75cm² flasklarda çoğaltılan HCT-116 hücreleri tripsinize edilir ve hücreler Neubauer lamında sayılır .
2. Hazırlanan 1x10⁵ hücre/mL süspansiyonundan 2şer mL 6lı plak kuyucuklarına ekilir. Böylece her bir kuyucuğa 2x10⁵ hücre ekilmiş olur.
3. Hücrelerin yapışması ve hücre sayısının dublikasyonu için plaklar 24 saat boyunca inkübatörde bekletilir.
4. Kuyucuklardaki ortamlar atılır ve yerine 0, 10, 20, 50, 100µM EGCG içeren deney ortamları ilave edilir. Her örnek ikiyeşerli çalışılmaktadır.
5. Plak inkübatörde 24 saat bekletilir.
6. 6lı plak kuyucuklarının içerikleri ayrı ayrı tüplere aktarılır .
7. Kuyucukların içerisindeki hücreler 1er mL tripsin ile kaldırılır ve hücreler kendi tüplerine aktarılır .
8. Kuyucuklar 1er mL PBS ile yıkanır ve kendi tüplerine aktarılır .
9. Bu süspansiyon Annexin-V apoptoz analizi ve hücre yaşam döngüsü regülasyon analizi için ayrılarak kullanılır.

10. Annexin-V için ayrılan hücre süspansiyonu oda sıcaklığında 1300rpmde 5 dakika santrifüj edilir.
11. Süpernatant atılır ve her bir pellet 115µL flüoresan reaktifi ile süspansiyon edilir.
12. Tüpler karanlıkta 15 dakika inkübe edilir.
13. Her bir tüpe 400er µL PBS ilave edilir ve akış sitometrede FL1 ve FL2 filtreleri kullanılarak okuma gerçekleştirilir.

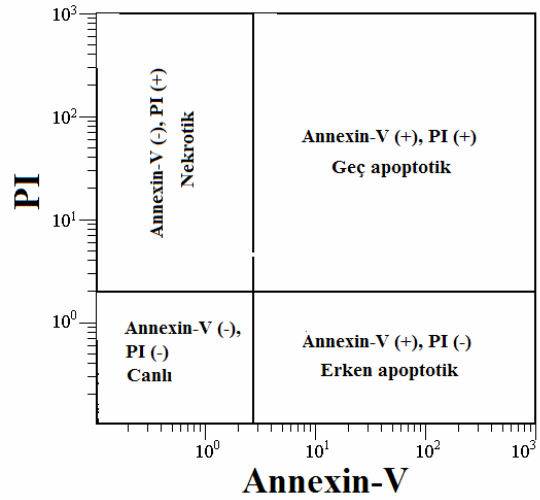
3.2.4.1.4. Hesaplama ve İstatistiksel Analiz

Hücreler, her bir hücrenin Annexin-V ve PI ışımaya miktarına göre diyagrama yerleştirilir (Şekil 15). Annexin-V ve PI sinyalinin algılanmadığı hücreler canlı, sadece PI sinyalinin algılandığı hücreler nekrotik, sadece Annexin-V sinyalinin algılandığı hücreler apoptotik ve hem Annexin-V hem de PI sinyalinin algılandığı hücreler geç apoptotik olarak değerlendirilir. Diyagramdaki her bir bölgeye düşen hücre sayısının (Hücre sayısı_{bölge}) sayılan toplam hücre sayısına oranından yüzde değerler hesaplanır.

$$\text{Yüzde Hücre} = \left(\frac{\text{Hücre sayısı}_{\text{bölge}}}{\text{Toplam Hücre sayısı}} \right) \times 100$$

Her bir örnek için ikişer ekim

gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek için bu formüle göre hesaplanan yüzde değerlerinin ortalamaları alınır. Elde edilen ortalama hücre yüzdeleri grafiğe geçirilerek veriler değerlendirilir. Veriler grafiğe geçirilirken tüm Annexin-V pozitif alanlara düşen hücreler bir arada apoptotik olarak değerlendirilmiştir. Bunun nedenle Annexin-V (+) / PI (-) (erken apoptotik) ve Annexin-V (+) / PI (+) (geç apoptotik) alanlarına düşen hücre yüzdeleri toplanmış ve elde edilen toplam değerler kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama değer +/- standart sapma olarak ifade edilmektedir.



Şekil 15. Annexin-V apoptoz analizi için akış sitometri diyagramı. Hücreler ışımaya şiddetlerine göre diyagrama yerleştirilir. Her bir alana düşen hücre sayısının toplam okunan hücre sayısına oranından hücre yüzdeleri belirlenir.

3.2.4.2. Akış Sitometrik Hücre Yaşam Döngüsü Regülasyon Analizi

Akış sitometrik analizler hücrelerin yaşam döngüsünün hangi fazında olduklarının belirlenmesi amacıyla da kullanılabilir. Çalışmamızda kullanılan hücre yaşam döngüsü regülasyon analizi, EGCG etkisi ile hücrelerin yaşam döngüsünde meydana gelen değişimin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem ayrıca hücrelerde gerçekleşen apoptozun belirlenmesine de olanak sağlamaktadır

Hücre yaşam döngüsü regülasyon analizinde hücrelerin DNA içerikleri fikse edilir. Flüoresan PI boyası hücrelerdeki DNA içeriklerini boyar. Her bir hücredeki PI boyasına ait flüoresan ışımaya, akış sitometrideki FL2 dedektörü (575) ile belirlenir. Hücrelerin yaşam döngüsünün hangi fazında olduklarına ($G_{0/1}$, S, M ya da $SubG_0$) DNA miktarlarına göre karar verilir. Hücrelerdeki DNA içeriği ne kadar fazla ise o kadar yüksek bir flüoresan sinyal elde edilir. Apoptotik hücrelerde ise fragmente DNA fikse edilemez ve sonuçta DNA miktarı çok düşük çıkar. Bu nedenle $G_{0/1}$ pikine kıyasla daha düşük PI sinyaline sahip (daha az DNA içeren) hücreler apoptotik olarak sınıflandırılmaktadır. Böylece apoptotik hücrelerin yüzdesi belirlenebilmektedir (154).

3.2.4.2.1 Kullanılan Reaktifler

- ❖ Mutlak etanol
- ❖ FA/PBS çözeltisi: 1,5mL %35 formaldehit (Sigma) + 48,5mL PBS (Biochrom)
- ❖ 40 μ g/mL RNAz (Sigma), bidistile su içerisinde
- ❖ 50 μ g/mL PI (Alexis), PBS (Biochrom) içerisinde

3.2.4.2.2 Kullanılan Cihazlar:

Hücre kültürü cihazlarına ek olarak,

- ❖ Buz makinesi (Scotsman AF-100) ve
- ❖ Akış Sitometre (Beckman Coulter –epics XL.MCL).

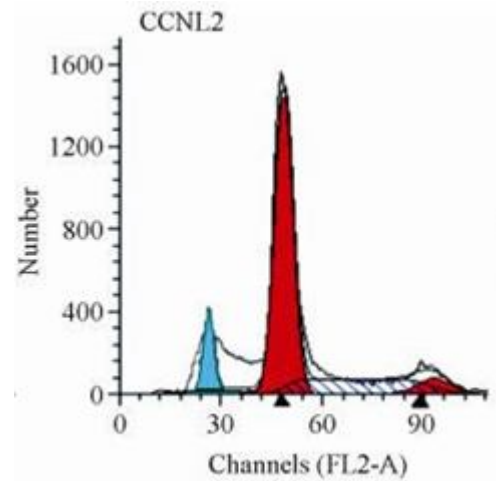
3.2.4.2.3 Deney Basamakları

1. Annexin-V apoptoz/nekroz analizi 9. basamakta hücre yaşam döngüsü regülasyonu için ayrılan süspansiyon 1300rpmde 5 dakika santrifüj edilir.
2. Pelletler 200er μ L FA/PBS çözeltisi ile süspanse edilir ve her bir tüp içeriği V-tabanlı-96lık plak kuyucuklarına aktarılır.

3. Buz üzerinde 30 dakika fiksasyon için beklenir.
4. Plak 1300rpmde 5 dakika +4°Cde santrifüj edilir.
5. Süpernatantlar aspire edilir.
6. Plak yavaşça vortekslenir.
7. Her bir kuyucuğa 50şer µL PBS ve 100er µL etanol ilave edilir
8. Buz üzerinde 15 dakika beklenir.
9. Plak 1300rpmde 5 dakika +4°Cde santrifüj edilir.
10. Süpernatantlar aspire edilir.
11. Plak yavaşça vortekslenir.
12. Her bir kuyucuğa 50şer µL RNAz ilave edilir.
13. RNAz aktivitesi için plak 37°Cde 30 dakika inkübe edilir.
14. Plak 1300rpmde 5 dakika +4°Cde santrifüj edilir.
15. Süpernatantlar aspire edilir.
16. Her bir kuyucuğa 200er µL PI ilave edilir.
17. Oda sıcaklığında 15 dakika beklenir.
18. Her bir kuyucuğun içeriği ayrı ayrı tüplere aktarılır.
19. Her bir tüpün üzerlerine 300'er µL PI ve 1 mL PBS ilave edilir
20. Akış sitometrede FL2 filtrede okuma gerçekleştirilir.
21. DNA miktarı küçükten büyüğe SubG₀ (apoptotik hücreler), G_{0/1} (hücre yaşam döngüsünün G₀ ya da G₁ fazı), S (hücre yaşam döngüsünün sentez fazı) ve M (hücre yaşam döngüsünün mitoz fazı) olarak değerlendirilir.

3.2.4.2.4. Hesaplama ve İstatistiksel Analiz

Hücreler her bir hücreye ait PI ışımaya göre diyagrama yerleştirilir. Diyagramın X ekseninde flüoresan ışımaya şiddeti, Y ekseninde ise hücre sayısı yer almaktadır (Şekil 16). Diyagramdan elde edilen pikler hücrelerin DNA içeriklerini ifade etmektedir. Hücreler DNA içeriklerine göre sınıflandırılarak hücre yaşam döngüsüne ait fazlar belirlenir. G_{0/1}



Şekil 16. Hücre yaşam döngüsü regülasyon analizi için akış sitometri diyagramı. Kırmızı büyük pik G_{0/1}, pikler arasındaki lacivert taralı bölge S, kırmızı küçük pik G₂ ve açık mavi pik SubG_{0/1} fazını ifade etmektedir.

pikine ait flüoresan ışımada şiddeti değerinin altında ışımada yapan hücreler ise apoptotik olarak nitelendirilir. Fazlara ait piklerin alanları hesaplanarak o alana düşen hücre miktarı yüzde cinsinden hesaplanır.

$$\text{Yüzde Hücre} = (\text{Hücre sayısı pik alanı} / \text{Toplam Hücre sayısı}) \times 100$$

