

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**RESVERATROL VE EPİGALLOKATEŞİN
KOMBİNASYONUNUN SIÇAN C6 GLİOMA
HÜCRELERİNDE APOPTOTİK ETKİLERİ**

Biyolog İpek YAŞA

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2011

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**RESVERATROL VE EPİGALLOKATEŞİN
KOMBİNASYONUNUN SIÇAN C6 GLİOMA
HÜCRELERİNDE APOPTOTİK ETKİLERİ**

Biyolog İpek YAŞA

Tez Danışmanı

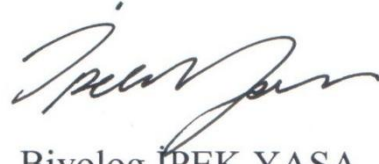
Prof.Dr. Tuncay ALTUĞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2011

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Biyolog İPEK YAŞA

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. KANSER	4
4.2. BEYİN TÜMÖRLERİ.....	6
4.2.1. C6 Glioma Hücreleri	7
4.3. EPİGALLOKATEŞİN-3-GALLAT	8
4.4. RESVERATROL	9
4.5. APOPTOZ	10
4.5.1. Apoptozun Temel İşlevleri	11
4.5.2. Apoptoz ve Nekroz.....	11
4.5.3. Apoptoz Mekanizmaları	14
4.5.3.1. Mitokondriyal Yol ile Apoptoz	15
4.5.3.2. Dış Sinyaller Yolu ile Apoptoz	16
4.5.3.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz	16
4.5.4. Apoptozun Düzenlenmesinde Görev Alan Genler.....	16
4.5.4.1. Kaspazlar.....	16
4.5.4.2. Bcl-2 Ailesi	17
4.5.4.3. p53	18
4.5.4.4. Apoptozda Görev Alan Diğer Proteinler	19
4.5.5. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	19
4.5.5.1. Tunel Yöntemi.....	20
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR VE ÇÖZELTİLER	21
5.1.1. EGCG için Kimyasal Data	21
5.1.2. Resveratrol için Kimyasal Data.....	22
5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER	22
5.2.1. Glioblastoma Multiforme Hücre Hattı	22
5.2.2. Hücre Kültürü.....	22

5.3. HÜCRE APOPTOZUNUN BELİRLENMESİ	23
5.3.1. Tünel Yöntemi	23
5.4. HÜCRE PROLİFERASYONUNUN BELİRLENMESİ	24
5.4.1. BrdU Yöntemi	24
5.5. MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRME	24
6. BULGULAR	25
6.1. APOPTOZ VERİLERİNİN MİKROSKOBİK ANALİZİ	25
6.2. PROLİFERASYON VERİLERİNİN MİKROSKOBİK ANALİZİ.....	40
7. TARTIŞMA.....	54
8. SONUÇ.....	59
9. TEŞEKKÜR	60
10. KAYNAKLAR.....	61

SİMGE VE KISALTMALAR

- AEC** : Amino etil karbazol
AIF : Apoptoz indükleyici faktör
APA F-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör
ATCC : Amerikan hayvan hücre kültür koleksiyonu
ATP : Adenozin trifosfat
BrdU : Bromo deoksi üridin
CAD : Kaspazla aktifleşen deoksiribonukleaz
DAB : Diamino benzidin
DMEM: Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle serumu
DMSO : Dimetil sulfoxide
EC : Epikateşin
ECG : Epikateşin-3-gallat
EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit
EGC : Epigallokateşin
EGCG : Epigallokateşin
FCS : Fetal sığır serumu
GBM : Glioblastoma multiforme
IAP : Apoptoz proteinleri inhibitörleri
ICAD : Kaspazla aktifleşen deoksiribonukleaz inhibitörü
IGF-1 : İnsülin benzeri büyüme faktörü
NCI : National Cancer Institute
PBS : Fosfat Tampon Çözeltisi
RES : Resveratrol
TdT : Terminal deoxynucleotidyl transferase
TNF : Tümör nekroz faktörü
TUNEL : TdT-mediated dUTP-FITC nick end-labeling

Araştırma Projesi No: TBG/0462009

1. ÖZET

Çalışmamızda doğal polifenolik bileşikler olan resveratrol ve epigallokateşin-3-gallat'ın ayrı ayrı ve bir arada kullanıldıklarında sıçan C6 glioma hücre soyu üzerindeki etkileri hücre kültüründe incelendi. Kültür ortamında iki bileşiğin etkileri 24, 48 ve 72. saatlerde hücre apoptozu ve hücre proliferasyonu açısından değerlendirildi.

Resveratrol'ün, kontrol grubuna göre, hücre kültüründe hücre apoptozunu artırıcı etki gösterdiği ve hücre proliferasyonunu azalttığı gözlemlendi. Faz kontrast mikroskopunda yapısal değişiklikler izlendi ve fotoğraflandı.

Epigallokateşin-3-gallat'ın, hücre kültüründe hücre apoptozunu artırıcı etki gösterdiği ve hücre proliferasyonunu durdurduğu gözlemlendi. Faz kontrast mikroskopunda yapısal değişiklikler izlendi ve fotoğraflandı.

Kombinasyon gruplarında, hücre kültüründen elde edilen bulgular resveratrol ve epigallokateşin-3-gallat grubunun tek tek uygulamaları ile elde edilen bulgulardan daha kuvvetli olmak üzere, benzerdi. Tüm kombinasyon grupları, hücre apoptozunu artırıcı ve hücre proliferasyonunu durdurucu etki gösterdi.

Sonuç olarak; resveratrol ve epigallokateşin-3-gallat kombinasyonunun sıçan C6 glioma hücre soyu üzerine etkileri hücre kültüründe incelendiğinde, bu maddelerin hücre apoptozunu indükledikleri ve hücre proliferasyonunu inhibe ettikleri gözlemlendi.

2. SUMMARY

In this study, the effects were investigated on C6 glioma cell family of rats when resveratrol and epigallocatechin-3-gallate which are natural polyphenolic composites were used together and separately. In the culture environment the effects of two composites were evaluated from the point of cell apoptosis and cell proliferation view in the 24, 48, and 72th hours.

Depends on control group the Resveratrol shows the increaser effect on cell apoptosis and it shows the detractive effect on cell proliferation. Constructional changings were analyzed and photographed under phase contrast microscope.

In the cell culture the observations were epigallocatechin-3-gallate shows the increaser effect on cell apoptosis and also it shows the detractive effect on the cell proliferation. Constructional changings were watched and photographed under phase contrast microscope.

In the combination groups, the findings from the cell culture were similar with the findings which were obtained by seperate applications of Resveratrol and epigallocatechin-3-gallate but cell culture findins were stronger. All of the combination groups showed the increaser effect on cell apoptosis and showed the inhibitor effect on cell proliferation.

As a result, when the effects of resveratrol and epigallocatechin-3-gallate combination were investigated on C6 glioma cell family of rats then the incentive effect on cell apoptosis and the inhibitor effect on cell proliferation were observed.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, epigenetik ve genetik birtakım değişiklikler sonucu organizmanın belli bir bölgesindeki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize olan neoplazinin kesin formlarını tanımlamak için kullanılan bir terimdir (1). Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu'na göre, kalp-damar hastalıklarından sonra kanser ve komplikasyonlarından dolayı olan ölümler, ikinci sırada yer almaktadır (2).

Kanser, vücuttaki hücrelerden herhangi birinin anormal çoğalması ile ortaya çıktığı için gerek davranış, gerek tedavi yöntemi, gerek de tedaviye yanıt açısından büyük ölçüde değişiklik gösteren çok sayıda türe sahiptir.

Primer beyin tümörleri, bütün kanserlere bağlı ölüm oranlarının %2'sini oluşturur. Uygulanan çeşitli tedavi yöntemlerine rağmen ortalama yaşam süresi 1 yıldır. Tümörün bu kötü prognozu ve beyin tümörlerinde cerrahi ve sitotoksik tedavinin sınırlı başarısı nedeniyle, toksik olmayan ve beyin tümörü hücrelerinde duyarlılık yaratacak ajanlar yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için umut kaynağı olmuşlardır.

Kanser tedavilerinde kullanılan çeşitli bitkisel maddeler, hücre proliferasyonunu engellemeleri ve buna karşılık apoptozu tetiklemeleri nedenleriyle kullanılmaktadırlar. Günümüzde Federal Almanya'da kullanılan hazır ilaçların %20'si, Rusya'da kullanılan ilaçların 1/3'den fazlası bitkisel kökenli ilaçlardır (3).

Epigallocateşin-3-gallat (EGCG) yeşil çayda bulunan en etkin kateşin olup, antioksidan aktivitesi C vitamininden 100 kat, E vitamininden 25 kat fazladır (4). Yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar ile, çay kateşinlerinin antimikrobiyal, antioksidan, anti-HIV, anti-mutajenik, antikanserojen özellikleri ve kalp-damar hastalıklarını engelleyici etkileri gösterilmiştir (4, 5, 6). Ulusal Kanser Enstitüsü'ne (NCI) göre, EGCG kanser önleyici bir maddedir (4).

Resveratrol (3,4,5 trihidroksistilben) (RES) üzüm tanelerinde bol miktarda bulunan polifenolik yapıdaki doğal bir antioksidandır. Resveratrolün antioksidan, antitümör etkilere sahip olduğunu gösteren çalışmalar vardır (7, 8). Hücre sinyal kaskadında çeşitli mekanizmalarla kanseri önleyici aktivitesi gösterilmiştir (9).

Bu çalışmamızda, epigallocateşin-3-gallat ve resveratrolün sıçan C6 glioma hücre soyunda, hücre canlılığı ve hücre proliferasyonu üzerine in vitro etkilerini doz ve zamana bağlı olarak araştırmayı amaçladık.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. KANSER

Kanser, epigenetik ve genetik birtakım değişiklikler sonucu organizmanın belli bir bölgesindeki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize olan neoplazinin kesin formlarını tanımlamak için kullanılan hastalıktır (1). Neoplazinin kanser olarak tanımlanabilmesi için, hücrelerin fenotiplerinin altı temel özelliği belirtilmiştir. Bu özellikler;

- 1- Apoptozun baskılanması
- 2- Sürekli proliferasyon
- 3- Büyüme sinyallerine duyarsızlık
- 4- Metastaz oluşumu
- 5- Doku invazyonu
- 6- Anjiyogenez'dir (10).

Kanser, genetik orijinli bir hastalık olup, neden olan genler iki temel alt grupta incelenebilir (1).

1- Onkogenler: Normal bir hücrede çoğalma ve farklılaşma üzerinde etkili olan genlere proto-onkogenler denir. Proto-onkogenler, aktive edici nokta mutasyonları, regülasyonlar ve gen overekspresyonlarından dolayı olan değişimler sonucunda onkogenlere dönüşürler (11). Onkogenlerin, proto-onkogenlerin mutant allelleri olarak telomerazları kodlayan veya apoptozisi bloke eden genler olduğu düşünülmektedir (1). Aktive edildiklerinde ya da ekspresyonları arttığına, tek bir mutant allel normal bir hücreyi, malign fenotipe dönüştürebilir (1). Evrim boyunca iyi korunan onkogenler, insanlardan mayalara kadar pek çok canlıda bulunmaktadır (12). Onkogenler; c-myc, L-myc, N-myc, Ras, erB-1, erB-2, BRCA-1, BRCA-2 olarak sınıflandırılırlar (13).

2- Tümör baskılayıcı genler: Hücre çoğalmasını kontrol eden genlerdir. Bu genlerin ürünleri olan proteinlerin kanser oluşumundaki rolü, hücre döngüsünü negatif yönde düzenlemeleri, yani, herhangi bir hata varsa o hatanın yeni hücrelere aktarımını engellemek için mitozu baskılamaları ile olur (14, 15). Tümör supressor genler, normal gen işlevlerini inaktive edici mutasyonlar, interstisyel delesyonlar ve hipermetilasyon ile

kaybederler. Bunlar sonucunda hücre siklusunun inhibisyonu engellenir ve tümör gelişimi görülür (16). Knudson'un iki allellik hedef (double hit) hipotezine göre, tümör supressor genlerdeki ekspresyonlar sonucu ortaya çıkan tümörler, bir allelin dominant negatif mutasyonu veya her iki allelde görülen fonksiyon kaybıyla ortaya çıkarlar (1, 15, 17). Tümör supressor genler; p53, Rb, p16, FHIT, bcl-2 olarak sınıflandırılırlar (13).

KontROLSÜZ hücre çoğalması sonucu meydana gelen ve bir yüzeyde şişlik meydana getiren hücre topluluklarına tümör adı verilir. Tümörler davranışlarının değerlendirilmesine göre malign ve benign olmak üzere ikiye ayrılır.

Malign tümörler; kanser özelliklerini taşıyan tümörlerdir. Bu tümörlerin hücreleri, çevre dokulara kan dolaşımı, lenf sistemi, vücut boşlukları ya da yüzeyleri yolu ile yayılarak o doku ve organlarda yeni tümörler oluştururlar. Buna metastaz denir. Malign tümörlerin en çok görülen özelliklerinden biri metastazdır. Malign tümörler anaplastik özellik gösterirler ve farklı düzeyde diferansiasyon gösterirler.

Benign tümörler; başlangıç bölgeleriyle sınırlı kalan tümörlerdir. Metastaz görülmez. Morfolojik ve fonksiyonel olarak normal dokuya benzerler.

Kanser, vücuttaki hücrelerden herhangi birinin anormal çoğalması ile ortaya çıktığı için gerek davranış, gerek tedavi yöntemi, gerek de tedaviye yanıt açısından büyük ölçüde değişiklik gösteren çok sayıda türe sahiptir. Tıbbi Onkoloji Derneği'ne göre, en yaygın görülen kanser türleri; lenfomalar, akciğer, kolon, meme, rahim ve rahim ağzı kanserleridir.

Genel olarak kanserler üç ana kategoride incelenirler.

1-Karsinomalar: Epitelial orijinli malign tümörlerdirler. Tüm kanserlerin %90'ını oluştururlar.

2-Sarkomlar: Mezenşimal orijinli malign tümörlerdir. Tüm kanserlerin %3'ünü oluştururlar.

3-Lenfoid maligniteler: Lenfatik sistem ve periferik kan boyunca yayılan tümörlerdir. Tüm kanserlerin %7'sini oluştururlar.

Hastalar, kanser tipine ve gelişim evrelerine bağlı olarak, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yöntemlerinin tek başlarına ya da beraber kullanılmaları ile tedavi edilir (18). Klasik tedavilerin yanısıra hastalar tedavi süresince enerji tedavileri, bitkisel tedaviler, akupunktur ve meditasyon gibi çeşitli destekleyici ve alternatif tedavileri de denemektedirler. Bunlar arasında dünyada ve ülkemizde en çok başvurulan yöntem bitkisel

tedavilerdir (19, 20). Bunun nedeni hastaların yararı bilinen, doğal tedavi yöntemlerini tercih etmeleridir (21).

4.2. BEYİN TÜMÖRLERİ

Beyin tümörleri, beyin hücrelerinin farklılaşarak kontrolsüz çoğalması ve kitle halini almasıyla oluşur. Tümörün büyümesi ve gelişmesi sonucunda, beyinin bölgelerine baskı yapılı ve kafatası içindeki basıncın artarak şiddetli baş ağrılarını neden olabileceği gibi, birçok organda da olumsuz bulgulara rastlanır.

Beyin tümörlerinin etiyolojileri tam olarak bilinmemekle beraber, kimyasal faktörlerin, radyasyonun, çevre kirliliğinin, genetik faktörlerin tümör oluşumu ve gelişimi üzerine etkili oldukları düşünülmektedir (22).

Beynin kendisinden (glial tümörler) ve çevresindeki zarından (menenjiomalar) gelişenler birincil beyin tümörleri, başka organlardan yayılımla (metastazlar) gelişenler ise ikincil beyin tümörü olarak değerlendirilmektedir. İkincil tümörler daha sık görülmektedir. Bunların dışında sinirlerden gelişenler (nörinom) ve beyin damarlarından gelişenler de (hemangiomlar) vardır. Beyin tümörlerinin %70'ini birincil beyin tümörleri, %30'unu ise ikincil beyin tümörleri oluşturur (23). Bütün kanserlere bağlı ölüm oranlarının %2'sini birincil beyin tümörleri oluşturur (24, 25).

Primer beyin tümörlerinin %60 kadarı glial tümörler olup, bunların da yaklaşık olarak 2/3'ünü agresif glial tümörler oluşturmaktadırlar (22, 26). Glial tümörler astrosit ya da oligodendrositlerden kaynaklanırlar (22). Astrositik tümörler; patolojik özelliklerine göre, astrositoma, anaplastik astrositoma ve glioblastoma multiforme olarak üçe ayrılırlar. Oligodendrogliyal tümörler ise, oligodendroglioma ve anaplastik oligodendrogliomalar olmak üzere ikiye ayrılırlar (22).

Merkezi sinir sisteminin malign tümörleri arasında en ölümcül seyirli olan ve en sık görülen tümör, glioblastoma multiformedir (GBM) (27, 28, 29, 30). Glioblastoma multiformenin önemli özellikleri; hızlı çoğalma, beyin dokusuna invazyon, nekroz, anjiyogenez, mikrovasküler proliferasyon ve migrasyondur (31). Her yaşta görülebilen GBM en sık 5-9 yaş arasında ve 60-69 yaşları arasında görülür (32). Beyaz ırkta ve erkeklerde daha sık görülmektedir (16). GBM tanısı için, mikroskopik olarak nükleer

polimorfizm, nekroz, mitotik aktivite, endotelial hiperplazi bulgularının en az üçünün olması gerekir (25).

Çeşitli tedavilere rağmen ortalama yaşam süresinin 1 yıl olması nedeni ile yeni tedavi yöntemlerinin bulunması amacıyla son yıllarda yoğun olarak araştırılan bir konudur.

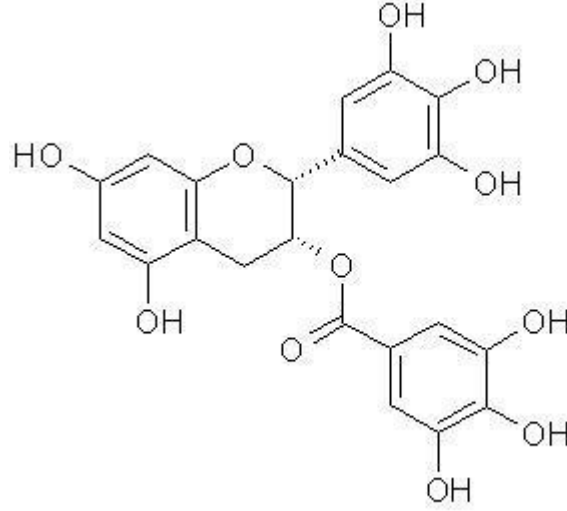
4.2.1. C6 Glioma Hücreleri

Malign beyin tümörlerinin oluşum ve gelişim evrelerinin anlaşılmasında ve bunlara yönelik tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde, tümörün kendisinden elde edilen, sınırsız mitotik aktiviteye sahip hayvansal kökenli hücre dizileri vazgeçilmez kaynaklardır (16, 33, 34).

İlk olarak 1968 yılında Benda ve arkadaşları tarafından Wistar-Furth sıçanlarına N-N' nitrozometilüre uygulanmasıyla oluşturulan C6 glioma tümör hattı, ilaç etkileşimi çalışmaları için tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır (35, 36, 37).

İntraserebral olarak Wistar-Furth sıçanlarına verilen C6 glioma hücreleri yüksek mitotik aktivite, tümör içi kanama, parenkimal indeksiyon, nükleer polimorfizm, tümör nekroz odakları gibi çeşitli malign glioblastoma karakteristiklerini gösterdikleri için GBM araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (16, 33, 35).

4.3. EPİGALLOKATEŞİN-3-GALLAT



Şekil 1: EGCG'nin Moleküler Yapısı

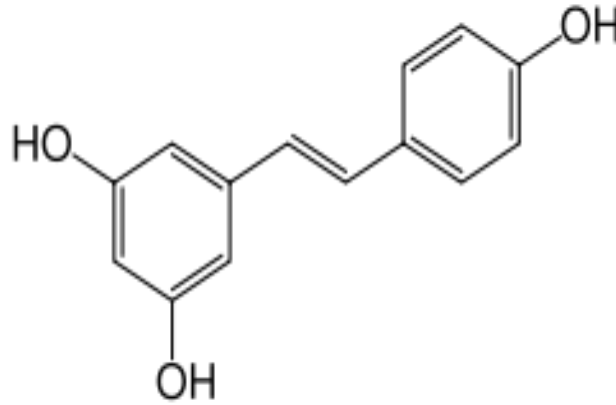
Çay, dünyada sudan sonra en çok tüketilen içecektir (38). Günümüzde ticari olarak üretilmekte olan üç tip çay vardır. Bunlar; siyah çay (%76), yeşil çay (%22) ve oolong çayı (%2)'dir (39). Bu çayların herbiri *Camellia sinensis* bitkisinin yapraklarından üretilir ve en önemlisi polifenoller olmak üzere çeşitli bileşikler içerirler (40). Yeşil çayın diğer bileşenleri, kafein, theanin, vitaminler, organik asitler, polisakkaritler, protein, lignin, florid ve mineraller'dir (41). Polifenollerin miktarı; genetik özelliklere bağlı olduğu gibi, iklim, ışık, yağış miktarı gibi çevresel faktörlere bağlı olarak da değişiklik gösterir (42).

Yeşil çayın kuru ağırlığının %30-42'sini kateşinler oluşturur. Çay yapraklarında bulunan kateşinler: Epigallokateşin-3-gallat (EGCG), Epigallokateşin (EGC), Epikateşin-3-gallat (ECG) ve Epikateşin (EC)'dir (40). Çay flavanollerinin farklı antioksidan etkileri; hidroksil gruplarının sayısı, bağlandıkları yerler ve galloil parçalarının varlığına bağlıdır (43, 44). Buna göre çay yapraklarında bulunan major kateşinlerin antioksidan aktiviteleri epigallokateşin gallat>epigallokateşin>epikateşin gallat>epikateşin olarak sıralanmaktadır.

Yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar ile, çay kateşinlerinin antimikrobiyal, antioksidan, anti-HIV, antikanserojen özellikleri ve kalp-damar hastalıklarını engelleyici etkileri gösterilmiştir (4,5,45).

İn vitro bir çok çalışmada, çay kateşinlerinin, özellikle EGCG'nin, melanoma, akciğer kanseri, meme kanseri, kolon kanseri ve lösemiye de içeren insan tümör hücreleri soylarında tümör büyümesini önlediği gösterilmiştir (46, 47). C6 glioblastoma multiforme, U-87 ve U-373 hücreleri ile yapılan bir çalışmada EGCG'nin apoptotik etkileri ve bu etkilere sebep olan maddenin de insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) olduğu gösterilmiştir (48). EGCG'nin tümör hücrelerinin yayılmasında önem taşıyan MMP-9 ve MMP-2'nin aktivitelerini azalttığı da yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (49, 50).

4.4. RESVERATROL



Şekil 2: RES'in Moleküler Yapısı

Resveratrol (RES) (3,4',5-trihidroksi-stilben) bir çok bitki tarafından bakteri ve fungi gibi patojenlere, sıcaklık dalgalanmalarına, UV ışınlarına ve yaralanmaya karşı doğal olarak üretilen bir fitoaleksindir. Resveratrol, ilk olarak 1940 yılında Michio Takaoka tarafından *Veratrum grandiflorum* O.Loes.'in (beyaz helleborus) kök bileşenlerinde tanımlanmıştır (51). Daha sonra 1977 yılında Langcake, resveratrolün *Vitis vinifera* (asma) yapraklarında UV ışınlarına ve fungal enfeksiyonlara karşı sentezlendiğini göstermiştir (52).

Resveratrol bu güne kadar yapılan çalışmalarda 72 tür, 31 cins ve 12 familyada tespit edilmiştir (53). Bununla beraber, öncelikle *Polygonum cuspidatum* (çoban değneği), *Vitis vinifera* (asma), *Vaccinium* sp. (kızılcık), *Veratrum grandiflorum* (beyaz çöpleme), *Arachis hypogea* (yer fıstığı) ve *Morus rubra* (dut) bitkilerinde bulunur (54). Çin ve Japon

geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanılan *Polygonum cuspidatum* bitkisinin kökü en zengin trans-resveratrol kaynağı olarak kabul edilir (55).

Resveratrol; antioksidan, antikanserojen, antiviral, antiinflamatuvar, kalp koruyucu ve kolesterol düşürücü özellikleri ile tıp alanında pek çok çalışmada kullanılmıştır.

Hayvan modellerinde yapılan ilk çalışmalarda resveratrolün kanser riskini tümör growth faktörü engelleyerek ve kanser hücrelerini apoptoza yönlendirerek azalttığı görülmüştür (56). Laboratuvar ortamında, düşük konsantrasyonlarda kullanılan resveratrolün insan lösemi hücrelerinde apoptozu başlattığı görülmüştür (57). Laboratuvar ortamında yapılan başka çalışmalarda da resveratrolün meme kanseri hücre soylarında, medulloblastoma hücre soylarında ve kolon kanseri hücrelerinde apoptozu başlattığı ve tümör büyümesini engellediği gösterilmiştir (58). Bunun yanısıra, prostat kanserinin önlenmesi ve tedavisinde etkilidir (59). Koroner kalp hastalıkları riskini trombosit kümeleşmesini ve LDL oksidasyonunu önleyerek azaltır (60). Çeşitli çalışmalarla, anti-proliferatif etkisi de kanıtlanmıştır (61).

4.5. APOPTOZ

Apoptoz, organizmadaki hücrelerin fizyolojik olan ya da olmayan sebeplerle komşu hücrelerden ayrılarak bazı değişikliklerden sonra yok olmasıdır (62).

Fizyolojik hücre ölümü 1920'lerden beri bilinmesine rağmen, apoptoz ilk olarak Kerr ve ark. tarafından 1972 yılında karaciğer hücrelerinde tespit edilmiş ve adlandırılmıştır (63, 64). Kerr'in büzüşme nekrozu olarak tanımladığı bu olayda, ölen hücrelerin çekirdeklerindeki kromatin parçalarının yoğunlaştığı gözlemlenmiş ve organallerin iyi korunduğu fark edilmiştir. Wyllie'nin 1980 yılında yaptığı çalışma ile, apoptozun ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiştir. Buna göre; olgunlaşmamış timus hücreleri, glukokortikoidlere maruz bırakılmış ve apoptoz gözlenmiştir. Daha sonra apoptotik hücre DNA'sına elektroforetik jel ayrımı yapılmış ve hücrede DNA bütünlüğü kalmadığı, apoptotik hücrelerde karakteristik olan merdiven şeklinde DNA bantlarının olduğu gösterilmiştir (65). Cohen, yaptığı çalışmalar sonucunda apoptozun genetik mekanizmalarla kontrol edildiğini göstermiştir (66). Çalışmalarında, timus hücreleri üzerinde yüksek doz steroid kullanarak, önce hücreleri apoptoza yönlendiren genlerin

aktive edildiğini, daha sonra timus hücrelerinin apoptoza yönlendirildiğini ortaya çıkarmıştır (67).

