

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

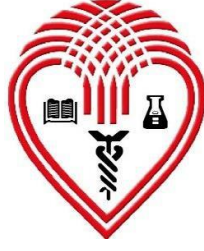
**MCF-7 HÜCRE SOYUNDA RESVERATROLÜN APOPTOZ
MEKANİZMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Eczacı Gülten KARABEKİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. GÜNNUR DEMİRCAN**

2017-İSTANBUL



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

**MCF-7 HÜCRE SOYUNDA RESVERATROLÜN APOPTOZ
MEKANİZMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Eczacı Gülten KARABEKİR
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. GÜNNUR DEMİRCAN**

**JÜRİ ÜYELERİ
Doç. Dr. AHMET OKAY ÇAĞLAYAN
Yrd. Doç. Dr. GÜNNUR DEMİRCAN
Yrd. Doç. Dr. YOSUN MATER**

2017-İSTANBUL

TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI

17 Ocak 2017

Yüksek Lisans öğrencisi Gülten KARABEKİR, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı'nda hazırlanmış olduğu "MCF-7 Hücre Soyunda Resveratrolün Apoptoz Mekanizması Üzerine Etkisinin Araştırılması" konulu tezini savunmuş ve aday jüri tarafından BAŞARILI/BAŞARISIZ bulunarak tez hakkında OYBİRLİĞİ/ÖYÇÜKLÜĞÜ ile KABUL, DEĞİLTME, RED kararı verilmiştir.


Yard. Doç. Dr. Gümüş DEMİROĞAN
(Üye)


Doç. Dr. Ahmet Okay ÇAĞLAYAN
(Başkan)

Yard. Doç. Dr. Fesih MATER
(Üye)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını ,tezimdeki 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 çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Eczacı Gülten Karabekir



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi birikimini ve anlayışını benden hiç esirgemeyen, verdiği tüm destek ve emeklerinden dolayı çok değerli hocam ve danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Günnur Demircan’a,

Çalışma konusunun belirlenmesi için yol gösteren Sayın Doç Dr.Veyssel Sabri Hançer’e,
Yüksek Lisans eğitimime katkıda bulunan İstanbul Bilim Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Yrd. Doç. Dr. Şule Beyhan Özdaş ve Doç. Dr. Ahmet Okay Çağlayan’a,

Flow Sitometri sonuçlarını değerlendirmemizde desteğini esirgemeyen Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Ayten Kandilci’ye, Yrd. Doç. Dr. Yosun Mater’e, Araştırma Görevlisi Z. Onur Çalışkaner’e, Araştırma Görevlisi Türkan Çakar’a,

Ve son olarak bana desteklerini hiç esirgemeyen , her zaman yanımda olan aileme ve çalışmalarım sırasında büyük sabır gösteren küçük kızım Melisa’ya sonsuz teşekkürler..

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGE VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	x
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	3
3 . GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. KANSER	7
4.1.1. Kanser Oluşumuna Etki Eden Faktörler	8
4.2. MEME KANSERİ	12
4.2.1. Meme Kanseri Oluşumuna Etki Eden Faktörler	14
4.2.1.1. Östrojen	15
4.2.1.2. Oksidatif Stres	16
4.3. MCF7 HÜCRE SOYUNUN ÖZELLİKLERİ	18
4.4. RESVERATROL	19
4.4.1. Resveratrol'un Anti-Kanser ve Apoptik Etkisi	20
4.5. APOPTOZ	22
4.5.1. Apoptoz Mekanizmaları	24
4.5.1.1 Mitokondriyal Yol ile Apoptoz	25
4.5.1.2. Dış Sinyaller Yolu ile Apoptoz	25

4.5.1.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz	25
4.5.2. Apoptozun Görüldüğü Durumlar	26
4.5.2.1. Embriyonik Dönemde Gözlenen Apoptoz	26
4.5.2.2. Postnatal Hayatta Gözlenen Apoptoz	26
4.5.2.3. Patolojik Durumlarda Gözlenen Apoptoz	27
4.5.3. Apoptoz Ve Nekroz Arasındaki Farklar	27
4.5.4. Apoptozun Genetik Kontrolü	29
4.5.4.1. Antiapoptotik	29
4.5.4.2. Proapoptotik Proteinler	31
4.6. APOPTOZUN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER	32
5. MATERYAL VE YÖNTEM	38
5.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN LABORATUVAR CİHAZ VE KİMYASALLARI	38
5.1.1. Kullanılan Cihazlar	38
5.1.2. Kullanılan Kimyasallar	38
5.1.3. Kullanılan Gereçler	38
5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER	39
5.2.1. Hücre Kültürü Aşaması	39
5.2.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı	39
5.2.1.2. Hücre Soyunun Açılması	40
5.2.1.3. Hücrelerin Çoğaltılması ve Sayımı	41
5.2.1.4. Resveratrolün Hücrelere Verilecek Dozlarının Ayarlanması	41
5.2.2. MTT Ölçümü	42
5.2.3. Apc Anneksin V İle Flow Sitometri Ölçümü	44
6. BULGULAR	46
6.1. MTT SONUÇLARI	46

6.2. ANNEKSİN V FLOW SİTOMETRİ SONUÇLARI	48
7.TARTIŞMA	56
8.SONUÇ	61
9. KAYNAKLAR	62
10.EKLER	80
EK 1: ÖZGEÇMİŞ	81
EK 2. ETİK KURUL ONAYI	81
EK 3.İstanbul Bilim Üniversitesi Multidisipliner Araştırma Laboratuvarı	
ÇALIŞMA İZİN ONAYI	83

SİMGE VE KISALTMALAR

APA F-1: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör

ATP: Adenozin trifosfat

BRDU : Bromo Deoksi Üridin

CAD: Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonukleaz

DCIS: Ductal Carcinoma İn Situ

DMEM-F12 Ham Medyumu: Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Medyumu, Besleyici

karışım F12 Ham Medyumu

DMSO: Dimetil Sulfoksit

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

E₁: Östron

E₂: β-östradiol

E₃: Östriol

ER: Östrojen Reseptörleri

FCS: Fetal Sığır Serumı

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

IAP: Apoptoz Proteinleri İnhibitörleri

ICAD: Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonukleaz İnhibitörü

IGF-1: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

LCIS: Lobular Carcinoma İn Situ

LPS: Lipopolisakkarit

MtDNA: Mitokondrial DNA

MtRNA: Mitokondrial RNA

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide

NO: Nitrik Oksit

OH: Hidroksil Radikali

PI: Propidium İyodür

PBS: Fosfat Tampon Çözeltisi

RES: Resveratrol

ROO: Peroksil Radikali

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SOD: Süperoksid Dismutaz

STS: Steroid Sülfataz

TdT: Terminal Deoxy Nükleotidil Transferaz

TNF: Tümör Nekroz Faktör

TSG : Tümör Supressor Gen

Yüksek Lisans Tez proje No: TBG/ YL/2332016

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 4. 1: MCF-7 Hücre Soyunun Yapısı	18
Şekil 4. 2: Resveratrol' un Moleküler Yapısı	18
Şekil 4.3: Apoptozun Sinyal Yolları	24
Şekil 4.4: Nekroz ve Apoptozun Elektron Mikroskobu Görüntüleri	28
Şekil 4.5: FITC ile işaretli Annexin-V hücre Yüzeyine Çıkan Fosfatidilserine	34
Bağlanabilmektedir	
Şekil 4.6: FITC-Anneksin V'in apoptotik Hücelere Bağlanması ile Elde Edilen Hücre Dağılımları	35
Şekil 5. 7 :MTT Testi Öncesi 96 Kuyucuklara Ekilmiş Hücreler	41
Şekil 5. 8: 12. Saat MTT Sonuç Görüntüleri	41
Şekil 5.9: 24. Saat MTT Sonuç Görüntüleri	42
Şekil 5.10 : 48. Saat MTT Sonuç Görüntüleri	42
Şekil 6.11: 12, 24 ve 48. Saatlerdeki Resveratrol Verilmemiş Kontrol Gruplarının Flow Sitometrik Ölçüm Grafikleri	48
Şekil 6. 12:100 µM Resveratrol Verilmiş MCF-7 Hücre Soyunda 12,24 ve 48. Saatlerdeki Flow Sitometrik Ölçüm Grafikleri	49
Şekil 6.13:100 µM Resveratrol Verilmiş MCF-7 Hücre Soyunda 12,24 ve 48. Saatlerdeki Flow Sitometrik Ölçüm Grafikleri	50
Şekil 6.14: 250 µM Resveratrol Verilmiş MCF-7 Hücre Soyunda 12,24 ve 48. Saatlerdeki Flow Sitometri Ölçüm Grafikleri	51
Şekil 6.15: MCF-7 Hücre Soyu Kontrol Grubu	52
Şekil 6.16: 250 µM Resveratrol Verilmiş MCF-7 Hücre Soyunun 12. Saat 10x40 Mikroskop Görüntüsü	52

Şekil 6.17: 250 µM Resveratrol Verilmiş MCF-7 Hücre Soyunun 24. Saat 10x40 Mikroskop Görüntüsü	53
Şekil 6.18: 250 µM Resveratrol Verilmiş MCF-7 Hücre Soyunun 48. Saat 10x40 Mikroskop Görüntüsü	53



TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1 :Anneksin-V pozitif, Propidyum iyodür Negatif hücreler Apoptotik Hücreler	37
Tablo 6.2: 10, 25, 50, 100, 250, 500 μ M Resveratrol verilmiş ve hiç Resveratrol Verilmemiş (Kontrol) MCF-7 Hücre Soyunun 12, 24 ve 48. Saatlerindeki MTT Absorbans Değerleri	46
Tablo 6.3: MCF-7 Hücre Soyunda Resveratrolün Kontrol Grubu, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M Konsantrasyonlarında 12. Saat Absorbans/Konsantrasyon Grafiği	47
Tablo 6.4: MCF-7 Hücre Soyunda Resveratrolün Kontrol Grubu, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M konsantrasyonlarında 24. Saat Absorbans/Konsantrasyon Grafiği ...	47
Tablo 6.5: MCF-7 Hücre Soyunda Resveratrolün Kontrol Grubu, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M konsantrasyonlarında 48. Saat Absorbans/Konsantrasyon Grafiği	48
Tablo 6. 6: Kontrol grubu 24 ve 48. Saat MCF-7 Hücre Soyu ve 100 ve 250 μ M Resveratrol Verilmiş MCF-7 Hücre Soyunda 12,24 ve 48. Saatlerdeki Canlı Hücre (Anneksin V (-) PI (-)), erken apoptotik hücre (Anneksin V (+) PI (-)),nekrotik hücre (Anneksin V (-) PI (+)) ve geç apoptotik ve nekrotik hücre (Anneksin V (+) PI (+)) Yüzde Değerleri	48

1.ÖZET

MCF-7 HÜCRE SOYUNDA RESVERATROLÜN APOPTOZ MEKANİZMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRIMASI

Öğrencinin Adı: Gülten Karabekir

Danışmanı: Günnur Demircan

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji ve Genetik

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en çok görülen malign tümördür. Kadınlarda görülen tüm kanserlerin %30'unu oluşturmaktadır. Tüm jinekolojik tümörlerden meme kanseri 3 kat daha yaygındır. Kanser sadece bir sağlık sorunu değildir. Sosyal ve ekonomik olarak da bir toplum sorunudur. Bu son derece önemli sağlık sorununa çözüm bulmak bir çok araştırmacı için ilk hedef olmuştur. Farklı maddelerin bu hastalık üzerindeki etkileri için tedaviye yönelik çalışmalar yoğun olarak araştırılmaktadır.