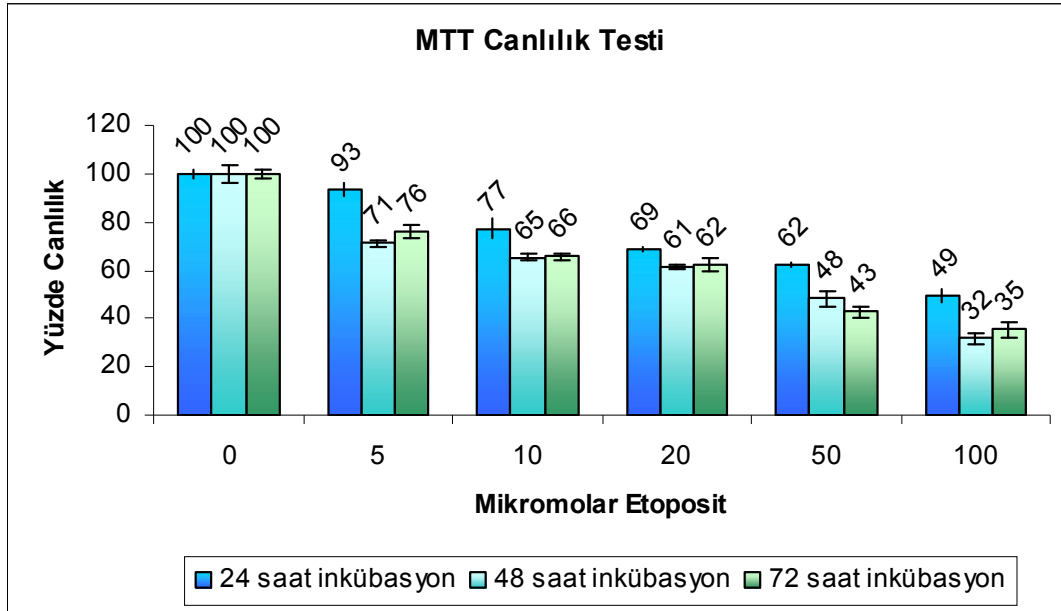
Her bir örnek için ikişer ekim yapılmıştır. Elde edilen yüzde değerlerinin ortalaması alınır ve ortalama değerler grafiğe geçirilerek veriler değerlendirilir. Sonuçlar ortalama değer +/- standart sapma olarak ifade edilmektedir.

4. BULGULAR

4.1. MTT Canlılık Testi

4.1.1. Etopositin HCT-116 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Tüm deneylerde pozitif kontrol olarak kullanılan 0, 5, 10, 50, 100µM etopositin ile 24, 48, 72 saat inkübe edilen HCT-116 hücrelerinin canlılık değişimi MTT canlılık testi ile tayin edildi. 0µM etopositin (kontrol) örneğinin canlılığı tüm zaman dilimleri için %100 kabul edildi ve diğer örneklere ait canlılık değerleri oransal olarak ortalama absorbans değerlerinden hesaplandı.

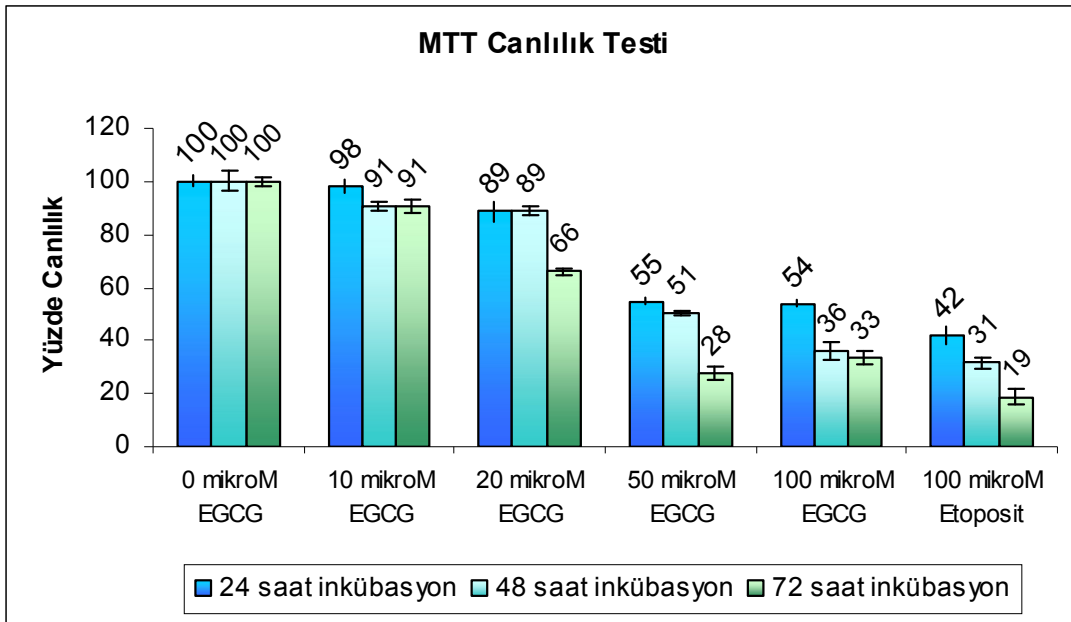


Şekil 17. Pozitif kontrol etopositin HCT-116 hücre canlılığı üzerine etkisi. Grafikte X eksenini µM cinsinden etopositin konsantrasyonunu, Y eksenini ise her bir örneğin ortalama absorbans değerlerinden hesaplanan yüzde canlılık değerini ifade etmektedir. ((Yüzde Canlılık = $[ABS_{ortalama}(\text{her bir örnek}) / ABS_{ortalama}(\text{kontrol})] \times 100$))

Bulgular, etopositin hücrelerde konsantrasyon ve süreye bağımlı olarak hücre ölümünü tetiklediğini göstermektedir (Şekil 17). 100µM etopositin hücre canlılığını %51-68 arasında inhibe etmiştir bu nedenle yapılacak tüm denemelerde 100µM etopositin pozitif kontrol olarak kullanılmasına karar verildi.

4.1.2. EGCG'nin HCT-116 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

0, 10, 20, 50, 100µM EGCG ve pozitif kontrol olarak 100µM etoposid ile 24, 48, 72 saat inkübe edilen HCT-116 hücrelerinin canlılık değişimi MTT canlılık testi ile tayin edildi. 0µM EGCG (kontrol hücreleri) örneğinin canlılığı tüm zaman dilimleri için %100 kabul edilerek diğer örneklere ait canlılık değerleri oransal olarak ortalama absorbans değerlerinden hesaplandı.

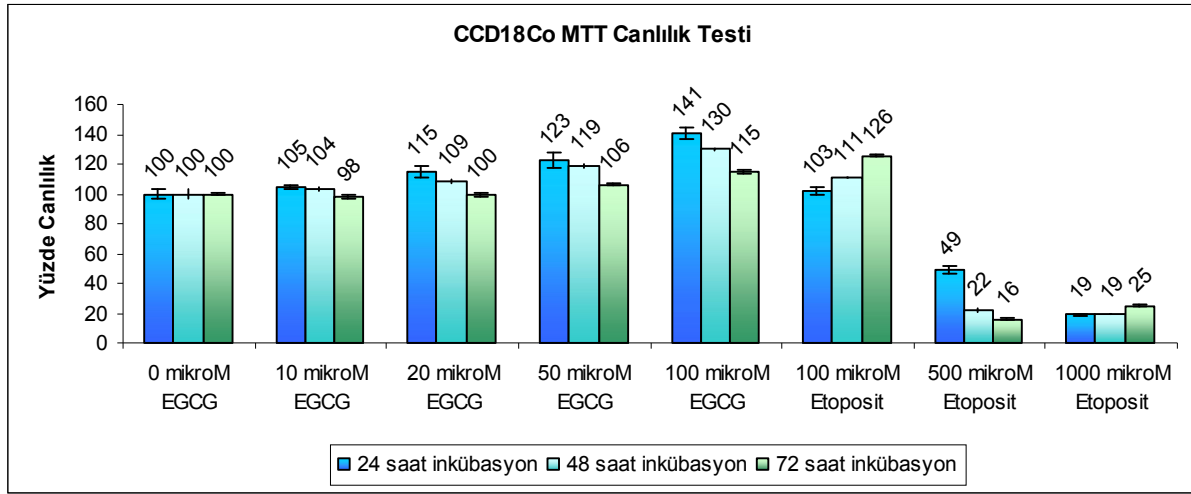


Şekil 18. EGCG'nin HCT-116 hücre canlılığı üzerine etkisi. Grafikte X eksenı EGCG ve etoposid konsantrasyonlarını, Y eksenı ise her bir örneğın ortalama absorbans değerlerinden hesaplanan yüzde canlılığı ifade etmektedir (Yüzde Canlılık = $[ABS_{ortalama} (her bir örnek) / ABS_{ortalama} (kontrol)] \times 100$).

Bulgular; EGCG'nin etoposite benzer şekilde hücrelerde konsantrasyon ve süreye bağımlı olarak hücre ölümünü tetiklediğini göstermektedir. EGCG'nin özellikle 50 ve 100µM konsantrasyonlarının %50 oranından daha fazla hücre ölümüne neden olduğu saptandı. 50µM EGCG konsantrasyonundan düşük konsantrasyonlarla muamele edilen hücrelerde ise çok düşük oranda hücre ölümü belirlendi (Şekil 18).

4.1.3. EGCG'nin CCD18co Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

0, 10, 20, 50, 100µM EGCG ve pozitif kontrol olarak 100, 500 ve 1000µM etoposid ile 24, 48, 72 saat inkübe edilen CCD18co hücrelerinin canlılık değişimi MTT canlılık testi ile tayin edildi. 0µM EGCG (kontrol hücreleri) örneğinin canlılığı tüm zaman dilimleri için %100 kabul edilerek diğer örnekler için canlılık değerleri oransal olarak ortalama absorbans değerlerinden hesaplandı.



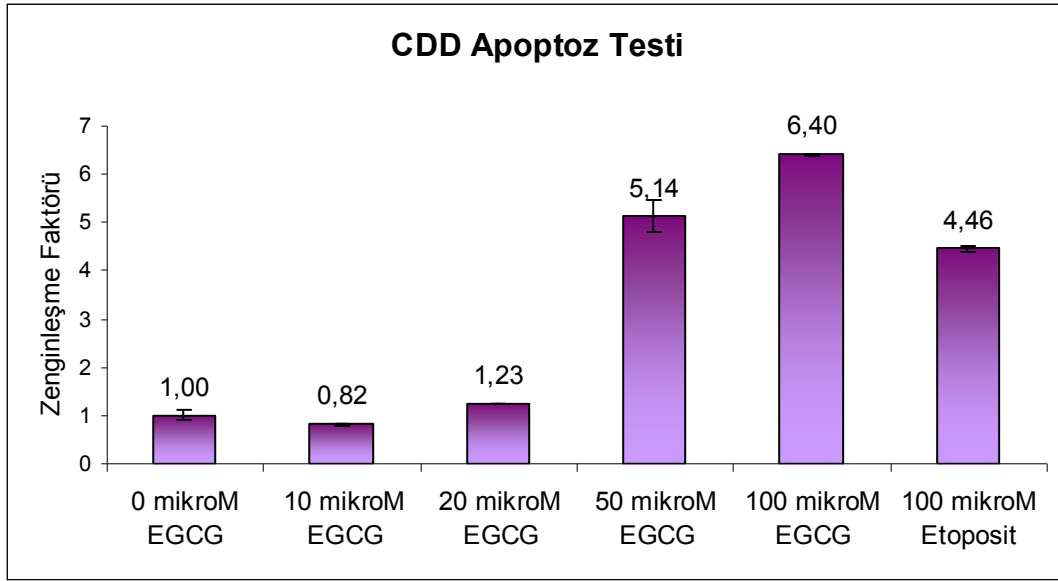
Şekil 19. EGCG'nin CCD18co hücre canlılığı üzerine etkisi. Grafikte X eksenini EGCG ve etoposid konsantrasyonlarını, Y eksenini ise her bir örneğin ortalama absorbans değerlerinden hesaplanan yüzde canlılık değerini ifade etmektedir. (Yüzde Canlılık = $[ABS_{ortalama} (her\ bir\ örnek) / ABS_{ortalama} (kontrol)] \times 100$).