4.5.1. Apoptozun Temel İşlevleri

Canlılarda embriyo döneminden, ölüme kadar bir çok evrede görev alan apoptoz, organizmadaki gelişim sürecindeki organizasyonun tamamlanması ve organizmanın devamlılığının korunmasında bazı hücrelerin ortadan kaldırılması için gereklidir (62).

Apoptozun görüldüğü olaylar başlıca şunlardır:

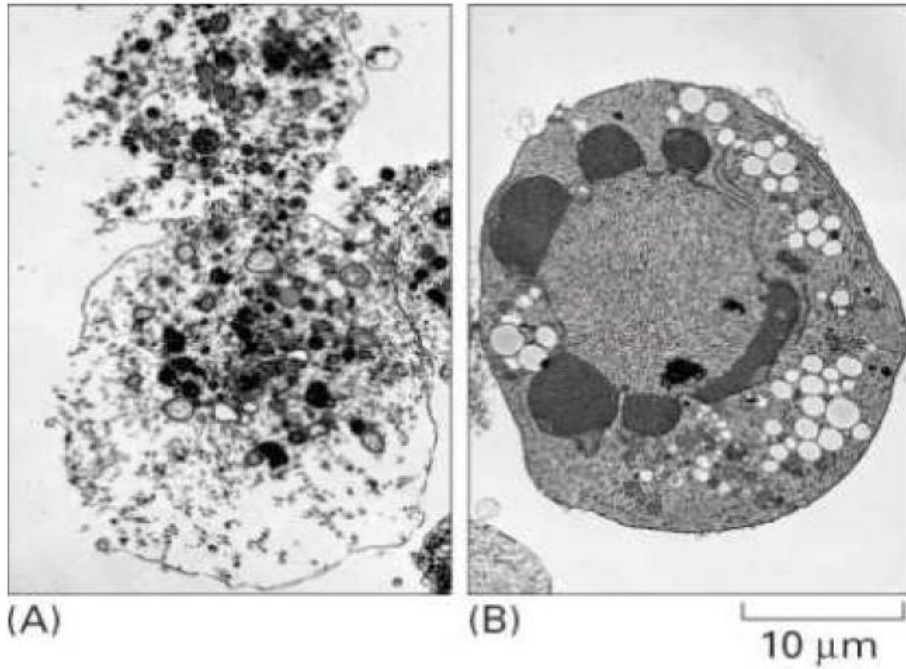
- Memelilerde intrauterin gelişimde görülen el ve ayak parmakların aralarında bulunan zarların ortadan kaldırılması, böbrek taslaklarının dejenerasyonu, kan damarlarının azaltılması (62, 68, 69).
- Embriyonik dönemin başında çok fazla üretilen nöronların azaltılması, dolayısı ile, sinir sisteminin normal şeklini alması (62).
- Metamorfoz ile kurbağa larvasının kuyruğunun ortadan kaldırılması (62)
- Erişkinde hormona bağımlı involüsyon (kadınlarda menstruasyon ile endometrium hücrelerinin yıkılması, menapozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin rejenerasyonu) (62, 70).
- Kanser hücrelerinin kemoterapi ajanları ile ortadan kaldırılması (62, 66).
- Otoimmün hastalıklarda sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümü (66).

Apoptoz sürecindeki dengenin bozulması, çeşitli hastalıkların patogeneze katkıda bulunur. Hücre ölümünün hücre proliferasyonundan fazla olduğu durumlarda organizmada, nörodejeneratif hastalıklar, arteriyosklerozis, edinilmiş bağışıklık yetersizliği sendromu (Acquired Immune Deficiency Syndrome; AIDS), insüline bağımlı diyabet, hepatit C enfeksiyonu, miyokard enfarktüsü gibi hastalıklar görülürken; hücre proliferasyonunun hücre ölümünden fazla olduğu durumlarda ise organizmada, kanser ve otoimmün hastalıklar görülür (71, 72, 73, 74, 75).

4.5.2. Apoptoz ve Nekroz

Canlı organizmalarda hücre ölümü apoptoz ve nekroz ile gerçekleşir.

Nekroz, klasik hücre ölümü olarak adlandırılır ve fizyolojik şartlar altında meydana gelir. Aşırı ısı değişimi, oksijensiz kalma veya zararlı bir uyarı ile hücrede şiddetli bir travma meydana gelir ve genellikle hücreleri gruplar halinde etkiler (76). Morfolojik olarak, endoplazmik retikulum, golgi kompleksi ve mitokondri gibi organellerde şişme görülür. Plazma membran iyon transportunun bozularak, hücre içine Ca ve su girişi gözlenir. Fazla Ca girişi ile hücrelerde endonükleazlar aktifleşir ve DNA'da kırıklar oluşarak, nükleus zarı parçalanır. Fazla su girişi nedeniyle de, hücreler şişer ve parçalanır. Hücrelerin parçalanması ile hücre içi bileşenleri ve lizozomal enzimler hücre dışı ortama dökülür. Bu enzimlerin komşu hücre ve dokuları zedelemesiyle inflamasyon meydana gelir (62, 76, 77).



Resim 1: Nekroz ve apoptozun elektron mikroskobu görüntüleri

A) Nekroz B) Apoptoz

Apoptoz, birçok özelliği ile nekrozdan farklılık gösteren hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelen bir ölüm şeklidir (72). Apoptoz, hücre membranında bleb oluşumu, hücre hacminde azalma, kromatin kondansasyonu, plazma membranının ve hücre organellerinin bütünlüğünün korunması ve DNA'nın nükleus içi nükleozom uzunluğundaki (yaklaşık 200Mb) fragmanlara endonükleotik kesimi ile karakterizedir. Apoptotik hücre ölümü, dokuda bir bölgedeki birçok hücreyi etkilemek yerine, tek başına bir hücreyi etkileyen ve aktif enerji tüketimi gerektiren bir

olaydır (68, 79, 80). Apoptozun en önemli özgül yönü, spesifik sistein proteazların (kaspazlar) aktivasyonu ile nukleus içinde DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180–200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsünün ortaya çıkmasına neden olur. Bununla beraber, bu durum hücre tipine bağlı olarak değişebilir ya da sadece yaklaşık 50 kilobaz çifti (kbp) boyutunda bir DNA fragmentasyonu da görülebilir (81). Morfolojik olarak görülen ilk değişiklik kromatinin nukleus zarının altında yoğunlaşmış ve kondanse olmasıdır. Kromatin kondansasyonundan sonra nukleus küçük parçacıklara ayrılır, hücre büzülür ve küçülür. En sonunda da çevreleri zar ile sarılmış, apoptotik cisimlere ayrılır. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri de, normalde hücre zarının iç yüzünde bulunan fosfolipidlerin'in erken evrede zarın dış yüzüne doğru yer değiştirmesidir. Bu mekanizma ile fosfolipidler, fagositik hücreler için sinyal verirler. Böylelikle apoptoz yolu ile ölen hücreler dokulardan temizlenir ve inflamasyon oluşumu görülmez (77, 82).

Hem nekroz, hem de apoptozun histolojik ve fizyolojik nedenlerinde büyük farklılıklar vardır (83, 84). Nekrozun en yaygın nedeni, oksijen yetersizliği anlamına gelen hipoksi'dir. Bununla beraber, arsenik, siyanid, insektisitler gibi toksik maddeler ve ağır metallerin yüksek konsantrasyonları, iskemi, hipertermi, litik viral enfeksiyonlar ve şiddetli oksidatif stres de nekroza neden olan etkenlerdir (4, 85). Bir hücrenin apoptozuna neden olan etkenler ise; büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması, HIV, kanser ilaçları, yüksek doz glukokortikoid, Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu, sitotoksik T lenfositler, ve çok şiddetli olmayan oksidatif stres'dir (4, 86).

ÖZELLİK	NEKROZ	APOPTOZ
Yol açan nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stres	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stres
Morfolojik özellikler	Hücre membran bütünlüğünün kaybı Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntakt hücre membranı, membranda ceççiklerinin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Hücrenin intakt mitokondri, ribozom, nükleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon hemostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4°C 'de gerçekleşebilir DNA rasgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu (ölümün geç safhasında)	İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4°C' de gerçekleşmez DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven paterni) Prelitik DNA fragmentasyonu (erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı bir arada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler İnflamasyon görülmez

Çizelge : Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması (86)

4.5.3. Apoptoz Mekanizmaları

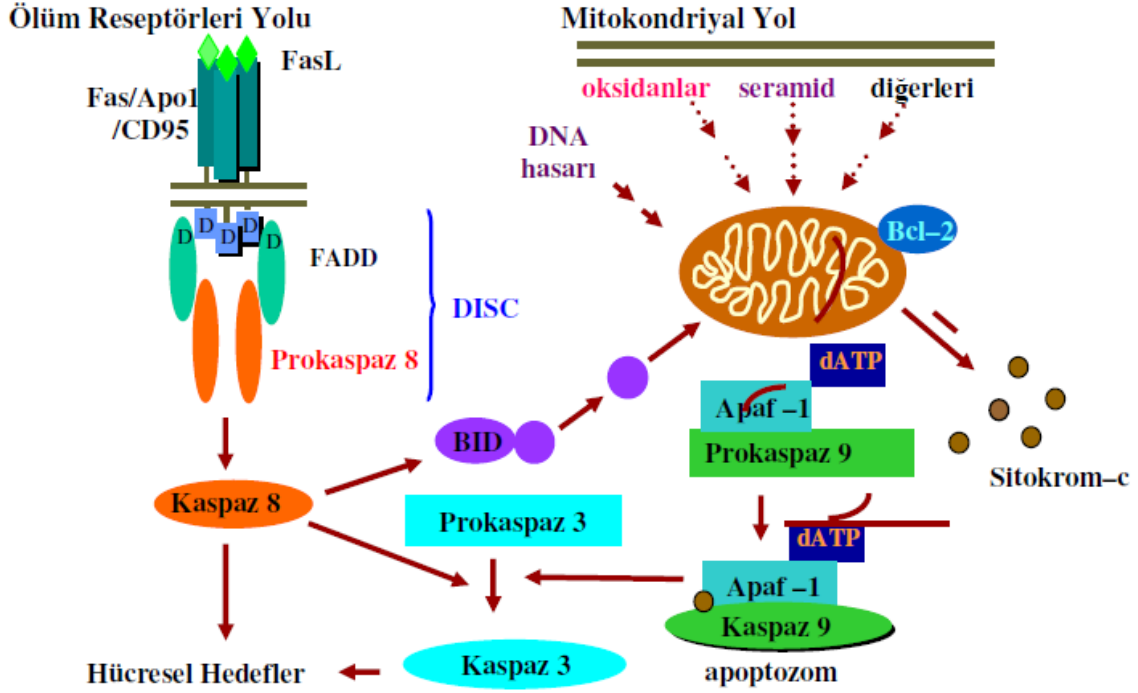
Apoptoz, çeşitli dış uyaranlar ya da iç sinyaller tarafından aktive edilir (87). Hücrelerin apoptoza gitmelerine pozitif ve negatif sinyaller arasındaki dengenin bozulması neden olur.

Pozitif sinyallerin kesilmesi; nöronlar için NGF ve lenfositler için interlökin-2'nin kesilmesidir (62).

Negatif sinyallerin alınması; TNF, Fas-ligand ve limfotoksin gibi proteinlerin uyarılarının alınmasıdır (62, 88).

Apoptozda görülen değişikliklerin çoğu, kaspazların aktive olmaları ile gerçekleşir. Apoptozun indüklenmesinde, temel olarak 3 yol vardır. Bunlar;

- 1- Mitokondriyal Yol ile Apoptoz
- 2- Dış sinyaller Yolu ile Apoptoz
- 3- Endoplazmik retikulum Aracılı Apoptoz



Şekil 3: Apoptoz sinyal yolları

4.5.3.1. Mitokondriyal Yol ile Apoptoz

Apoptozu başlatan yolların kavşak noktasının mitokondri olduğu belirlenmiştir. Özellikle mitokondri iç membranında bulunan ve elektron transport zincirinin bir üyesi olan sitokrom-c'nin salıverilmesi, apoptozu geri dönüşmez bir şekilde başlatır. Sitokrom-c, mitokondriden apoptoz indükleyici faktör (AIF) ile beraber sitoplazmaya salınır. Bunun ardından, sitokrom-c sitoplazmik bir protein olan apoptotik proteaz aktive edici faktör (APAF-1)'e bağlanır ve onu aktive eder. ATP'nin de katılımıyla "apoptozom" adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise kaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla

aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü'nü (ICAD, Inhibitor of Caspase-Activated Deoxyribonuclease) inaktifleştirir. Böylece, ICAD'ın bağlandığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD, Caspase-Activated Deoxyribonuclease) serbestleşir ve bu da apoptozun karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (2).

4.5.3.2. Dış Sinyaller Yolu ile Apoptoz

Ölüm aktivatörleri olarak bilinen Fas (APO-1,CD95) ve tümör nekroz faktör (TNF)'ün hücre yüzeyinde yer alan Fas-L ve TNF-1 reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplazmaya prokaspaz -8'i aktive eden sinyaller gönderilir. Aktive olan kaspaz-8 de, kaspaz kaskadını tetikleyerek apoptoz oluşturur (89, 90).

4.5.3.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz

Endoplazmik retikulum (ER), hücre içi kalsiyum deposu olarak görev alır (91). Bunun yanı sıra, ER stresinin, hücre ölümünü tetiklediği ve çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patogenezi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (2). Kaspaz-12 ER membranında yer alır ve bu yolla oluşan apoptozda gerekli bir kaspazdır. Hücre içindeki artan kalsiyum seviyesi kaspaz-12'nin aktive olmasına neden olur ve kaspaz-9 ile etkileşerek kaspaz kaskadını aktive eder (92, 93).

4.5.4. Apoptozun Düzenlenmesinde Görev Alan Genler

4.5.4.1. Kaspazlar

Kaspazlar, apoptoz olayının en son efektörü olup, proteaz olarak görev yaparlar ve hücreyi apoptoza uğratırlar (62, 94). Kaspazlar, normalde hücrede inaktif proenzimler olarak sentezlenir. Bir kısmı, kendileri aktifleşerek görev yaparlarken, bir kısmı da diğer kaspazlar tarafından proteolitik parçalanmalarından sonra aktif hale geçerler (62) ve hücreyi apoptoza götüren reaksiyonlar başlar (94, 95). Kaspazlar, sitoplazmik proteinlerin

ya da nükleer DNA'nın kesilmesinde ve kaspaz ailesinden inaktif olan proteinlerin aktifleşmelerinde rol oynarlar (62).

Memelilerde şimdiye kadar 14 kaspaz tespit edilmiştir. Kaspazlar, 3 grupta sınıflandırılırlar. Bunlar;

-Grup I (İnflamatuar kaspazlar): Kaspaz 1, kaspaz 4, kaspaz 5, kaspaz 11, kaspaz 12, kaspaz 13, kaspaz 14. Sitokin sekresyonu ve inflamasyondan sorumludurlar. Ayrıca kaspaz 1, kaspaz 4 ve kaspaz 5 tetrapeptid olup kendi kendilerine aktive olabilmektedirler.

-Grup II (Başlatıcı kaspazlar): Kaspaz 2, kaspaz 8, kaspaz 9, kaspaz 10

-Grup III (Efektör kaspazlar): Kaspaz 3, kaspaz 6, kaspaz 7 (4, 93, 96, 97).

Apoptotik etkiden sorumlu olan kaspaz 3, hücrelerde en çok bulunan kaspaz olup, etkisi kaspaz 6 ve kaspaz 7 tarafından desteklenmektedir. Kaspaz 3'ün aktif formunun ekspresyon seviyesi genellikle apoptozu ortaya çıkarmakta kullanılmaktadır (98).

Kaspazların düzenlenmesi, apoptoz proteinleri inhibitörleri (IAP) adı verilen ve kaspaz ailesini direkt olarak baskılayarak apoptozu engelleyen bir protein ailesi tarafından yapılır (4, 94). Günümüzde 5 tanesi tanımlanmış bulunan IAP proteinleri, XIAP (X linked inhibitor of apoptosis), c-IAP1, c-IAP2, nöronal IAP ve survivindir (99). En yaygın ve en etkin olanı XIAP olup, c-IAP1 ve c-IAP2 ile beraber direkt olarak kaspaz 3, kaspaz 7 ve kaspaz 9'un inhibe edilmesinden sorumludur (99).

4.5.4.2. Bcl-2 Ailesi

Apoptozu mitokondrial seviyede kontrol eden Bcl-2 ailesi, antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşan bir onkogen grubudur (95, 99). Antiapoptotik üyelerden Bcl-2 ve Bcl-XL, kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da kaspaz akışını direkt olarak aktive eden sitoplazmadaki apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve sitokrom-c gibi apoptotik faktörlerin mitokondriden salınımını engellerler (100). Dolayısıyla, hücre apoptozu gidemez. Proapoptotik üyelerden Bax ve Bak gibi üyeler de heterodimerizasyon yoluyla kaspaz serbestleşmesini uyarır ve mitokondri zarının geçiş porlarının açıklığını değiştirerek sitokrom-c'nin sitoplazmaya salınmasını sağlarlar. Dolayısıyla kaspaz aktivasyonuna yol açarlar (100, 101).

Bir hücrenin apoptoza eğilimli oluşu heterodimer ya da homodimer formundaki Bcl-2 ailesi genlerinin etkisine bağlıdır (95). Bcl-2 ailesine ait olan tüm proteinlerde homoloji ünitesi (BH) bulunur (BH1-BH2-BH3-BH4) (99).

Bcl-2 protein ailesinin üyeleri yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre üçe ayrılırlar (102).

1- Antiapoptotik üyeler: Bu üyeler en azından BH1 ve BH2 ünitelerini içerirler ve hücreyi apoptoza karşı korurlar. En önemlileri şunlardır; Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, AI, NR13, Boo/Diva.

2- Proapoptotik üyeler: Bu üyeler apoptozda rol oynarlar ve BH4 dışındaki diğer üniteleri içerirler. En önemlileri şunlardır; Bax, Bak, Bok.

3- Sadece BH3 ünitesi içeren üyeler: Bu üyeler sadece BH3 ünitesi içerirler ve proapoptotik rolleri vardır. En önemlileri şunlardır; Bid, Bad, Bim, Bik, Bnk, Hrk.

Antiapoptotik üyelerden Bcl-2 ve Bcl-XL sadece mitokondrinin dış membranında bulunurlarken, proapoptotik üyeler sitozolde veya membranda bulunabilirler.

Bcl-2'nin ayrıca mitokondri ile olan ilişkisinden dolayı antioksidan bir etkiye sahip olduğu ve böylece oksidatif stresin neden olduğu apoptozu baskılayabildiği bulunmuştur (103, 104).

4.5.4.3. p53

Apoptozun en önemli regülatörü, DNA hasarı ile düzenlenen p53 tümör supresör genidir. Normal p53 hücre siklusunun, G1 fazında duraklamasına neden olmaktadır. Böylece DNA hasarının tamiri için gerekli süre sağlanarak mutasyonların oluşması engellenmektedir. Eğer tamir olayı gerçekleşmezse, p53 apoptozu indüklemektedir (105).

Günümüzde anti-tümör olarak kullanılan ilaçların birçoğu, p53 proteini seviyesini arttırmaya yöneliktir. Bunun sonucunda hasar tamir edilebilir veya apoptoz uyarılabilir (106, 107). Apoptozun indüklenmesinde p53'ün önemi, normal p53'e sahip kanserli hücrelerin kemoterapiye cevap vermesi, mutant p53'e sahip olanların ise kötü prognozu şeklinde karşımıza çıkmaktadır (108, 109). Memeli hücrelerinde p53 ile aynı işlevi yapan p63 ve p73 genleri de tespit edilmiştir (110).

4.5.4.4. Apoptozda Görev Yapan Diğer Proteinler

Mitokondriden salınan apoptoz indükleyici faktör (AIP) ve Endonukleaz G, kaspaz aktivasyonu olmadan hücre ölümüne neden olurlar.

AIF (Apoptoz indükleyici faktör); mitokondride görev yapan bir flavoprotein olup, apoptoz uyarısının alınmasını takiben nukleusa geçer. DNA'nın parçalanmasında ve nukleusta kromatin yoğunlaşmasında görev alır (76).

Endonukleaz G; kuvvetli nukleaz aktivite gösterir. Mitokondrideki görevi; transkripsiyon esnasında RNA-DNA hibritlerinin ayrılmasında etkili olmaktadır. Apoptoz uyarısının alınmasını takiben nukleusa geçerek DNA'nın parçacıklara ayrılmasına neden olur (76).

4.5.5. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Apoptozu belirlemek için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler; morfolojik, immünohistokimyasal, biyokimyasal ve immünolojik yöntemlerdir. Biz de çalışmamızda apoptozun saptanmasında en çok kullanılan histokimyasal yöntemlerden biri olan terminal deoksिनükleotidil transferaz (TdT)-aracılı dUTP-biotin çentik-uç etiketleme (TdT-mediated dUTP-FITC nick end-labeling, TUNEL) yöntemini kullandık.

Hücrede apoptozu belirleme yöntemlerini şu şekilde sınıflandırabiliriz; (2)

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri

- Işık mikroskobu ile : Giemsa ve Hematoksilen ile boyama
- Floresan mikroskobu / Lazerli konfokal mikroskop kullanımı ile : Hoechst boyası, DAPI, propidium iyodür ile boyama
- Elektron mikroskobu ile
- Faz kontrast mikroskobu ile

2. İmmünohistokimyasal yöntemler

- Anneksin V Yöntemi
- Tunel Yöntemi
- M30 Yöntemi
- Kaspaz-3 Yöntemi

3. Biyokimyasal yöntemler

- Agaroz Jel Elektroforezi
- Western Blotting
- Akım Sitometri
- 4. İmmünolojik yöntemler
 - Enzim ilintili immün test (ELISA)
 - Florimetrik yöntem
- 5. Moleküler biyoloji yöntemleri .

4.5.5.1. Tunel Yöntemi

Apoptozun en önemli karakteristik özelliklerinden biri, DNA üzerinde kırıklar meydana gelmesidir. Tunel yönteminde, DNA kırıklarının serbest 3'OH kısmı biotin, digoxigenin ya da florescein gibi modifiye edilmiş enzimatik etiketlerin bağlanması ile belirlenir (111). Apoptoz çalışmalarında yaygın kullanılan metodlardan biri olan Tunel, ilk kez 1992'de Gavrieli ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (112).

İşaretlenen hücreler, flow sitometri ya da immünohistokimyasal yöntemlerle incelenebilir (4).

Tunel metodu uygulanan doku kesitleri, hematoksilen ile zıt boyama yapıldıktan sonra incelenir. Parafinle bloklanan kesitler ise, sırayla deparafine ve dehidrate edildikten sonra, çeşitli tamponların ve çözeltilerin kullanıldığı işlemlerden geçirilir (95).

5. MATERİYAL VE YÖNTEM

5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR VE ÇÖZELTİLER

- 1) NaCl, Atabay AT091-950
- 2) Na₂HPO₄, Riedel-de Hæn 81890
- 3) DMEM, Sigma D5546
- 4) Nutrient mixture F-12, Sigma N6658
- 5) L-Glutamin, Biological Industries 03-020-IC
- 6) Penisilin+Streptomisin, Biological Industries 03-031-1C
- 7) Fetal Sığır Serumu, Seromed S0115
- 8) Metanol, Riedel-DC-Haen 24229
- 9) Tripsin EDTA, Biological Industries 243338
- 10) DMSO, Sigma D 2650
- 11) Apoptag plus peroxidase kit, Chemicon, S7101 millipore
- 12) Hematoksilen eosin
- 13) Epigallocatechin gallate, ≥95, 50 mg, Sigma aldrich E4143
- 14) Resveratrol, >99%, 100 mg, Sigma aldrich R5010
- 15) BrdU antikoru, Neomarker MS-1058-P
- 16) 5-Bromo-2-deoksiuridin, Sigma B-5002
- 17) AEC Substrat Kit, In vitrogen 85-9943
- 18) Histostain plus kit, In vitrogen 85-9043

5.1.1. EGCG İçin Kimyasal Data

Sinonim: (-)-*cis*-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol 3-gallate, (-)-*cis*-3,3',4',5,5',7-Hexahydroxy-flavane-3-gallate, EGCG

Moleküler Formül: C₂₂H₁₈O₁₁

Moleküler Ağırlık: 458,37

Katalog No: 989-51-5 (64).

5.1.2. Resveratrol İçin Kimyasal Data

Sinonim: 3,4',5-Trihydroxy-*trans*-stilbene, 5-[(1E)-2-(4-Hydroxyphenyl)ethenyl]-1,3-benzenediol

Moleküler Formül: C₁₄H₁₂O₃

Moleküler Ağırlık: 228.24

Katalog No: 501-36-0

5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

5.2.1. Glioblastoma Multiforme Hücre Hattı

Bu araştırmada Amerikan Hayvan Hücre Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, Maryland, USA) hücre bankasından sağlanan CCL-107 kodlu sıçan C6 hücre soyu kullanıldı. İstanbul Bilim Üniversitesi Hücre Kültürü laboratuvarında pasajlamalar yapıldı.

5.2.2. Hücre Kültürü

Çalışmamızda kullandığımız, C6 glioma hücreleri için besi ortamı; inaktive edilmiş %10 fetal sığır serumu (FCS) ve 0,2mM glutamin, 100 ünite/ml penisilin ve 100 g/ml streptomisin antibiyotikleri içeren Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Medyumu (DMEM-F12) ve besleyici karışım Ham's F12 medyumudur. C6 glioma hücreleri DMEM-F12 besiyeri içerisinde, iç ortamı %5 CO₂, %95 nem içeren ve 37°C olan inkübatörde büyütüldü. Haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi. EGCG distile su içerisinde hazırlandı. Resveratrol, 1:1 oranında dimetil sülfoksit (DMSO) ve distile su içinde hazırlandı.

RES'in etkilerini belirlemek için oluşturulan deney grubuna 12,5 µg/ml konsantrasyonunda RES eklendi.

EGCG'nin etkilerini belirlemek için oluşturulan deney gruplarına 50 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında EGCG eklendi.

RES ve EGCG'nin etkilerinin birlikte inceleneceği deney gruplarına; 12,5 µg/ml RES ve 50 µg/mg EGCG, 12,5µg/ml RES ve 100 µg/mg EGCG, 25 µg/ml RES ve 50 µg/mg EGCG, 50 µg/ml RES ve 100 µg/mg EGCG birlikte uygulandı.Tüm çalışma gruplarında 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonrasında deney sonlandırıldı.

5.3. HÜCRE APOPTOZUNUN BELİRLENMESİ

5.3.1. TUNEL Yöntemi

Tunel yöntemi, apoptotik hücreleri saptamaya yarayan, en duyarlı ve en hızlı metod olup, nükleer DNA fragmentasyonunu saptamaya dayanan biyokimsiyal bir indikatördür. Bu yöntem temelinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarını serbest 3`-OH uçlarında enzimatik bir reaksiyon ile tespit etmeye dayanır,apoptoza giden hücrelerin görüntülenmesini sağlar (113). Kromojen diamino benzidin (DAB) ile görünür hale getirilir.