Kanser tedavilerinde kullanılan çeşitli bitkisel maddeler, hücre proliferasyonunu engellemeleri ve buna karşılık apoptozu tetiklemeleri nedeniyle kullanılmaktadırlar.

Çalışmamız da in-vitro ortamda doğal polifenolik bir bileşik olan resveratrolun MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmalarımızda, hücrelere verilecek olan resveratrol dozları MTT analizi ile belirlenmiştir. MTT analizi ilk olarak Mosmann tarafından geliştirilmiştir, ardından Alley ve ark. tarafından uygulanmıştır. Bu yöntemde 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ile hücre canlılığı tespit edilmiştir. 12, 24 ve 48 saat süreyle 100 ve 250 μ M resveratrol ile inkübe ettiğimiz MCF-7 hücrelerinden elde ettiğimiz MTT sonuçlarından, resveratrolun artan konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak hücre yoğunluğunun kontrol grubuna göre azaldığı tespit edildi.

MTT analizlerinde, kontrol grubuna göre %50 absorbans azalmasına yol açan resveratrol dozu (IC50) sitotoksik doz olarak belirlenmiştir. Analizlerde 12. saatte ölçülen sitotoksik doz 250-500 μ M arasında, 24. saatteki ölçümlerde 100-250 μ M arasında, 48. saatteki ölçümlerde ise 100 μ M olarak belirlenmiştir.

Çalışmalarımızdan elde edilen Anneksin V Flow-Sitometri ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde; MCF-7 hücrelerine verilen 100 ve 250 µM resveratrolün kontrol grubuna göre erken apoptozu arttırdığı gözlemlenmiştir. Özellikle 48 saat sonunda erken apoptozis yüzdesinin kontrol grubuna kıyasla fazla oranda arttığı görülmüştür.

Resveratrol'un kontrol grubuna göre, MCF-7 hücrelerinde apoptozu arttırıcı etki gösterdiği ve hücre poliferasyonunu azalttığı gözlemlenmiştir. Faz kontrast mikroskobunda yapısal değişiklikler izlenmiş ve fotoğraflanmıştır.

Sonuç olarak, resveratrolun tüm bu antikanser etkilerinden biri olan apoptotik etkisi hem doz hem de zamana bağlı olarak MCF-7 meme kanseri hücre soyunda özellikle erken apoptozu indüklediği gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: MCF-7, Anneksin V, Apoptoz, Resveratrol

2. SUMMARY

STUDY ON EFFECTS OF RESVERATROL ON APOPTOSIS IN MCF-7 CELL LINE

The Name of the Student: Gülten Karabekir

Supervisor: Günnur Demircan

Department: Faculty of Medical Biology and Genetics

Breast cancer today is the most common malignant tumor amongst women worldwide. It alone makes up the 30 % of all malignancies in women. Breast cancer is 3 times more common than the rest of all gynecological cancers. It is so presenting not just a major health problem for our modern society but also a significant social and economic dilemma. Being a major current socio-economical-medical problem to tackle, the disease has been a priority of research that aims the early diagnosis and more efficient treatment methods, in particular better chemotherapeutic agents.

Various plant based chemicals are used in cancer therapy to prevent cell proliferation while triggering apoptosis.

In the lights of existing knowledge and experience, our study aimed the evaluation of the selective cytotoxic effect of resveratrol, a polyphenolic phytonutrient agent, on MCF-7 type breast cancer cells in an invitro environment.

In our work we determined the dose of resveratrol by carrying out MTT analysis. MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide} assay, which was first used by Mosmann and further developed by Alley and colleagues, is a practical test used to determine cell viability. The right dosaging of resveratrol was determined after MCF-7 cells were incubated with 100 and 250 μ M of resveratrol for 12, 24 and 48 hours. We found that cell density decreased compared to the control group in increasing concentrations of resveratrol.

MTT analysis helped us identify the cytotoxic concentration of resveratrol that decreases the absorbance of cells by 50% (IC₅₀) compared to the control group. Different

incubation times led to different cytotoxic doses such as 250-500 μM , 100-250 μM , 100 μM after 12, 24 and 48 hours, respectively.

When the Annexin V Flow-Cytometry results are taken into consideration, it was observed that resveratrol concentrations between 100- 250 μM increased apoptosis in MCF-7 cells compared to the control group. Especially after 48 hours percentage of apoptosis was shown to be significantly higher compared to the control group.

According to our results resveratrol significantly increased apoptosis and reduced proliferation *in vitro* compared to the control group. Structural changes were observed and documented with a phase contrast microscope.

In conclusion, resveratrol was shown to have anticancer properties such as triggering early apoptosis via a time and dosage dependent manner in MCF-7 breast cancer cells.

Key words: MCF-7, Anneksin V, Apoptosis, Resveratrol

3. GİRİŞ

Kaliteli bir yaşam demek bireylerin, ihtiyaçlarını eksiksiz karşılaması, gayelerini gerçekleştirebilmesi, sosyal hayatlarında başarılı olması ve benlik saygısı gibi olgulara sahip olmasıdır (Arslan ve Bölükbaş, 2003; Gürel, 2007). Birçok hastalık bireylerin fiziksel, sosyal ve ruhsal durumlarını etkiler. Dolayısıyla bireyin sosyo-ekonomik, psikolojik ve aile hayatı gibi bütün hayat alanları yani yaşam kalitesini her yönüyle etkilenir (Arslan ve Bölükbaş, 2003). Kanser, bu hastalıklardan en yaygın olanıdır ve kısaca hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmaları şeklinde tanımlanır. Kanser hastalıkları günümüzde yaygın olarak görülür. Bu yüzden kanser, morbidite ve mortaliteye neden olma riskinin yüksek olması nedeniyle giderek önemi artan bir sağlık ve yaşam sorunu haline gelmiştir (Gürel, 2007; Alıcı ve ark.,2006).

Ülkemizde ve dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedeni %22'lik oran ile kanserdir. 2000'li yılların başında dünya genelinde kansere yakalanan insan sayısı 6 milyon kadarken, önümüzdeki yirmi yıl içerisinde bu sayının daha da çok artacağı tahmin edilmektedir. Örn: 2005 yılında 12 milyon kişi kanserle mücadele etmiş, 7 milyon insan kanser nedeni ile hayatını yitirmiştir. Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın verilerine göre ne yazık ki 2030 yılında, 17 milyon insanın kanser nedeniyle yaşamını yitireceği, aynı yıl 24 milyon insanın kansere yakalanacağı tahmin edilmektedir ((<http://onkofar.com/vImages/pdfler> , Erişim tarihi: 15 Temmuz 2016).

Dünyada ve ülkemizde kanserin bu kadar fazla görülmesi ve ölüm nedenleri arasında üst sıralarda yer alması nedeniyle kanser hastalığı artık bir sağlık sorunu değildir. Sosyal ve ekonomik açıdan kanser bir toplum sorunu haline gelmiştir (<http://sbu.saglik.gov.tr>, Erişim tarihi: 15 Temmuz 2016). Birçok araştırma laboratuvarlarının bu kadar önemli bir sağlık sorununa çözüm bulunması öncelikli hedefi olmuş böyle bir çözüme ulaşmak, sağlığını kaybetmiş ve giderek daha da kötüye giden hasta insanlar açısından da oldukça önemli bir konudur. Kesin çözüm bulmak bir yana, hastalığın seyrini düzeltmek, yaşam süresini uzatmak ve hayat kalitesini biraz olsun geliştirmek bile birçok kanserli hastada önem arz etmektedir. Bu nedenle kanser tedavi için farklı çalışmalar yapılmakta ve birçok farklı maddelerin kanser hastalığı üzerindeki etkileri yoğun olarak araştırılmaktadır.

Kanser tedavisinde, hücre poliferasyonunu engellemeleri ve apoptozu tetiklemeleri nedeniyle çeşitli bitkisel maddeler kullanılmaktadırlar. Günümüzde Rusya'dakullanılan ilaçların üçte birinden fazlası ve Almanya'da kullanılan ilaçların %20'si bitkisel kökenli ilaçlardır (Uçar, 2006).

Resveratrol (3,4,5 tri hidroksistilben)(RES)üzüm tanelerinde bol miktarda bulunan polifenolik yapıdaki doğal bir antioksidandır. Resveratrolün antitümör, antioksidan etkilere sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (İkizler ve ark.,2003; Wenzel ve Somoza 2005).

Resveratrolün hücre sinyal kaskadında çeşitli mekanizmalarla kanseri önleyici aktivitesi gösterilmiştir (Aggarwal, 2006).

Çalışmada kansere çözüm sağlayabileceği düşüncesinden yola çıkarak, alternatif tıp uygulamalarında çok yönlü etkileriyle bilinen polifenolik bir bileşik olan resveratrolün kanser ile ilişkisini araştırmayı amaçlamaktayız.