Bulgular EGCG'nin CCD18co hücrelerinde hücre ölümüne neden olmadığını göstermektedir. Denemede 100µM etoposid ile muamele edilen hücrelerde de hücre ölümü gözlenmemiştir. Bu nedenle 500 ve 1000µM konsantrasyonlar denenmiştir. 500 ve 1000µM etoposid CCD18co canlılığını yüksek oranda inhibe etmiştir. Sonuçlar belirlenen konsantrasyonlarda EGCG'nin kolon karsinoma hücrelerinde hücre ölümünü tetiklerken, normal kolon hücrelerinde hücre ölümüne neden olmadığını göstermektedir (Şekil 19).

4.2. Apoptoz Analizleri

4.2.1 Kolorimetrik Apoptoz Tayini (Cell Death Detection ELISA^{PLUS} - Roche)

0, 5, 10, 50, 100µM EGCG ve pozitif kontrol olarak 100µM etoposit ile 24 saat inkübe edilen HCT-116 hücrelerinde tetiklenen apoptoz, Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche) kolorimetrik apoptoz tayin kiti ile belirlenmiştir. DNA fragmantasyonunu ifade eden mono- ve oligo-nükleozom zenginleşmesi 0µM EGCG (kontrol hücreleri) örneği için 1,00 kabul edildi ve diğer örnekler için zenginleşme faktörleri oransal olarak hesaplandı.

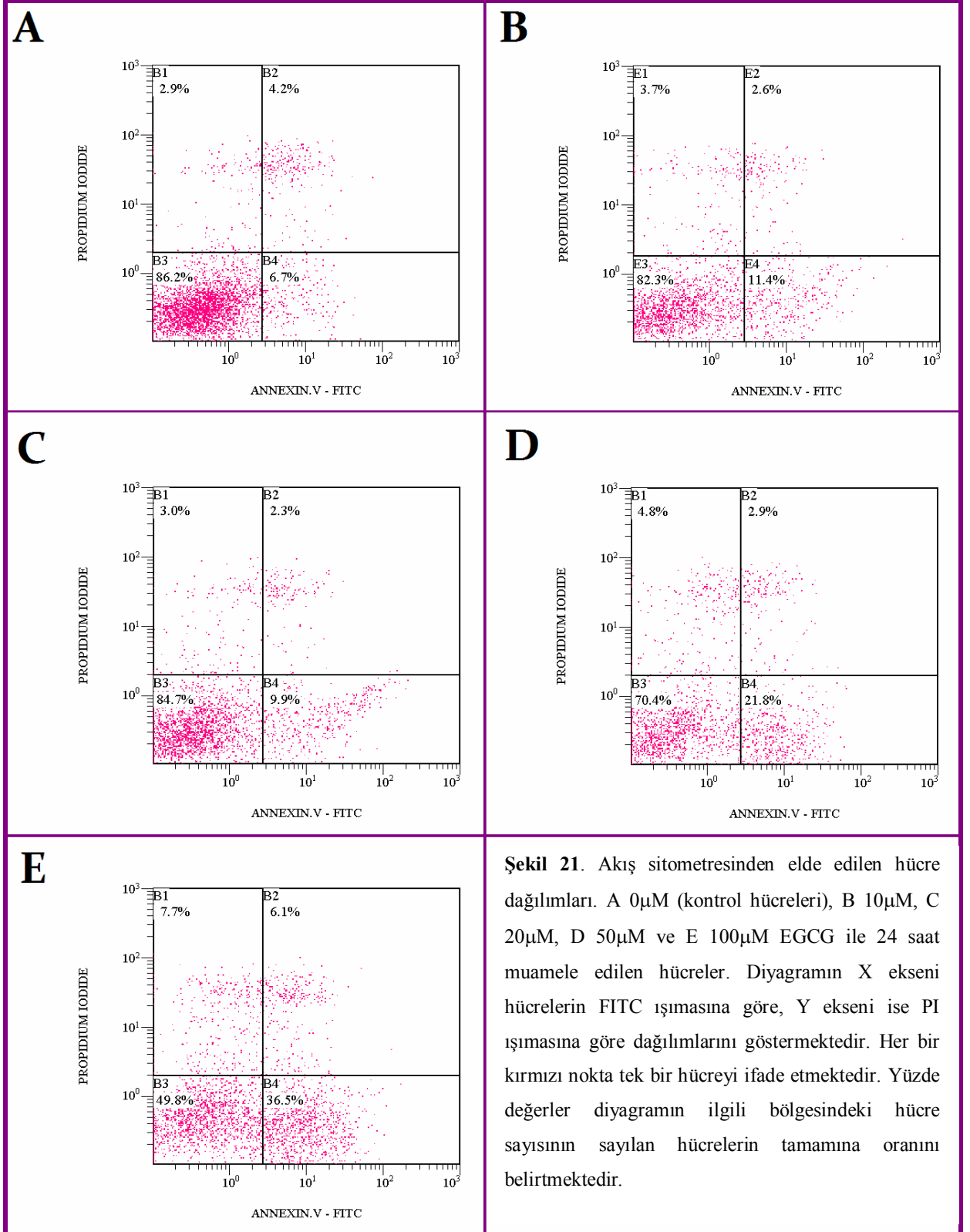


Şekil 20. EGCG'nin HCT-116 hücrelerine apoptotik etkisi. Grafikte X eksenine EGCG ve etoposit konsantrasyonları, Y eksenine ise her bir örneğin ortalama absorbans değerlerinin kontrolün absorbans değerine oranından hesaplanmış olan zenginleşme faktörünü ifade etmektedir. (Zenginleşme Faktörü = $ABS_{ortalama} (her\ bir\ örnek) / ABS_{ortalama} (kontrol)$)

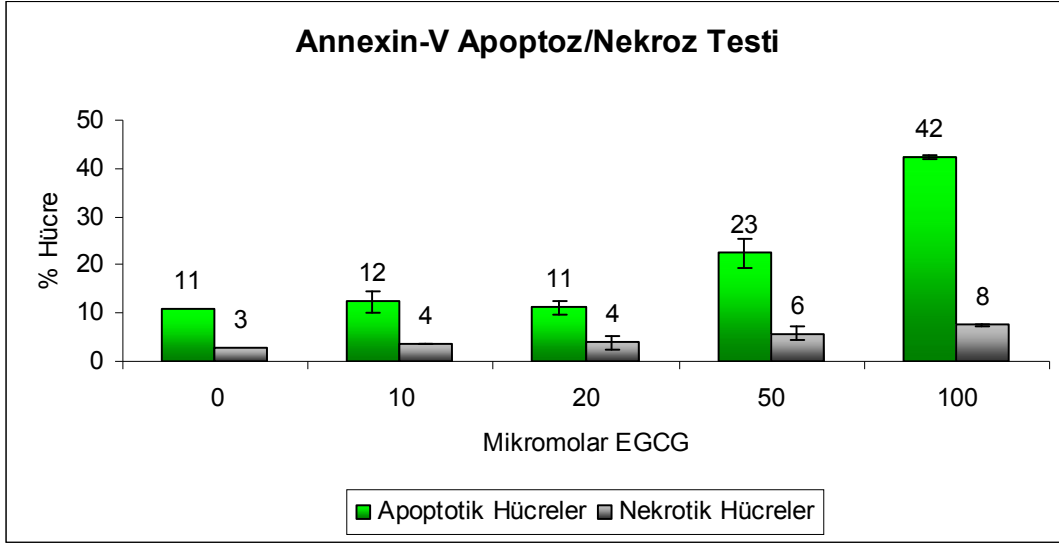
50 ve 100µM EGCG ile 24 saat inkübe edilen hücrelerde zenginleşme faktörü sırasıyla 5,1 ve 6,4 olarak hesaplandı. Bu değerler 50 ve 100µM EGCG ile muamele edilen HCT-116 hücrelerindeki mono-, oligo-nükleozom miktarının kontrol hücrelerindeki oranını ifade etmektedir. Bu durumda 50µM EGCG ile 24 saat muamele edilen hücrelerde kontrole göre 5,1 kat, 100µM EGCG ile 24 saat muamele edilen hücrelerde kontrole göre 6,4 kat daha fazla apoptozun tetiklendiği söylenebilir. MTT verileri ile uyumlu olarak daha düşük dozlarda apoptotik bir etki belirlenmemiştir (Şekil 20). 50µM EGCG hücrelerde 1000µM etopositten daha etkin bir şekilde apoptoz tetikleyebilmektedir. Aynı dozun CCD18co normal kolon hücrelerinde hücre canlılığını etkilemediği de göz önünde bulundurulmalıdır.

4.2.2. Akış Sitometrik Annexin-V Apoptoz/Nekroz Analizi

0, 5, 10, 50, 100 μ M EGCG ile 24 saat inkübe edilen HCT-116 hücrelerinde apoptotik/nekrotik hücre ölümünün tipi, Akış Sitometrik Annexin-V Apoptoz/Nekroz Analizi ile incelendi. Her bir örnek için akış sitometride 20000 hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Annexin-V (-) ve PI (-) hücreler sağlıklı, Annexin-V (+) ve PI (-) hücreler erken apoptotik, Annexin-V (+) ve PI (+) hücreler geç apoptotik ve son olarak Annexin-V (-) ve PI (+) hücreler nekrotik olarak kabul edilmiştir (Şekil 21). Her bir alana düşen hücre yüzdeleri hesaplandıktan sonra ortalama yüzde değerler grafiğe geçirilmiştir. Grafik sütunlarında hem erken apoptotik hem geç apoptotik hücrelere ait yüzde değerleri toplanarak “apoptotik” olarak adlandırılmıştır (hesaplamanın ayrıntıları için bakınız bölüm 3.2.4.1.4. hesaplama).



Şekil 21. Akış sitometresinden elde edilen hücre dağılımları. A 0 μ M (kontrol hücreleri), B 10 μ M, C 20 μ M, D 50 μ M ve E 100 μ M EGCG ile 24 saat muamele edilen hücreler. Diyagramın X eksenini hücrelerin FITC ışımaya göre, Y eksenini ise PI ışımaya göre dağılımlarını göstermektedir. Her bir kırmızı nokta tek bir hücreyi ifade etmektedir. Yüzde değerler diyagramın ilgili bölgesindeki hücre sayısının sayılan hücrelerin tamamına oranını belirtmektedir.