TUNEL

Deney gruplarına ait hücreler, %5 CO2 inkübatörde 24saat, 48 saat ve 72 saat olacak şekilde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler 1xfosfat tampon çözeltisi (PBS) ile 5 dakika yıkandı. Sonra, metanol ile -20 derecede 5 dakika fikse edildi. Metanol uygulaması sonrası hücreler, 1xPBS`te 5 dakika bekletildi. Equilibrasyon tamponu 5 dakika oda ısısında hücrelere uygulandı. Bu aşamada her lamel için 57 µl TdT tamponu 3 µl TdT enzimi ile karıştırıldı ve hücrelere 1 saat 37 °C`de uygulandı. İnkübasyon sonrası PBS ile 3x1 yıkama yapıldı. Anti-digoksinin konjugatı lamellere oda ısısında 30 dakika uygulandı. 2x4 1xPBS ile yıkama sonrasında hücreler 1x3 distile su ile yıkandı. PBS yıkamalarından sonra, DAB peroksidaz substratı eklendi ve 5 dakika hematoksilen eozin ile zıt boyama yapıldı. Hücrelerin fotoğrafı Olympus BX-50 ışık mikroskobu ile çekildi.

5.4. HÜCRE PROLİFERASYONUNUN BELİRLENMESİ

5.4.1. BrdU Yöntemi

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU); DNA'daki nükleik asitlerin bazlarından biri olan timin (T)deki metil grubu yerine bromin atomu içerir. BrdU, kültür ortamında T ile yer değiştirir ve replikasyon sırasında DNA zincirine girer. Anti- BrdU monoklonal antikoruna ile boyanarak sayım yapılabilir veya ELISA ile ölçülebilir (114).

Bromodeoksiuridin (BrdU) İmmünohistokimyası

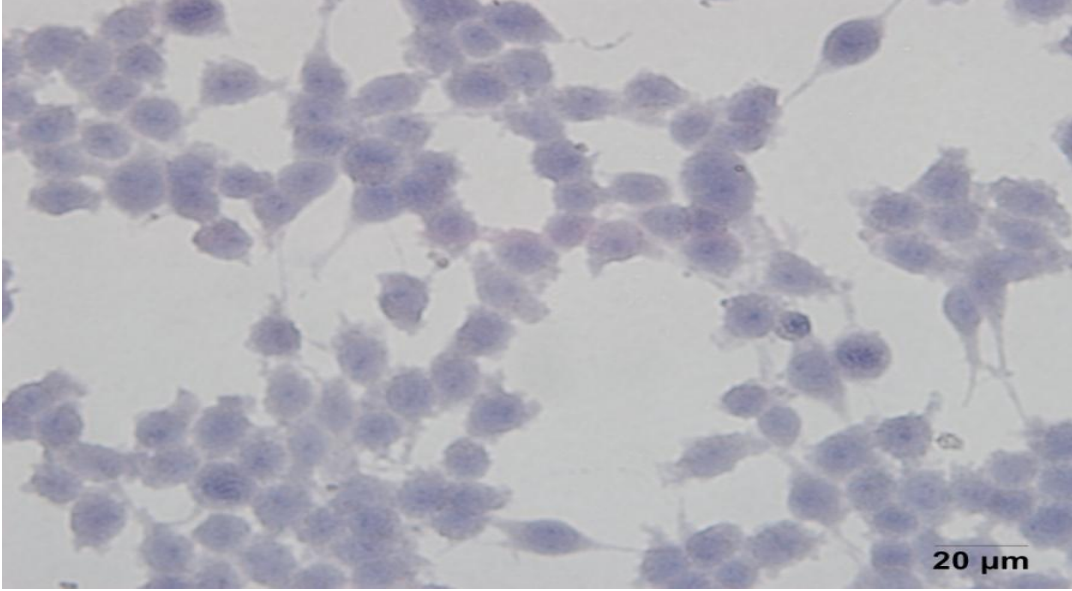
Deney gruplarına ait hücreler, proliferasyon oranlarının belirlenmesi amacıyla ile, hücre siklusunun S fazına özgü olan olan bromodeoksiüridin (BrdU) işaretleyicisinden 1mM eklenerek 1 saat süre ile 37°C'de inkübe edildi. Sonra, metanol ile fikse edilen hücrelerin DNA'sı 2N HCl ile 37°C'de 30 dakika boyunca denatüre edildi ve borat tampon ile (pH:8) nötralize edildi. PBS ile yıkanan hücrelere, spesifik olmayan reaksiyonları engellemek amacıyla ile, non-immun serumla 20 dakika blokama işlemi uygulandı. Anti-BrdU fare monoklonal antikoruna (Mouse monoclonal- NeoMarkers) ile 0.5/100 dilüsyonda, 1 saat oda ısısında bırakıldı. Primer antikor uygulamasından sonra hücreler PBS ile yıkanarak, sırayla; biyotin-HRP bağlı ve streptavidin peroksidaz sekonder antikorları (Histostain Plus Kit, Zymed) 20'şer dakika uygulandı. Spesifik renk reaksiyonunu görüntüleyebilmek için amino etil karbazol (AEC) kromojeni uygulandı.

5.5. MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRME

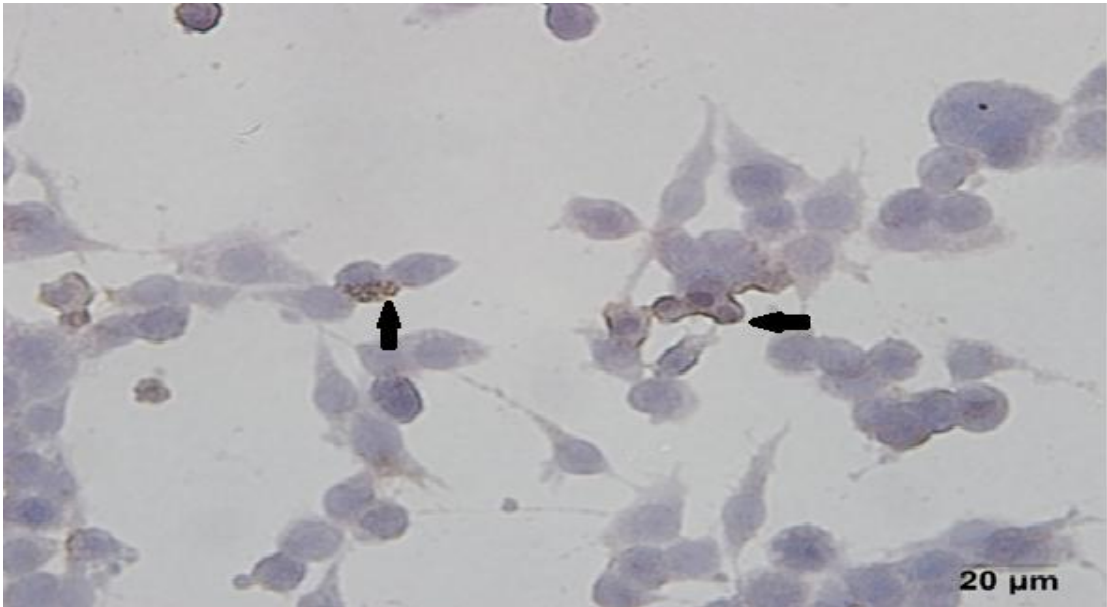
Kültüre edilen hücrelerin inceleme ve değerlendirmeleri Olympus X70 invert mikroskopta gerçekleştirildi. İmmünohistokimyasal olarak boyanan hücrelerin inceleme, değerlendirme ve fotoğraflandırma işlemleri ise Olympus BX 50 mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildi.

6. BULGULAR

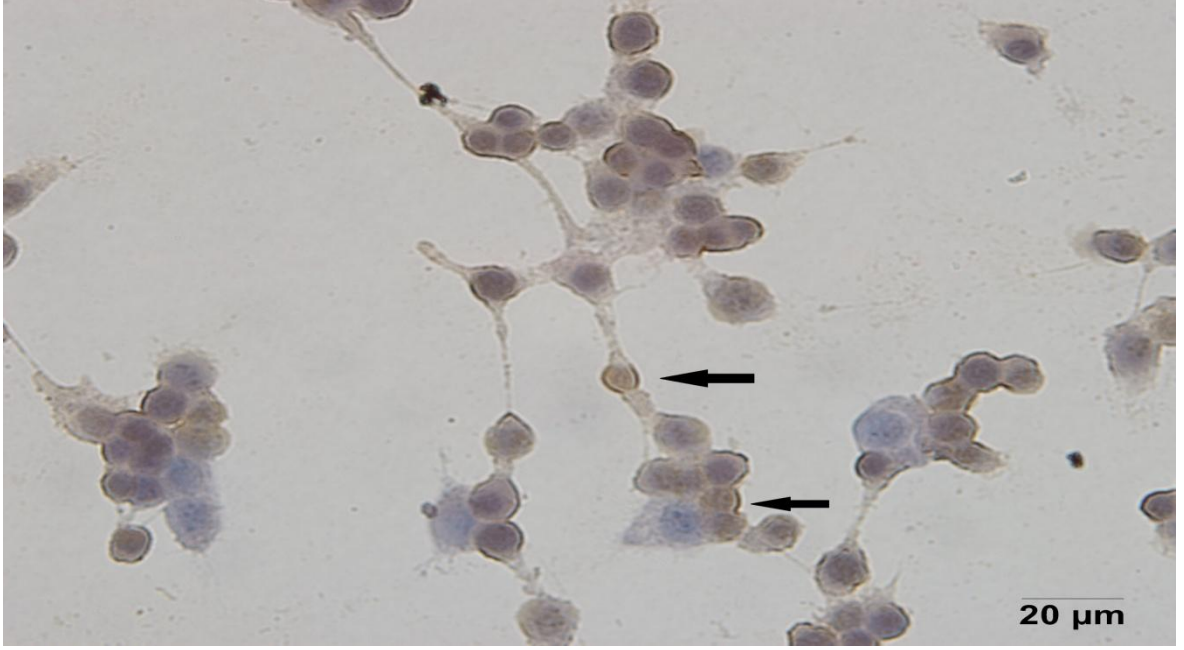
6.1. APOPTOZ VERİLERİNİN MİKROSKOBİK ANALİZİ



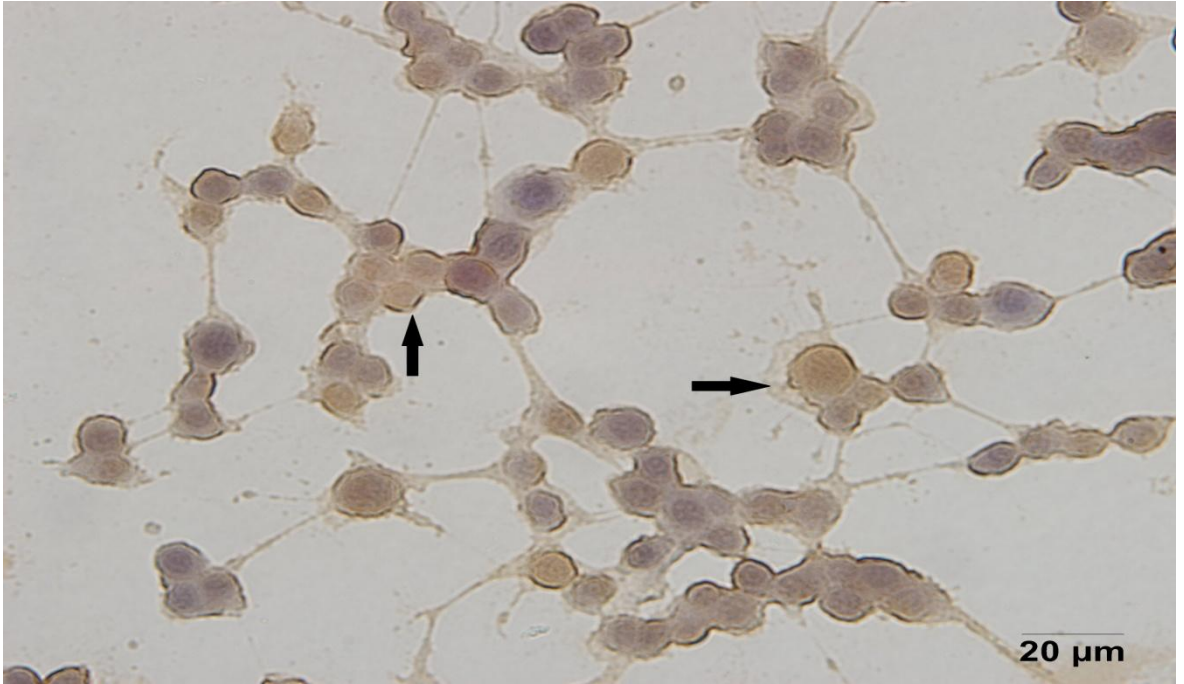
Resim 2: 24 saatlik kontrol grubu hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



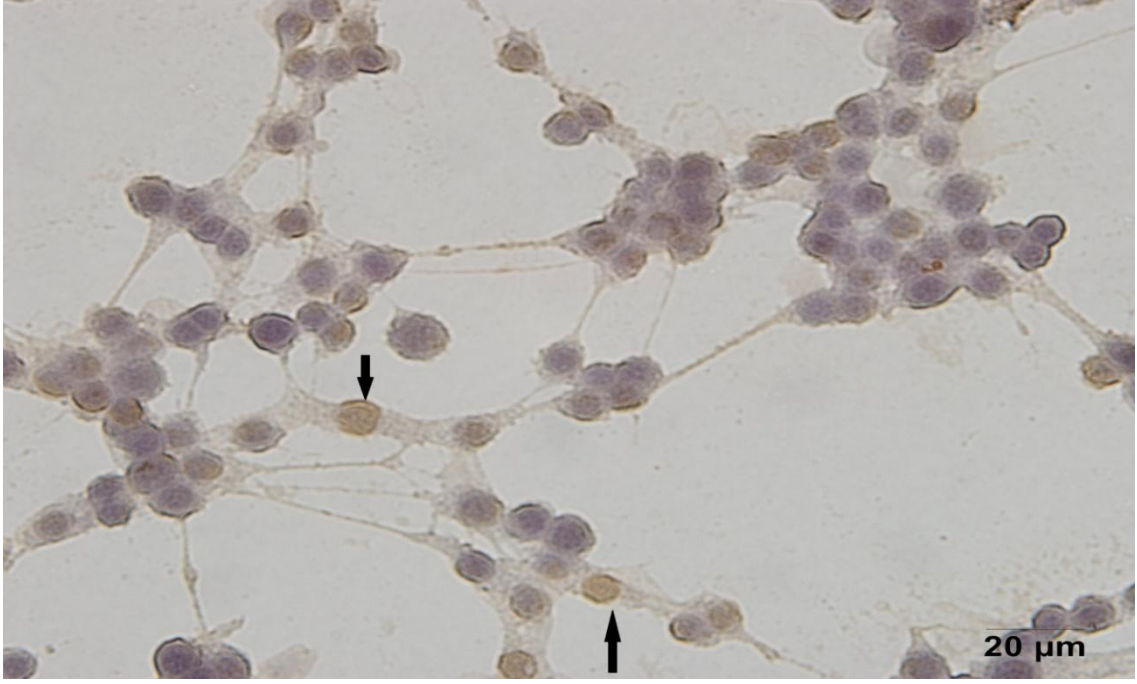
Resim 3: 24 saatlik 12,5 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



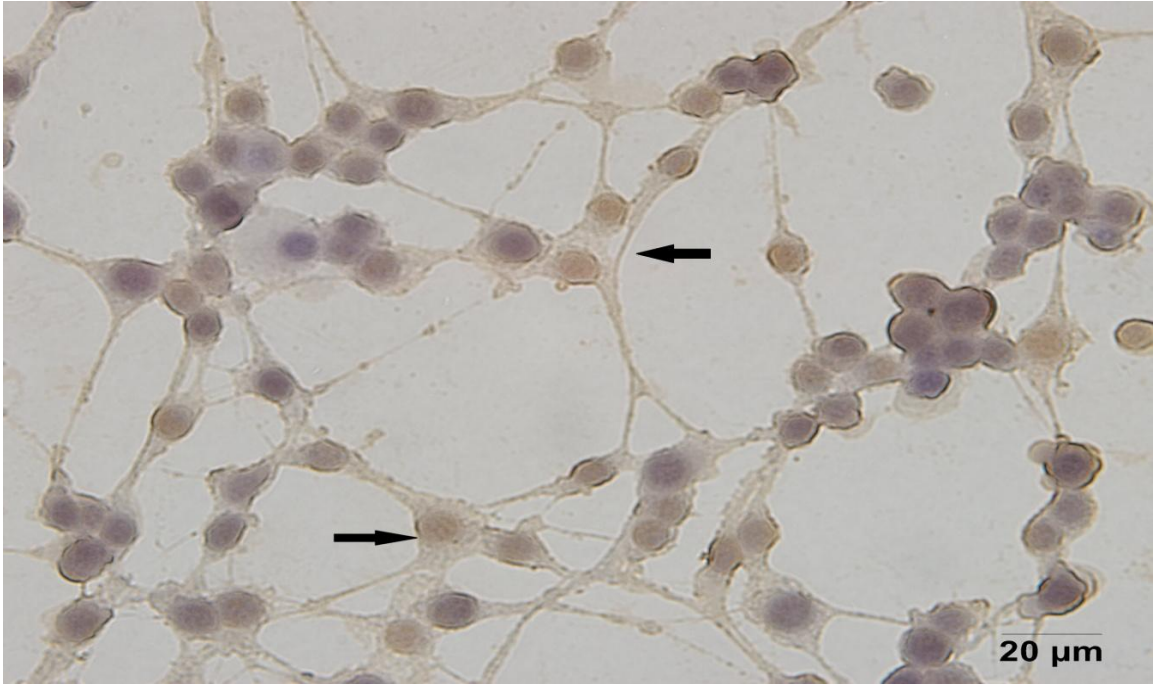
Resim 4: 24 saatlik 50 µg/ml EGCG ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



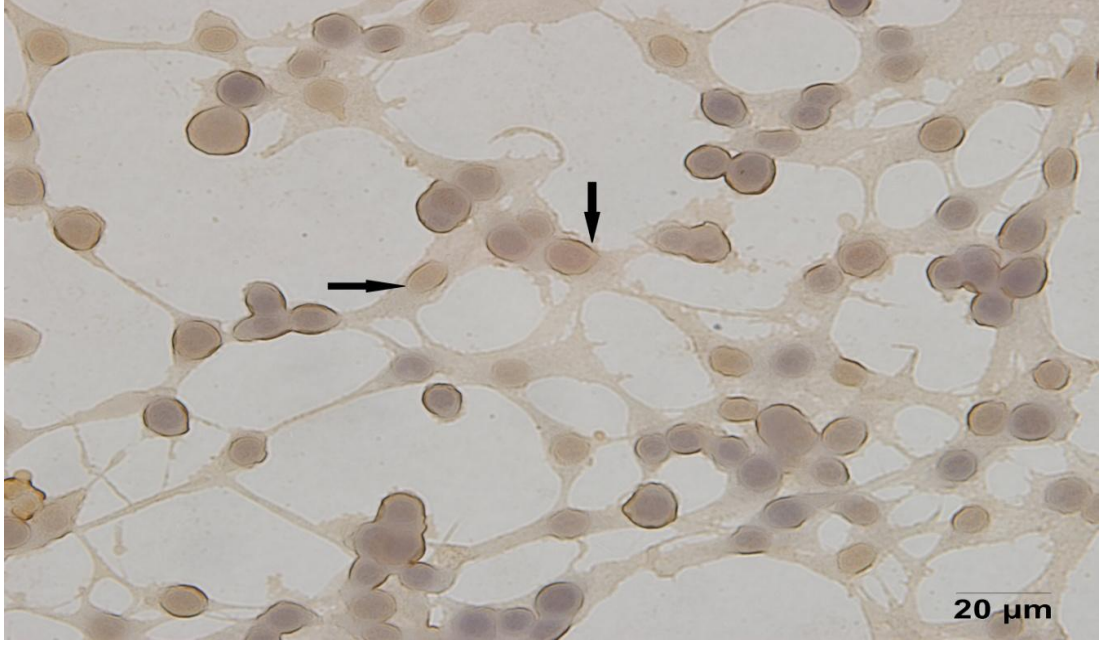
Resim 5: 24 saatlik 100 µg/ml EGCG ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



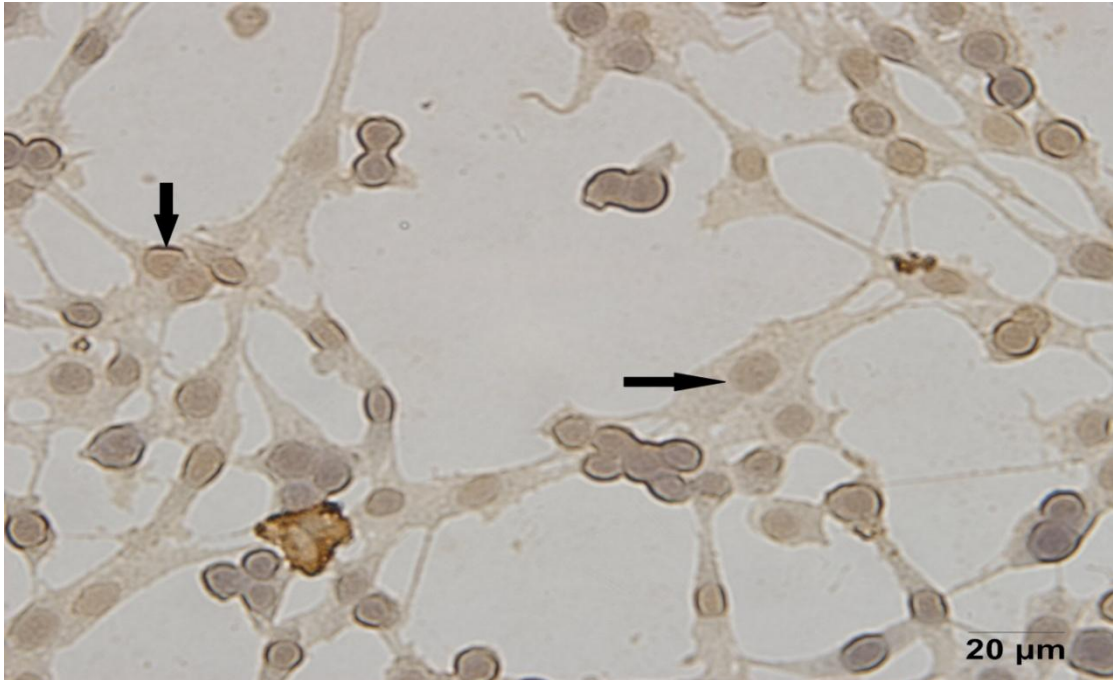
Resim 6: 24 saatlik 50 µg/ml EGCG ve 12.5 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



Resim 7: 24 saatlik 100 µg/ml EGCG ve 12.5 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



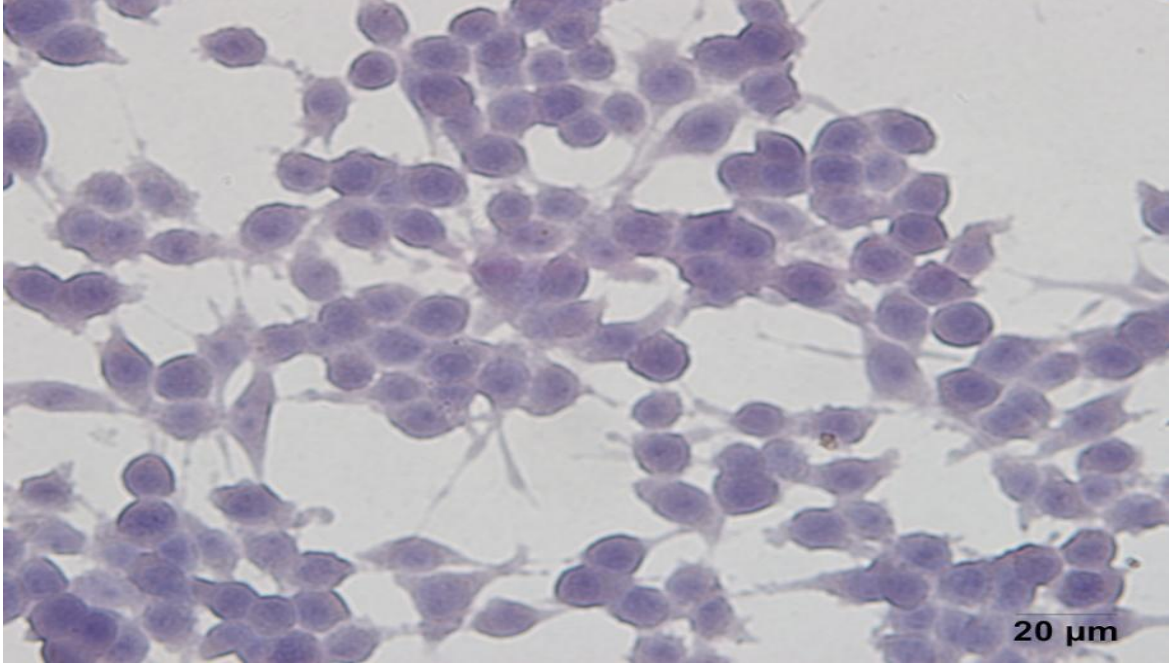
Resim 8: 24 saatlik 50 µg/ml EGCG ve 25 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



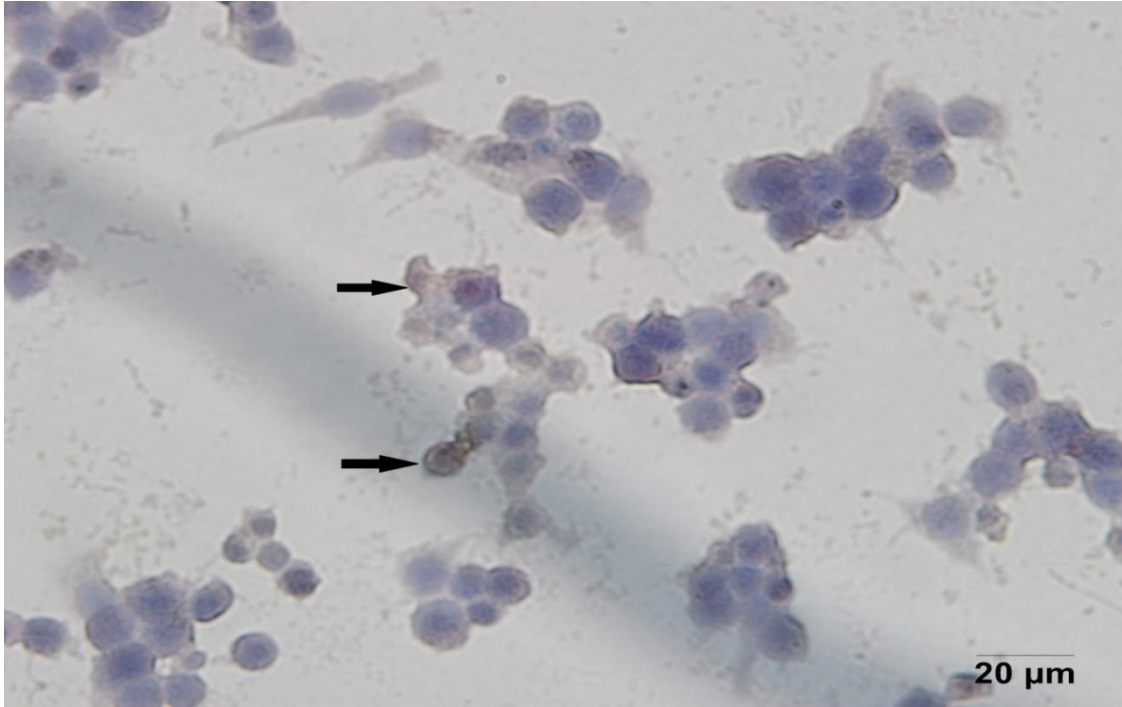
Resim 9: 24 saatlik 100 µg/ml EGCG ve 50 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100