4.GENEL BİLGİLER

4.1. KANSER

Kanser, hasarlı hücrelerin vücudun herhangi bir yerinde kontrol dışı çoğalıp, o bölgenin de dışına yayılmasından ileri gelen hastalıkların genel adıdır. İstatistiklere göre yaşayan her beş kişiden bir tanesi, yaşantısının bir döneminde kanser ile karşı karşıya gelmiştir. İlerleyen tıp, dolayısıyla uygulanan tüm yeni tedavi yaklaşımlarına karşın halen kanserden ölümler gelişmiş toplumlarda ikinci sırada yer almaktadır (Gürel, 2007). Canlıların temel yapı taşları hücrelerdir. Hücreler, enzimler, hormonlar ve diğer uyarılar vasıtasıyla, canlının ihtiyacına göre düzenli bir şekilde büyür, bölünür, yaşlanır ve ölürler. Çeşitli etkenlerle değişime uğramış hücreler kanser hastalığında düzensiz ve kontrolsüz bir şekilde devamlı olarak büyürler ve bölünürler (Topal ve ark. 2009; Öncel, 2012). Çoğalan hücreler vücutta kan, lenf ya da vücut boşlukları yoluyla ilk oluştukları yerler dışındaki yerlere sıçrarlar; bu olaya metastaz adı verilir. Taşındıkları yerlerde de büyümeye devam ederek canlı için risk oluşturmaya başlarlar. Kanser hücrelerinde hem yapısal hem de işlevsel farklılıklar oluşur. Yani hücreler, normal süreçteki fonksiyonlarını yapamaz hale gelir ya da bazı yeni fonksiyonlara sahip olurlar (<http://sbu.saglik.gov.tr>, Erişim tarihi: 15 Temmuz 2016). Kanser hücreleri bir araya gelerek oluşturdıkları tümörden herhangi bir sebepten dolayı ayrılırsa, vücuttaki taşınım sistemleri olan kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri yerlerde de yine tümör kolonileri oluşturur ve kontrolsüzce büyümeye devam ederler. Bu hücreler, sağlıklı hücrelerden farklı olarak birbirlerine yapışık değildir, etrafındaki hücrelerden gelen dış sinyallere yanıt vermez, özelleşmez ve ortamdan elimine edilmek için apoptoza uğramazlar (Aslan, 2010).

Kanser, yüzyıllar öncesinde olduğu gibi günümüzde de aramızdaki varlığını sürdürmektedir. Malign tümörlerle ilgili tanımlara ilk olarak Mısır papirüsleri, Babil çivi yazısı tabletleri ve eski Hint yazmalarında rastlanılmaktadır. Ebers Papirüsünde (M.Ö. 15. yüzyıl), tümör tedavisinin öldürücü olabileceği belirtilmektedir. Antik döneme ait Yunan tıbbi kayıtlarında ve Galen'in çalışmalarında ise birçok kanser olgusuna rastlanmakla birlikte, bunların ne tür tümörler olduğuna karar vermek çoğu kez olanaksızdır. Organizmada şifa bulmayan yeni yapılanmaları anlatmak için kanser terimi ilk olarak Hipokrat tarafından (M.Ö

460-377) kullanılmıştır. O zamanlarda Hipokrat, vücudun yüzeyinde gelişen, diğerlerinden farklı karakterde ve yapıda olan, rengi kırmızı ve daha yavaş büyüyen şişliklere “Carcinos” ya da “Carcinoma” adını vermiş, Galen (M.S. 2. yüzyıl) ise bu tip oluşumlara görünümeleri yengece benzettiği için “kanser” adını vermiştir. O zamanlarda yalnızca epitel kökenli tümörlere kanser denildiği ve hastalığın sebebinin de vücut sıvıları arasındaki dengesizlikten kaynaklandığı düşünülmekteydi. Türk tıp tarihinde, Tarsuslu Osman Hayri Efendi’nin “Kenz üs-sıhhat ül-ebdaniye” (1298) adlı eserinde de fındık kadar ya da küçük yumru büyüklüğü kadar, ağırlı ve etrafı damar ile kaplı bir oluşumu anlatmak için “seratan” ifadesini kanserin karşılığı olarak kullandığı tespit edilmiştir (Atıcı, 2007).

4.1.1. Kanser Oluşumuna Etki Eden Faktörler

Birçok mekanizma normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşümü sürecinde etkin rol oynamaktadır. Fakat bu mekanizmaların tümü henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu dönüşümün nasıl meydana geldiğini anlayabilmemiz için, normal bir hücrenin yaşamsal döngüsünü bilmemiz gerekmektedir.

Hücre siklusu hücrenin normal yaşam döngüsü genel olarak dinlenme ve bölünme dönemi olarak ikiye ayrılır. Dinlenme dönemi, bölünmeye göre daha uzun ve yaşamsal faaliyetlerin devam ettiği bir dönemdir. Dinlenme dönemi, G₀ fazı olarak da adlandırılır. Bölünme dönemi ise mitoz bölünmeye hazırlığın yapıldığı G₁, S ve G₂ fazları ile mitoz bölünmenin gerçekleştiği M fazından oluşur. G₁ fazında DNA replikasyonunda kullanılacak olan proteinlerin ve RNA üretimi yapılır, S fazında DNA replikasyonuna başlanacak bölgeler işaretlenir ve DNA eşlenerek diploid hale getirilir, G₂ fazında ise mitoz bölünme için gerekli olan son hazırlıklar yapılır. Bir hücrenin iki eş hücre haline geldiği mitoz bölünme aşamasına da M fazı denilir. Bu dönemlerin ardı sıra ve zamanında başlayabilmesi ve hatasız bir şekilde yürütülebilmesi, kontrol görevi üstlenmiş birçok protein arasındaki uyum ile sağlanmaktadır. Bu proteinlerin sentezini düzenleyen genler ya proto-onkogenler ya da tümör baskılayıcı genler (TSG; tumor supressor gene-antionkogen)’dir (Topal, 2009). Çeşitli nedenlerle normal hücre büyümesi ve farklılaşması için önemli bazı proteinlere ait kodları içeren proto-onkogenler ile tümör baskılayıcı genler arasında var olan dengenin bozulması, normal hücrelerdeki DNA dizilerinde değişikliklere, kansere engel olan bazı proteinlerin sentezinde ise azalmalara neden olmaktadır (Topal, 2009; Aslan, 2010). DNA dizilerinde meydana gelen değişiklikler proto-onkogenlerin kansere sebep olan onkogenlere dönüşmesine, normalde tümör oluşumunu engelleyen proteinleri üreten tümör baskılayıcı genlerin ise inaktive olmasına neden olmaktadır (Aslan, 2010).

Normal bir hücrenin kanserli hücre olmasına neden olabilecek protein ürününe sahip olan onkogenler, hücrenin gerektiğinde çoğalması için gereken gen grubu olup hücreyi çoğalmaya zorlamaktadırlar. Öte yandan tümör baskılayıcı genler, onkogenleri dengeleyen ve hücrenin aşırı çoğalmasını engelleyen yine fizyolojik olarak bulunan gen gruplarıdır. Bunlar arasında p53, RB1, p16, p21 ve ING ailesi gibi genler sayılabilir. Onkogenlerin aktive edici mutasyon sonucu aşırı aktivasyonu ya da bunları dengeleyen tümör baskılayıcı genlerin kromozomal lokalizasyonlarındaki delesyonu ya da inaktive edici mutasyon sonucu fonksiyonlarını yitirmesi ile hücre çoğalmasının aşırı olması ve durdurulamaması sonucunda kanserleşmeye neden olmaktadır (Gündüz ve ark., 2009).

Tümör baskılayıcı genler arasında en çok araştırılan ve hergün yeni bir işlevi olduğu anlaşılan bir gen olan p53 tümör baskılayıcı geni, 17. kromozomun p koluna yerleşmiş (17p13.1), 53 Kd ağırlığında 393 aminoasitlik bir nükleer fosfoproteini kodlayan genidir. 11 exonu ve 10 intronu bulunan p53 geni, 5 ve 8 exonlarına karşı gelen protein bölgesi ile DNA'ya bağlanır. Normalde inaktif halde bulunan p53 molekülü, DNA hasarı ile aktif şekle gelmektedir (Karaman, 2003). Aktif hale gelen p53 geni, hücre siklusunu G1 fazında durdurarak ya DNA tamiri için gereken zamanı sağlar ya da düzeltilemeyen bir hata varsa hücreyi yaşlanmaya (senesense) veya apoptoza yönlendirir. DNA bütünlüğünün, hücre canlılığının korunmasında, hücre siklusunun kontrolünde çok işlevli bir transkripsiyon faktörü olan p53 tümör baskılayıcı proteini ve onun fonksiyonlarıyla bağlantılı genler komplike bir gen ağı oluştururlar. Bu gen ağında oluşan bir bağlantı kopukluğunda engellenen p53 geni birçok bozukluğa neden olur (Yılmaz ve Altunok, 2011). Kanser oluşumuna ya onkogenlerin ya yapılarında meydana gelen değişiklikler ya da ekspresyon seviyelerindeki kantitatif değişikliklerin yol açtığı düşünülmektedir. Bu değişiklikler arasında gen delesyonu, nokta mutasyonu, gen amplifikasyonu (gen çoğaltımı), kromozomlarda yeni düzenlenmeler ve insersiyonal mutagenез (yeni DNA katılımı) gibi olaylar sayılabilir. DNA dizisindeki sadece bir bazın değişmesi (nokta mutasyon) ile proto-onkogenler, onkogenlere dönüşmekte ve bunun sonucunda anormal gen kanserli hücrelerde çok sık görülmekle birlikte normal hücrelerde ya çok nadir görülür yada hiç görülmez (<http://www.ctf.edu.tr>, Erişim tarihi: 16 Temmuz 2016). Büyüme ve gelişmeyi yönlendiren ürün olarak sentezlenen onkoproteinler de hücre gelişimini ve bölünmesini uyararak kansere neden olmaktadır. Onkogene ait DNA parçasının çok sayıda replike olması ile meydana gelen gen amplifikasyonu proto-onkogenlerin çalışmalarını kontrol eden, malign değişimleri ve anormal büyümeyi engelleyen tümör baskılayıcı genlerin her iki alleli kaybolduğunda (heterozigotluk kaybı) veya bu genler

mutasyona uğradığında kontrol mekanizması ortadan kalkar ve tümör oluşumu gerçekleşir (<http://www.ctf.edu.tr>, Erişim tarihi: 16 Temmuz 2016).