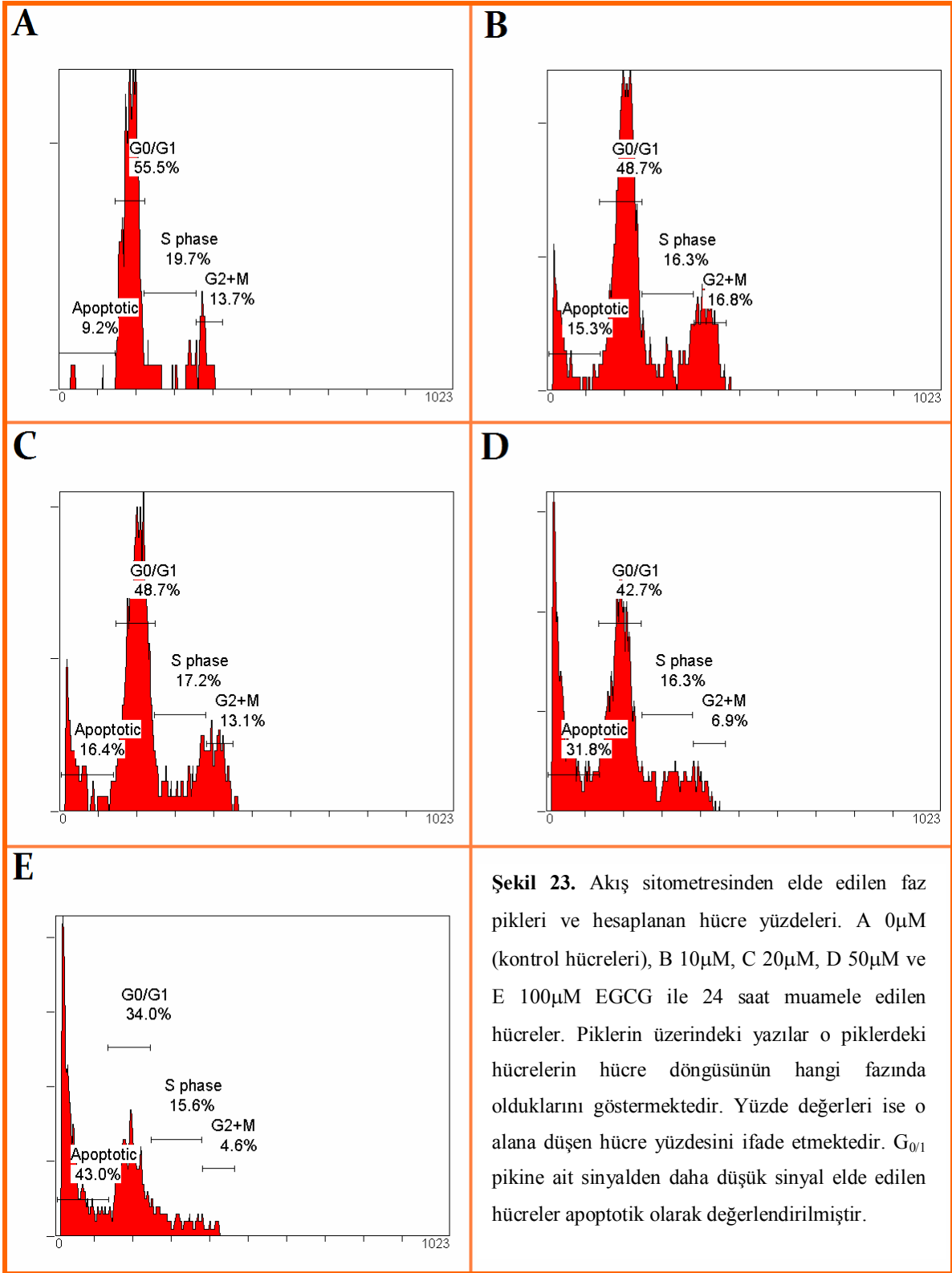


Şekil 22. EGCG'nin HCT-116 hücrelerine apoptotik/nekrotik etkisi. Akış sitometri diyagramından elde edilen yüzde değerlerin ortalamaları (Y eksenini), μM cinsinden EGCG konsantrasyonuna (X eksenini) karşı grafiğe geçirilmiştir.

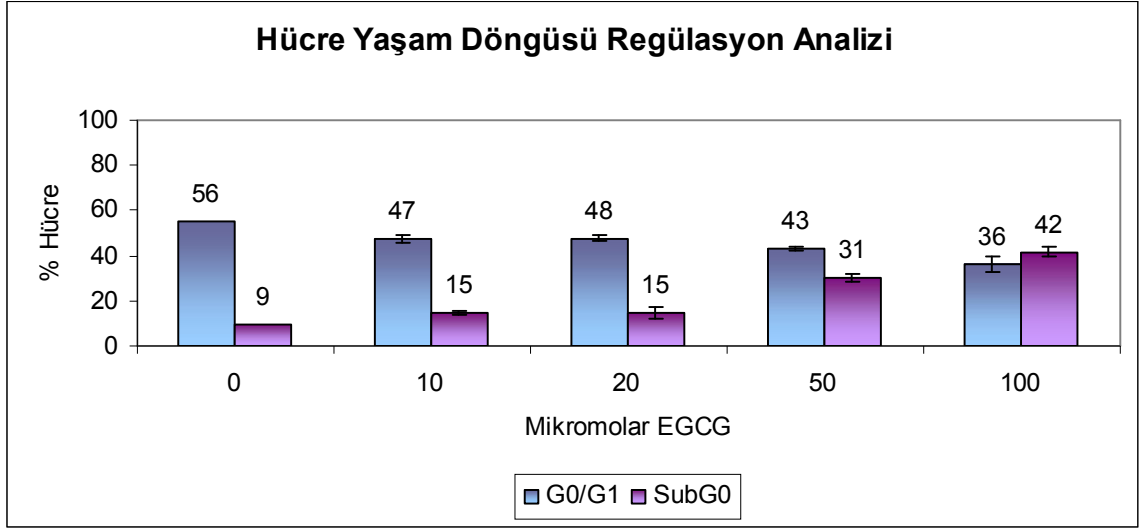
Elde edilen veriler MTT ve CDD bulgularıyla uyumludur. 50 ve $100\mu\text{M}$ EGCG ile 24 saat muamele edilen hücrelerde sırasıyla %23 ve %42 apoptoz tespit edildi. EGCG ile muamele edilen hücrelerde düşük miktarlarda nekrotik hücre ölümü saptandı.. $100\mu\text{M}$ EGCG ile 24 saat muamele edilen hücrelerde kontrole göre %5 daha fazla nekroz tespit edilmiştir. Bu yüzde hücrelerde tetiklenen apoptozun yanında oldukça düşük kalmaktadır ve sonuçlar hücre ölümünün asıl sorumlusunun apoptotik hücre ölümü olduğunu düşündürmektedir (Şekil 22.).

4.2.3. Akış Sitometrik Hücre Yaşam Döngüsü Regülasyon Analizi

0, 5, 10, 50, $100\mu\text{M}$ EGCG ile 24 saat inkübe edilen HCT-116 hücrelerinde yaşam döngüsünde meydana gelen değişim akış sitometrik hücre yaşam döngüsü regülasyon analizi ile tayin edilmiştir. Her bir örnek için akış sitometride 20000 hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Her bir hücredeki DNA pikleri değerlendirilip G_0/G_1 ve G_2/M fazları belirlenmiştir. Bu pikler arasında kalan bölge S fazı olarak nitelendirilmiştir. G_0/G_1 pikinden az DNA içeriğine sahip hücreler ise sub G_0/G_1 fazı ve apoptotik hücre olarak değerlendirilmiştir (Şekil 23.). Pik alanlarına düşen hücre sayısının sayılan toplam hücre sayısına oranından her bir faz için hücre yüzdeleri hesaplanmış ve ortalama yüzde değerler grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 23. Akış sitometresinden elde edilen faz pikleri ve hesaplanan hücre yüzdeleri. A 0µM (kontrol hücreleri), B 10µM, C 20µM, D 50µM ve E 100µM EGCG ile 24 saat muamele edilen hücreler. Piklerin üzerindeki yazılar o piklerdeki hücrelerin hücre döngüsünün hangi fazında olduklarını göstermektedir. Yüzde değerleri ise o alana düşen hücre yüzdesini ifade etmektedir. G_{0/1} pikine ait sinyalden daha düşük sinyal elde edilen hücreler apoptotik olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 24. Akış sitometresinden elde edilen ve hesaplanan fazlara ait pik yüzdelерinin grafiksel ifadesi. Akış sitometri diyagramındaki pik alanlarından hesaplanan yüzde değerlerin ortalamaları (Y eksenі), μM cinsinden EGCG konsantrasyonuna (X eksenі) karşı grafiğe geçirilmiştir.

Elde edilen sonuçlar diğer bulgularla uyumludur. 50 ve $100\mu\text{M}$ EGCG ile 24 saat muamele edilen hücrelerde sırasıyla %31 ve %42 oranında apoptoz belirlenmiştir. Daha düşük konsantrasyonlarda ise herhangi bir etki saptanmamıştır. EGCG konsantrasyonu arttıkça $G_{0/1}$ fazındaki hücre yüzdesi azalmaktadır. Bu durum EGCG'nin HCT-116 hücrelerinde hücre yaşam döngüsünün $G_{0/1}$ fazında duraksamaya neden olmadığını ifade etmektedir (Şekil 24).

5. TARTIŞMA VE SONUC

EGCG ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen veriler; bir katekin turevi olan EGCG etkisinin konsantrasyon, sure ve hucre tipine gore değişken olduğunu gostermektedir. Çalışmamızda HCT-116 hucre hattı, kolon karsinomaları temsilen kullanılmıştır. Yaptığımız literatür araştırması sonucunda kolon kanseri olgularının çoğu adenokarsinoma olduğundan bu konuda yapılan çalışmalarda daha çok HT29 kolon adenokarsinoma hucre hattı tercih edildiği görülmektedir (16). EGCG'nin apoptotik etkisini HT29 hücrelerinde araştırın çalışma sayısı HCT-116 hücrelerinde araştırınlara kıyasla oldukça yüksektir (147,148, 154-157). Bu nedenle EGCG'nin HT29 üzerindeki etkisinin HCT-116 hücrelerindeki kıyasla daha iyi anlaşıldığı söylenebilir. HCT-116 ve HT29 hücreleri benzer morfoloji gsterseler de genetik profilleri oldukça farklıdır. Bu nedenle apoptoz tetikleyici etkenlere verdikleri cevap çeşitlilik gstermektedir. HT29'un aksine HCT-116 hücrelerinde p53 geni mutasyona uğramamıştır ve aktiftir (158). Bu nedenle HCT-116 hücreleri apoptotik tetiklemeye karşı HT29 hücrelerine göre daha duyarlıdır. Çalışmamızın hipotezi; HT29'a kıyasla HCT-116 hücrelerinde daha düşük EGCG konsantrasyonlarında ve inkübasyon sürelerinde apoptoz tetiklenmesinin mümkün olacağı doğrultusundaıdır. Bunun dışında RAS proto-onkogeni HCT-116 hücrelerinde mutantken, HT29 hücrelerinde normal ve inaktiftir (159) . RAS proteini aktiveleştiginde siklin ve CDK proteinleri üzerinden hucre döngüsünün ilerlemesine neden olmaktadır. Bu nedenle iki hucre hattının yaşam döngüsünün regülasyonu açısından farklı tepkiler vermelerinin mümkün olduğu düşünölmektedir. HCT-116 kolon karsinoma hücrelerinde EGCG'nin apoptotik etkisini inceleyen çalışma sayısının oldukça kısıtlı olması (149, 158) ve HT29 hucre hattında gerçekleştiren çalışma sonuçlarının kolon karsinomayı temsil edemeyeceği düşünölerek çalışmamızda hucre hattı olarak HCT-116 kolon karsinoma hucre hattı tercih edilmiştir.