Apoptotik verilerimizi zamana göre değerlendirdiğimizde, 24 saatlik zaman aralığında;

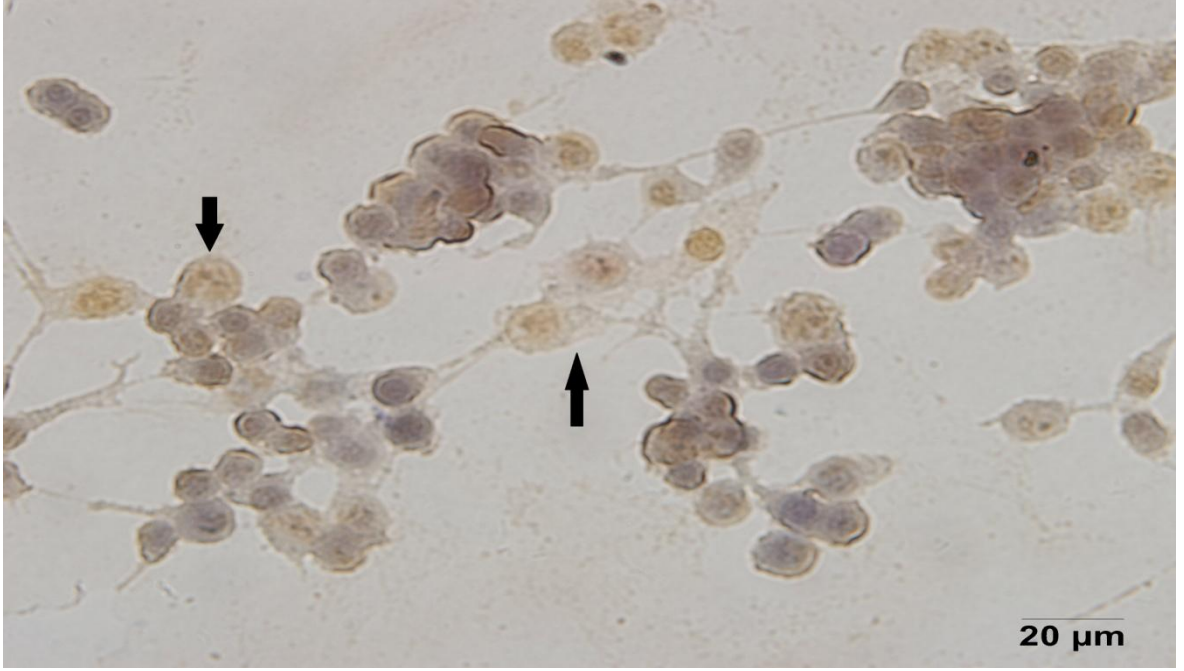
- Kontrol grubu hücrelerinde morfolojik bir değişiklik gözlenmedi. Hücreler, sağlıklı hücre morfolojisine sahipti (Resim 2).
- 12,5 µg/ml RES ile etkileşime sokulmuş C6 glioma hücrelerinde 24.saatin sonunda az da olsa, apoptoza uğramış hücelere rastlandı (Resim 3).
- 50 µg/ml EGCG ile muamele edilmiş hücrelerde düşük doz ve uygulama süresinin kısalığına bağlı olarak hücrelerde az miktarda apoptoz görüldü (Resim 4).
- 100 µg/ml EGCG ile muamele edilmiş hücrelerde, konsantrasyondaki artışa bağlı olarak apoptoza uğramış hücelerde artış görüldü (Resim 5).
- 12,5 µg/ml RES ve 50 µg/ml EGCG grubunda, apoptoza uğramamış C6 glioma hücrelerinde azalma görüldü (Resim 6).
- 12,5 µg/ml RES ve 100 µg/ml EGCG grubunda, apoptoza uğramamış C6 glioma hücrelerinde azalma görüldü (Resim 7).
- 25 µg/ml RES ve 50 µg/ml EGCG grubunda, apoptoza uğramamış C6 glioma hücrelerinde azalma görüldü (Resim 8).
- 50 µg/ml RES ve 100 µg/ml EGCG grubunda, apoptoza uğramayan çok az C6 glioma hücresi gözlenmiştir (Resim 9).



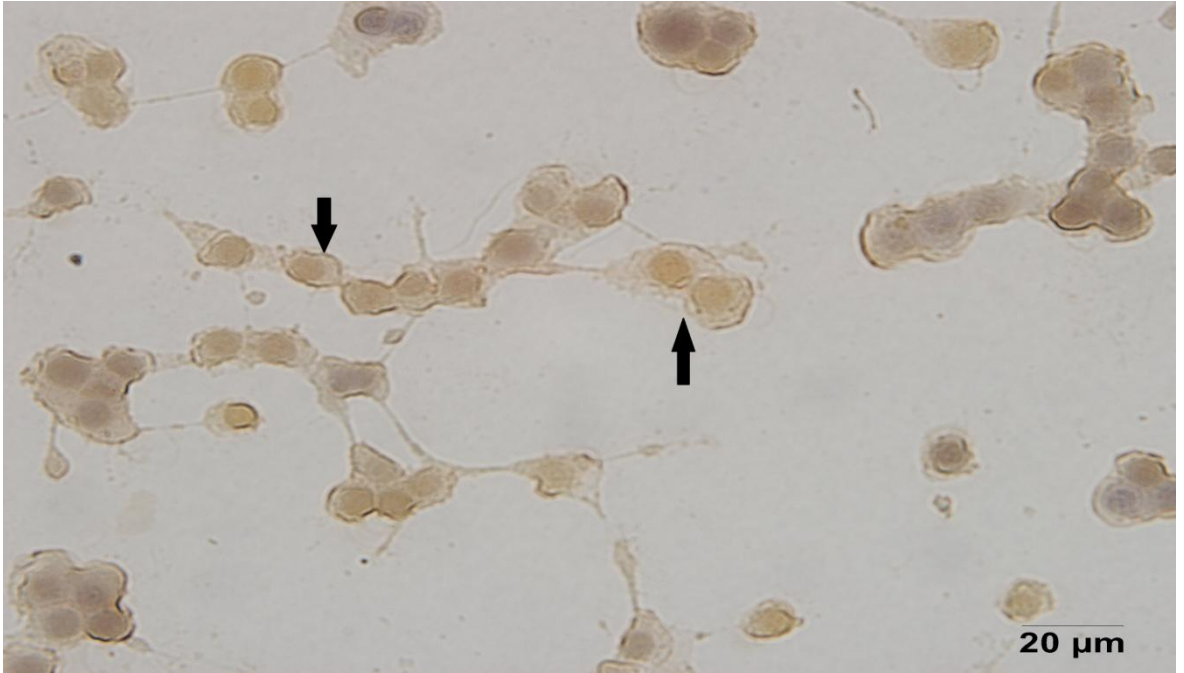
Resim 10: 48 saatlik kontrol grubu hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



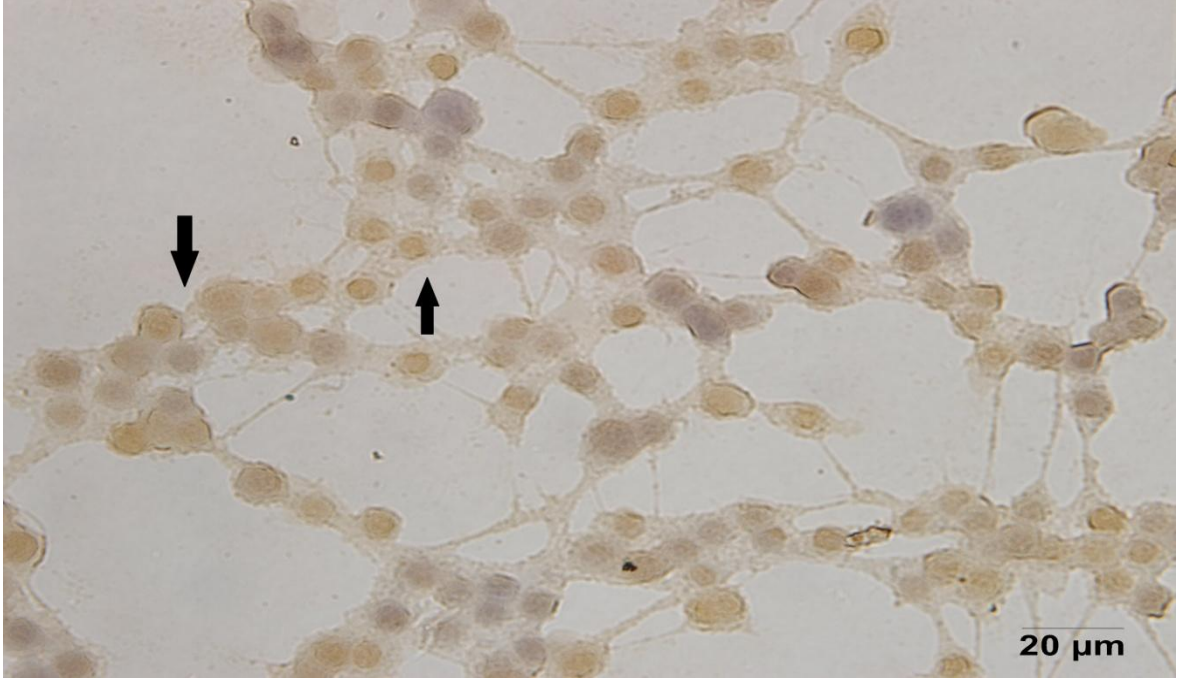
Resim 11: 48 saatlik 12,5 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



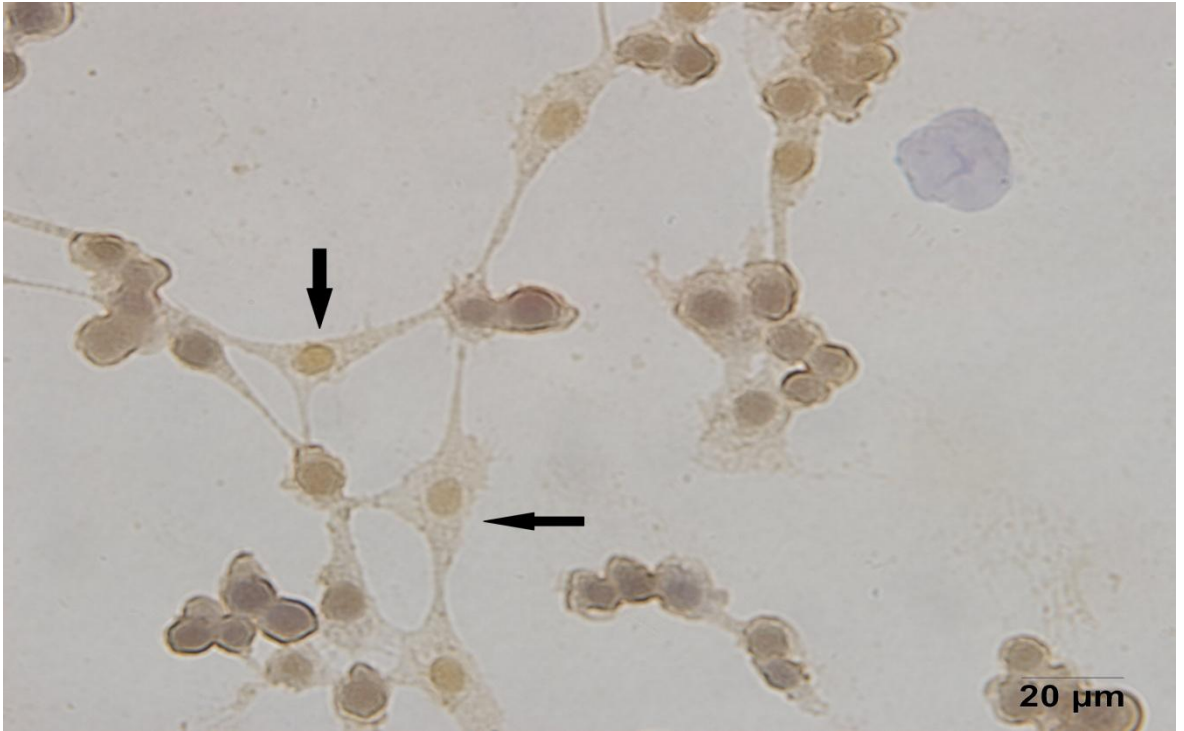
Resim 12: 48 saatlik 50 µg/ml EGCG ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



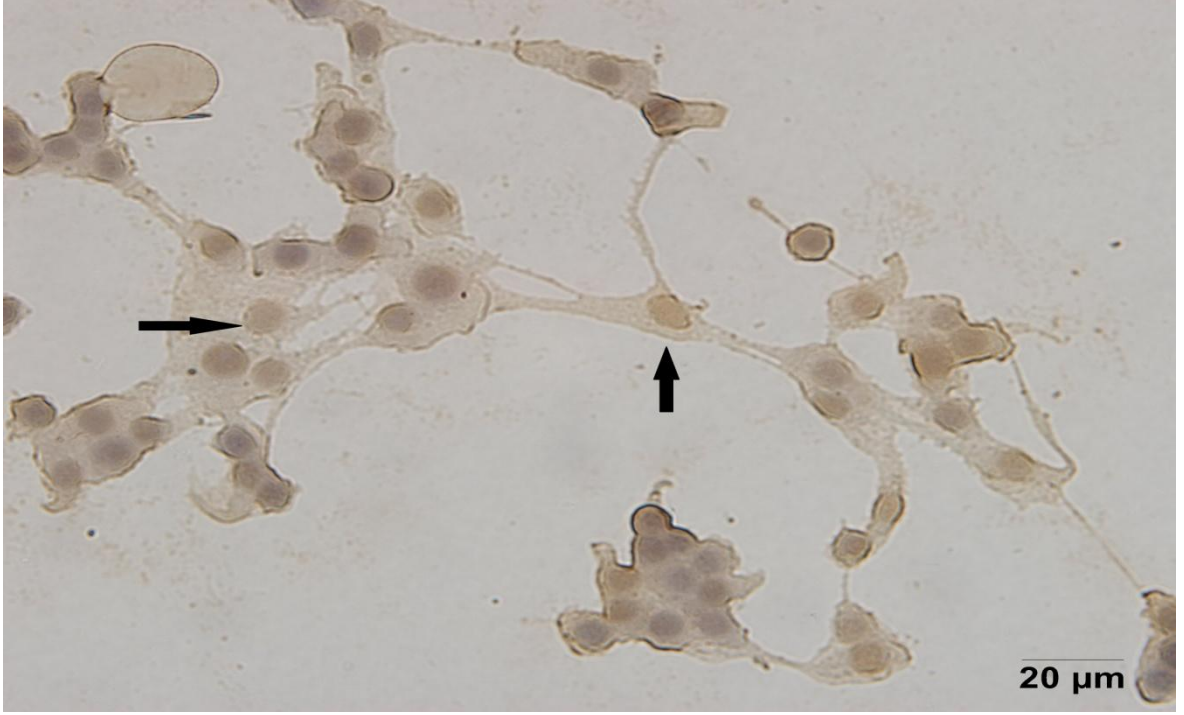
Resim 13: 48 saatlik 100 µg/ml EGCG ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



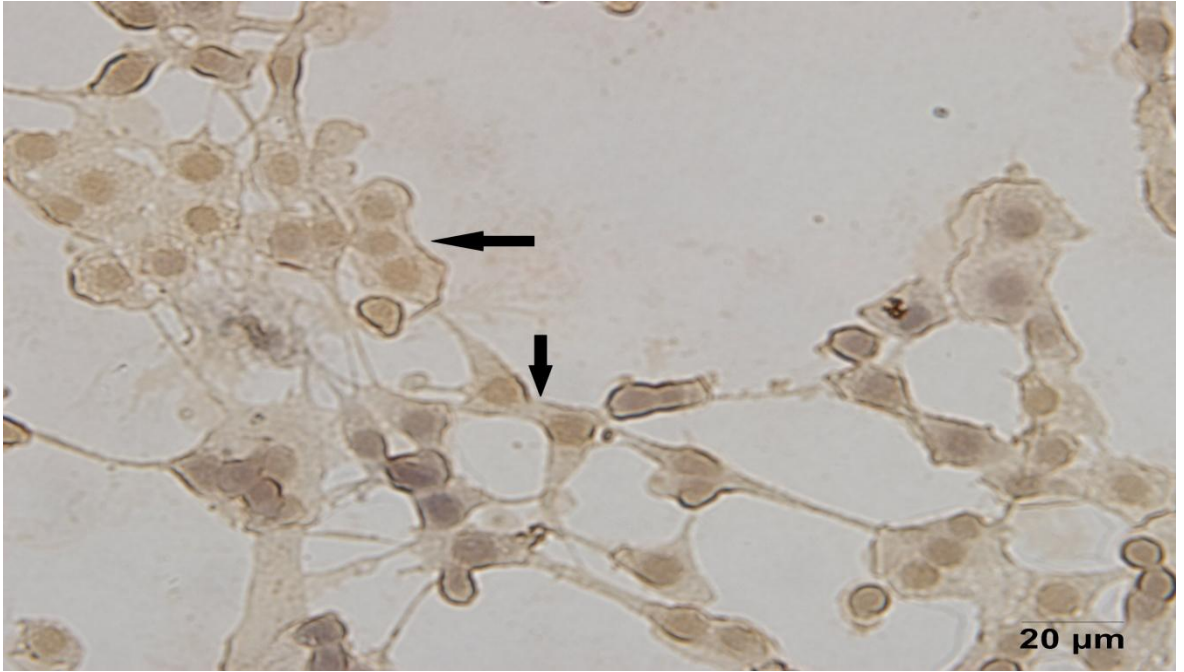
Resim 14: 48 saatlik 50 µg/ml EGCG ve 12.5 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



Resim 15: 48 saatlik 100 µg/ml EGCG ve 12.5 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



Resim 16: 48 saatlik 50 µg/ml EGCG ve 25 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



Resim 17: 48 saatlik 100 µg/ml EGCG ve 50 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100

Apoptotik verilerimizi zamana göre değerlendirdiğimizde, 48 saatlik zaman aralığında;

-Kontrol grubu hücrelerinde morfolojik bir değişiklik gözlenmedi. Hücreler,sağlıklı hücre morfolojisine sahipti.24 saatlik kontrol grubuna göre,hücre sayısında artış meydana geldi (Resim 10).

-12,5 µg/ml RES ile etkileşime sokulmuş C6 glioma hücrelerinde 48.saatin sonunda 24 saatlik 12,5 µg/ml RES grubuna göre, apoptoza uğramış hücrelerde artış gözlendi (Resim 11).

-50 µg/ml EGCG ile muamele edilmiş hücrelerde 24 saatlik 50 µg/ml EGCG grubuna benzer şekilde apoptoza uğramış hücreler gözlendi (Resim 12).

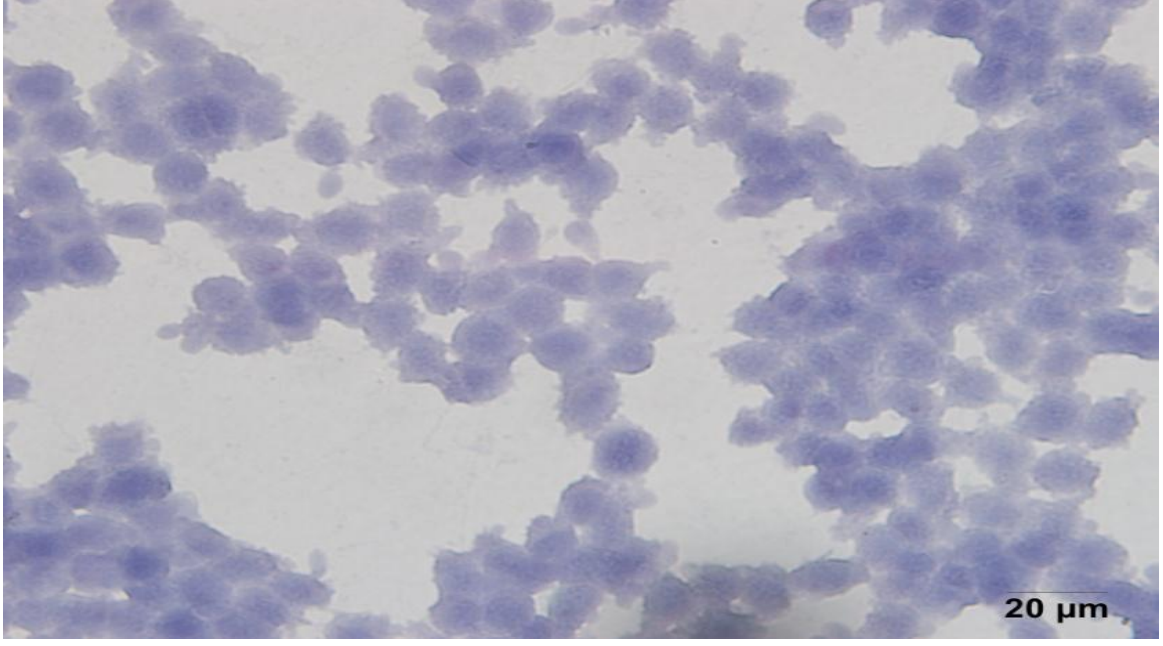
-100 µg/ml EGCG ile muamele edilmiş hücrelerde, 48.saatin sonunda 24 saatlik 100 µg/ml EGCG grubuna göre apoptoza uğramış hücrelerde artış gözlendi (Resim 13).

-12,5 µg/ml RES ve 50 µg/ml EGCG grubunda, 24 saatlik 12,5 µg/ml RES ve 50 µg/ml EGCG grubuna göre apoptoza uğrayan C6 glioma hücrelerinde artış gözlemlendi (Resim 14).

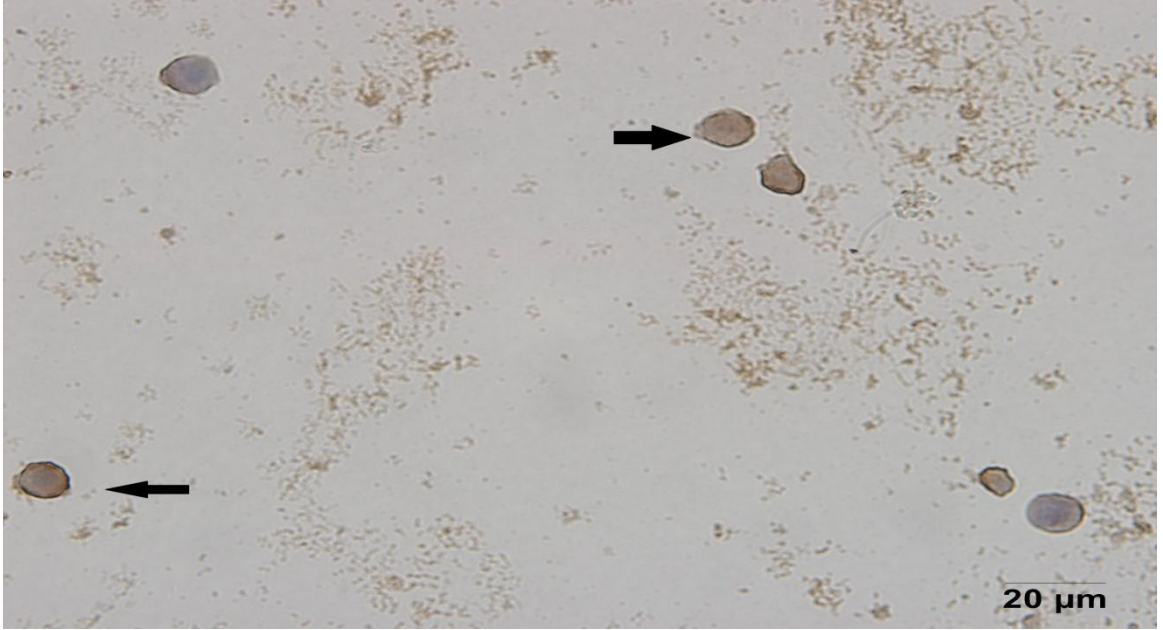
-12,5 µg/ml RES ve 100 µg/ml EGCG grubunda, hücrelerin büyük bir kısmının apoptoza uğradığı gözlemlendi (Resim 15).

-25 µg/ml RES ve 50 µg/ml EGCG grubunda, hücrelerin büyük bir kısmının apoptoza uğradığı gözlemlenmiştir (Resim 16).

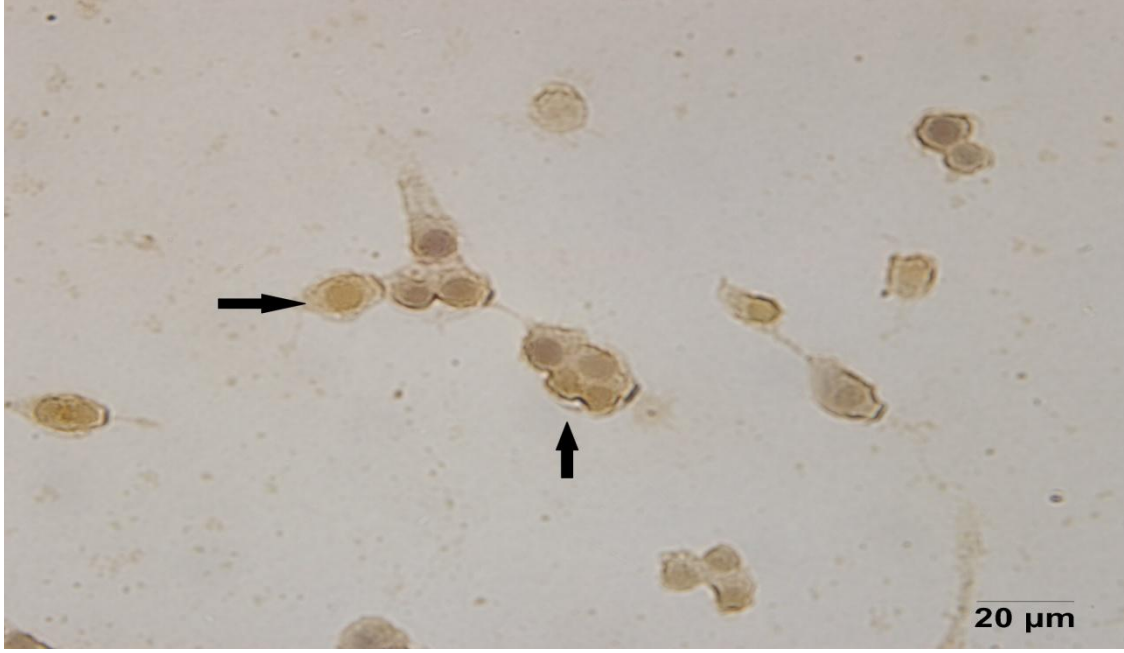
-50 µg/ml RES ve 100 µg/ml EGCG grubunda, hücrelerin çoğunluğunun apoptoza uğradığı gözlemlenmiştir (Resim 17).