P53 proteini, kanser hastalarında mutasyonu en sık görülen proteindir. Kanser hastalarının yaklaşık % 50-55'inde mutant olduğu gösterilmiştir. Meme kanseri gibi birçok tümörlerde, p53 geninin her iki allelinde kayıp veya nokta mutasyonlar olduğu da tespit edilmiştir (Yılmaz ve Altunok, 2011).

Tümör hücreleri, benign (iyi huylu, selim) ve malign (kötü huylu, habis) olmak üzere çevre dokulara yayılma özelliklerine göre iki gruba ayrılırlar.

Benign tümörlerde, tümör hücreleri vücudun diğer bölümlerine invaze olmazlar ya da yerel dokuları istila etmezler. Kapsül oluşturarak canlının yaşamını çok fazla tehlikeye sokmayan benign tümörler sinir sistemi, damarlar ve kanallara basınç yaparak hastalık belirtilerini gösterirler ve genellikle operasyonla alınırlar. Kapsül oluşturmeyen malign tümörler ise oluştukları yerden ayrılıp vücut içinde başka bir bölgeye giderek ikinci bir tümöre sebep olurlar. Bu olaya da metastaz denilmektedir (Yılmaz ve Altunok, 2011).

Kanser oluşumunun nedenleri ile ilgili bilgiler az olmakla birlikte hastalığa zemin hazırlayan neden pek çok faktörün olduğu da bilinmektedir. Bu faktörler arasında güneş ışığı, radyasyon, ısı, endüstriyel maddeler, kronik irritasyon, ilaçlar, besinler, sigara, alkol, virüs, bakteri ve parazitler, 55 yaş ve üstünde olmak, stres, hareketsiz bir yaşam tarzı, yüksek tansiyon, immün yetmezlik gibi daha birçok faktör sayılmaktadır. Kanser oluşumunda bu çevresel faktörlerden başka genetik faktörlerin de rol aldığı bilinmektedir (Erman, 2007). Çevresel faktörlerden kısaca açıklayacak olursak:

-Ultraviyole Işıklar: Güneşteki ultraviyole ışınları direkt olarak melanoma ve diğer deri kanserleri oluşumu ile ilişkilidir. Açık havada çalışanlar, açık tenli insanlar ve güneş ışığına kontrolsüz şekilde maruz kalanlarda deri kanserleri daha sık görülmektedir (<http://sbu.saglik.gov.tr>, Erişim tarihi: 15 Temmuz 2016).

-İyonize Radyasyon: Epitelyal kanserler ve lösemi başta olmak üzere iyonize radyasyonun da çeşitli kanserlere yol açtığı bildirilmektedir (<http://sbu.saglik.gov.tr>, Erişim tarihi: 15 Temmuz 2016).

-Kimyasal Karsinojenler: Katran ve kömürün yanma ürünleri, benzen, naftilaminler, asbest, vinil klorür, krom vb. maddelerle meslekleri dolayısıyla temas etmek zorunda kalan insanlarda kanserin oluşabileceği bildirilmektedir. Örneğin; boya sanayiinde çalışanlarda mesane kanserlerinin, plastik sanayiinde çalışanlarda karaciğer kanserlerinin, katranla uğraşanlarda ise deri kanserlerinin görüldüğü belirtilmektedir (<http://sbu.saglik.gov.tr>, Erişim tarihi: 15 Temmuz 2016).

-Beslenme Faktörleri: Beslenme alışkanlıkları sindirim sistemi kanserleri ile ilişkili olduğundan düşük yağ ve yüksek lif içeren beslenme şekilleri tavsiye edilmektedir (<http://sbu.saglik.gov.tr,Erişim> tarihi : 15 Temmuz 2016).

-Sigara: Sigaranın içerisinde hem kanser sürecini başlatan hem de hızlandıran maddeler bulunuyor. Akciğer kanserlerinin ise neredeyse tamamından sorumludur. Kanserlerin üçte birinde sigaranın önemli rolü vardır. Ayrıca, larinks, ağız boşluğu, yutak, mesane ve pankreas kanserleri riskini sigaranın artırdığı da belirtilmektedir (<http://sbu.saglik.gov.tr,Erişim> tarihi: 15 Temmuz 2016).

-Alkol: Ağız, yutak, gırtlak ve yemek borusu kanserleri riskini uzun süreli alkol alımı arttırmaktadır. Bu kişilerde çok alkol içenlerin genellikle aynı zamanda sigara da içiyor olması kanser tehlikesini kat kat arttırmaktadır (<http://sbu.saglik.gov.tr,Erişim> tarihi: 15 Temmuz 2016).

-Virüsler: Bilinen en küçük mikroorganizmalardır. Bazı virüsler kapsüllerinin içerisinde DNA taşır; hücre içerisine girdikten sonra kendi DNA'larını hücrenin DNA'sına entegre eder ve kendilerini kopyalarlar. Bu entegrasyon hücrenin DNA yapısını etkilediği için normal hücre çoğalmasını da etkiler. Virüslerin deney hayvanlarında kansere yol açtığı gösterilmiştir. Hepatit-B virüsünün insanlarda karaciğer kanseri ile Epstein-Barr virüsünün Burkitt lenfoma ile ilişkili olduğu da bilinmektedir (<http://sbu.saglik.gov.tr,Erişim> tarihi: 15 Temmuz 2016).

-Genetik Faktörler: Kanserlerin yaklaşık % 20 sinin kalıtsal nedenlere bağlı olduğu düşünülüyor. Daha çok çocuklarda görülen bir göz kanseri olan retinoblastoma gibi,tüm meme kanserlerinin % 5–10'un da ailevi geçiş görülmektedir. Sonuçta kanser tek bir sebebe değil birden çok sebebe bağlı olarak gelişen bir hastalıktır (<http://sbu.saglik.gov.tr,Erişim> tarihi. 15 Temmuz 2016).

Gelişmiş ve az gelişmiş ülkeler arasında kanser insidans hızlarının ve profillerinin farklılık gösterdiği de bildirilmektedir. Gelişmiş ülkelerde, meme kanseri ve kolorektal kanserler kadınlarda erkeklerden daha çok, erkeklerde ise akciğer ve prostat kanseri daha çok görülmektedir. Az gelişmiş ülkelerde erkeklerde akciğer, mide ve karaciğer kanseri, kadınlarda ise meme ve serviks kanseri daha sık görülmektedir. Türkiye'de ise kadın nüfusunda meme kanseri ve kolorektal kanserlerin, erkek nüfusunda akciğer, mesane ve mide kanserlerinin daha sıklıkla izlendiği tespit edilmiştir (<http://www.tapdk.gov.tr,Erişim> tarih: 20 Temmuz 2016).

4.2. MEME KANSERİ

Dünyanın hemen her bölgesinde meme kanseri önemli bir sağlık sorunudur. Kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. Akciğer kanserinden sonra kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır (Somunoğlu, 2009; Saip ve ark, 2011). Yaklaşık her 10 kadından birinin yaşam boyunca bu hastalığa yakalanma riskinin ve yakalananların üçte birinin de yaşamlarını bu hastalık nedeniyle kaybetme risklerinin olduğu bildirilmektedir (Gölbaşı ve ark., 2010). 2012 yılında 1.7 milyon kadına meme kanseri teşhisi konulmuş ve son beş yılda bu kanserden tedavi gören kadın sayısı 6.3 milyon olmuştur. 2008 yılından bu yana meme kanserine yakalanan kadın sayısında %20'nin üzerinde artış ortaya çıkmıştır. Buna karşılık, meme kanserinden ölenlerin oranı % 14 azalmıştır. Meme kanseri aynı zamanda kadınların en çok hayatlarını kaybettikleri kanser türü olmuştur. 2012 yılında 522 bin kadın bu hastalıktan dolayı yaşamını yitirmiştir. 184 ülkenin 140'ında kadınlarda en sık görülen kanser türü olup, kadınlarda görülen en sık dört kanser türlerinde ilk sıraya yerleşmiştir (<http://onkofar.com/vImages>, Erişim tarihi : 15 Temmuz 2016).

Meme kanserleri tümörün oluşumu, boyu ve metastaz durumuna göre çeşitli evrelere ayrılmıştır. Bu evreler şöyledir (<http://www.cancer.gov/cancertpics>, Erişim tarihi: 15 Temmuz 2016).

Evre 0;

Bu evre aynı zaman da 'in-situ' olarak da isimlendirilmektedir. Bu evre, etrafındaki çevre dokulara sıçramamış ve yerinde kalmış kanser türünü ifade etmek için kullanılmaktadır. Oluştukları yere göre bu evre kanserler ikiye ayrılırlar. Eğer süt kanallarında (düktus) oluşmuşsa ductal carcinoma in situ (DCIS) olarak isimlendirilirler. Eğer kanser süt bezlerinde (lobus) oluşmuşsa lobular carcinoma in situ (LCIS) olarak isimlendirilirler. Genel olarak bakıldığında LCIS kanser olarak davranmaz ve bu yüzden de kanser gibi tedavi edilmez. LCIS'nin mikroskopik özellikleri normal hücrelerden farklı ve kanser hücrelerine daha benzerlik gösterir. LCIS yalnızca göğsün herhangi bir yerinde kanser oluşması riskinin arttığını gösteren bir göstergedir. DCIS durumunda ise kanser hücreleri oluştukları süt kanalları içerisinde kalmış, göğsün yağ dokusu ya da lenf bezleri gibi vücudun farklı

alanlarına yayılmamıştır ((<http://www.cancer.gov/cancertpics>, Erişim tarihi : 15 Temmuz 2016).

Evre I;

Meme kanserinin yayılabilen başlangıç safhasıdır. Bu evrekanser hücrelerinin memeden başka yerlere (lenf bezleri gibi) yayılmadığı ve tümörün 2 cm'den daha büyük olmadığı durumdur ((<http://www.cancer.gov/cancertpics>, Erişim tarihi : 15 Temmuz 2016).

Evre II;

2 alt bölüme ayrılmaktadır. Evre IIA bunlardan biridir :

- Koltuk altındaki lenf bezlerinde kanser vardır, ancak memede tümör yoktur.
- Koltuk altındaki lenf bezlerine yayılmıştır.

Ya da tümör 2 cm büyüklüğünde veya daha küçüktür.