Kanser hücrelerinde DNA hasarının onarımı ile ilişkili genlerde mutasyonlar sıklıkla gözlenmektedir. Bu nedenle normal hücrelerin DNA hasarı ile indüklenen apoptoza karşı kanser hücrelerine kıyasla daha dayanıklı oldukları söylenebilir. Kematerapötik ajanlarda istenen özelliklerden biri normal hücrelere minimum hasarı vererek kanser hücrelerini öldürmesidir. Çalışmamızda CCD18co normal kolon hücreleri sağlıklı hucre kontrolü olarak kullanılmış ve

EGCG'nin sağlıklı kolon hücrelerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Normal hücrelerdeki canlılık inhibisyonunun kanser hücrelerindeki canlılık inhibisyonu ile karşılaştırılmasının literatüre katkı sağlayacağı öngörülmüştür.

Çalışmamızda EGCG'nin hücre canlılığı üzerine etkisi MTT canlılık analizi ile belirlendi. MTT ve aynı prensibi kullanan diğer yöntemler (XTT, MTS, WST1) hücre canlılığının analizi için sıklıkla kullanılan uygulaması kolay yöntemlerdir. Alternatif olarak tripan mavisi ile hücrelerin sayımı da canlılık değişiminin belirlenmesi amacıyla kullanılabilir fakat otomatik bir sayıcı kullanılmadığı sürece hata payı spektrofotometrik MTT yöntemine kıyasla yüksektir. Kolon kanseri hücre hatlarında gerçekleştirilen benzeri çalışmalarda da MTT ve MTS yöntemleri tercih edilmiştir (111). MTS ve WST1 yöntemlerinin MTT'den tek farkı MTT reaktifi elde edildikten sonra elde edilen formazan kristallerinin kendiliğinden çözünebilir özellikte olmasıdır. Bu nedenle hem işlem süresi kısaltmakta hem de yöntemin uygulanması basitleşmektedir. Buna karşın maliyeti MTT yöntemine kıyasla daha yüksektir ve bu nedenle tercih edilmemiştir.

Apoptozun tayini için kullanılan yöntemler apoptozun tetiklenmesi sırasında meydana gelen karakteristik olayların ölçümü prensibine dayanır. Özellikle de DNA fragmentasyonu ve fosfatidil serin kalıntılarının hücre membranının dış yüzeyine çıkması apoptozun belirlenmesinde en çok kullanılan özelliklerdir (151).

DNA fragmentasyonu akış sitometrik TUNEL, kolorimetrik CDD veya elektroforetik DNA merdiveni oluşumu yöntemleri ile belirlenebilir. TUNEL yönteminde terminal deoksinükleotidil transferaz enziminin aktivitesi aracılığıyla DNA fragmanları işaretlenir ve akış sitometri ile işaretlenen fragmanlar analiz edilir. Son yıllarda bu yöntemin nekrotik hücreleri de apoptotik olarak değerlendirebildiği ortaya çıkmıştır. Artık bu yöntem sadece geç-apoptotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (160). DNA merdiveni oluşumu yönteminde ise fragmente DNA'yı içeren örneğin agaroz jelde yürütülüp etidyum bromür ya da SYBR Green I aracılığıyla görüntülenmesi söz konusudur. Jel görüntüsünde merdivensi görüntünün oluşu DNA'nın fragmentasyonunu göstermektedir. Çalışmamızda kantitasyonunun mümkün olmaması nedeniyle bu yöntem tercih edilmemiştir. Cell Death Detection ELISA^{PLUS} yöntemi ise fragmente DNA'nın

plak tabanına fikse edilerek spektrofotometrik olarak analiz edilmesi ile uygulanır. Yöntem pratiktir ve kısa sürede sonuç vermektedir. CDD yöntemi örnek gruplarından elde edilen ortalama absorpsiyon değerlerinin kontrole ait ortalama absorpsiyon değerine oranlanması ile örneklerde tetiklenen apoptozun yarı-kantitatif olarak hesaplanmasına olanak sağlamaktadır. Çalışmamızda CDD yöntemi hem pratik olduğundan hem de kantitasyona olanak sağladığından tercih edilmiştir. Ayrıca akış sitometri ile gerçekleştirilen hücre yaşam döngüsünün analizinde de fragmente DNA, SubG_{0/1} piki olarak belirlenebilir. Çalışmamızda bu yöntem hem EGCG'nin HCT-116 hücrelerinin hücre yaşam döngüsüne etkisinin belirlenmesinde hem de apoptozun onaylanmasında kullanılmıştır. Kolon kanseri hücre hatlarında gerçekleştirilen diğer çalışmalarda da bu yöntemin her iki amaç için de kullanılabildiği görülmektedir (148, 157).

Fosfatidil serin kalıntılarının hücre membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine çıkması apoptozun spesifik göstergelerinden biridir. Annexin-V lektini spesifik olarak bu fosfatidil serin kalıntılara bağlanabilmektedir (152). Apoptotik hücre membranında bulunan PS kalıntısına bağlanan FITC işaretli Annexin-V, Annexin-V apoptoz / nekroz analizi yönteminin temel prensibini oluşturmaktadır. Nekrotik hücrelerin DNA'larını boyayan PI flüoresan boyası ile bir arada kullanıldığında yöntem apoptoz / nekroz ayrımının gerçekleştirilebilmesine olanak sağlamaktadır. Çalışmamızda EGCG'nin olası apoptotik ve nekrotik etkisinin bir arada değerlendirilebilmesi amacıyla Annexin-V apoptoz / nekroz analizi kullanılmıştır.

MTT sonuçları değerlendirildiğinde EGCG konsantrasyonu ile HCT-116 hücre canlılığı inhibisyonu arasında doğrusal bir ilişki olduğu görülmektedir (Şekil 18). EGCG'nin hücre ölümünü tetikleyici etkisi hem konsantrasyona hem de süreye bağlı olarak artmaktadır. EGCG ile 24 saat inkübe edilen HCT-116 hücrelerinde canlılığın 10µM ve 20 µM konsantrasyonlarda çok düşük değişim gösterdiği (sırasıyla %2 ve %11) daha yüksek konsantrasyonlarda ise bu etkinin arttığı saptanmıştır. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise 50µM EGCG'nin 24 saatte %45, 100µM EGCG'nin %46 oranında hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan 100µM etopositin tetiklediği hücre ölüm oranı ise %58 olarak saptanmıştır. EGCG ile 48 saat inkübe edilen hücrelerde; 10µM ve 20µM konsantrasyonlarında 24 saat verileri ile aynı canlılık değerleri elde edilmiştir. Buna karşın, 50µM ve 100µM EGCG ile 48 saat inkübe

edilen hücrelerde canlılık oranı daha da azalmıştır. 50µM EGCG 48 saat inkübasyon ile %49 oranında hücre ölümüne neden olurken, 100µM etopositin neden olduğu hücre ölümü %64 olarak belirlenmiştir. Bu değer 100µM etoposit ile aynı süre inkübe edilen hücrelerden elde edilen hücre ölüm yüzdesine (%69) yakın bir değerdir. Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda 48 saat için hücre canlılığını %50 oranında inhibe eden konsantrasyon (İK₅₀) 50µMdan biraz fazladır. EGCG ile 72 saat inkübe edilen hücrelerden elde edilen canlılık verileri de benzer şekildedir ve konsantrasyon ile artış göstermektedir. 20µM EGCG 72 saatte önemli oranda etki göstermiş ve hücre canlılığını %44 oranında inhibe etmiştir. 50µM EGCG ile 72 saat inkübe edilen hücrelerde ise etki doruğa ulaşmış ve hücre ölüm oranı %72ye kadar yükselmiştir. Bu verilerden yola çıkılarak 72 saat EGCG inkübasyonu için İK₅₀ değerinin 20-50µM arasında olduğu söylenebilir. 100µM EGCGde 72 saat inkübasyonda görülen etki %67dir. Bu etki aynı konsantrasyonun 48 saatte gösterdiği etkiden yüksek fakat 50µM EGCGnin aynı inkübasyon süresinde gösterdiği etkiden azdır. Bu sonuçlar ışığında 50µM EGCG, HCT-116 hücrelerinde apoptoz tetiklemek için yeterlidir ve bu doz ileriki çalışmalarda etkin apoptotik EGCG dozu olarak tercih edilebilir.

EGCG'nin kolon kanseri hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda elde edilen sonuçlar farklılık göstermektedir. Uesato ve ark.'nın (147) yaptıkları bir çalışmada HCT-116 hücrelerinde 24 saat EGCG inkübasyonu için elde edilen İK₅₀ değeri 71,3µM ve 72 saat EGCG inkübasyonu için elde edilen İK₅₀ değeri 47,7µM olarak belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda 24 saat EGCG inkübasyonunda İK₅₀ değerinin 100µMın üzerinde olduğu, 72 saatte ise İK₅₀ değerinin 20-50µM arasında olduğu belirlenmiştir. Uesato ve ark.'nın yaptıkları çalışmada manuel MTT yöntemi kullanılmıştır ve hücreler kuyucuk başına 2,5 x 10⁴ hücre düşecek şekilde ekilmiştir. Çalışmada hücreler deneysel süreç başlamadan önce 1-3 gün inkübatörde bekletilmiştir. Bu durumda deneye başlandığında hücre sayısının 5,0 - 20,0 x 10⁴ hücre/kuyucuk civarında olması beklenmektedir. Bizim çalışmamızda ise aynı deylene 1,0 x 10⁴ hücre/kuyucuk hücre sayısı ile başlanmıştır. Bu nedenle aynı etki belirlenememiş olabilir. Benzeri bir çalışma da Inaba ve ark. (148) tarafından gerçekleştirilmiştir. WST1 ile gerçekleştirilen çalışmada kuyucuk başına ekilen HCT-116 hücre sayısı 5,0 x 10² – 5,0 x 10⁵ arasında denenmiştir ve her bir hücre sayısı için 24 saat EGCG inkübasyonunun İK₅₀ değerleri

hesaplanmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler IK_{50} değerinin hücre sayısına göre farklı olduğunu göstermektedir. Çalışmada $1,0 \times 10^4$ hücre/kuyucuk hücre konsantrasyonunda 24 saat inkübasyon için EGCGnin IK_{50} değeri $\approx 130\mu M$ olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda bu konsantrasyona çıkılmadığı için 24 saatte IK_{50} değeri ancak $100\mu M$ ın üzerinde olarak ifade edilmektedir. Shimizu ve ark. (157) HCT-116 ve HT29 gibi çeşitli kolon kanseri hücre hatlarında EGCGnin hücre canlılığı üzerine etkisini MTT yöntemi ile incelemiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre çeşitli kolon kanseri hücre hatlarında (HCT-116, HT29, Caco2 ve SW837) 48 saat EGCG inkübasyonu için hesaplanan IK_{50} değerleri $40-50\mu M$ arasında değişmektedir. HCT-116 için ise hesaplanan IK_{50} değeri $47,7\mu M$ dır. Bizim çalışmamızda da benzer bir şekilde 48 saat EGCG inkübasyonu için IK_{50} değerinin $50\mu M$ ın biraz üzerinde olduğu belirlenmiştir. HT29 kolon adenokarsinoma hücre hattında gerçekleştirilen çalışmalarda çeşitli EGCGnin konsantrasyon aralıkları $500\mu M$ a kadar 24-72 saat inkübasyon aralığında denenmiştir (154-157). Elde edilen tüm sonuçlar EGCG konsantrasyonu ile HT29 hücrelerinde tetiklenen hücre ölümünün doğru orantılı olduğunu, bu etkinin konsantrasyon ile birlikte inkübasyon süresine de bağımlı olduğunu ortaya koymaktadır. Chen ve ark. (154) yaptıkları çalışmada HT29 hücrelerinin 36 saat EGCG inkübasyonu için IK_{50} değerini $100\mu M$ olarak belirlemiştir. Shimizu ve ark.'nın (157) yaptıkları çalışmada ise HT29 hücrelerinde 48 saat EGCG inkübasyonu için elde edilen IK_{50} değeri $50,2\mu M$ olarak ifade edilmektedir. Bu sonuçlara bakıldığında EGCG'nin HT29 ve HCT-116 hücreleri arasındaki etkisinin çok farklı olmadığı anlaşılmaktadır. Tartışmanın ilk bölümünde belirtildiği gibi özellikle p53 bakımından bu iki hücre hattı farklılık göstermektedir. Etkinin her iki hücre hattında benzer olması apoptoz mekanizmasının p53 bağımsız olabileceğine işaret etmektedir. Buna karşın literatürdeki veriler EGCG ile tetiklenen apoptozun p53 bağımlılığını ortaya koymuştur (126-132). Birden fazla mekanizmanın aynı anda işlediği düşünülebilir.