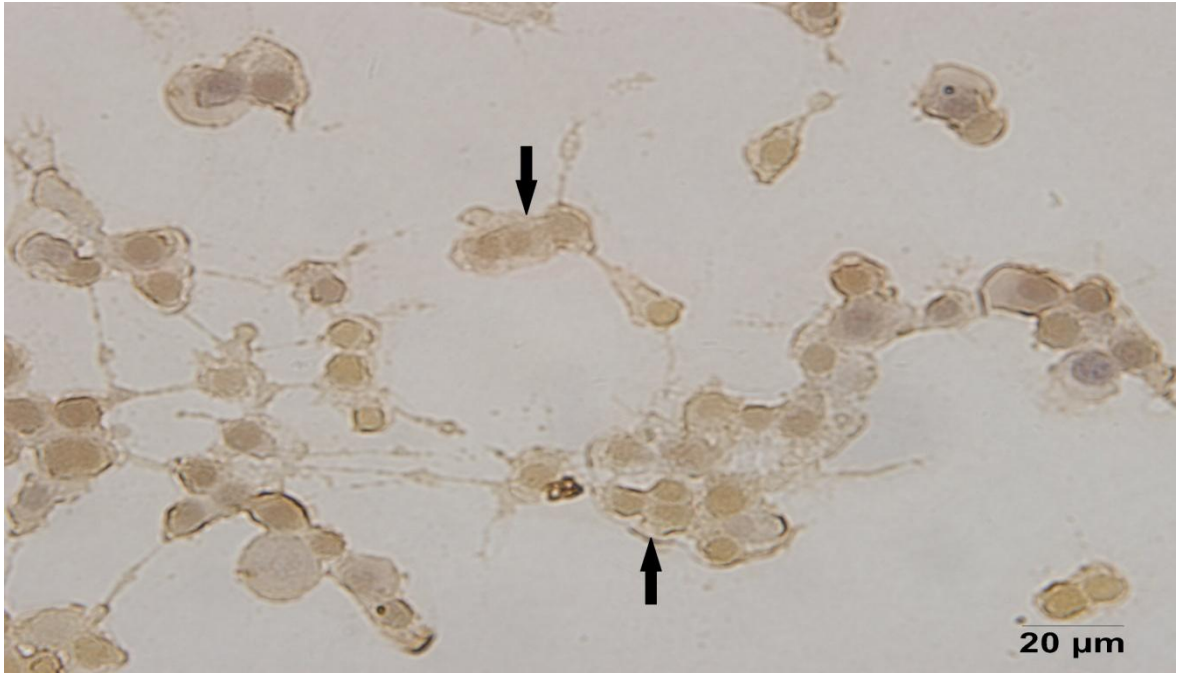
Resim 18: 72 saatlik kontrol grubu hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



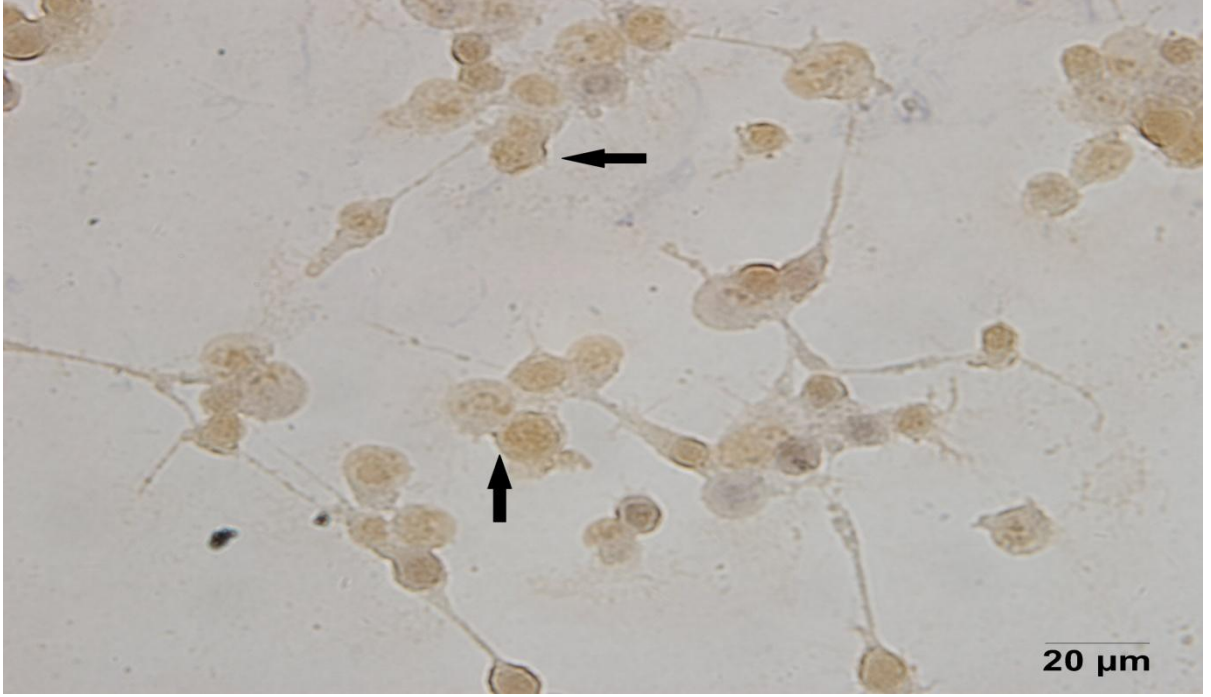
Resim 19: 72 saatlik 12,5 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



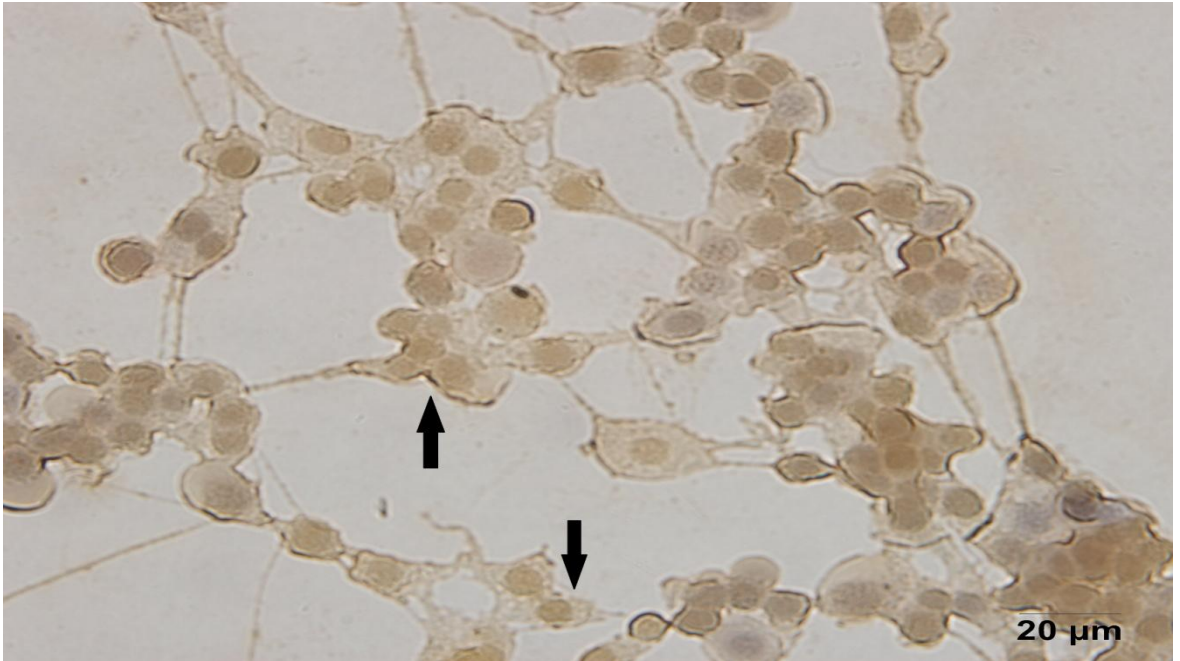
Resim 20: 72 saatlik 50 µg/ml EGCG ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



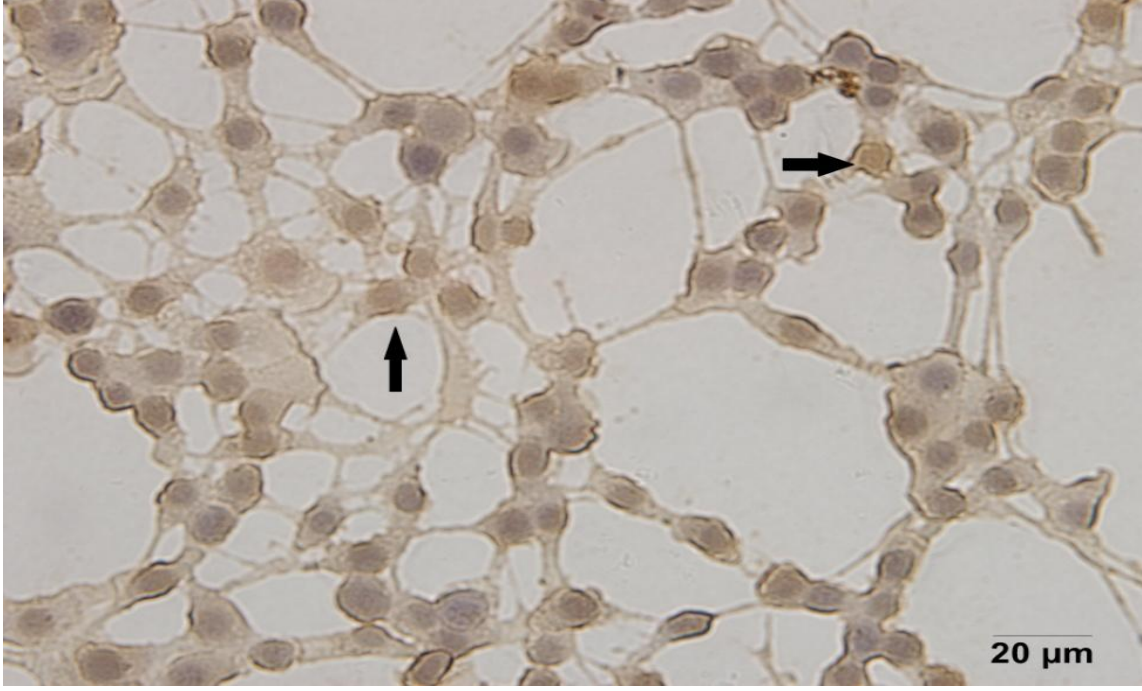
Resim 21: 72 saatlik 100 µg/ml EGCG ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



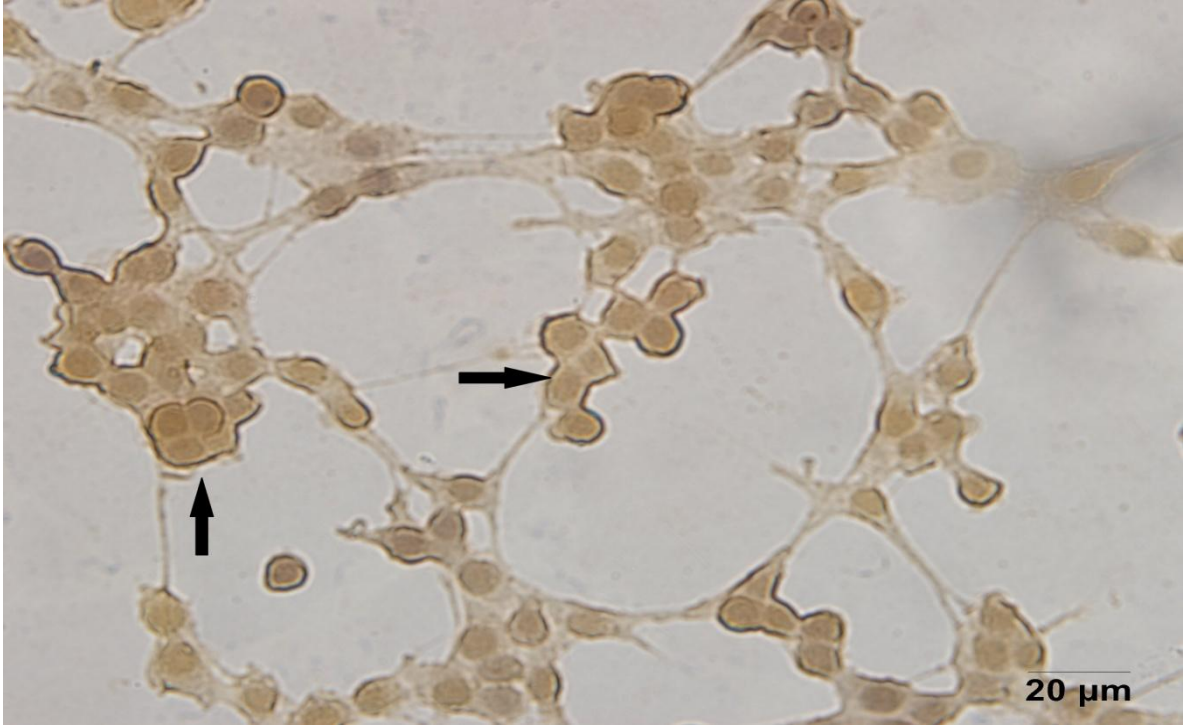
Resim 22: 72 saatlik 50 µg/ml EGCG ve 12.5 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



Resim 23: 72 saatlik 100 µg/ml EGCG ve 12.5 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



Resim 24: 72 saatlik 50 µg/ml EGCG ve 25 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100

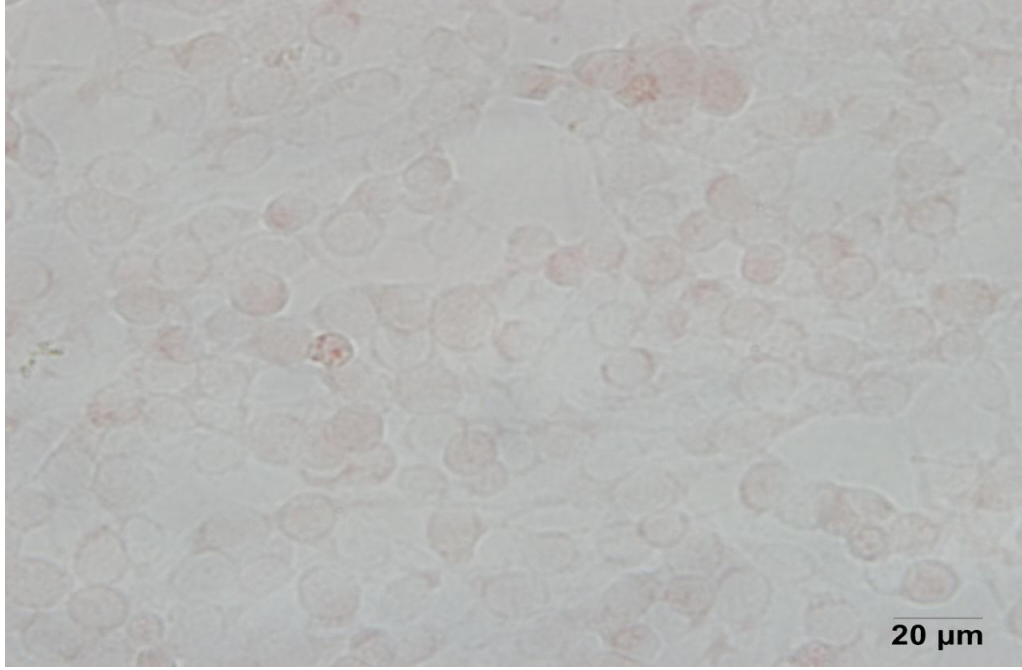


Resim 25: 72 saatlik 100 µg/ml EGCG ve 50 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100

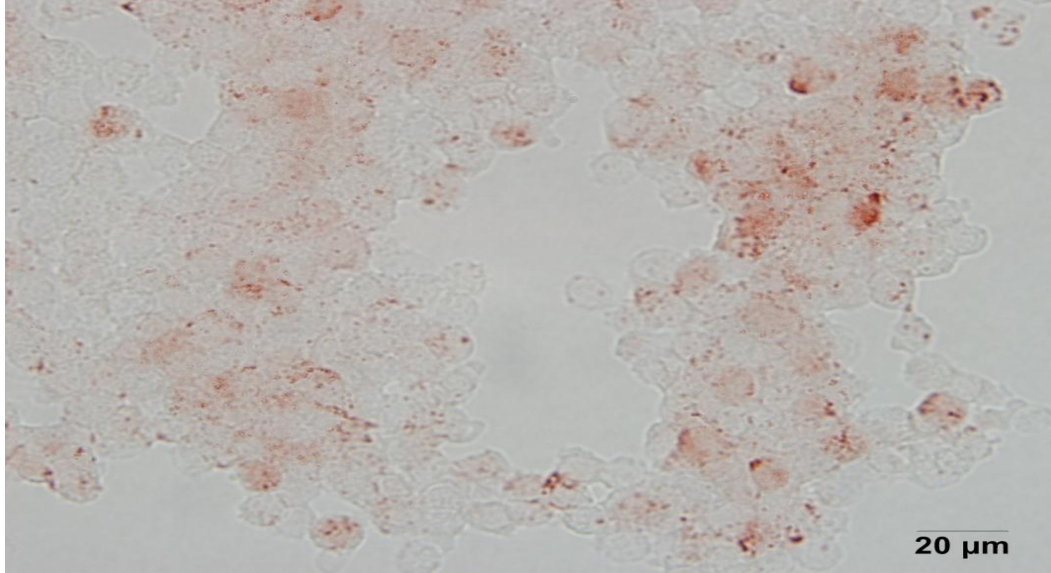
Apoptotik verilerimizi zamana göre değerlendirdiğimizde, 72 saatlik zaman aralığında;

- Kontrol grubu hücrelerinde morfolojik bir değişiklik gözlenmedi. Hücreler,sağlıklı hücre morfolojisine sahipti.24 ve 48 saatlik kontrol gruplarına göre,hücre sayısında artış meydana geldi (Resim 18).
- 12,5 µg/ml RES ile etkileşime sokulmuş C6 glioma hücrelerinde 72.saatın sonunda hücre sayısının azaldığı belirlenirken, tüm hücrelerde apoptoz görüldü (Resim 19).
- 50 µg/ml EGCG ile muamele edilmiş hücrelerde 24 ve 48 saatlik 50 µg/ml EGCG gruplarına göre, apoptoza uğramış hücrelerde artış gözlendi (Resim 20).
- 100 µg/ml EGCG ile muamele edilmiş hücrelerin, 24 ve 48 saatlik 100 µg/ml EGCG gruplarına göre, en fazla bu doz ve sürede apoptoza uğradıkları görülmüştür (Resim 21).
- 12,5 µg/ml RES ve 50 µg/ml EGCG grubunda, az miktarda apoptoza uğramamış hücre gözlemlendi (Resim 22).
- 12,5 µg/ml RES ve 100 µg/ml EGCG grubunda, hücrelerin tümünde apoptoz gözlemlendi (Resim 23).
- 25 µg/ml RES ve 50 µg/ml EGCG grubunda, 72 saatin bu doz için en fazla hücrenin apoptoza uğradığı süre olduğu gözlendi (Resim 24).
- 50 µg/ml RES ve 100 µg/ml EGCG grubunda, hücrelerin tamamının apoptoza uğradığı gözlemlendi (Resim 25).

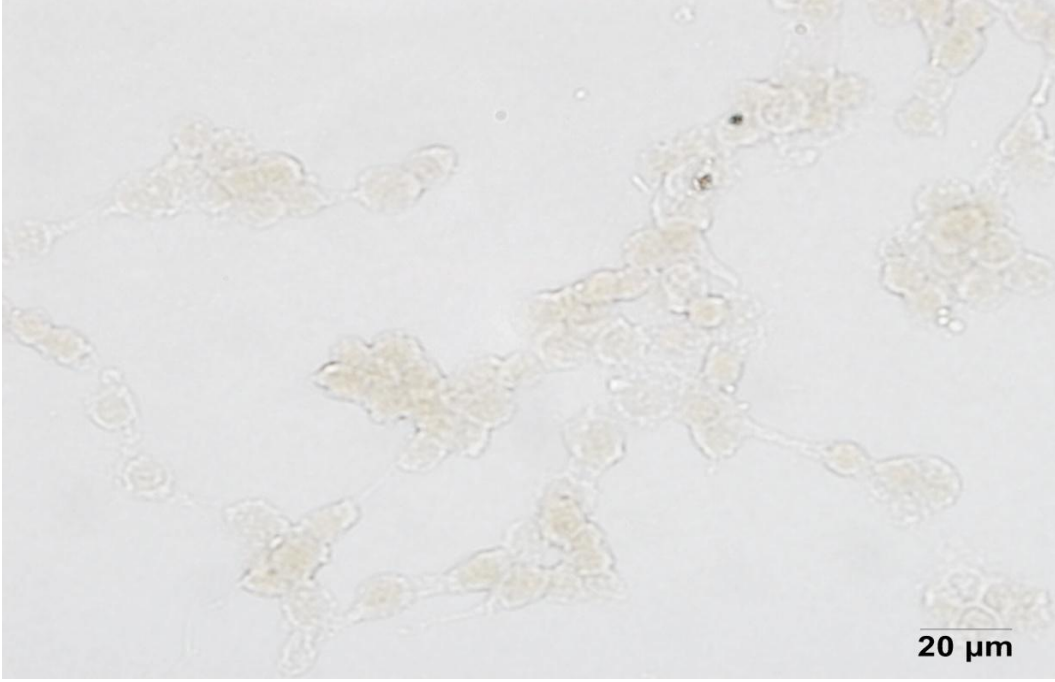
6.2. PROLİFERASYON VERİLERİNİN MİKROSKOBİK ANALİZİ



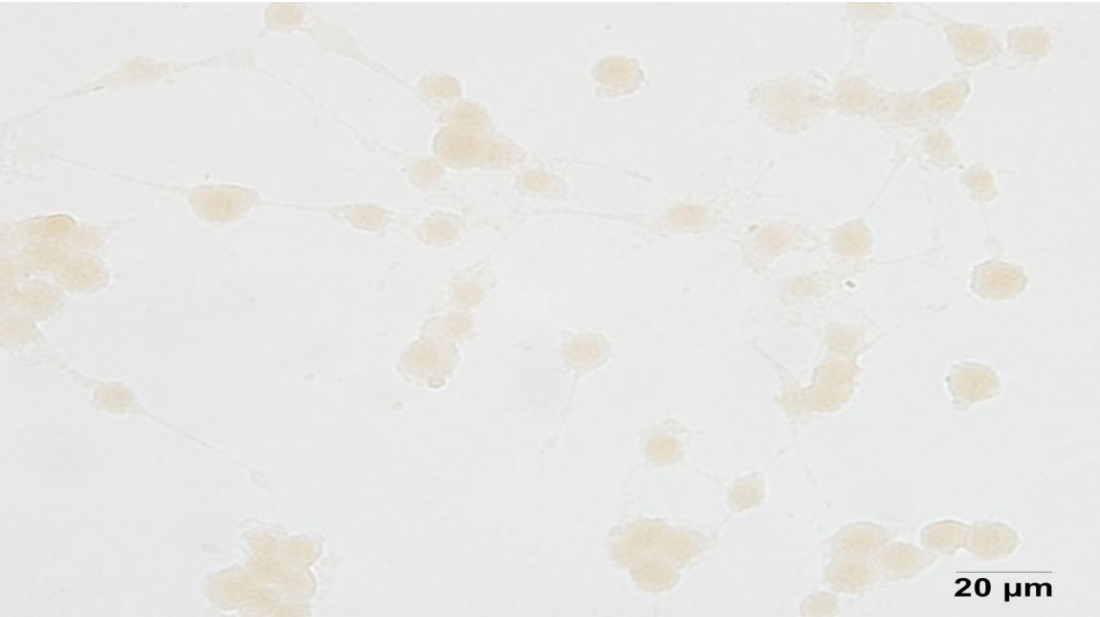
Resim 26: 24 saatlik kontrol grubu hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



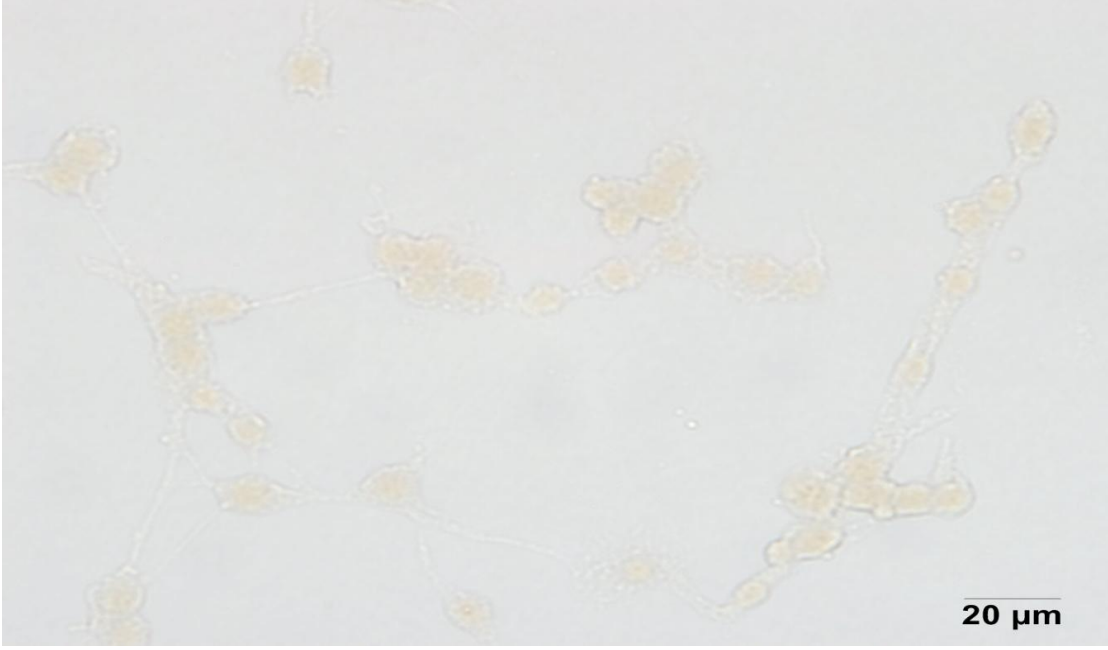
Resim 27: 24 saatlik 12.5 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