Diğer evre olan Evre IIB'de ise:

Evre IIB'de tümör:

2 cm'den büyük, 5 cm'den küçüktür ve koltuk altı lenf bezlerine yayılmıştır; veya

- 5 cm'den büyüktür ancak koltuk altı lenf bezlerine yayılmamıştır.

Evre III;

Evre IIIA;

- Memede tümör yoktur, ancak koltuk altı lenf bezlerinde (koltuk altındaki lenf bezleri) birbirine veya çevre dokulara yapışık kanser vardır; veya
- Tümör 5 cm veya daha küçüktür ve çevre dokulara veya birbirine yapışık koltuk altı lenf bezlerine yayılmıştır; veya
- Tümör 5 cm' den büyüktür ve koltuk altı lenf bezlerine (birbirlerine veya çevre dokulara yapışık olabilir) yayılmıştır.

Evre IIIB;

Tümör herhangi bir boyut da olabilir ve

- Memeye komşu dokulara (deri veya göğüs duvarı, kaburgalar veya göğüs duvarındaki kaslar) yayılmıştır,
- Meme içerisindeki lenf nodlarına veya kolun altındaki lenf nodlarına yayılmıştır.

Evre IIIC;

- Kanser köprücük kemiği altındaki ve komşu boyun boyunca uzanan lenf nodlarına yayılmıştır,
- Kanser kolun altındaki ve meme içerisindeki lenf nodlarına ve memeye komşu dokulara yayılabilir.

Evre IIIC, ameliyat olabilir ve ameliyat olamaz olarak ikiye ayrılmaktadır.

Ameliyat olabilir Evre IIIC meme kanserinde;

- Kolun altındaki lenf nodlarında 10 veya daha fazla sayıda lenf nodunda tutulum vardır,
- Memedeki tümörle aynı taraflı köprücük kemiği altındaki lenf nodları ve komşu boyun lenf nodlarında yayılım vardır,
- Meme içindeki lenf nodları ve kolun altındaki lenf nodlarında yayılım vardır.

Evre IIIC; Meme kanserinde, kanser köprücük kemiği üstündeki lenf nodlarına yayılmıştır ve memedeki tümörle aynı taraftaki komşu boyun bölgesindeki lenf nodlarında tutulum vardır.

Evre IV;

Uzak metastatik kanserdir. Kanseri vücudun diğer bölgelerine sıçramıştır.

Tekrarlayan kanser;

Tedaviden sonra tekrar oluşan kanserdir. Kanseri, lokal (meme veya göğüs duvarında) olarak veya vücudun herhangi bir bölgesinde (kemik, karaciğer, akciğer gibi) tekrarlayabilir ((<http://www.cancer.gov/cancertpics>, Erişim tarihi : 15 Temmuz 2016).

4.2.1. Meme Kanseri Oluşumuna Etki Eden Faktörler

Meme kanserinin hangi nedene bağlı olarak ortaya çıktığı tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, dünyada yapılan araştırmalar sonucunda bazı özelliklere sahip olan kadınlarda meme kanseri görülme riskinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu özelliklere risk faktörleri adı verilmiştir. Bu risk faktörlerinden biri; BRCA1 ve BRCA2 genlerinin taşınmasıdır. Bu genlerin görevi meme hücrelerinin normal olarak gelişmelerini sağlamak ve kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemektir. Ancak bu genlerde bozukluk veya mutasyonlar olursa, meme kanseri riskinde artış meydana gelmektedir. Anormal BRCA1 ve

BRCA2 genleri tüm meme kanserlerinin yaklaşık % 10'undan sorumludur. Anormal BRCA1 veya BRCA2 geni taşıyan meme kanserli hastaların aile öykülerinde meme kanseri, yumurtalık kanseri veya her ikisi yer almaktadır. Ancak, meme kanserli kadınların çoğunun aile öyküsünde meme kanserinin bulunmadığının da unutulmaması gerekmektedir. BRCA1 ve BRCA2'nin tanımlanmasıyla meme kanseri tarama ve tedavisinde yeni teknikler geliştirilmiş ve hastalık riski azaltılmıştır.

Diğer risk faktörleri şunlardır; ailede meme kanseri hikâyesinin olması, genetik yatkınlık, önceden meme kanseri geçirmiş olmak, alkol alımı, düşük doz radyasyon, pestisitlere maruz kalmak. Ayrıca ilk adet görme (menarş), geç menopoz, diabetes mellitus, ilerleyen yaşlar, obezite, doğum kontrol ilaçlarının kullanımı, ilk doğumun geç yaşta yapılmış olması veya çocuk doğurmamış olmak gibi durumlar da meme kanseri oluşumuna neden olan önemli faktörler arasında sayabilmektedir (Kosova ve Arı, 2008; Somonoğlu, 2007; Karaman, 2003).

4.2.1.1. Östrojen

Meme kanserinin gelişim nedenleri arasında en üst sıraları hormonlar almaktadır (Karakuş, 2010). Yapılan çalışmalarda, östrojenin bu hormonlar arasında en büyük risk faktörünün olduğu tespit edilmiştir (Martin ve Weber, 2000; Martin ve ark. 1990). Çoğu çalışmada 10 yıldan fazla östrojen alımının meme kanseri gelişiminde ufak bir risk artışına sebep olduğu gösterilmiştir. Fakat bu çalışmalarda aynı zamanda östrojen alımının osteoporoz, kalp hastalığı, alzheimer ve kolon kanseri riskinin azalmasına sebep olduğu da vurgulanmıştır. Östrojen, kadın cinsiyet hormonudur. Büyük ölçüde ovaryumlardaki olgun granüloza hücrelerinden, az miktarda da böbreküstü bezlerinden ve plasentadan salgılanır (Altunkaynak ve ark. 2012; Russo ve ark. 2003). Doğal östrojenler olan β -östradiol (E2), östron (E1) ve östriolden (E3) en fazla salgılanan β -östradiol, en az salgılanan ise östrondur (Altunkaynak ve ark. 2012). Östriol ise östradiol ve östronun özellikle karaciğerdeki oksidasyonu sonucu ortaya çıkan bir üründür (Altunkaynak ve ark., 2012; Ozan ve ark., 1999). Ancak gebelik döneminde plasentadan bol miktarda salgılanmaktadır (Ozan ve ark., 1999). β -östradiolün, östronun 12, östriolün ise 80 katı östrojenik etkiye sahip olduğu da bilinmektedir (Altunkaynak ve ark., 2012). β -östradiol, biyolojik olarak meme dokusu üzerinde en aktif olan östrojendir (Russo ve ark., 2003).

Meme ve uterus dokusu bulundurdıkları östrojen reseptörleri (ER) nedeniyle östrojenin etkilerine açık durumdadır. ER pozitifliğinin meme kanseri vakalarında %40-80 oranlarında olduğu tespit edilmiştir (Kömürcü, 1995). ER pozitif meme kanseri hücrelerinde

östrojen, kendi reseptörünü aktive ederek, hücre siklusunun G₁ fazını kısaltmakta ve hücrenin daha hızlı bir şekilde bölünmesine neden olmaktadır (Karakuş, 2010). Kanserli hücrelerde bulunan ER miktarının, normal hücrelerde bulunan ER miktarından belirgin derecede fazla olduğu tespit edilmiştir (Tüzüner, 2008).

Yapısı itibariyle steroid bir hormon olan östrojenin, steroid sülfattan aktif olarak sentezlenme mekanizması “intrakrin östrojen sentezi” olarak tanımlanmıştır. Bu sentez özellikle deri, kemik, kas, yağ ve meme bezi gibi perifer dokularda aromataz enzimi ve steroid sülfataz (STS) ile katalize edilerek gerçekleşmektedir. Hücre içinde östrojen sentezinin menopoz öncesi dönemdeki kadınlarda toplam östrojen yapımının yaklaşık % 75’ini, menopoz sonrası dönemdeki kadınlarda ise %100’e yakınına oluşturduğu tespit edilmiştir. Menopoz öncesinde ovaryumda meydana gelen östrojen sentezi menopoz sonrası dönemde durmuştur ve serbest östrojen konsantrasyonu biyolojik etki seviyesinin altına inmiştir. Ancak buna rağmen östrojene bağımlı meme kanserlerinin büyük bölümü bu dönemde ortaya çıkmaktadır. Bu durumda, aktif östrojenin tümör dokusunda steroid sülfatlardan oluşturulduğunu göstermiştir (Karakuş, 2010).

Östrojene duyarlı olduğu belirlenen meme kanserlerinde, östrojen hormonunun yapımını baskılayan ya da östrojenin kanser hücreleri üzerindeki etkisini azaltan ilaçlar sayesinde meme kanserli hastaların yaşam süreleri belli oranlarda uzatılabilmektedir.

4.2.1.2. Oksidatif Stres

Kuantum kimyası kurallarına göre; ancak iki elektronun bir araya gelmesiyle bir bağ oluşmaktadır. İnsan vücudunda bulunan elektronların neredeyse tamamı elektron çiftleri halinde bulunur ve oldukça kararlı bir yapıya sahiplerdir. Aradaki bağın kopması durumunda ise elektronlar ya birlikte kalarak başka bir atomun yapısına katılırlar ya da birbirlerinden ayrılarak farklı atomlara bağlanırlar. Birlikte kalmaları durumunda iyonlar, ayrılmaları durumunda ise serbest radikalleri oluştururlar (Aydemir, 2009). Son yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulunduran atomlara “serbest radikaller”, “oksidan moleküller” ya da “reaktif oksijen türleri (ROS: reactive oxygen species)” isimleri verilmektedir (Tamer ve ark., 2000). ROS’un dokularda fazla miktarda bulunması veya üretilmesi bulunduğu dokuda hasarına yol açmaktadır. ROS’un yarattığı bu olumsuz etki “oksidatif stres” olarak adlandırılmaktadır (Başkol ve ark., 2007). Oluşan serbest radikaller, oksidatif reaksiyonlar sonucunda protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi vücuttaki önemli moleküllere bağlanarak onların üç boyutlu yapılarının bozulmasına ve pek çok biyolojik soruna neden olmaktadır (Aydemir, 2009; Altan ve ark., 2006). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller

oksijenden oluşmaktadır (Tamer ve ark., 2000). Antioksidan savunma sistemi olarak adlandırılan bir savunma mekanizması ise vücutta ROS'un oluşumunu ve oluşturabileceği hasarı önlemek için savaşılmaktadır (Yokuş ve Çakır, 2012). Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki denge, hücreler ve dokular arasındaki bütünlüğün korunması ve normal işlevlerini yerine getirmeleri için olmak zorundadır (Aydemir ve Sarı, 2009; Yokuş ve Çakır, 2012). Normalde ROS ve antioksidanlar arasında var olan antioksidanlar ve ROS arasındaki denge eğer ROS lehine bozululursa oksidatif hasar meydana gelir ve eğer bu hasar telafi edilemezse ateroskleroz, diyabet, alzheimer, koroner kalp hastalıkları ve kanser gibi birçok sistemik hastalığın oluşmasına vesile olmaktadır (Aydemir ve Sarı, 2009; Yokuş ve Çakır, 2012). Halliwell'e göre ROS kaynaklı DNA hasarı oluşumunda iki ana mekanizma rol oynar. Bunlardan birincisi "direkt olarak hidroksil radikali tarafından oluşturulan DNA zincir kırılımı, baz modifikasyonu ve deoksiriboz fragmentasyonu, ikincisi ise, oksidatif stres sonucu oluşan endonükleaz inaktivasyonu ile meydana gelen DNA fragmentasyonlarıdır (Halliwell ve Aruoma, 1991).