Çalışmamızda EGCGnin CCD18co normal kolon hücrelerine etkisi MTT testi ile tayin edilmiştir. Çalışılan konsantrasyon ve inkübasyon aralığında hücre ölümü belirlenmemiştir. Elde edilen veriler artan EGCG konsantrasyonu ile hücre canlılığının da doğru orantılı olarak arttığını göstermektedir. 24 saatte $100\mu M$ EGCG hücre canlılığını kontrole kıyasla %41 oranında arttırırken 72 saatte bu etki %15e gerilemektedir. Benzer şekilde $100\mu M$ etoposid de hücrelerde

hücre ölümünü tetikleyememiştir. Ancak konsantrasyon 500-1000 μ M'a çıktığında hücrelerde canlılık inhibisyonu gözlenmektedir. EGCG'nin pro-oksidan olarak davranabildiğini, yüksek konsantrasyonlarda H₂O₂ oluşumuna ve DNA hasarına neden olduğu çeşitli çalışmalarda ifade edilmektedir (96-100). Kanser hücrelerinin DNA hasar tamir mekanizmaları çok iyi çalışmadığı için EGCG normal bir hücreye kıyasla kanser hücrelerine daha fazla zarar verebilmektedir. Yine de bu EGCG'nin proliferatif etkisini açıklamamaktadır. Normal hücrelerde (CCD18co) ortamdaki EGCG antioksidan etki göstererek hücreleri hasardan koruyor olabilir veya normal hücrenin kanser hücrelerinden farkı düşünüldüğünde etkisi tamamen farklı bir mekanizma üzerinden gerçekleşiyor olabilir. Literatürdeki çalışmalarda EGCG'nin etkileri incelenirken CCD18co hücre hattı tercih edilmemiştir. Buna karşın FHC (fetal human colon) ile gerçekleştirilmiş iki çalışma mevcuttur. Bunlardan ilki Chen ve ark. (154) tarafından gerçekleştirilmiştir. MTT yönteminin kullanıldığı çalışmada 36 saat EGCG inkübasyonu için hesaplanan İK₅₀ değeri 250 μ Mın üzerindedir. Aynı çalışmada HT29 hücreleri için hesaplanan değer 100 μ M olduğu düşünülürse, normal kolon hücrelerinin kolon kanseri hücrelerine kıyasla EGCG ile tetiklenen hücre ölümüne karşı daha dirençli oldukları açıktır. Shimizu ve ark. (157) benzer şekilde 24 saat EGCG inkübasyonu için HT29 hücrelerinin İK₅₀ değerini 91 μ M olarak hesaplamıştır. Çalışmada denenen tüm kolon kanseri hücre hatlarında değer 40-50 μ M olduğu düşünüldüğünde elde edilen sonuç farklı değildir.

Çalışmamızda elde edilen CDD verileri MTT verileri ile uyumludur. Hücrelerde 10 μ M ve 20 μ M EGCG ile 24 saat muamele edilen hücrelerde apoptotik hücre oranı kontrolden çok farklı değildir (sırasıyla 0,82 ve 1,23). 50 μ M EGCG ile 24 saat inkübe edilen hücrelerde bu oran 5,14e ve 100 μ M EGCG ile 24 saat muamele edilen hücrelerde 6,40a çıkmıştır. Bu sonuçlar hücrelerde 50 ve 100 μ M EGCG'nin 24 saatte apoptozu tetikleyebildiğini göstermektedir. CDD yönteminin prensibi DNA fragmantasyonuna dayanmaktadır. Literatürde apoptozun belirteci olarak DNA fragmantasyonunun değerlendirildiği ve kolon kanser üzerine EGCG'nin etkisinin araştırıldığı çalışmalarda elde edilen çeşitli veriler mevcuttur. Chen ve ark.'nın (154) yaptıkları çalışmada DNA fragmantasyonu DNAnın agaroz jelde yürütülmesi ile kalitatif olarak değerlendirilmiştir. Deneysel sonuçları 50 μ M EGCG ile 36 saat inkübe edilen HT29 kolon adenokarsinoma

hücrelerinde DNA merdiven oluşumu gözlenmiştir. Bu etki 100 ve 200 μ M EGCGde daha belirginken 25 μ M EGCGde benzeri bir etki belirlenememiştir. Çalışmamızda 24 saat inkübasyonda 50 μ M EGCG konsantrasyonunda DNA fragmantasyonu belirlenirken, 20 μ M konsantrasyonda belirlenememiştir. Her ne kadar hücre hatları ve inkübasyon süreleri farklı olsa da, her iki kolon kanseri hücre hattında da sonuçların uyumlu olduğu söylenebilir. Çalışmamızda bu etki daha kısa inkübasyon sürelerinde de belirlenebilmiştir. Shimizu ve ark. (157) ise CDD yöntemi ile gerçekleştirdikleri çalışmada HT29 hücrelerinde 48 saatte 44 μ M EGCGnin kontrole kıyasla 3,5 kat daha fazla apoptoza neden olduğunu bulmuşlardır. Çalışmamızda HCT-116 hücrelerinde 50 μ M EGCG daha düşük inkübasyon süresinde (24 saat) daha yüksek apoptoza (5,14 kat artış) neden olmaktadır. Çalışmamızda sunulan canlılık testi sonuçları HCT-116 ve HT29 kolon kanseri hücre hatlarına EGCG'nin benzer etkisinin olduğuna işaret etmekteydi. Diğer hücre hatları ile yapılan çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında, HCT-116 hücrelerinin EGCG ile tetiklenen apoptoza daha duyarlı olabileceklerini ortaya koymaktadır. HT29 hücrelerinde EGCG etkisi ile meydana gelen hücre ölümünün apoptoz dışı etkenlerden kaynaklanma olasılığı (nekroz ya da otofaji gibi) mevcuttur. Buna karşın Inaba ve ark. (148) apoptozu agaroz jelde DNA merdiveni oluşturulması ile belirlemişlerdir ve HCT-116 hücrelerinde ancak 200 μ M EGCG ile 24 saat inkübe edilen hücrelerde merdiven oluşumu gözlenmektedir. Aynı çalışmada DNA fragmantasyonu ve kromatin kondenzasyonu flüoresan Hoechst boyası ile kalitatif olarak değerlendirilmiştir ve apoptotik etkinin 50 μ M EGCG konsantrasyonunda gözlemlenebildiği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde 50 μ M ve daha yüksek konsantrasyonlarda apoptoz tetiklendiğini belirtmiş idi. Hoechst boyasının apoptoz tayini için kullanıldığı başka bir çalışma da Hwang ve ark. (155) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 100 μ M EGCGnin HT29 hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonucu kromatin kondenzasyonuna ve DNA fragmantasyonuna neden olduğu ifade edilmektedir.

Annexin-V apoptoz/nekroz analizi sonuçları CDD ile benzer şekilde apoptotik hücre oranının 50 μ Mın altındaki konsantrasyonlarda kontrolden farklı olmadığını, 50 μ M EGCG ile 24 saat muamele edilen hücrelerde apoptotik hücre sayısının %11den %23e çıktığını ve 100 μ M konsantrasyona çıkıldığında ise bu etkinin %42lere ulaştığını göstermektedir. Nekrotik hücre

oranı ise kontrolde %3'tür ve 100µM EGCGde %8'e kadar çıkmaktadır. Nekrotik hücre oranında bir miktar artış olsa da ölen hücrelerin çoğu apoptotik olarak belirlenmiştir. Bu sonuç hücrelerde tetiklenen hücre ölümünden asıl sorumlu mekanizmanın apoptoz olduğunu düşündürmektedir. Apoptoz enerji gerektiren aktif bir süreçtir ve apoptoza giden hücrenin ATPsinin tükenmesi sonucunda nekrotik hücre ölümü meydana gelebilmektedir (161). Nekrotik hücre yüzdesindeki artış ATP tükenmesine bağlı olabilir. Literatürde kolon kanseri hücrelerinde EGCGnin nekrotik etkisini araştıran ya da nekroz/apoptoz ayırımını hedefleyen bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Fakat başka hücrelerde EGCGnin nekrotik etkisini belirlemeye yönelik gerçekleştirilmiş çalışmalar mevcuttur Hsuuw ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada MCF-7 meme kanseri hücre hattında 50µM EGCG konsantrasyonunda apoptozun, 100µMın üzerinde konsantrasyonlarda ise nekrozun tetiklendiği gösterilmiştir (142). Çalışmada Annexin-V apoptoz/nekroz analizi kullanılmıştır. Ayrıca örneklerdeki ATP miktarları da ölçülmüş ve konsantrasyon artışı ile ATP miktarı arasında ters orantı olduğu belirtilmiştir. Özellikle 100µM ve üzerindeki konsantrasyonlarda ATP miktarı kontrole kıyasla anlamlı ölçüde düşük ($p<0,01$) bulunmuştur. Bu sonuçlar da az önce bahsedilen hipotezi desteklemektedir. Hücrelerdeki ölüm mekanizması ATP miktarı belli bir seviyenin altına indiğinde apoptozdan nekroza kaymaktadır fakat bu durum HCT-116 hücrelerinde çalıştığımız konsantrasyon ve inkübasyon aralığında oldukça düşük bir etki göstermiştir.