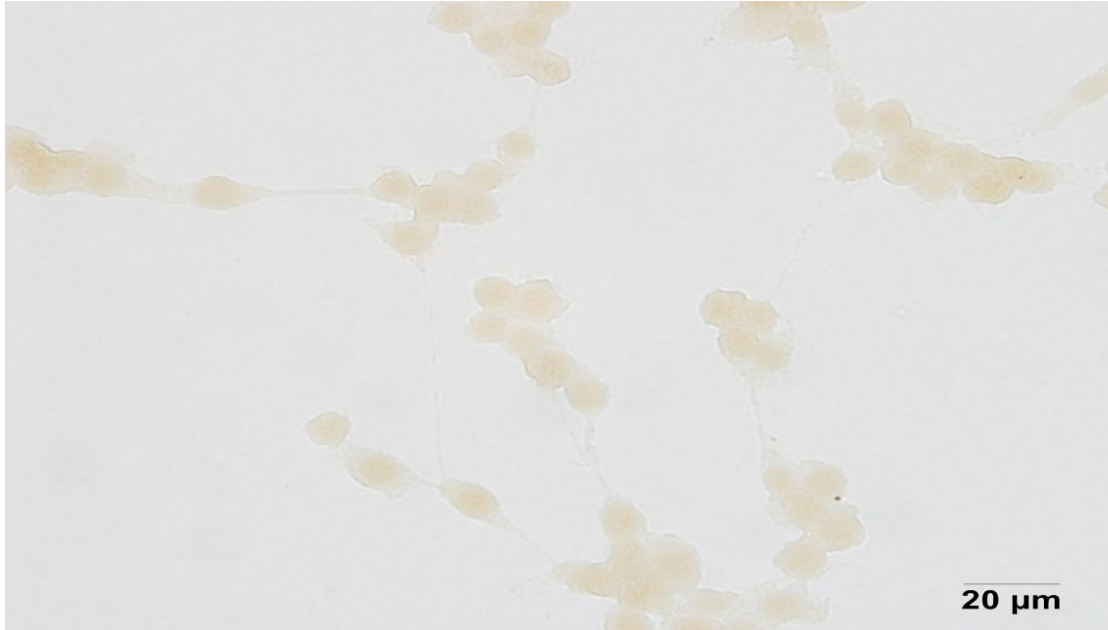
Resim 28: 24 saatlik 50 µg/ml EGCG ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



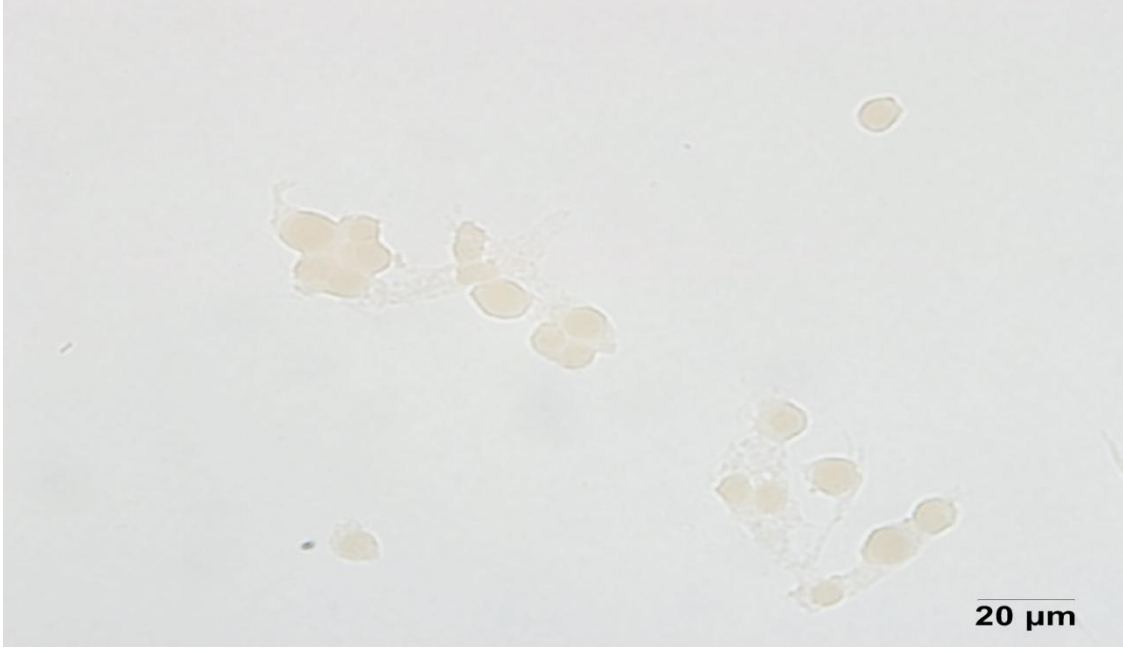
Resim 29: 24 saatlik 100 µg/ml EGCG ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



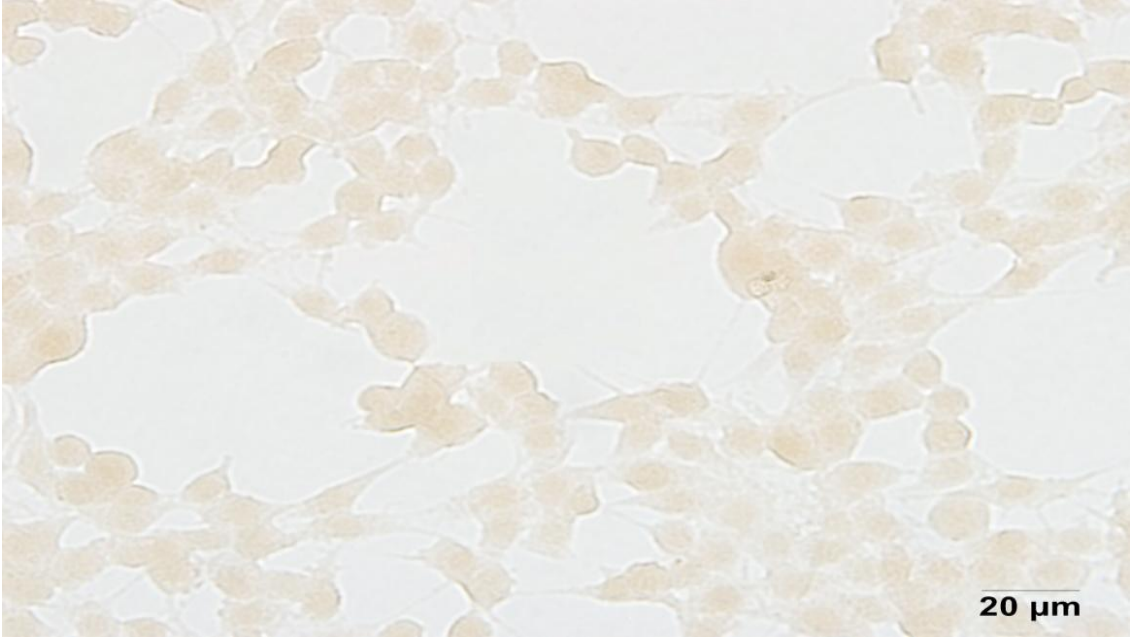
Resim 30: 24 saatlik 50 µg/ml EGCG ve 12.5 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



Resim 31: 24 saatlik 100 µg/ml EGCG ve 12.5 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



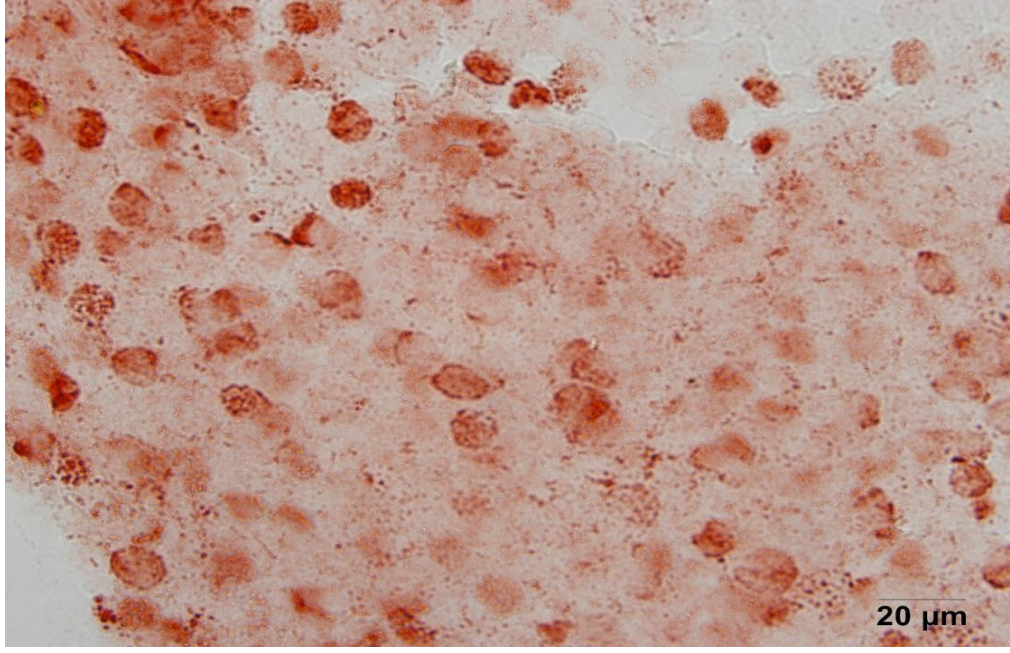
Resim 32: 24 saatlik 50 µg/ml EGCG ve 25 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



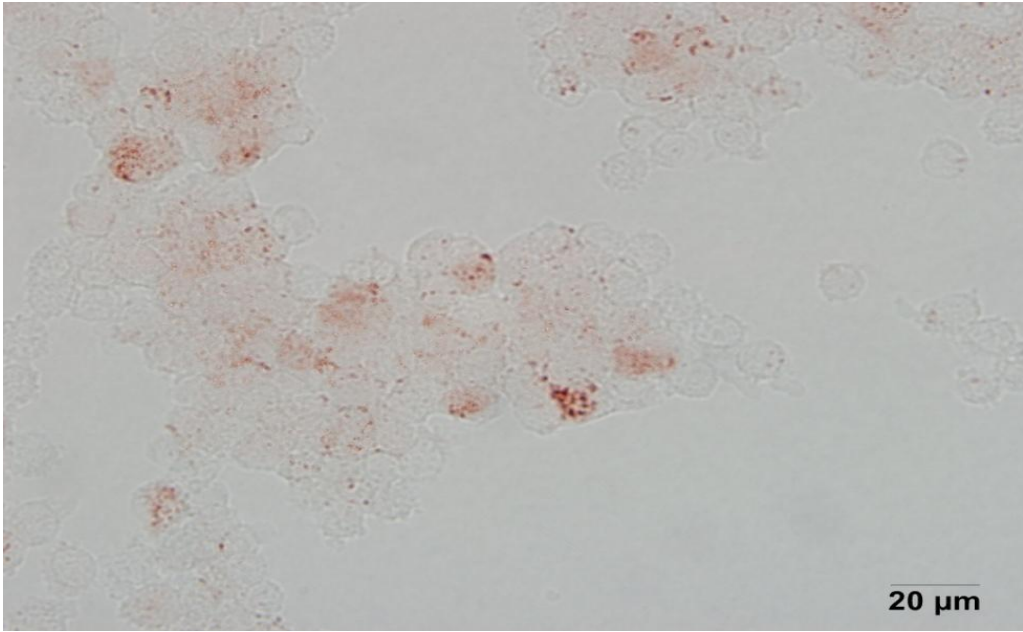
Resim 33: 24 saatlik 100 µg/ml EGCG ve 50 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100

Proliferasyon verilerimizi zamana göre değerlendirdiğimizde, 24 saatlik zaman aralığında;

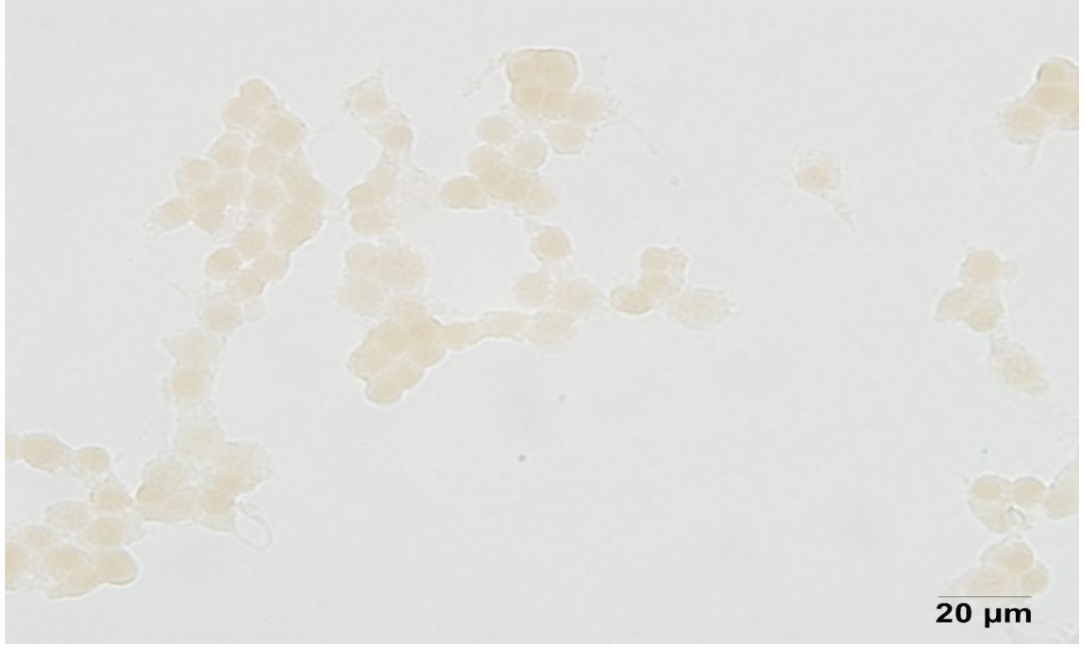
- Kontrol grubunda hücre siklusunun erken fazında olduğunu düşündüğümüz hücrelerde BrdU ile işaretleme az miktarda gerçekleşti (Resim 26).
- 12,5 µg/ml RES ile etkileşime sokulmuş C6 glioma hücrelerinde işaretleme gözlendi (Resim 27).
- 50 µg/ml EGCG ile muamele edilmiş hücrelerin BrdU ile işaretlemediği gözlendi (Resim 28).
- 100 µg/ml EGCG ile muamele edilmiş hücrelerin, BrdU ile işaretlemediği gözlendi (Resim 29).
- 12,5 µg/ml RES ve 50 µg/ml EGCG grubundaki hücrelerin, BrdU ile işaretlemediği gözlendi (Resim 30).
- 12,5 µg/ml RES ve 100 µg/ml EGCG grubundaki hücrelerin, hücre BrdU ile işaretlemediği gözlendi (Resim 31).
- 25 µg/ml RES ve 50 µg/ml EGCG grubundaki hücrelerin, BrdU ile işaretlemediği gözlendi (Resim 32).
- 50 µg/ml RES ve 100 µg/ml EGCG grubunda hücrelerin BrdU ile işaretlemediği gözlendi (Resim 33).



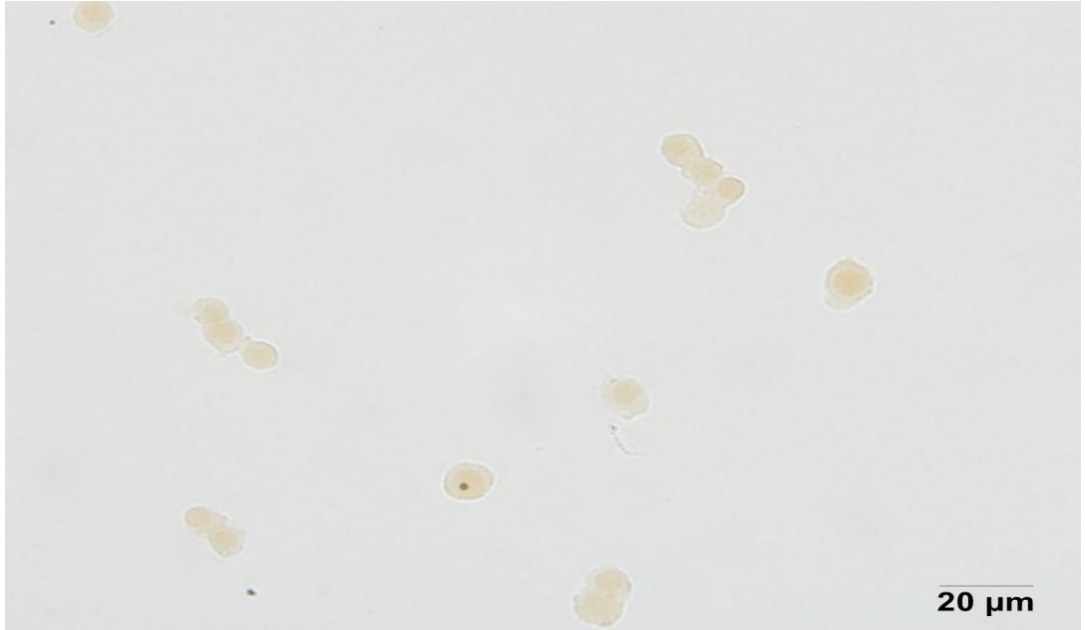
Resim 34: 48 saatlik kontrol grubu hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



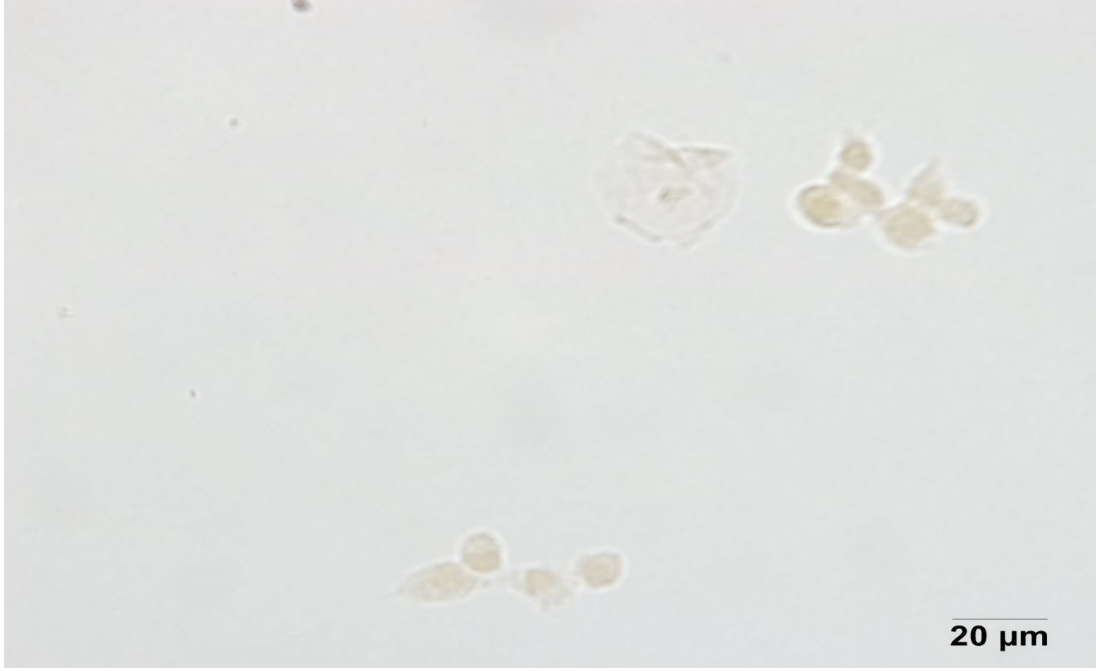
Resim 35: 48 saatlik 12,5 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



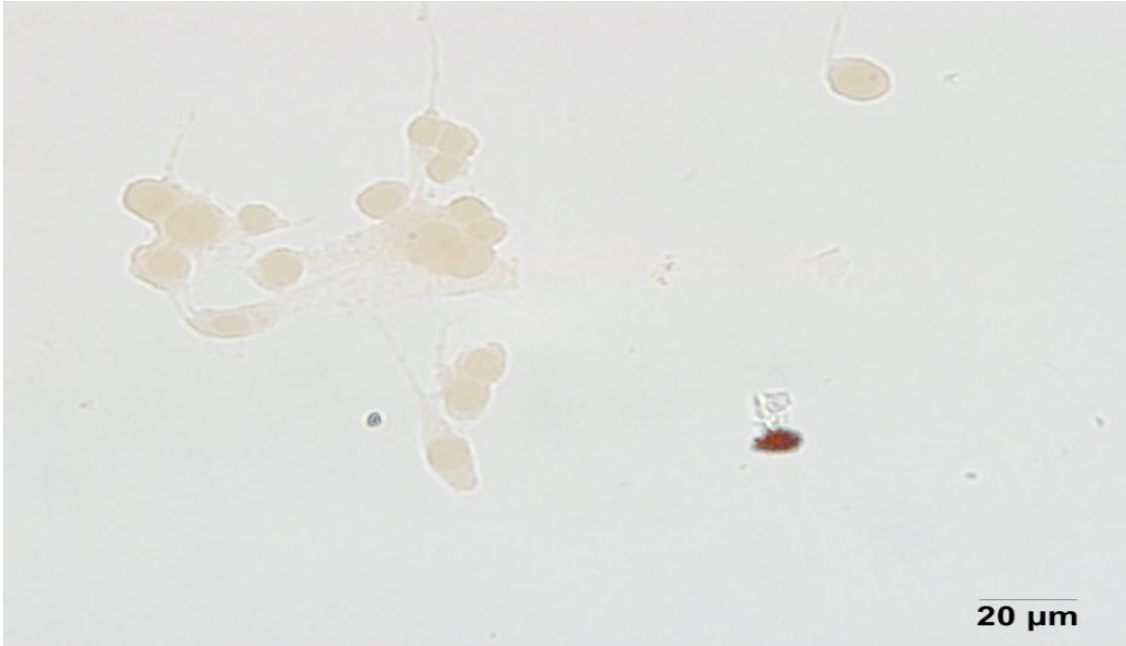
Resim 36: 48 saatlik 50 µg/ml EGCG ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



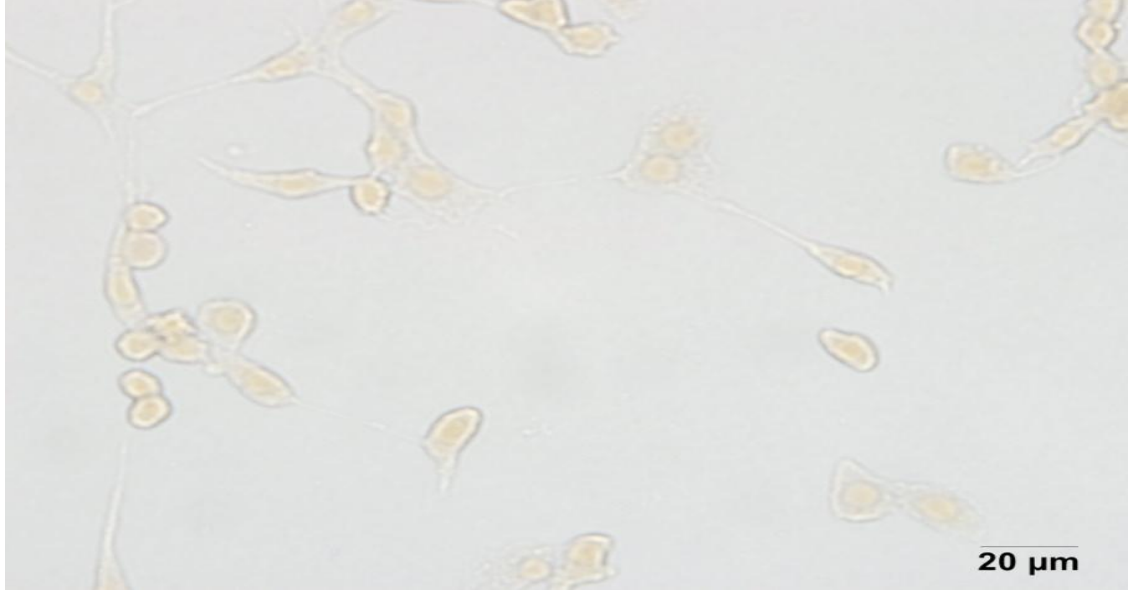
Resim 37: 48 saatlik 100 µg/ml EGCG ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



Resim 38: 48 saatlik 50 µg/ml EGCG ve 12,5 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



Resim 39: 48 saatlik 100 µg/ml EGCG ve 12,5 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



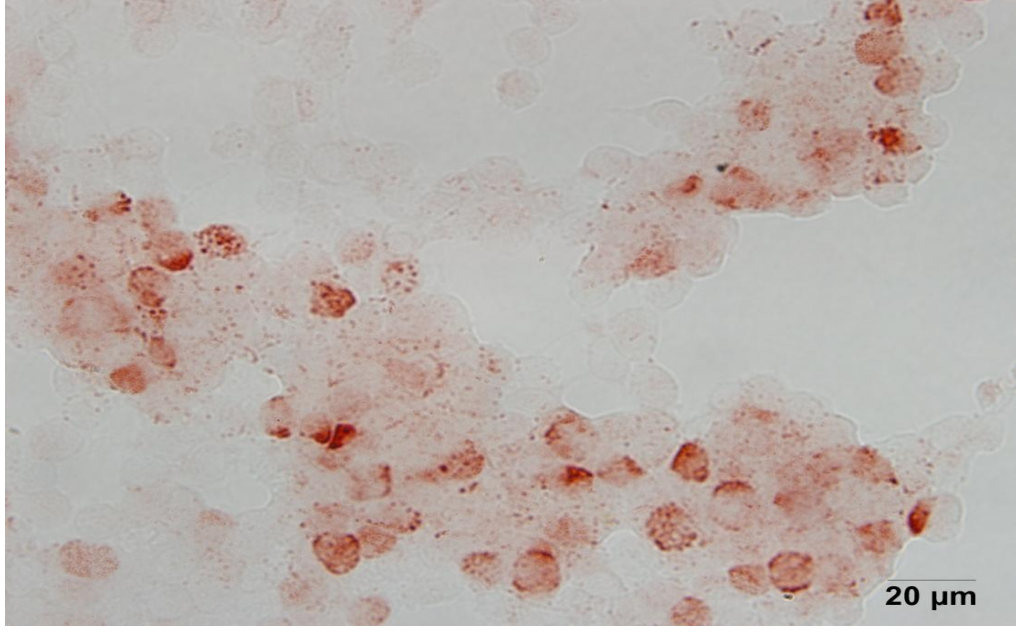
Resim 40: 48 saatlik 50 µg/ml EGCG ve 25 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