Serbest radikaller hücrelerde hem endojen hem de ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşabilmektedirler. Organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları, endojen etkenler olarak sayılabilirler. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında ise; stres, virüsler, enfeksiyon, pestisitler, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonlar, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, demir, bakır, kadmiyum, nikel, krom, civa gibi metal iyonları, asbest lifleri, mineral tozlar ve karbonmonoksit sayılabilir (Atmaca ve Aksoy, 2009).

Hücrel membranlardaki lipitlerle, DNA'daki nükleotidlerle, proteinlerdeki sülfidril gruplarıyla reaksiyona giren reaktif oksijen bileşikleri oksidasyonlara neden olarak dokulara zarar vermektedir (Waris ve Ahsan, 2006). Mitokondrial solunum esnasında elektron transferi sürecinde tekli elektron transferi ile oksijenden süperoksit üretimi ile başlayan ROS oluşum basamakları hidroksil radikallerinin de ana kaynağını teşkil etmektedir. Oluşan süperoksit radikali kendiliğinden dismutasyona uğrar ya da süperoksid dismutaz (SOD) enzimi tarafından hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülür. H_2O_2 hücre içinde katalaz veya glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından toksik olmayan ürünlere çevrilir. Ancak metal iyonları varlığında Fenton reaksiyonu ile oldukça toksik bir yapıya sahip olan hidroksil radikaline dönüştürülmektedir (Hekimoğlu, 2010; Özel, 2006).

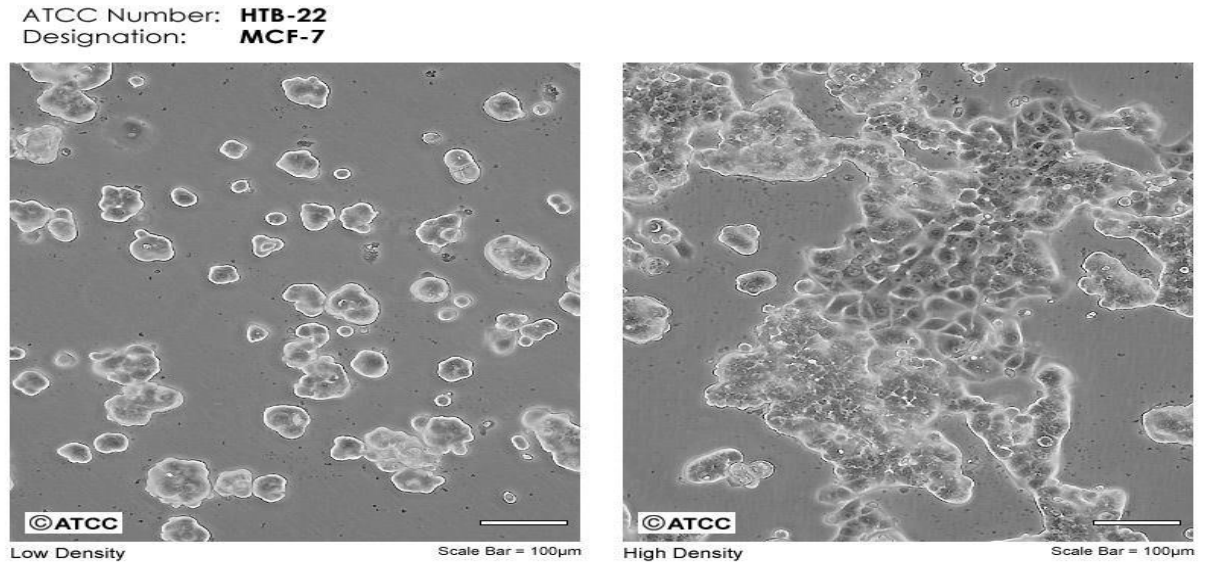
Hücrelerdeki DNA başta olmak üzere tüm protein, karbonhidrat, lipid gibi makromoleküllerde de oksidatif hasar meydana getiren en reaktif ROS formunun hidroksil radikali olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Storz, 2005; Chan ve ark. 2011).

Oksidatif stres hücre ölümüne neden olabildiği gibi, hücresel içeriğin hücre membranında bulunan lipidlerin oksidasyonundan dolayı hücre dışı ortama yayılmasına da neden olabilmektedir (Henrotin ve ark., 2003).

Mitokondriler görevleri itibariyle başlıca ROS kaynağıdır. Buna rağmen, serbest radikallerin zararlı etkilerinden de en fazla etkilenen organellerin başında gelmektedir. Mitokondride meydana gelen sorunlar mitokondrial DNA (mtDNA) da dolayısıyla da mitokondrial RNA (mtRNA) transkripsiyonu, mitokondrial protein sentezi ve mitokondrial fonksiyonlarda meydana gelen hasarlarla da kendisini göstermektedir (Ide ve ark., 2001).

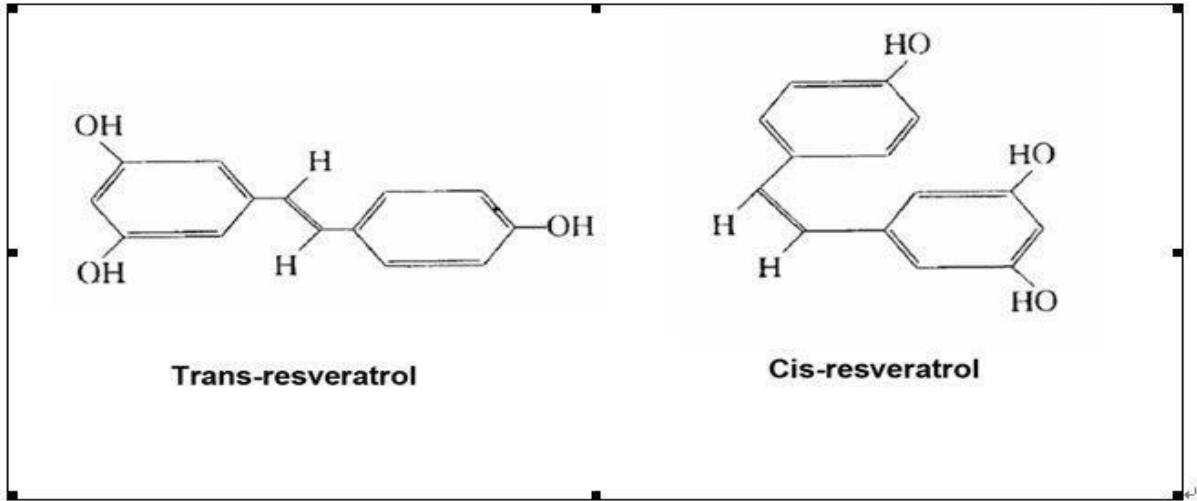
4.3.MCF-7 HÜCRE SOYUNUN ÖZELLİKLERİ

MCF-7 hücreleri, 1970 yılında 69 yaşında bir hastanın metastatik dokusundan elde edilen epitel hücrelerdir. MCF-7 hücreleri yapışkan özellikler gösterip aynı zamanda transfeksiyonlar içinde uygundur. Bu hücreler ER pozitif özellik gösterdiğinden dolayı meme kanseri araştırmalarında sık sık kullanılırlar. Bu hücrelerin büyümesi in-vitro olarak TNF alpha ve anti-estrogenler ile inhibe edilebilir (Şekil 4).



Şekil 4. 1:MCF-7 Hücre Soyunun Yapısı (ATCC Number:HTB-22)

4.4.RESVERATROL



Şekil 4. 2:Resveratrol' un Moleküler Yapısı

Resveratrol (RES) (3,4',5-trihidroksi-stilben) birçok 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.Loos.'in (beyaz helleborus) kök bileşenlerinde tanımlanmıştır (Cichewicz ve Kouzi, 2002). Daha sonra 1977 yılında Langcake, resveratrolün *Vitis vinifera* (asma) yapraklarında UV ışınlarına ve fungal enfeksiyonlara karşı sentezlendiğini göstermiştir (Langcake ve Pryce, 1997).

Resveratrol bu güne kadar yapılan çalışmalarda 72 tür, 31 cins ve 12 familyada tespit edilmiştir (Alkan, 2007). Yaygın olarak, *Polygonum cuspidatum* (çoban değneği), *Vitis vinifera* (asma), *Vaccinium* sp. (kızılcık), *Veratrum grandiflorum* (beyaz çöpleme), *Arachis hypogea* (yer fıstığı) ve *Morus rubra* (dut) bitkilerinde bulunur (Shishir ve ark., 2006). Çin ve Japon geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanılan *Polygonum cuspidatum* bitkisinin kökü en zengin trans-resveratrol kaynağı olarak kabul edilir (Soleasa ve ark., 1997).

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 büyüme faktörünü engelleyerek ve kanser hücrelerini apoptoza yönlendirerek azalttığı görülmüştür (Jang ve ark., 1997). Laboratuvar ortamında, düşük konsantrasyonlarda kullanılan resveratrolün insan lösemi hücrelerinde apoptozu başlattığı görülmüştür (Ahmad ve ark., 2004). 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 (Schneider ve ark., 2000). Bunun yanı sıra, prostat kanserinin önlenmesi ve tedavisinde etkilidir (Kim ve ark., 2003). Koroner kalp hastalıkları riskini, trombosit kümeleşmesini ve LDL oksidasyonunu önleyerek azaltır (Koca, 2008). Çeşitli çalışmalarla, anti-proliferatif etkisi de kanıtlanmıştır (King ve ark., 2006).