Hücre yaşam döngüsü regülasyon analizi sonuçları hücrelerde konsantrasyon ile artış gösteren apoptoz tetiklenmesini (SubG_{0/1}) göstermektedir. Hücre yaşam döngüsünün G_{0/1} fazındaki hücre yüzdesi artan EGCG konsantrasyonu ile birlikte azalmaktadır. Bu sonuç hücre yaşam döngüsünde duraksamanın, EGCG etkisi ile tetiklenen asıl hücre canlılık inhibisyon mekanizması olmadığını göstermektedir. Kontrolde SubG_{0/1} fazındaki hücre yüzdesi %9 iken 100µM EGCG ile bu değer %42'ye ulaşmıştır. Bu örnekte hücre yaşam döngüsünün SubG_{0/1} fazındaki hücre sayısı G_{0/1} fazındakine kıyasla daha yüksektir. Inaba ve ark. (148) tarafından gerçekleştirilen ve HCT-116 hücrelerinde 200µM EGCGnin 24 saat inkübasyonda hücre yaşam döngüsü üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada hücre yaşam döngüsünde duraksama belirlenmemiştir. Bu sonuç elde ettiğimiz verilerle uyumludur. Buna karşın aynı çalışmada yaşam döngüsünün SubG_{0/1} fazında da hücre belirlenmemiştir. Aynı çalışmada akış sitometrik TUNEL

analizi ile 200µM EGCG etkisi ile 24 saat inkübasyon sonucu HCT-116 hücrelerinde tetiklenen apoptoz gösterilmiştir. İki farklı yöntem sonucu elde edilen zıt iki sonucun nedeni belli değildir ve çalışmanın yazarları bu konuda herhangi bir yorum yapmamışlardır. Shimizu ve ark. (157) ise 44µM EGCG etkisi ile 48 saat inkübasyon sonucunda HT29 hücrelerinde G₁ fazındaki hücre sayısının kontrole kıyasla %26lık bir artış gösterdiğini bulmuşlardır. Akış sitometrik hücre yaşam döngüsü regülasyon analizi ile gerçekleştirilen çalışmada apoptoz, yani SubG_{0/1} fazındaki hücre miktarı, değişmemiştir. Çalışmada elde edilen bu sonuç HT29 hücrelerinde EGCG etkisi ile hücre döngüsünün G₁ fazında duraksama meydana geldiğini göstermektedir. İki kolon kanseri hücre hattında EGCGnin apoptotik etkisinin farklı ama canlılık inhibisyonunun benzer olmasının nedeni bu durum olabilir. HCT-116 hücrelerinde RAS onkogeni aktiftir ve hücre döngüsünü ilerlemeye yönlendirmektedir. Aynı zamanda p53 normaldir ve hücrelerin apoptoza karşı daha dirençsiz olmalarına neden olmaktadır. HT29 hücrelerinde ise p53 mutasyonu vardır ve bu nedenle hücreler apoptoza karşı daha dirençlidir. Aynı zamanda RAS inaktiftir ve bu nedenle hücre yaşam döngüsüne müdahale daha kolaydır.

Çalışmamız, HCT-116 hücrelerinde EGCG etkisi ile 24 saatte 50-100µM konsantrasyonlarda hücre ölümünün tetiklenebildiğini ve temel mekanizmanın ağırlıklı olarak apoptoz olduğunu göstermektedir. Elde edilen veriler nekroz veya hücre yaşam döngüsünde duraksamanın apoptoz kadar etkin olmadığını göstermektedir. Fizyolojik bir süreç olan apoptoz, enflamasyona neden olmadığından ve çevre dokulara zarar vermediğinden kanser terapisinde tercih edilen bir yoldur. EGCG'nin potansiyel anti-kanser etkisinin daha derinlemesine anlaşılabilmesi için çalışmamızın temel oluşturabileceğine inanmaktayız. EGCGnin normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerine daha fazla hasar vermesi bu maddenin kanser hücrelerine yönelik kullanım potansiyelini arttırmaktadır. Yapılacak ileri çalışmalar ile EGCG'nin etki mekanizmasının anlaşılması ve etkisinin normal hücrelere daha az, kanser hücrelerine daha fazla zarar verebilecek şekilde modifiye edilmesi amaçlanmalıdır.

6. KAYNAKLAR

1. Smith JA, Martin L. Do cells cycle? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973 Apr;70(4):1263-7.
2. The Cell Cycle And Programmed Cell Death. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. 2007; 991
3. Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 2004;116:221–234
4. Nigg EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 1995 June;17(6): 471–80
5. Stephen JE. Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis. *Science* 1996 Dec;274 (5293): 1664-1672
6. Macaluso M, Montanari M, Cinti C, Giordano A. Modulation of cell cycle components by epigenetic and genetic events. *Semin Oncol*. 2005 Oct;32(5):452-7
7. Zetterberg A, Engstrom W, Larsson O. Growth activation of resting cells: induction of balanced and imbalanced growth. *Ann N Y Acad Sci* 1982;397:130–147
8. Maller JL. MPF and cell cycle control. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 1990;24:323-8. Review.
9. Karp G. *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments* (4 ed.). Hoboken, NJ: John Wiley and Sons. 2005;598–599
10. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Dec.7;(12):979-87
11. Zhang H. Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. *J Cell Physiol*. 2007 Mar;210(3):567-74. Review
12. Bos J. "RAS oncogenes in human cancer: a review". *Cancer Res* **49** 1989;(17): 4682–9.
13. World Health Organization. WHO "Cancer". (February 2006). Retrieved on 2009-02-12
14. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y. Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008;58/2: 71-96
15. Arab L, Il'yasova D. The epidemiology of tea consumption and colorectal cancer incidence. *J Nutr*. 2003;133:3310S-3318S.
16. Kang H, O'Connell JB, Leonardi MJ, Maggard MA, McGory ML, Ko CY. Rare tumors of the colon and rectum: a national review. *Int J Colorectal Dis*. 2007 Feb;22(2):183-9. Epub 2006 Jul 15.

17. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* **363** (6429): 558–61
18. Raff MC: Cell suicide for beginners. *Nature* 1998, 396:119-122.
19. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997, 88:347-354.
20. Cryns VL, Yuan J. The cutting edge: caspases in apoptosis and disease. In *When Cells Die*. Edited by Lockshin RA, Zakeri Z, Tilly JL. *New York: Wiley-Liss Inc*; 1998:177-210.
21. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68:251–306.
22. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:383–424.
23. Kaufmann SH. The intrinsic pathway of apoptosis. In: Gewirtz DA, Holt SE, Grant S, ed. *Apoptosis, Senescence, and Cancer*, second edition. *Humana Press*. 2007
24. Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J* 1996; 10(5): 587–97.
25. Youle RJ. Cell Biology. Cellular demolition and the rules of engagement. *Science* 2007; 315:776–7.
26. Ratus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:14250–5.
27. Boatright KM, Ratus M, Scott FL, et al. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 2003; 11(2):529–41.
28. Creagh EM, Martin SJ. Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans* 2001; 29:696–702.
29. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997; 278(5336):294–8.
30. Rao L, Perez D, White E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 1996; 135:1441–55.
31. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391:43–50.
32. Emoto Y, Manome Y, Meinhardt G, et al. Proteolytic activation of protein kinase-C by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J* 1995; 14(24):6148–56.

33. Frasch SC, Henson PM, Kailey JM, et al. Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *J Biol Chem* 2000; 275:23065–73.
34. Hoffmann PR, deCathelineau AM, Ogden CA, et al. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol* 2001; 155:649–59.
35. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; 305(5684):626–9.
36. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2000; 2(3):156–62.
37. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C. Elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90(3):405–13.
38. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91(4):479–89.
39. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999; 274(17):11549–56.
40. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15(22):2922–33.
41. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(1):67–71.
42. Anflous K, Armstrong DD, Craigen WJ. Altered mitochondrial sensitivity for ADP and maintenance of creatine-stimulated respiration in oxidative striated muscles from VDAC1-deficient mice. *J Biol Chem* 2001; 276:1954–60.
43. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, et al. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 2004; 427:461–5.
44. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005; 434:652–8.
45. Hockenbery DM, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348:334–6.
46. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:1899–911.
47. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22(53):8590–607.

48. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292(5517):727–30.
49. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movements of bax from cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 139:1281–92
50. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 2001; 276(15):11615–23.
51. Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, et al. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 1999; 144(5):903–14.
52. Epanand RF, Martinou JC, Montessuit S, Epanand RM, Yip CM. Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298(5):744–9.
53. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome C release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94(4):481–90.
54. Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 2005; 17:525–35.
55. Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* 1994; 79(2): 189–92.
56. Cheng EH, Levine B, Boise LH, Thompson CB, Hardwick JM. Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* 1996; 379:554–6.
57. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin X-M, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75:241–52.
58. Bossy-Wetzl E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome C release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J* 1998; 17(1):37–49.
59. Baffy G, Miyashita T, Williamson JR, Reed JC. Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem* 1993; 268:6511–9.
60. Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275:1129–32.

61. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Cell Mol Biol* 2002; 3:401–10.
62. Goyal L. Cell death inhibition: keeping caspases in check. *Cell* 2001; 104(6):805–8.
63. Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, et al. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell* 2003; 11(2):519–27.
64. Scott FL, Denault JB, Riedl SJ, Shin H, Renatus M, Salvesen GS. XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J* 2005; 24(3):645–55.
65. Ekert PG, Vaux DL. The mitochondrial death squad - hardened killers or innocent bystanders. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17:626–30.
66. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; 102(1):45–53.
67. Bruns P. Die Heilwirkung des Erysipels auf Geschwulste. *Beitr Klin Chir* 1868; 3:443–6.
68. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72(9):3666–70.
69. Granger GA, Shacks SJ, Williams TW, Kolb WP. Lymphocyte *in vitro* cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells. *Nature* 1969; 221(5186):1155–7.
70. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, et al. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984; 312(5996):724–9.
71. Gray PW, Aggarwal BB, Benton CV, et al. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature* 1984; 312(5996):721–4.
72. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104(4):487–501.
73. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(9):745–56.
74. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14(22):5579–88.
75. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995; 81(4):505–12.

76. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85(6):817–27.
77. Donepudi M, Mac Sweeney A, Briand C, Grutter MG. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* 2003; 11(2):543–9.
78. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998; 17(6):1675–87.
79. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003; 10(1):45–65.
80. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 1995; 81(4):495–504.
81. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 1996;84(2):299–308.
82. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000; 256:42–9.
83. Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin K-M. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* 1996; 2:574–7
84. Müller M, Strand S, Hug H, et al. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1-Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest* 1997; 99:403–13.
85. Eischen CM, Kottke TJ, Martins LM, et al. Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood* 1997; 90(3):935–43
86. Tolomeo M, Dusonchet L, Meli M, et al. The CD95/CD95 ligand system is not the major effector in anticancer drug-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 1998; 5:735–42.
87. Houghton JA, Harwood FG, Gibson AA, Tillman DM. The Fas signaling pathway is functional in colon carcinoma cells and induces apoptosis. *Clin Cancer Res* 1997; 3:2205-7.
88. Tani E, Kitagawa H, Ikemoto H, Matsumoto T. Proteasome inhibitors induce Fas-mediated apoptosis by c-Myc accumulation and subsequent induction of FasL message in human glioma cells. *FEBS Lett* 2001; 504:53–8.
89. Altucci L, Rossin A, Raffelsberger W, Reitmair A, Chomienne C, Gronemeyer H. Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nat Med* 2001; 7(6):680–6.