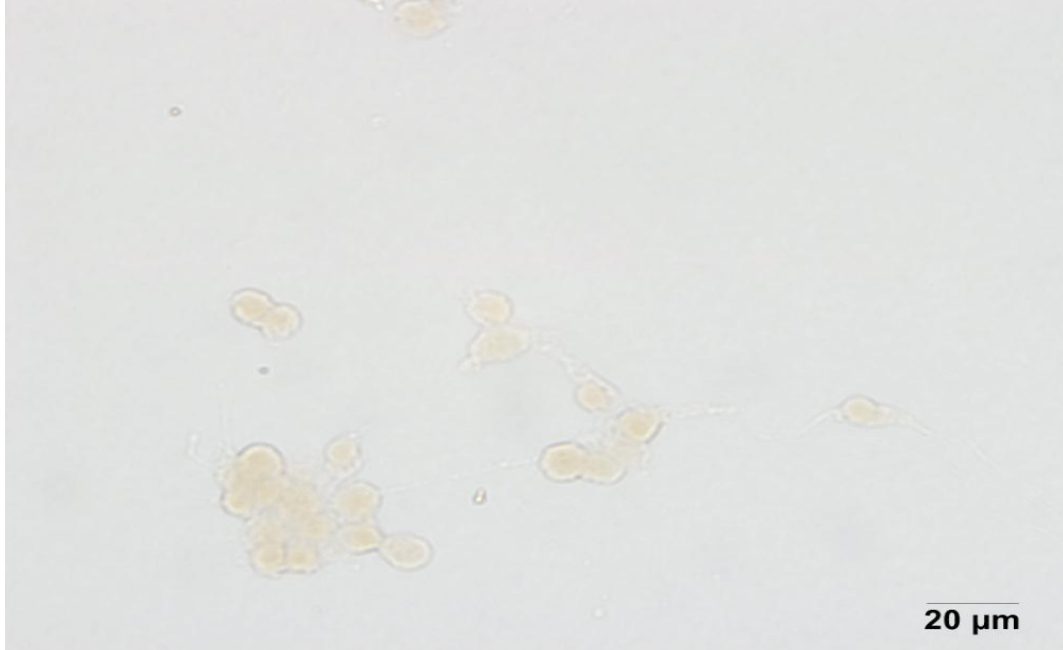
Resim 41: 48 saatlik 100 µg/ml EGCG ve 50 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100

Proliferasyon verilerimizi zamana göre değerlendirdiğimizde, 48 saatlik zaman aralığında;

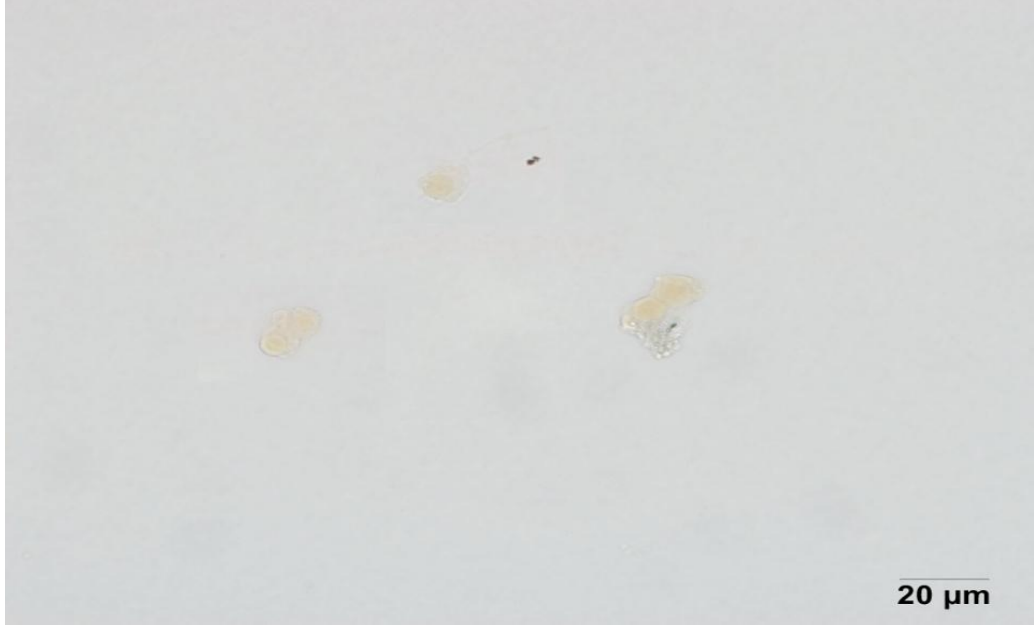
- Kontrol grubunda hücre kültüründe çok sayıda C6 glioma hücrelerinin BrdU ile işaretlendiği gözlendi (Resim 34).
- 12,5 µg/ml RES ile etkileşime sokulmuş C6 glioma hücrelerinde işaretlenme gözlendi (Resim 35).
- 50 µg/ml EGCG ile muamele edilmiş hücrelerin BrdU ile işaretlenmediği gözlendi (Resim 36).
- 100 µg/ml EGCG ile muamele edilmiş hücrelerin, BrdU ile işaretlenmediği gözlendi (Resim 37).
- 12,5 µg/ml RES ve 50 µg/ml EGCG grubundaki hücrelerin, BrdU ile işaretlenmediği gözlendi (Resim 38).
- 12,5 µg/ml RES ve 100 µg/ml EGCG grubundaki hücrelerin, hücre BrdU ile işaretlenmediği gözlendi (Resim 39).
- 25 µg/ml RES ve 50 µg/ml EGCG grubundaki hücrelerin, BrdU ile işaretlenmediği gözlendi (Resim 40).
- 50 µg/ml RES ve 100 µg/ml EGCG grubunda hücrelerin BrdU ile işaretlenmediği gözlendi (Resim 41).



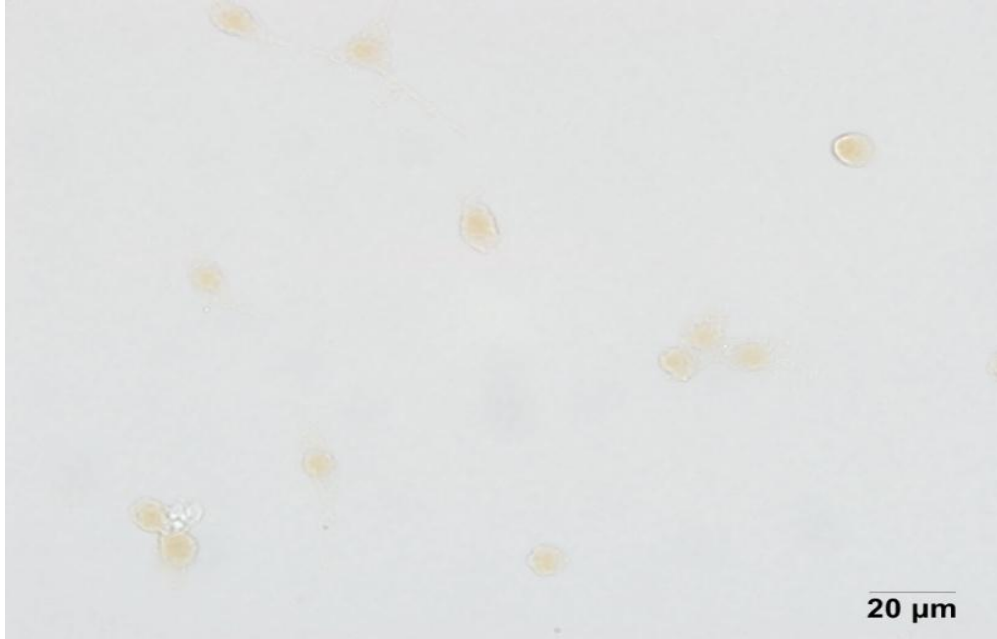
Resim 42: 72 saatlik kontrol grubu hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



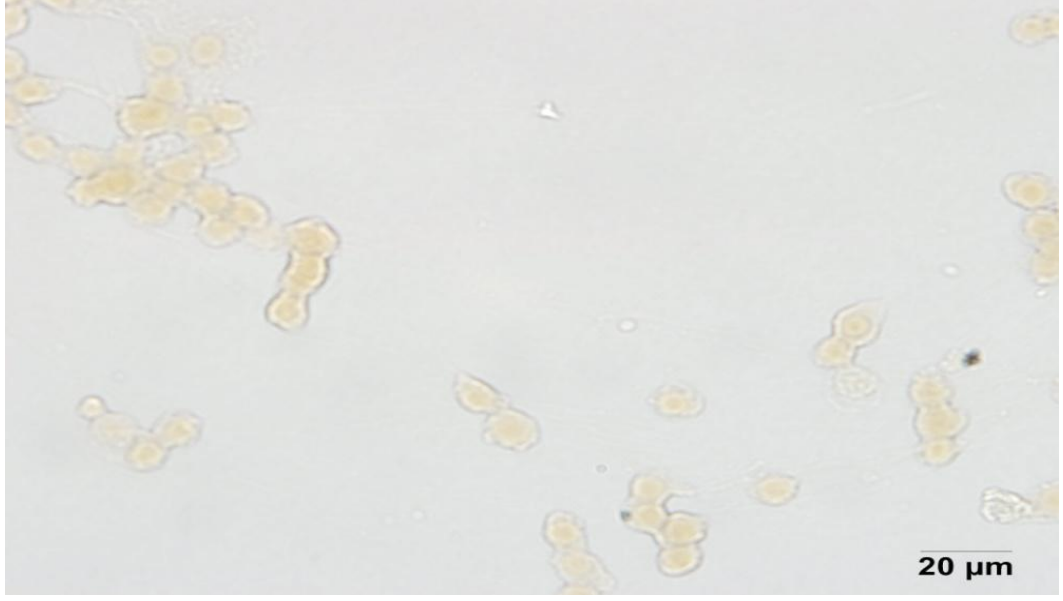
Resim 43: 72 saatlik 50 µg/ml EGCG ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskopundaki görüntüsü, x100



Resim 44: 100 µg/ml EGCG ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



Resim 45: 50 µg/ml EGCG ve 12,5 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



Resim 46: 100 µg/ml EGCG ve 12,5 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100



Resim 47: 50 µg/ml EGCG ve 25 µg/ml RES ile muamele edilen C6 glioma hücrelerinin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü, x100

Proliferasyon verilerimizi zamana göre değerlendirdiğimizde, 48 saatlik zaman aralığında;

- Kontrol grubunda hücre kültüründe çok sayıda C6 glioma hücrelerinin BrdU ile işaretlendiği gözlemlendi (Resim 42).
- 12,5 µg/ml RES grubunda, 72. saatte hücre görülmedi.
- 50 µg/ml EGCG ile muamele edilmiş hücrelerin BrdU ile işaretlenmediği gözlemlendi (Resim 43).
- 100 µg/ml EGCG ile muamele edilmiş hücrelerin, BrdU ile işaretlenmediği gözlemlendi (Resim 44).
- 12,5 µg/ml RES ve 50 µg/ml EGCG grubundaki hücrelerin, BrdU ile işaretlenmediği gözlemlendi (Resim 45).
- 12,5 µg/ml RES ve 100 µg/ml EGCG grubundaki hücrelerin, hücre BrdU ile işaretlenmediği gözlemlendi (Resim 46).
- 25 µg/ml RES ve 50 µg/ml EGCG grubundaki hücrelerin, BrdU ile işaretlenmediği gözlemlendi (Resim 47).
- 50 µg/ml RES ve 100 µg/ml EGCG grubunda 72. saatte hücre görülmedi.

7. TARTIŞMA

Kanser, vücuttaki hücrelerden herhangi birinin anormal çoğalması ile ortaya çıkabileceği için gerek davranış, gerek tedavi yöntemi, gerek de tedaviye yanıt açısından büyük ölçüde değişiklik gösteren çok sayıda türe sahiptir. Hastalar, kanser tipine ve gelişim evrelerine bağlı olarak; cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yöntemlerinin tek başlarına ya da beraber kullanılmaları ile tedavi edilir (18). Klasik tedavi yöntemlerinin kanser tedavisindeki önemi tartışılmazdır. Bununla beraber, kanser vakalarının sayılarının artışı ve kullanılan ilaçlara karşı oluşan direnç ile yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde doğal beslenme ve çevreye olan ilgi her geçen gün biraz daha artmakta ve bunun sonucu olarak, tıbbi ve aromatik bitkilerin önemi ön plana çıkmaktadır (115). Bunun nedeni hastaların konvansiyonel uygulamalarla birlikte yararı bilinen, doğal tedavi yöntemlerini tercih etmeleridir (21).

Çin ve Tayvan gibi bazı Asya ülkelerinin çayı 3000 yıldır sağlık amacıyla kullandıkları bilinmektedir. Geleneksel Çin ve Hindistan tıbbında yeşil çay idrar söktürücü, vücut yaralarını ve kalp rahatsızlıklarını iyileştirici amaçlar için kullanılmıştır. Günümüzde ise yeşil çayın insan sağlığı üzerine etkileriyle ilgili hücre kültürlerinde ve hayvan modellerinde önemli bilimsel çalışmalar yürütülmektedir (3).

EGCG, yeşil çayda bulunan fenolik yapıdaki kateşinlerin en önemlilerinden biridir. Yeşil çayın farmakolojik aktivitelerinden sorumlu olan ve en fazla oranda bulunan kateşindir (115).

Yeşil çayda bulunan saf kateşinlerin ve fenolik asitlerin, bir *in vitro* lipoprotein oksidasyon modelinde antioksidan vitaminler olan C, E ve β -karotenden daha güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu ileri sürülmüştür (116).

EGCG'nin kansere karşı koruyucu etkisi ilk kez 1987'de yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (117). 1992 yılında da yeşil çay kanser önleyici ajan olarak onaylanmıştır (118).

Yapılan çalışmalarda, yeşil çayın kanseri önleme mekanizmaları; mutajeniteyi ve genotoksisiteyi önleme, tümör başlama ve ilerlemesini geciktirme, detoksifikasyon enzimlerini etkinleştirme, karsinogenlerin aktifleşmiş mekanizmalarını tuzağa düşürme ve serbest radikal temizleme aktivitesi gösterme olarak belirlenmiştir (119, 120).

Yeşil çayın, hücre proliferasyonunun ve transformasyonunun inhibisyonuna yol açan sinyal transdüksiyon yollarını düzenlediği, preneoplastik ve neoplastik hücre apoptozisini indüklediği, tümör invazyonu ve anjiyojenezisini inhibe ettiği belirtilmektedir (121,122). EGCG neoplastik hücrelerin yayılmasına ve metastazına neden olan proteolitik aktiviteye sahip ürokinaz enzimi üzerinde inhibitör etki göstermektedir (118).

Hayvan çalışmaları yeşil çayın deri, akciğer, oral kavite, özofagus, karaciğer, mide, böbrek ve diğer organ kanserlerini inhibe ettiğini göstermiştir (120, 122, 123, 124, 125).

Apoptozis hasarlı veya anormal hücreleri yok etmeye yarayan bir mekanizmadır. EGCG'nin oksidatif strese karşı koruyuculuğunda apoptik yolları etkilediği gösterilmiştir (126). EGCG apoptozisi; G0/G1 fazı hücre döngüsü arresti yaparak NFkB (127) ve Tümör nekroze faktör (TNF) gen ekspresyonu ve salımının inhibisyonu (128), mitokondrial depolarizasyon (129), büyüme faktörlerinin sinyalizasyonunun (130), kaspaz-8 (131) ve kaspaz-3 (132) aktivasyonunun önlenmesi gibi mekanizmalarla indükler.

EGCG'nin kanserli hücrelerin hücre siklusunu duraklattığını ve apoptoza yönlendirdiği, bunu yaparken normal hücelere ya etki etmediği ya da etkisinin az olduğu gözlemlenmiştir (133). Buna göre EGCG bir çok tümör hücrelerini apoptoza yönlendirebilir. Bu seçimli apoptotik potansiyeliyle EGCG, üzerinde durulması gereken bir anti-neoplastik ajandır (4).

TNF, tümör oluşumunda esansiyel bir sitokindir. AP1 ve NFkB ekstraselüler sinyallere hızlıca cevap veren transkripsiyon faktörleridir. EGCG, AP1 ve NFkB aktivasyonunu baskılayarak TNF gen ekspresyonunu inhibe eder (134, 135). Yapılan bir çalışmada, farelere içme suyu ile verilen %0.1 yeşil çay ekstresi TNF düzeyini azaltmıştır (117).

Fujiki H. ve arkadaşları toksik olmayan kimyasal kanser önleyici ajanlar geliştirmek amacıyla fare derisi üzerinde tümör gelişimi prosesini inhibe eden ajanlarla yapmış oldukları çalışmanın sonucunda Japon yeşil çayının ana bileşeni olan EGCG'nin günlük hayatta kullanılabilir pratik kanser önleyici etkisinin olduğunu bulmuşlardır (136).

Yeşil çay kateşinlerinin, insan mide kanseri KA-TO III hücrelerinin, insan lösemi MOLT-4B hücrelerinin, DU 145 insan prostat hücrelerinin apoptozunu indükledikleri ve doku kültüründe hücre büyümelerini inhibe ettikleri saptanmıştır (137).

Hirose ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yeşil çay kateşinlerinin ince barsakta kanser oluşumunu karsinojenle birlikte veya kanser oluşuktan sonra verilse dahi baskıladıklarını göstermişlerdir (138).

Birçok tümör hücre serisinde EGCG, tümörün büyümesini inhibe eder. EGCG'nin normal W138 hücreleri ve kanser hücreleri olan W138VA ile normal insan fibroblastları üzerine etkisi de incelenmiştir. 40 µM konsantrasyonlarda EGCG normal hücreler üzerine etki göstermezken; kanser hücrelerinin büyümesini inhibe eder. Aynı hücreler 200 µM dozda EGCG'ye 8 saat maruz bırakıldıklarında, kanser hücrelerinin %50'den fazlası apoptoza yönelirken, normal hücrelerin sadece %1'den azı apoptoza gitmiştir (139).

Telomeraz bölünmeleri sırasında kanser hücrelerinin kromozomlarının uçlarını korur ve onların proliferasyon kapasitesi için esansiyeldir. EGCG'nin, hücre ekstraktında ve canlı hücrelerde telomerazı inhibe ettiği gösterilmiştir. Çayın antikanser özelliğinin açıklanmasında, ana mekanizmalardan biri telomerazın inhibisyonu olabileceği belirtilmiştir (140).

İnsan meme epiteli 184-B5 hücrelerinde benzopirenin (BP) indüklediği hatalı proliferasyonu EGCG inhibe eder. Kateşin bunu p53 bağımlı apoptozu indükleyerek ve hücre siklusunu düzenleyerek yapmaktadır (141).

Kateşinler ayrıca apoptozisi proapoptotik ve antiapoptotik gen ekspresyonunu değiştirerek etkilemişlerdir (126).

Ayrıca bir çok çalışma, çay katesinlerinin antimutajenik aktivitesi olduğunu göstermiştir (142, 143). İnsan lökositlerinde çay kateşinlerinin mitokondrial DNA'da (mtDNA) mtDNA4977 delesyon mutasyonunu baskılayabileceği gösterilmiştir. 10 sağlıklı kadına 5 hafta boyunca 350 ml, kateşinden zengin çay içirilmiş, 5 haftanın önce ve sonrasında deneklerden ikişer kez kan örneği toplanmış, mtDNA'da delesyonlar polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak analiz edilmiştir. 9 kaside çay içmeden önce mtDNA 4977 delesyonu görülmüş, bu delesyon çay içen pek çok kişide bulunmamıştır (144).

EGCG, tümör promotörü olan okadaik asit etkisi ile indüklenen BALB/3T3 hücrelerinde TNF- α (Tümör nekrozis faktör) salınımını inhibe eder. Bundan yola çıkarak EGCG'nin m-RNA ekspresyonunu, salınımını ve tümör promotörün hücrelerle etkileşimini engelleyerek inhibe ettiği ileri sürülmektedir (145).

Resveratrol başlıca üzüm meyvesinde bulunan, kırmızı şarapta önemli konsantrasyonlarda varlığı bilinen, lösemi, prostat, meme kanseri ve diğer epitelyal kanserlerde hücre çoğalmasını engelleyen doğal bir bileşiktir (146, 147).

Resveratrol çok yönlü moleküler ve biyokimyasal özellikleri olan bir bileşik olmasıyla birlikte, en çok bilinen ve araştırılan özellikleri arasında antimitotik, antineoplastik, antioksidan, antiproliferatif ve antiinflamatuvar etkileri sayılabilir (148).

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile, öncelikli olarak siyah üzüm çekirdeğinde ve kabuğunda bol miktarda bulunan ve antioksidan özelliği iyi bilinen resveratrol gibi maddelerin kanserden koruyucu etkisinin olduğu ortaya koyulmuştur (149). Bazı yayınlarda kanser hücre soylarında resveratrolün apoptozise neden olabileceği ve bu etkisi ile kanser hücrelerinin proliferasyon oranını düşürebileceği gösterilmiştir (150, 151).

Jang ve arkadaşları resveratrolün, kanserin üç önemli evresi olan başlatma, yükseltme ve ilerleme evreleri ile ilgili olayların inhibisyonuna neden olduğunu yaptıkları çalışmalarda göstermişlerdir. Bunun yanısıra, in vitro olarak birçok farklı kanser hücre tipinde resveratrolün apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini tanımlamışlardır (152).

Literatürlerde 1-100 µM resveratrolün hematopoetik ve solid organ tümör hücre dizilerinde, sitotoksik ve apoptozisi indükleyici özellikleri olabileceğine dair yayınlar bulunmaktadır (151).

Aggarwal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, resveratrolün kanser tedavisinde moleküler hedefi olan COX-1, COX-2 ve NfκB inhibisyonunu gerçekleştirirken, p53, bax ve kaspaz aktivitelerinde de artışa neden olduğu gösterilmiştir (9). NfκB hücre içi transkripsiyon faktörüdür ve çeşitli uyarıların ardından çekirdeğe geçip, DNA'ya bağlanarak uyarının gerektirdiği spesifik genleri aktifleyip, protein sentezini gerçekleştirir. Ayrıca kanser hücrelerini sürekli aktif tutarak hücre fonksiyonunu bir anlamda kötüye kullanır. Hücre çoğalmasını uyarıcı, ya da hücre ölümünü engelleyici fonksiyonlarının yanı sıra, hücrenin yüzeye tutunmasını da uyarır (153, 154).

Resveratrolün, NfκB aktivasyonunu baskıladığı, epitelyal (HeLa), lenfoid (Jurkat), myeloid (U937) gibi bir çok kanser hücre soyunda gözlenmiştir (8, 155, 156, 157, 158).

Omay ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, resveratrolün tek başına kullanılması durumunda, epitelyal ve hematolojik tümör hücre dizilerinde sitotoksik olduğu görülmüştür (151).

Resveratrol'un antiproliferatif etkisi siklin E, siklin A, cdc2 ve Rb ekspresyonlarında meydana getirdiği değişiklikler ve buna bağlı olarak da hücre devrinin G2-S geçişinde tutulmaya sebep olmasıyla ilişkilidir (147, 159, 160, 161).

Literatürde çalışmamızda kullandığımız antioksidan maddeler ile ilgili bir çok yayın bulunduğu halde, her iki maddenin kombine olarak C6 glioma hücreleri ile ilgili bir çalışmada kullanımlarına rastlanmadı.

Bulgularımızı değerlendirdiğimizde, EGCG'nin yalnız kullanıldığı ve RES ile EGCG'nin kombine kullanıldığı deney gruplarımızda apoptozun indüklendiği ve proliferasyonun inhibe edildiği gözlenmiştir. RES 12,5mg/ml'lik dozun da diğer gruplar gibi apoptozu indüklediği,ancak erken zaman aralığında proliferasyonu inhibe etmediği gözlendi.

Çalışmamıza yakın araştırmalardan biri olan Lauren ve ark.'nın bulguları C6 glioma hücrelerinde resveratrolün tümör hücrelerini apoptoza yönlendirerek, anti-tümör etkisi olduğunu göstermiştir (162). Young ve ark.yaptığı çalışmada, resveratrolün 20mg/ml'ye kadar dozlarında ve yalnız kullanıldığı gruplarda C6 glioma hücreleri üzerine sitotoksik bir etkisi olmadığını göstermişlerdir (163).

Sonuçlarımızı destekleyen Shunichi ve ark. (164), Ahmad ve ark. (165),Watanabe ve ark. (166) çalışmalarında, EGCG'nin apoptozisi uyararak, tümör büyümesini engellediğini gözlemlemişlerdir.

İleriki çalışmalarda iki veya üç boyutlu tümör modelleri de kullanılarak, RES ve EGCG'nin tümör invazyonu, damar oluşumuna etkileri ve genel kanser tedavileri ile birlikte klinik kullanımına yönelik yeni değerlendirmelerin yapılmasında çalışmamızın önemli bir kaynak olacağı düşünülmektedir.

8. SONUÇ

İncelenen çalışmalarda, EGCG ve RES'in savunduğumuz şekilde apoptozu indükledikleri ve proliferasyonu inhibe ettikleri kaydedilmiştir. Biz de yaptığımız deneylerde RES ve EGCG'nin etkilerini ayrı ayrı (RES:12,5 mg/ml, EGCG:50 mg/ml ve 100 mg/ml) ve kombine gruplarda(EGCG+RES: 50 mg/ml+12,5 mg/ml, EGCG+RES: 100 mg/ml+12,5 mg/ml , EGCG+RES: 50 mg/ml+25 mg/ml , EGCG+RES: 100 mg/ml+50 mg/ml) farklı zaman aralıklarında(24, 48, 72 saat), sıçan C6 glioma hücrelerinde oluşturduğumuz modelde inceledik. Apoptozu belirlemek için hücreleri TUNEL yöntemi ile, proliferasyonu belirlemek için ise, hücreleri BrdU yöntemi ile işaretleyip görünür hale getirdik. Yaptığımız mikroskopik gözlemlerden sonra, şu çıkarımlarda bulduk:

RES'in 12,5 mg/ml'lik dozda tüm zaman aralıklarında zamanla artan bir apoptotik etkisi olduğu saptandı.

RES'in 12,5 mg/ml'lik dozda 24. ve 48. saatlerde proliferasyonu azalttığı saptandı.

EGCG'nin 50 mg/ml ve 100 mg/ml'lik dozlarının mikroskopik görüntülerinde iki dozda da zamanla apoptotik etkinin arttığı saptandı. İncelenen preparatlarda 72. saatin sonunda 100 mg/ml'lik dozun 50 mg/ml'lik doza göre daha etkin olduğu gözlemlendi.

EGCG'nin 50 mg/ml ve 100 mg/ml'lik dozlarının mikroskopik görüntülerinde proliferasyonu durdurduğu belirlendi. Zamanla hücre sayısında azalma olduğunu gözlemlendi.

EGCG+RES kombinasyonunda tüm grupların, hücre apoptozu üzerinde arttırıcı etkisi olduğu saptandı.