Resveratrol ve vücutta oluşan metabolitlerinin (trans-resveratrol 3-O-sülfat, transresveratrol 4'-O-sülfat, trans-resveratrol 3-O-4'-disülfat, trans-resveratrol 3-O-glukuronit ve trans-resveratrol 4'-O-glukuronit), insan malign MCF-7, MDA-MB-231, ZR-75-1 meme kanseri hücre kültürü üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Sonuçta, resveratrol, hücrelerin yaşam sürelerini anlamlı ölçüde kısaltırken, sülfatlanmış metabolitleri zayıf aktivite göstermiştir (Fed, 2011).

4.4.1. Resveratrol'un Anti-Kanser ve Apoptik Etkisi

Resveratrolün kanser önleyici aktivitesi, tümör hücrelerinin hücre döngüsü süreci, proliferasyonu, apoptozu, metastazı, anjiyogenezi ve invazyonunu düzenleyen çeşitli hücre sinyal moleküllerinin modülasyonu vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Resveratrolün kemoterapiye direnç mekanizmalarının üstesinden gelerek kemoterapötik ajanlara karşı dirençli hücreleri duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Gupta ve ark., 2011). Bazı tümör hücrelerinde kansere karşı resveratrolün koruyucu olarak görev yaptığı bilinmektedir. Apoptozun indüklenmesi bir çok anti-tümör tedavisi için önemli bir mekanizmadır. Resveratrol, kültüre edilmiş kanser hücre dizilerinde hücrelerin çoğalmasını engelleyebilen bir özelliğe sahiptir ve hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozun indüklenmesinde önemli rol oynamaktadır. Huh-7 karsinom hücrelerinde 25 µM resveratrolün, hücre döngüsünü durdurması ve apoptoza neden olması Liao ve ark.ları tarafından yapılan çalışmada bildirilmiştir (Liao ve ark., 2010). Resveratrolün K-562 hücrelerinde PKC ve ERK1/2 p53 fosforilasyonuna ve apoptoza neden olduğu rapor edilmiştir (Chakraborty ve ark., 2008; Can ve ark., 2012).

Japonya’da yapılan araştırmalar, resveratrolün diyetlere eklenmesiyle meme kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini ve batı tipi diyetlerdeki linoleik asitin büyüme teşvikini bloke ettiğini göstermektedir.

Yüksek dozda resveratrol radyasyonla kombine edilince, Annexin V ile ölçülen apoptoz ve ROS’da artış olduğu bildirilmiştir. Resveratrolün tek başına ROS aktivitesinde değişikliğe neden olmadığı da aynı çalışmada rapor edilmiştir (Sun ve ark., 2008).

Son bilgiler resveratrol’ün eşsiz bir hücre yok etme sistemine sahip olduğunu ve tümör baskılayıcı gen p53 olsa da olmasa da kanser hücrelerini öldürdüğünü göstermektedir. Ayrıca resveratrol’ün meme kanseri üzerine etkisi, östrojen reseptör pozitifte olsa, östrojen reseptör negatif te olsa görölmektedir (www.kilispostasi.com/modules, Erişim Tarihi: 16 Temmuz 2016). Resveratrol, meme kanseri hücrelerinde hormon-duyarlı ve hormon-direnç etkilerinin her ikisini de göstermektedir. Resveratrolün meme kanseri hücrelerinde anti-başlatıcı ve anti-ilerletici aktivitelerini de gösterdiği kaydedilmiştir (Corre ve ark., 2005).

Birçok dokuda antikanserojen etkisi gösterilen resveratrolün, etki mekanizmaları gün ışığına çıkarılmayı beklemektedir. Resveratrol hücre farklılaşmasını inhibe ederek kanserin ilerlemesini kontrol altına alabilmektedir. Resveratrolün maymun deri kanseri modelinde malign tümör gelişimini ve tümör oluşumunu engellediğı gösterilmiştir. Resveratrolün insan meme epitel hücresinde, zaman ve doza bağımlı olarak çoğalmayı durdurduğı gösterilmiştir (Jang ve ark., 1997). Resveratrol tedavisi ile canlı hücre sayısının azaltıldığı ve hipertrofi gelişiminin önlendiğı gösterilmiştir. Bu etkilerinin, siklooksijenaz enzimi (COX) oluşumunun protein kinaz C yolu üzerinden inhibisyonu ile olduğı gösterilmiştir (Coşkun, 2004; Jang ve ark., 1997). Apoptozun, hücre çoğalması ile ölümü arasındaki dengede kritik bir rolü vardır; bununla beraber kanserin oluşumu ve gelişimini önleme noktasında da önemlidir. Birçok sitotoksik ve sitostatik kanser ilacının kanser hücrelerinde apoptozu etkilediğı bilinmektedir. İnsan promyleositik lösemi hücrelerinde resveratrolün hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiğı, apoptozu etkin kıldığı, antiapoptotik onkoprotein Bcl-2 artışını engellediğı ve DNA da kırılmalara neden olduğı gösterilmiştir. Resveratrolün lenfoblastoma hücrelerinde, apoptozu artırdığı bilinen p53 proteinindeki artışı belirgin şekilde tetiklediğı ortaya koyulmuştur (Huang ve ark., 1999). İnsan meme kanseri hücrelerinde, dioksin ve benzopirinlerin arilhidrokarbon aracılı kanserojenik etkilerinin resveratrol ile azaltılabildiğı gösterilmiştir (Casper ve ark., 1999). Kanser tedavisinde büyük yer tutan tirozin kinaz grubu enzimlerin inhibisyonun insan plasental ve prostatik adenoma hücrelerinde çalışıldığı bir çalışmada, resveratrolün olumlu etkileri tespit edilmiştir. Nitrik oksidin tümör gelişiminde, yayılımında, anjiyogenezisinde ve tümör hücrelerinin göçünde etkili olduğı murin meme tümörü ile ilgili

bir çalışmada gösterilmiştir. Birçok insan kanserlerinde NOS aktivitesinin arttığı da bilinmektedir. Lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış peritoneal eksuda makrofajlarının NO oluşturmaları resveratrol ile baskılanmıştır. Ayrıca DNA sentezini baskıladığı, apoptozu indüklediği ve hücre siklusunda hücreleri G₀/G₁ fazında durdurma gibi etkileri saptanmıştır. Resveratrolün hepatik metastatik invazyonu önlediği ve melanom hücrelerinden hazırlanan in-vitro bir düzeneğe de hücre çoğalması ile reaktif oksijen türlerini azalttığını gösterilmiştir (Gusman ve ark., 2001).

Meme kanseri riskinde, resveratrol tüketimiyle azalma olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. Resveratrolün östrojen reseptör bağımlı meme kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Kalp damar sistemi üzerinde, onun östrojen benzeri biyolojik aktiviteleriyle resveratrolün olumlu etkileri iyi bir şekilde ilişkilendirilmektedir. Jank ve ark.'nın yaptığı çalışmada; 25 µM resveratrol uygulanan farelerde, cilt tümörlerinin sayısının % 98 oranında azaltıldığı belirtilmiştir (Jang ve ark., 1997). Tümörlü fare sayısı da % 88 oranında azalmıştır. Resveratrolün antitümör etkisinin ribonükleotid redüktaz, DNA polimeraz, protein kinaz C, siklooksijenaz-2 aktivitelerinin inhibisyonuna, karsinogenezin inhibisyonuna ve apoptotik hücre aktivasyonuna bağlı olabileceği bildirilmiştir (Jang ve ark., 1997). Resveratrolün 23mg/l dozda 10 gün süresince, farelere içme suyu içerisinde veya oral olarak 20 mg/kg dozunda günde iki kez uygulanması neticesinde kanserli hücrelerin büyümesi engellenmiştir (Asensi ve ark., 2002). Kırmızı şarap ekstraktlarının insan plasenta mikrozomlarında aromataz enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Aromataz enziminin aşırı miktardaeksprese olduğu dişi transgenik farelerinin 3 hafta boyunca gavajla oral olarak 100 µl kırmızı şarap ekstraktlarıyla beslenmesi sonucu, hiperplazinin ortadan kalktığı, aromatazın aşırı eksprese olmasına bağlı olarak meme dokusunda gerçekleşen neoplastik değişikliklerin azaldığı gösterilmiştir. Meme kanseri hücre dizisi MCF-7 hücrelerinde resveratrolün aromataz enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Eng ve ark., 2001).

4.5.APOPTOZ

Organizmada hücre canlılığı sürekli bir denge halindedir. Bir taraftan yeni hücreler sentez edilirken, varolan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmaktadır. Böylece organizmadaki canlı ve ölü hücreler arasındaki denge korunmaktadır. Hücre ölümünün başlıca iki tipi vardır, bunlar apoptoz ve nekroz olarak tanımlanır (Ameisen, 1996; Thompson, 1995). Hem apoptoz hem de nekrozda düzenli olarak birbirini izleyen

biyo kimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir (Kiess ve Gallaher, 1998).

1842 yılında Vogt tarafından hücrelerin normal gelişim sürecinde meydana gelen hücre ölümü tanımlanmıştır. 1965 yılında ise “programlanmış hücre ölümü” terimi ilk defa kullanılmıştır. 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından da “Apoptoz” terimi ilk defa kullanılmıştır (Kerr ve ark., 1972). Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır.

Apoptoz köken olarak "apo-ptö-sis" 'den gelmektedir ve eski Yunanca'da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamındadır (Touchette, 1991).

Hücre proliferasyonu nasıl mitoz ile belirleniyorsa, belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptoz ile belirlenir (Belamy ve ark., 1995; Cummings ve ark., 1997).

Apoptoz ve mitoz yani hücre ölümü ve hücre çoğalması dokuda hep bir denge halindedir. Apoptoz aynı zamanda; programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılmaktadır (Belamy ve ark., 1995; Majno ve Torisl, 1995; Schwartzman ve Cidloski, 1993).