90. Kalli KR, Devine KE, Cabot MC, et al. Heterogeneous role of caspase-8 in fenretinide-induced apoptosis in epithelial ovarian carcinoma cell lines. *Mol Pharmacol* 2003; 64(6):1434–43.
91. Amarante-Mendes GP, Kim CN, Liu L, et al. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome c and activation of caspase-3. *Blood* 1998; 91(5):1700–5.
92. Kottke TJ, Blajeski AL, Martins LM, et al. Comparison of paclitaxel-, 5-Fluoro-2_-deoxyuridine and epidermal growth factor-induced apoptosis: evidence for EGF-induced anoikis. *J Biol Chem* 1999; 274:15927–36.
93. Makin GWJ, Corfe BM, Griffiths GJ, Thistlethwaite A, Hickman JA, Dive C. Damage-induced Bax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Bax dimers/complexes occur regardless of cell fate. *EMBO J* 2001; 20:6306–15.
94. Jia L, Patwari Y, Srinivasula SM, et al. Bax translocation is crucial for the sensitivity of leukaemic cells to etoposide-induced apoptosis. *Oncogene* 2001; 0:4817–26.
95. Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler KW, Vogelstein B. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* 2000; 290:989–92.
96. Perkins CL, Fang G, Kim CN, Bhalla KN. The role of Apaf-1, Caspase-9, and BID proteins in etoposide or paclitaxel-induced mitochondrial events during apoptosis. *Cancer Res* 2000; 60(6):1645–53.
97. Svingen PA, Tefferi A, Kottke TJ, et al. Effects of the Bcr/abl kinase Inhibitors AG957 and NSC 680410 on chronic myelogenous leukemia cells *in vitro*. *Clin Cancer Res* 2000; 6:237–49.
98. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl2 family and cell death. *Blood* 1996; 88(2):386–401.
99. McKay DL, Blumberg JB. The role of tea in human health: an update. *J Am Coll Nutr.* 2002;21:1-13.
100. Bliss RM. Brewing up the latest tea research. *Agric Res.* 2003;51:10-13.
101. Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr.* 2003;133:3275S-3284S.
102. Liao S. The medicinal action of androgens and green tea epigallocatechin gallate. *Hong Kong Med J.* 2001;7:369-374.
103. Yang CS, Wang ZY. Tea and cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1038–49.
104. Yang CS, Maliakal P, Meng X. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002;42: 25–54.

105. Rietveld A, Wiseman S. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *J Nutr.* 2003;133:3285S-3292S.
106. Katiyar SK, Afaq F, Azizuddin K, Mukhtar H. Inhibition of uvb-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001;176: 110–117.
107. Erba D, Riso P, Colombo A, Testolin G. Supplementation of Jurkat T cells with green tea extract decreases oxidative damage due to iron treatment. *J Nutr.* 1999;129: 2130–2134.
108. Herbert V. Prooxidant effects of antioxidant vitamins. Introduction. *J. Nutr.* 1996;126: 1197S–200S.
109. Furukawa A, Oikawa S, Murata M, Hiraku Y, Kawanishi S. (-)-Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA. *Biochem Pharmacol.* 2003;66:1769-1778.
110. Lambert JD, Yang CS. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J. Nutr.* 2003;133, 3262S–3267S.
111. Yang GY, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis* 1998;19: 611–616.
112. Elbling L, Weiss RM, Teufelhofer O, et al. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J.* 2005 May;19:807-809.
113. Kanadzu M, Lu Y, Morimoto K. Dual function of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) in healthy human lymphocytes. *Cancer Lett.* 2006 Sep 28;241:250-255. Epub 2005 Nov 21
114. Bamias A, Dimopoulos MA. Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy. *Eur J Intern Med.* 2003;14:459-469.
115. Masuda M, Suzui M, Lim JT, Deguchi A, Soh JW, Weinstein IB. Epigallocatechin-3-gallate decreases VEGF production in head and neck and breast carcinoma cells by inhibiting EGFR-related pathways of signal transduction. *J. Exp. Ther. Oncol.* 2002;2: 350–359.
116. Sartippour MR, Shao ZM, Heber D, Beatty P, Zhang L, Liu C, Ellis L, Liu W, Go VL, Brooks MN. Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in human breast cancer cells. *J. Nutr.* 2002;132: 2307–2311.
117. Jung YD, Kim MS, Shin BA, Chay KO, Ahn BW, Liu W, Bucana CD, Gallick GE, Ellis LM. EGCG, a major component of green tea, inhibits tumour growth by inhibiting VEGF induction in human colon carcinoma cells. *Br. J. Cancer* 2001;84: 844–85.

118. Maiti TK, Chatterjee J, Dasgupta S. Effect of green tea polyphenols on angiogenesis induced by an angiogenin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;308:64-67.
119. Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papatsoris AG, Papavassiliou AG. Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer agents, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, doi:10.1016/j.biocel.2007.11.007.
120. Zhen MC, Huang XH, Wang Q, Sun K, Liu YJ, Li W, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses rat hepatic stellate cell invasion by inhibition of MMP-2 expression and its activation, *Acta Pharmacol. Sin.* 27 2006;1600–1607.
121. Kim CH, Moon SK. Epigallocatechin-3-gallate causes the p21/WAF1-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and inhibits matrix metalloproteinase-9 expression in TNF α -induced vascular smooth muscle cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 435 2005;264–272.
122. Isemura M, Saeki K, Minami T, Hayakawa S, T. Kimura, Shoji Y, et al. Inhibition of matrix metalloproteinases by tea catechins and related polyphenols, *Ann. NY Acad. Sci.* 878 1999;629–631.
123. Garbisa S, Sartor L, Biggin S, Salvato B, Benelli R, Albini A. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate, *Cancer* 91 2001;822–832.
124. Ho YC, Yang SF, Peng CY, Chou MY, Chang YC, Epigallocatechin-3-gallate inhibits the invasion of human oral cancer cells and decreases the productions of matrix metalloproteinases and urokinase-plasminogen activator, *J. Oral Pathol. Med.* 36 2007;588–593.
125. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Dec;7(12):979-87.
126. Chung FL, Schwartz J, Herzog CR, Yang YM. Tea and cancer prevention: studies in animals and humans. *J Nutr.* 2003;133:3268S-3274S.
127. Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells, *J. Natl. Cancer Inst.* 89 1997;1881–1886.
128. Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate, *Cancer Res.* 66 2006;2500–2505
129. Hastak K, Gupta S, Ahmad N, Agarwal MK, Agarwal ML, Mukhtar H. Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of LNCaP cells, *Oncogene* 22 2003;4851–4859.

130. Hastak K, Agarwal MK, Mukhtar H, Agarwal ML. Ablation of either p21 or Bax prevents p53-dependent apoptosis induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *FASEB J*. 2005;789-91
131. Roy AM, Baliga MS, Katiyar SK. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells via modulation in protein expression of p53 and Bax and caspase-3 activation. *Mol Cancer Ther*. 2005;4(1):81-90.
132. Kuo PL, Lin CC. Green tea constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits Hep G2 cell proliferation and induces apoptosis through p53-dependent and Fas-mediated pathways. *J Biomed Sci*. 2003;10(2):219-27.
133. Leone M, Zhai D, Sareth S, Kitada S, Reed JC, Pellecchia M. Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2-family proteins, *Cancer Res*. 63 2003;8118–8121.
134. Islam S, Islam N, Kermode T, Johnstone B, Mukhtar H, et al. Involvement of caspase-3 in epigallocatechin-3-gallate-mediated apoptosis of human chondrosarcoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2000;270:793–97.
135. Qanungo S, Das M, Haldar S, Basu A. Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 2005 26(5):958-967
136. Gupta S, Hastak K, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H. Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis. *Oncogene*. 2004;23(14):2507-22.
137. Qin J, Xie L-P, Zheng X-Y, Wang Y-B, Bai Y, Shen H-F, Li L-C, Dahiya R. A component of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate, promotes apoptosis in T24 human bladder cancer cells via modulation of the PI3K/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007;354 852–857.
138. Das A, Banik NL, Ray SK. Mechanism of apoptosis with the involvement of calpain and caspase cascades in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to flavonoids. *Int J Cancer*. 2006;119(11):2575-85.
139. Hayakawa S, Saeki K, Sazuka M, Suzuki Y, Shoji Y, Ohta T, Kaji K, Yuo A, Isemura M. Apoptosis induction by epigallocatechin gallate involves its binding to Fas. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;285(5):1102-6.

140. Ahn WS, Huh SW, Bae SM, et al. A major constituent of green tea, EGCG, inhibits the growth of a human cervical cancer cell line, CaSki cells, through apoptosis, G(1) arrest, and regulation of gene expression. *DNA Cell Biol.* 2003;22:217-224.
141. Liang YC, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Inhibition of cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as induction of Cdk inhibitors p21 and p27 during growth arrest of human breast carcinoma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate, *J. Cell Biochem.* 75 1999;1–12
142. Hsuuw YD, Chan WH, Ann NY. Epigallocatechin gallate dose-dependently induces apoptosis or necrosis in human MCF-7 cells. *Acad Sci.* 2007;1095:428-40.
143. Brusselmans K, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells. *Int J Cancer.* 2003;106:856-862.
144. Imai K, Suga K, Nakachi K. Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population. *Prev. Med.* 1997;26, 769–775.
145. Zhang B, Li X, Nakama H, Zhang X, Wei N, Zhang X, Xhang L. A case-control study on risk of changing food consumption for colorectal cancer. *Cancer Invest.* 2002;20, 458–463.
146. Sun CL, Yuan JM, Koh WP, Yu MC. Green tea, black tea and colorectal cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Carcinogenesis* 2006;27, 1301–1309.
147. Uesato S, Kitagawa Y, Kamishimoto M, Kumagai A, Hori H, Nagasawa H. Inhibition of green tea catechins against the growth of cancerous human colon and hepatic epithelial cells. *Cancer Lett.* 2001 Sep 10;170(1):41-4.
148. Inaba H, Nagaoka Y, Kushima Y, Kumagai A, Matsumoto Y, Sakaguchi M, Baba K, Uesato S. Comparative examination of anti-proliferative activities of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epigallocatechin against HCT116 colorectal carcinoma cells. *Biol Pharm Bull.* 2008;31(1):79-84.
149. Patterson MK (1979) Measurement of growth and viability of cells in culture. In: Jakoby WB & Paston IH (eds) *Cell Culture*, vol. 11, pp. 141-151. Academic Press, New York.
150. Mosmann T Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
151. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry.* 1992;13(8):795-808. Review.
152. Vermes I, Hanen C, Steffens NH and Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184, 39-51

153. Nicolett I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F and Riccardi CA. Rapid And Simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 1991;139, 271–279.
154. Chen C, Shen G, Hebbar V, Hu R, Owuor ED, Kong AN. Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2003 Aug;24(8):1369-78.
155. Hwang JT, Ha J, Park IJ, Lee SK, Baik HW, Kim YM, Park OJ. Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Lett.* 2007 Mar 8;247(1):115-21.
156. Peng G, Dixon DA, Muga SJ, Smith TJ, Wargovich MJ. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits cyclooxygenase-2 expression in colon carcinogenesis. *Mol Carcinog*. 2006 May;45(5):309-19.
157. Shimizu M, Deguchi A, Lim JT, Moriwaki H, Kopelovich L, Weinstein IB. (-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2005 Apr 1;11(7):2735-46.
158. Rodrigues NR, Rowman A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7555–7559
159. Schroy PC, Brown SS, Kim K, Johnson KA, Murnane MJ, Yang S, O'Brien MJ, Carney WP, Kupchik HZ. Detection of p21ras mutations in colorectal adenomas and carcinomas by enzyme-linked immunosorbent assay. *Cancer* 76:201–209, 1995
160. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem*. 1996 Sep;44(9):959-68
161. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res*. 1997 May 15;57(10):1835-40.