EGCG+RES kombinasyonlarının hücre proliferasyonunu durdurduğu, incelediğimiz preparatlarda gözlemlendi. EGCG ve RES kombinasyonlarının bütün dozlarda ve zaman aralıklarında BrdU ile işaretlenme göstermediği mikroskopik olarak gözlemlendi.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince, bıkmadan gösterdiği bilimsel yol gösterici tutumu ile bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yetişmemde kuşkusuz en büyük emeği olan danışman hocam, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ'a;

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilimsel birikimini benimle paylaşan, güleryüzünü ve desteğini esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK'e;

Apoptoz bulgularını değerlendirmemde yardımcı olan Dr. Elif İlkay TAŞKIN'a;

Tezimin başlangıcından itibaren bilgi ve görüşlerini benimle paylaşan, yapım aşamasında ve bulguları değerlendirmem konusunda bana yol gösteren Melike ERSÖZ'e

Yüksek Lisans eğitimin süresince bıkmadan usanmadan her türlü yardımına koşan, İlknur KARAOSMANOĞLU'na;

Dostlukları ve yardımları için, dönem arkadaşlarım İpek Pınar ÇALICIOĞLU'na, Elif YILMAZ'a, Ebru KARAKAŞ'a;

Her zaman yanımda olup, destek olan Gülsem BOSTANOĞLU'na;

Zor günlerimde yanımda olan ve hayatımın her anında yanımda olmasını istediğim Sinan EYİDOĞAN'a;

Yüksek Lisans yapmam konusunda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen kuzenim Çiğdem ŞEKERYAPAN'a;

Hayatım boyunca beni hep destekleyen ve gösterdikleri sevgi ve anlayışla bugün burada olmamı sağlayan anneannem Nebahat KIRGIZ'a, sevgili kardeşim Yasin YAŞA'ya, annem Dilek YAŞA'ya ve tüm aileme;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

10. KAYNAKLAR

1. Nussbaum LR, McInnes RR, Willard FH. Genetik ve Kanser. Thompson&Thompson Genetics in Medicine. Ed: Aktaş D. İstanbul, Güneş Kitabevi, 2005.
2. Derici E. Rho kinaz ve siklooksijenaz inhibitörleri ile siklofosamid kombinasyonlarının çeşitli tümör hücre serilerine etkileri. Mersin, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2007.
3. Uçar T. Bazı bitkisel çayların mineral madde içeriği üzerine farklı demleme ve kaynatma sürelerinin etkisi. Konya, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006.
4. Arslanyüreği H. Epigallocatechin-gallat'ın C6 glioma hücrelerine apoptotik etkileri. İstanbul, Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2009.
5. Kang WS, Lim IH, Yuk DY, Chung KH, Park JB, Yoo HS, Yun YP. Antithrombotic activities of green tea catechins and (-)-epigallocatechin gallate. *Thromb Res.* 1999, 96:229-237.
6. Muhandiram R, Chakrabartty A, Bennick A, Wroblewski K. The molecular interaction of human salivary histatins with polyphenolic compounds. *Eur J Biochem.* 2001, 268:4384-4397.
7. İkizler M, Dernek S, Erkasap N, Kaygisiz Z, Sevin B, Kural T. İzole rat kalplerine uygulanan reperfüzyon hasarında resveratrol'ün hemodinamik etkileri. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Der.* 2003, 11:91-95.
8. Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49:472-481.
9. Aggarwal BB, Shishir S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *J Biochem Pharmacol.* 2006, 71:1397-1421.
10. DiPaola RS, Patel J, Rafi MM. Targeting apoptosis in prostate cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2001, 15:509-24.
11. Daloğlu C.B. Tiroit kanserli ve tiroit bozukluğu olan hastalarda ras onkogen mutasyonlarının yuvalanmış polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon enzim kesimi ile araştırılması. Ankara, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2008.

12. Lowitz BB, Casciato AD. Principles of Medical Oncology and Cancer Biology. Manuel Of Clinical Oncology. Ed: Casciato AD. Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins, 2009.
13. Yiğitbaş B. Primer akciğer karsinomu nedeniyle opere edilecek hastalarda otofloresan ve senkron tümörlerin sıklığının araştırılması. İstanbul, Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Doktora Tezi, 2005.
14. Sábado Alvarez C. Molecular biology of retinoblastoma. *Clin Transl Oncol.* 2008, 10:389-394.
15. Berek JS, Martinez-Maza O, During O. Molecular Biology and Genetics in Berek & Novak's Gynecology. Ed: Berek J.S. Philadelphia USA, Lippincott Williams and Wilkins, 2007.
16. ÖZEN E. C6 glioma hücrelerinde Morinda citrifolia ve Paklitakselin etkilerinin araştırılması. İstanbul, Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2009.
17. Knudson AG. Chasing the cancer demon. *Annu. Rev. Genet.* 2000, 34:1-19.
18. Rang PH, Dale MM, Ritter MJ, Moore P. Cancer Chemotherapy. Pharmacology. London, Elsevier Churchill Livingstone, 2003.
19. Algier LA, Hanoğlu Z, Özden G, Kara F. The use of complementary and alternative (non-conventional) medicine in cancer patients in Turkey. *Eur J Oncol Nurs.* 2005, 9:138-146.
20. Molassiotis A, Fernandez-Ortega P, Pud D, Ozden G. Use of complementary and alternative medicine in cancer patients: a European survey. *Ann Oncol.* 2005, 16:655-663.
21. Niggeman B, Gruber C. Side effects of complementary and alternative medicine. *Allergy.* 2003, 58:707-716.
22. Yıldız GO. Santral Sinir Sistemi Tümörleri Ders Notları. Erciyes, 1-11.
23. Tascos N, Karkavelas G. Epidemiology, Histologic Classification, and Clinical Course of Brain Tumors. Imaging of Brain Tumors with Histological Correlations. Ed: Antonios Drevelegas. Berlin, Springer, 2011.
24. Memmedov C. Kersetin ve Epigallokateşin gallat'ın C6 glioblastoma multiforme kanser hücreleri üzerine toksik etkilerinin ve bu etkilerde kalsiyumun rolünün araştırılması. Eskişehir, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006.

25. Hanımoğlu H. Glioblastoma multiformede doku 8-hydroxydeoxyguanosine ve total antioksidan kapasite değerleri. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 2007.
26. Graham AC, Cloughesy TF. Brain tumor treatment: chemotherapy and other new developments. *Semin Oncol Nurs.* 2004; 20:260-272.
27. Bacciocchi G, Gibelli N. Establishment and characterization of two cell lines derived from human glioblastoma multiforme. *Anticancer Res.* 1992, 12:853-862.
28. Tatter SB , Wilson CB, Harsh GR. Neuroepithelial tumors of the adult brain. Youmans Neurological Surgery. Ed: Youmans RJ. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1990.
29. Lichtenberg FV . Infectious Disease. Pathologic Basis of disease Ed: Robbins S, Cotren RS, Vumar V. Philadelphia, WB. Saunders Co, 1989.
30. Watkins D, Rouleau AG. Genetics, prognosis and therapy of central nervous system tumors. *Cancer Detect and Prev.* 1994, 18(2):139-144.
31. Mut M. Glioblastomalarda fosfatidylinositol 3-kinase/akt yolu üzerinden elk-1 aktivasyonunun değerlendirilmesi. Ankara, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2007.
32. Sutherland GR, Florell R, Louw D, Choi NW,Sima AA. Epidemiology of primary intracranial neoplasms in Manitoba, Canada. *Can J Neurol Sci.* 1987, 14(4):586-592.
33. Ergüven M. Suramin'in C6 gliomada telomeraz aktivitesi üzerine etkisi. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2004.
34. Bakır A. İnsan glioblastoma multiforme hücre dizisi (cell line) oluşturulması. Ankara, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 1995
35. Gazi C, Tapul L. Sıçan C6 glioma hücreleri üzerine Aloe emodin ve Cisplatinin etkilerinin iki ve üç boyutlu hücre kültür modellerinde incelenmesi. *J Ist Faculty Med.* 2006, 69:110-116.
36. Grobben B, De Deyn PP, Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res.* 2002, 310(3):257-270.
37. Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated rat glial strain in tissue culture. *Science.* 1968, 161:370-371.
38. Tosun İ, Karadeniz B. Çay ve çay fenoliklerinin antioksidan aktivitesi. *J. of Fac. of Agric., OMU.* 2005, 20:78-83.
39. Trevisanato SI, Young-In Kim MD. Tea and Health. *Nutr Rev.* 2000, 58:1-10.

40. Fujimura Y, Hirofumi T. Molecular Basis for the Anti-Cancer Activity of EGCG In vivo. Handbook of Green Tea and Health Research. Ed: McKinley H, Jamieson M. NewYork, Nova Science, 2009.
41. Gupta S, Saha B, Giri AK. Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: a Review. *Mutat Res.* 2002, 512:37-65.
42. Chu KO, Wang CC, Chu CY, Rogers MS, Choy KW, Pang CP. Determination of chatechin and chatechin in tissues bu liquid chromatography with coulometric array detection and selective solid phase extraction. *J Chromatogr.* 2004, 810:187-195.
43. Benzie IFF, Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioksidant power assay. *J Agric Food Chem.* 1999, 64:633-636.
44. Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Tea flavonoids: Their functions, utilisation and analysis. *Trends in Food Sci Tech.* 2000, 11:152-160.
45. Karaman B, Belce A, Altug T. Kanserde kateşinlerin rolü. *Türk Onkoloji Dergisi.* 2000, 15(3):123-126.
46. Yang CS, Landau JM. Effects of tea consumption on nutrition and health. *American Society for Nutritional Sciences.* 2000, 130:2409-2412.
47. Yang CS, Chung JY, Yang G, Chhabra SK, Lee M. Tea and tea polyphenols in cancer prevention. *American Society for Nutritional Sciences.* 2000, 130:472-478.
48. Yokoyama S, Hirano H, Wakimaru N, Sarker KP, Kuratsu J. Inhibitory effect of epigallocatechin-gallate on brain tumor cell lines in vitro. *Neuro Oncol.* 2001, 3(1):22-28.
49. Na HK, Sur YJ. Intracellular signaling network as a prime chemopreventive target of (-)-epigallocatechin gallate. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006, 50(2):152-159.
50. Katiyar S, Elmets CA, Katiyar SK. Green tea and skin cancer: Photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. *J Nutr Biochem.* 2007, 18:287-296.
51. Cichewicz HR, Kouzi AS. Resveratrol oligomers: Structure, chemistry and biological activity. *Natural Products Chemistry.* 2002, 26(7):507-579.
52. Langcake P, Pryce RJ. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia.* 1997, 33:151-152.
53. Alkan R. Natural plant antibiotics: resveratrol. *Gıda.* 2007, 32(5):259-262.
54. Shishir S, Bharat B. Aggarwal. Resveratrol: A Polyphenol for All Seasons. Resveratrol in Health and Disease. Ed: Aggarwal BB, Shishir S. London, Taylor&Francis, 2006.

55. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?. *Clin Biochem.* 1997, 30:91-113.
56. Jang M, Cai L, Udeani GO et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* 1997, 275:218-220.
57. Ahmad KA, Clement MV, Hanif IM, Pervaiz S. Resveratrol inhibits drug-induced apoptosis in human leukemia cells by creating an intracellular milieu nonpermissive for death execution. *Cancer Res.* 2004, 64:1452-1459.
58. Schneider Y, Vincent F, Duranton B, et al. Anti-proliferative of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Lett.* 2000, 158:85-91.
59. Kim YA, Rhee SH, Park KY, Choi YH. Antiproliferative effect of resveratrol in human prostate carcinoma cells. *J Med Food.* 2003, 6:273-280.
60. Koca İ, Evren M. Resveratrol ve Sağlık Üzerine Etkisi. Türkiye 10. Gıda Kongresi. 2008, 1099-1102.
61. King RE, Bomser JA, Min DB. Bioactivity of resveratrol. *Compreh Rev Food Sci Food Safety.* 2006, 5:65-70.
62. Başaran A. Tıbbi Biyoloji. İstanbul, Güneş&Nobel Tıp Kitapevleri, 2005.
63. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972, 26: 239-257.
64. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol.* 1997, 21(1):88-101.
65. Wyllie A H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980, 284: 555-556.
66. Cohen J J. Apoptosis. *Immunol Today.* 1993, 14:126-130.
67. Cohen J J. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract.* 1993, 15: 35-43 .
68. Çolakoğulları M. BCL-2 proteininin apoptoz yolları üzerine etkisinin incelenmesi. Bursa, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2007.
69. Levison DA, Hopvwood D. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol.* 1976, 119:159-166.
70. Geoffrey MC. and Robert EH. The cell a molecular approach. Boston, ASM Press, 2004.
71. MAK T. The E. Donnall Thomas Lecture--apoptosis: "tis death that makes life live".

- Biol Blood Marrow Transplant.* 2003, 9(8):483-488.
72. Ulukaya E. Biyokimya Ders Notları. Bursa, 2003, 58-64.
73. Öztürk F. Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2002, 9(2):143-148.
74. Öniz H. Apoptoz: ölmeye yatmak. *SSK Tepecik Hast Derg.* 2004, 14(1):1-20.
75. Erdogan BB, Uzaslan EK. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. *Akciger Arsivi.* 2003, 4:165-174.
76. Güneş VH. Moleküler Hücre Biyolojisi Kitabı. Eskişehir, Kaan Kitabevi, 2006.
77. Lossi L, Merighi A. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian. *Cns. Prog Neurobiol.* 2003, 69:287-312.
78. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the cell. New York, Garland Science Taylor & Francis Group, 2002.
79. Clarke LE, Bayerl MG, Bruggeman RD, Mauger D et al. Death receptor apoptosis signaling mediated by FADD in CD30-positive lymphoproliferative disorders involving the skin. *Am J Surg Pathol.* 2005, 29(4):452-459.
80. Arai M, Sasaki A, Saito N, Nakazato Y. Immunohistochemical analysis of cleaved caspase-3 detects high level of apoptosis frequently in diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system. *Pathol Int.* 2005, 55(3):122-9.
81. Bostancıoğlu R. Beklem. Bazı binaftol türevlerinden hareketle elde edilen metal komplekslerinin sağlam ve kanserli hücreler üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması. Eskişehir, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2007.
82. Chang Hy, Yang X. Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000, 64:821-46.
83. Walker NI, Harnon BW, Gobe GC, Kerr JF. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol.* 1988, 13:18-54.
84. Wyllie AH. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980, 68:251-306.
85. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Review.* 1993, 14:133-150.
86. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabaib VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death?. *Exp Cell Res.* 2003, 283:1-16.
87. Erdoğan BB, Uzaslan EK. Apoptozis mekanizmaları: Tümör gelişiminde Fas-FasL bağımlı apoptozis. *Akciger Ars.* 2003, 4:165-174.

- 88.** Yehielly F, Deiss LP. Apoptosis and cancer. Basic Science of Cancer. Ed. Kruh GD, Tew KD. Philadelphia, Current Medicine Group, 2000.
- 89.** Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea JR, Krajewski S, Reed JC, Dietrich WD. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Nueropathol Exp Neurol.* 2001, 60:422-429.
- 90.** Lou J, Lenke LG, Ludwig FJ, O'Brien MF. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* 1998, 36:683-690.
- 91.** Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K, Fadel MP, Lozyk M, Gopin IS, Opas M, Bleackly CR, Green RD, Michalak M. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol.* 2000, 150:731-740.
- 92.** Rao RV, Hermel E, Obregon SC, Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program mechanism of caspase activation. *J Biol Chem.* 2001, 276:869-874.
- 93.** Antar V. Bir genel kaspaz inhibitörü olan Qvd-Oph'nin nöroprotektif etkilerinin deneysel spinal kord travması modelinde incelenmesi. İstanbul, Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, Uzmanlık Tezi, 2005.
- 94.** Sakızlı M, Atabey N. Hücre: Moleküler Yaklaşım . İzmir, İzmir Tıp Kitabevi, 2006.
- 95.** Altunkaynak ZB, Özbek E. Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir?. *Tıp Araştırmaları Dergisi.* 2008, 6(2):93-104.
- 96.** Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Diff.* 2007, 14(1):32-43.
- 97.** Prior PF, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *J Biochem.* 2004, 384:201–232.
- 98.** Forest V, Peoc'h M, Campos L et al. Effects of cryotherapy or chemotherapy on apoptosis in a non-small-cell lung cancer xenografted into SCID mice. *Cryobiology.* 2005, 50(1):29–37.
- 99.** Aydın Y. Sıçanlarda tek taraflı ooferektomi sonrası kalan overde follikül dinamiği ve apoptoz'un incelenmesi. İzmir, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 2008.
- 100.** Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family of proteins in apoptosis, apoptosomes or mitochondria?. *Genes Cells.* 1998, 3(11): 697-707.

- 101.** Taneja N, Tjalkens R, Philbert MA, Rehemtulla A. Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system. *Oncogene*. 2001, 20(2): 167-77.
- 102.** Kim M, Tilly JL. Current Concepts in Bcl-2 Family Member Regulation of Female Germ Cell Development and Survival. *Biochimica et Biophysica Acta* . 2004, 1644:205–210.
- 103.** Er E, Oliver L, Cartron P, Juin P, Manon S, Vallette FM. Mitochondria as the target of the proapoptotic protein Bax. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2006, 1757:1301–1311.
- 104.** Virkajarvi N, Paakkö P, Soini Y. Apoptotic index and apoptosis influencing proteins Bcl-2, Mcl-1, Bax and Caspases 3, 6 and 8 in pancreatic carcinoma. *Histopathology*. 1998, 33:432–439.
- 105.** Soy N.N. Doku kültüründe paklitaksel'in apoptotik ve antiproliferatif etkileri. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006.
- 106.** Thompson CB. Apoptosis in The Pathogenesis of Autoimmune Disease. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995, 267: 1456-1462.
- 107.** Fisher DE. Apoptosis in Cancer Therapy: Crossing the Threshold. *Cell*. 1994, 78(4): 539-542.
- 108.** Vogelstein B, Kinzler KW, p53 function and dysfunction, *Cell*, 1992, 70:523-526.
- 109.** KURDOĞLU B. Taksole bağlı olarak oluşan radyoduyarlılığın moleküler mekanizmasının araştırılması. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 1998.
- 110.** Kaellin WG. The emerging p53 gene family. *J Natl Cancer Inst*. 1999, 91:594-598.
- 111.** Jin WP, Quan XQ, Meng FP, Cui XD, Piao HJ. Relationship among hepatocyte apoptosis, P450 2E1 and oxidative stress in alcoholic liver disease of rats. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2007, 19(7):419-421.
- 112.** Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992, 119:493-501.
- 113.** Ünal O. İnternal torasik arter üzerine topikal uygulanan papaverin, diltiazem ve nitroprussid'in apoptotik etkilerinin karşılaştırılması. Eskişehir, Orhangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 2006.
- 114.** Babich H, Reisbaum AG, Zuckerbraun HL. In vitro response of human gingival epithelial S-G cells to resveratrol. *Toxicol Lett*. 2000, 114:143-153.

- 115.** Tokaç D. Bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin oksidatif DNA hasarına etkileri. Ankara, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2007.
- 116.** İrteğün S. (+)-Kateşinin ovariectomize edilen ve potasyum bromat etkisine maruz bırakılan Wistar ratların çeşitli dokularında bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkisi. Elazığ, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006.
- 117.** Sueoka N, Suganuma M, Sueoka E, Okabe S, Matsuyama S, Imai K et al. A new function of green tea: prevention of lifestyle-related diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2001, 928:274-280.
- 118.** Jankun J, Selman SH, Skrzypczak-Jankun E. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature.* 1997, 387:561.
- 119.** Ahmad N, Mukhtar H. Green tea polyphenols and cancer: Biologic mechanisms and practical implications. *Nutr Rev.* 1999, 57:78–83.
- 120.** Chung FL, Schwartz J, Herzog CR, Yang YM. Tea and cancer prevention: studies in animals and humans. *J Nutr.* 2003, 133(10):3268-3274.
- 121.** Cabrera C, Artacho R, Gimenez A. Beneficial effects of green tea-a review. *J Am Coll Nutr.* 2006, 25(2):79-99.
- 122.** Yang CS, Maliakal P. ve Meng X. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002, 42:25-54.
- 123.** Okabe S, Suganuma M, Hayashi M, Sueoka E, Komori A, Fujiki H. Mechanisms of Growth Inhibition of Human Lung Cancer Cell Line, PC-9, by Tea Polyphenols. *Cancer Science.* 1997, 88(7):639-643.
- 124.** 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(6):844-850.
- 125.** Yamamoto T, Hsu H, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B et al. Green tea polyphenols causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003, 301:230-236.
- 126.** Sutherland BA, Rahman RMA, Appleton I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia induced neurodegeneration. *J Nutr Biochem.* 2006, 17(5):291-306.

- 127.** Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor kappa B in cancer cells versus normal cells. *Arch Biochem Biophys.* 2000, 376:338-346.
- 128.** Okabe S, Ochiai Y, Aida M, Park K, Nomura T, Suganuma M.ve Fujiki H. Mechanistic aspects of green tea as a cancer preventive: effects of components of human stomach cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res.* 1999, 90:733-739.
- 129.** Chung LY, Cheung TC, Kong SK, Fung KP, Choy YM, Chan ZY, Kwok TT. Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU 145 cells. *TIT J Life Sci.* 2001, 68:1207–1214.
- 130.** Otsuka T, Ogo T, Asano Y, Suganuma M, Niho Y. Growth inhibition of leukemic cells by (-)-Epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea. *TIT J Life Sci.* 1998, 63:1397-1403.
- 131.** Hayakawa S, Saeki K, Sazuka M., Suzuki Y, Shoji Y, Ohta T et al. Apoptosis induction by Epigallocatechin gallate involves its binding to Fas. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 285:1102-1106.
- 132.** Islam S, Islam N, Kermod T, Johnstone B, Mukhtar H, Moskowitz R et al. Involvement of caspase 3 in Epigallocatechine-3-gallate mediated apoptosis of human chondrosarkoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000, 270: 793-797.
- 133.** Dirks PB, Rutka JT. Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle--a review. *J Neurosurg.* 1997, 40:1013-1015.
- 134.** Aktas O, Prozorovski T, Smorodchenko A, Savaskan NE, Lauster R, Kloetzel PM, Infante-Duarte C, Brocke S, Zipp F. Green tea Epigallocatechin-3-gallate mediates T cellular Nfkappa B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2004, 173:5794-5800.
- 135.** Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate Differentially Modulates Nuclear Factor κ B in Cancer Cells versus Normal Cells. *Arch Biochem Biophys.* 2000, 376(2):338-346.
- 136.** Fujiki H, Saganuma M, Okabe S. Sueoka N, Komori A, Sueoka E, Kozu T, Tada Y, Suga K, Imai K, Nakachi K. Cancer inhibition by green tea. *Mutat Res.* 1998, 402:307-310.
- 137.** Hibasami H, Komiya T, Achiwa Y, Ohnishi K , Kojima T, Nakanishi K, Akashi K,

Hara Y. Induction of apoptosis in human stomach cancer cells by green tea catechins. *Oncol Rep.* 1998, 5:527-529.

138. Hirose M, Hoshiya T, Akagi K, Takahashi S, Hara Y, Ito N. Effects of green tea catechins in a rat multiorgan carcinogenesis model. *Carcinogenesis.* 1993, 14:1549-1553.

139. Chen ZP, Schell JB, Ho CT, Chen KY. Green tea Epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Lett.* 1998, 129:173-179.

140. Nasani I, Seimiya H, Tsuruo T. Telomerase inhibition, telomerase shortening, and senescence of cancer cells by tea catechins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, 249:391-396.

141. Katdore M, Osborne MP, Telang NT. Inhibition of aberrant proliferation and induction of apoptosis in pre-neoplastic human mammary epithelial cells by natural phytochemicals. *Oncol Rep.* 1998, 5:311-315.

142. Okuda T, Mori K, Hayatsu H. Inhibitory effect of tannins on direct-acting mutagens. *Chem Pharmaceut Bull.* 1984, 32:3755-3758.

143. Tanaka R. Protective effects of (-)-Epigallocatechin gallate and (+)-Catechin on paraquat-induced genotoxicity in cultured cells. *J Toxicol Sci.* 2000, 25:199-204.

144. Iwai K, Iwamura Y, Yamashita S, Wadano Y, Mesaki N. Effect of tea catechins on mitochondrial DNA 4977- bp deletion in human leucocytes. *Mutat Res.* 2006, 595(1-2):191-195.

145. Saganuma M, Okabe S, Sueoka E, Lida N, Komori A, Kim S, Fujiki H. A new process of cancer prevention mediated through inhibition of tumor necrosis factor expression. *Cancer Res.* 1996, 56:3711-3715.

146. Bhat KP, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann.NY. Acad.Sci.* 2002, 957:210-229.

147. Hsieh TC, Wu JM. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp. Cell Res.* 1999, 249:109-115.

148. El-Mowafy AM, Alkhalaf M. Resveratrol activates adenylyl-cyclase in human breast cancer cells: a novel, estrogen receptor-independent cytostatic mechanism. *Carcinogenesis.* 2003, 24(5):869-873.

- 149.** Şahin F, Avcu F, Saydam G, Yılmaz Mİ, Sarper M, Hışıl Y, Ural AU, Omay S.B. Kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktı ve ana bileşenlerinden resveratrol ve boraks malign hücre dizileri üzerinde sitotoksik etki göstermektedir. *Turk J Hematol.* 2004, 21:3.
- 150.** Benitez DA, Pozo-Guisado E, Alvarez-Barrientos A, Fernandez-Salguero PM, Castellon EA. Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines. *J Androl.* 2006, 28(2).
- 151.** Riles WL, Erickson J, Nayyar S, Atten MJ, Attar BM, Holian O. Resveratrol engages selective apoptotic signals in gastric adenocarcinoma cells. *World J Gastroenterol.* 2006, 12(35): 5628-5634.
- 152.** Zunino JS, Storms DH. Resveratrol-induced apoptosis is enhanced in acute lymphoblastic leukemia cells by modulation of the mitochondrial permeability Transition Pore. *Cancer Lett.* 2005, 1-12.
- 153.** Sharma HW, Narayanan R. The Nf-KappaB transcription factor in oncogenesis. *Anticancer Reseach.* 1996, 16(2):589-96.
- 154.** Luque I, Gelinas C. Rel/Nf-KappaB and I kappaB factors in oncogenesis. *Semin Cancer Biol.* 1997, 8(2): 103-11.
- 155.** Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-κB/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1994, 269: 4705-4708.
- 156.** Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppress TNF-induced activation of nuclear transcription factors Nf-kappaB, activator Protein-1 and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol.* 2000, 164:6509-6519.
- 157.** Han YS, Zheng WH, Bastianetto S, Chabot JG, Quirion R. Neuroprotective effects of resveratrol against β-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. *Br J Pharmacol.* 2004, 141: 997-1005.
- 158.** Pervaiz S. Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin R Resveratrol. *Drug Resist Updat.* 2004, 7(6):333-344.
- 159.** Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, Pietra VD, Racioppi L, Soldati G et al. Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 1998, 250:53-58.
- 160.** Hsieh TC, Burfeind P, Laud K, Backer JM, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Wu

- JM. Cell cycle effects and control of gene expression by resveratrol in human breast carcinoma cell lines with different metastatic potentials. *Int. J. Oncol.* 1999, 15:245-252.
- 161.** Bernhard D, Tinhofer I, Tonko M, Hubl H, Ausserlechner MJ, Greil R et.al. Resveratrol causes arrest in the S-phase prior to Fas-independent apoptosis CEM-C7H2 acute leukemia cells. *Cell Death Differ.* 2000, 7:834-842.
- 162.** Zamin LL, Filippi-Chiela CE, Dillenburg-Pilla P, Horn F, Salbego C, Lenz G. Resveratrol and Quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. *Cancer Sci.* 2009,100(9):1655-1662.
- 163.** Kim AY, Lim YS, Rhee HS, Park YK, Kim HC,Choi TB, Lee JS,Park MY,Choi HY. Resveratrol inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in β -amyloid-treated C6 glioma cells. *Int J Mol Med.* 2006, 17(6):1069-1075.
- 164.** Shunichi Y, Hirofumi H, Naruhito W, Krishna PS, Jun-ichi K. Inhibitory effect of Epigallocatechin-gallate on brain tumor cell lines in vitro. *Neuro Oncol.* 2001, 3(1): 22-28.
- 165.** 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.* 1997, 89:1881-1886.
- 166.** Watanabe J, Kawabata J, Niki R. Isolation and identification of Acetyl-CoA carboxylase inhibitors from green tea (*Camellia sinensis*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998, 62:532-534.