Wyllie, 1980 yılında apoptoz üzerine yaptığı deneylerde; olgunlaşmamış timüs hücrelerini glukokortikoidlere maruz bırakmış ve apoptotik hücre DNA'sını agaroz jel de yürüterek apoptotik hücrede DNA bütünlüğünün kalmadığını, apoptotik hücre için karakteristik olarak tanımlanan merdiven tarzında DNA bantlarının oluştuğunu göstermiştir (Wyllie, 1980).

1993 yılında Cohen yaptığı araştırmalarda; steroidlerin yüksek dozda kullanılmasının timus hücreleri üzerinde meydana getirdiği etkileri incelemiş ve timus hücrelerinin yüksek doz steroid sonrasında direkt olarak apoptoza yönelmediğini, apoptoza neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptoza yönlendirdiğini bildirmiştir (Cohen, 1993). Bu durumda apoptozun genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü şekli olduğu ortaya çıkmıştır (Cohen, 1993).

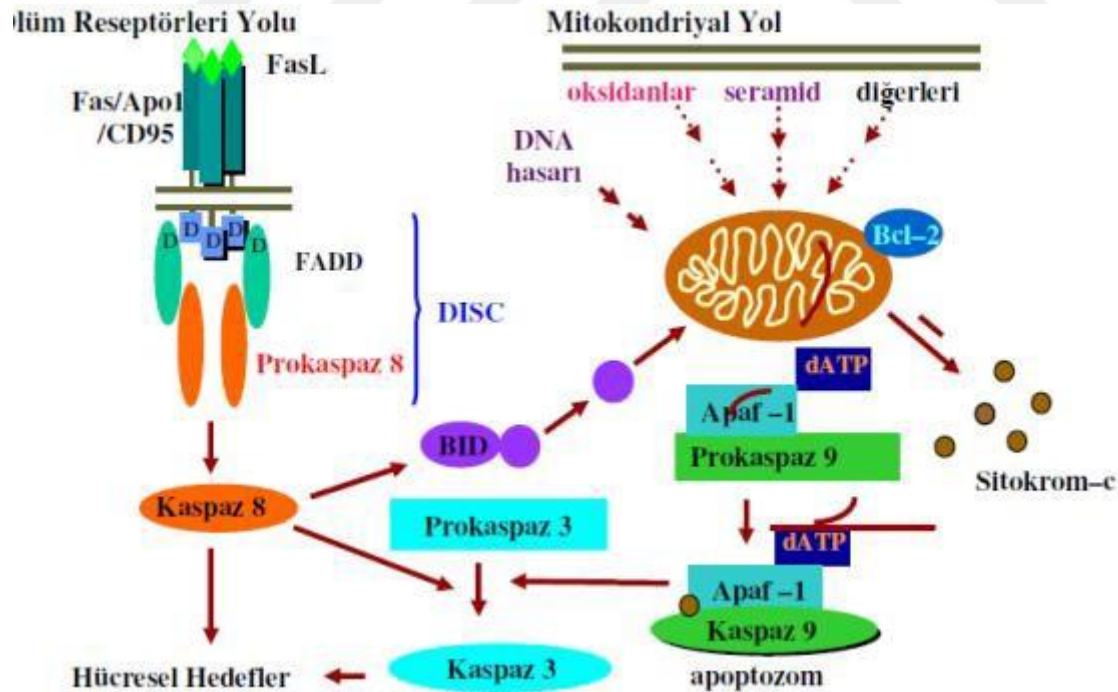
Apoptoz genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla düzenlenir (Cohen, 1993). Nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma membranı yırtılır. Hücreden etrafa kemoatraktanlar salgılanarak inflamasyon oluşur. Apoptoz da ise

hücre bütünlüğü bozulmaz. Apoptoz enerji gerektiren fizyolojik bir hadisedir. Bu yüzden hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptoz ile mi yoksa nekroz ile mi öleceğine yön verir. Enerji ihtiyacı gerçeği mitokondrinin hücredeki önemini apoptozun erken fazında göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir (Lu ve ark., 2000). Apoptoz, hücrenin kendisini aktif olarak yok ettiği bir intihardır. Bu olayı tanımlayan başlıca iki durum vardır; çekirdekte meydana gelen büzülme ve DNA'nın fragmantasyonudur (Gavrieli ve ark., 1992; Lu ve ark., 2000).

4.5.1. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptozun indüklenmesi için üç temel sinyal yolu bulunmaktadır.

1. Mitokondri/Sitokrom-C aracılığı ile apoptozun oluşturulması
2. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile apoptozun tetiklenmesi
3. Endoplazmik Retikulum vasıtasıyla apoptozun oluşturulması



Şekil 4. 3: Apoptozda Görülen Sinyal Yolları

4.5.1.1.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 salınması, apoptozu geri dönülmez 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 inhibitörünü (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 yoğunlaşmasına ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (Derici, 2007).

4.5.1.2.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 apoptozu oluşturur (Keane ve ark., 2001; Lou ve ark.,1998).

4.5.1.3.Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptoz

Endoplazmik retikulum (ER), hücre içi kalsiyum deposu olarak görev yapar (Nakamura ve ark., 2000). Bunun yanı sıra, hem ER stresi ile hem de hücre ölümünü tetiklediği ve çeşitli nörodejeneratif hastalıkların patogenezi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Derici, 2007). Kaspaz-12, ER membranında yer alan ve bu yolla oluşan apoptozda gerekli olan bir kaspazdır. Hücre içindeki artan kalsiyum seviyesi kaspaz-12'nin aktive olmasına neden olur ve kaspaz-9 ile etkileşerek kaspaz kaskadını aktive eder (Rao ve ark., 2001; Antar, 2005).

4.5.2.Apoptozun Görüldüğü Durumlar

4.5.2.1.Embriyonik Dönemde Gözlenen Apoptoz

Memelilerde embriyonik dönemde gözlenen apoptoz, embriyoda el ve ayak parmak taslaklarının arasındaki ara dokunun ortadan kalkması, merkezi sinir sisteminin şekillenmesi, kan damarlarının sayısının azaltılması, fötusun cinsel gelişimi sırasında duktus sisteminin gerilemesi gibi birçok süreçte meydana gelir. Başka bir örnek de ise; kurbağaların metamorfoz sırasında kuyrukları da apoptoz ile kaybolduğu belirtilebilir. Ayrıca gözün lens hücreleri embriyonik gelişimin ileri evrelerinde apoptozla ölür ve içleri kristallin adı verilen şeffaf bir protein ile dolar (Vaux, 1999; Franz, 1997).

4.5.2.2.Postnatal Hayatta Gözlenen Apoptoz

Kemik iliğindeki kan üretiminin dengede tutulması için (Hughes ve Gorospe, 1991) kan hücrelerinin ortadan kaldırılması, menstruasyon sırasında endometriyumun iç tabakasının dökülmesi, menstruel siklus sonunda korpus luteumun involusyonu gibi birçok fizyolojik olay apoptoz ile gerçekleşir. İnce barsaklardaki kriptaların tabanlarında yeni oluşan hücrelerde, zamanla kriptaların uçlarına göç ederler ve bu hücreler apoptoz geçirdikten sonra barsak boşluğuna dökülürler. Deri hücreleri de derinin bazal tabakasında oluşur. Zamanla bu hücreler derinin en üst tabakasına doğru göç ederler. Hücreler bu göç sırasında derinin her tabakasında çeşitli farklılaşma özellikleri gösterirler, en sonunda da organizmayı dış etkenlere karşı koruyan tabakayı oluşturmak üzere ölürler. İmmün sistemin çok önemli hücreleri olan T lenfosit hücrelerinin olgunlaşma yeri timusdur. T lenfositlerinin reseptör kompleksleri eksik olanlar veya organizmanın kendi dokularına karşı reaksiyon verme potansiyeli taşıyanlar da kan dolaşımına girmeden önce apoptozla ortadan kaldırılırlar. Tüm bu örneklerle ek olarak, süttan kesilen dişilerin meme bezlerinde ve kastrasyon yapılan erkeklerin prostat bezlerinde de apoptoz gözlenir (Marti ve ark., 2001; Ford, 2001).

4.5.2.3. Patolojik Durumlarda Gözlenen Apoptoz

Diyabet, parkinson hastalığı, alzheimer hastalığı, vücudun bağışıklık sisteminin düzgün işlemediği durumlarda ortaya çıkabilen bağışıklık sistemi hastalıkları, viral enfeksiyonlar, tümör oluşumu, AIDS, aterosklerozis, miyokard infarktüsü, organ transplantasyonları, oksidatif stres, alkolizm, X ışınları ve radyasyon gibi birçok patolojik durum da canlıda apoptoza neden olur (Blanch ve ark., 1999; Hughes ve Gorospe, 1991; Kannan ve Jain, 2000).

4.5.3. Ve Nekroz Arasındaki Farklar

Apoptoz, sadece sonuç odaklı düşünüldüğünde, hücrede yarattığı bu değişikliklerle nekrozun bir parçasıymış gibi algılanabilir. Ancak nekroz ile aralarında birçok farklılık mevcuttur (Şekil 4.4).

Fiziksel Farklar;

- 1- Nekrozdan, tek tek olabileceği gibi birbirine birleşik hücre grupları da etkilenir, oysa apoptoz da hücreler tek başına etkilenir (Cummings ve ark., 1997; Spencer ve ark., 1996).
- 2- Nekrozun gerçekleşmesi için fizyolojik uyarılara ihtiyaç yoktur, apoptoz ise birçok durumda fizyolojik uyarılarla da başlayabilir (örnek: hormonal dengenin bozulması) (Belamy ve ark., 1995; Wyllie, 1980).
- 3- Nekroza uğrayan hücre, çevreye kemotaktik maddeler yayar. Bu kemotaktik maddeler aracılığı ile o bölgeye çağrılan makrofajlar tarafından nekrotik hücre fagosite edilir. Apoptoza uğrayan hücre ise çevreye nekrotik hücre gibi fagositleri çekici etki yapan kemotaktik madde yaymaz; yanında bulunan epitel hücreleri veya makrofajlar aracılığı ile direkt olarak fagositoza uğrar. Nekrozda ile apoptoz arasındaki en temel fark da, nekrozda inflamatuvar cevabın olup, apoptozda ise olmamasıdır (Belamy ve ark., 1995; Cummings ve ark., 1997; Majno ve Torisl, 1995).

Morfolojik Farklar;

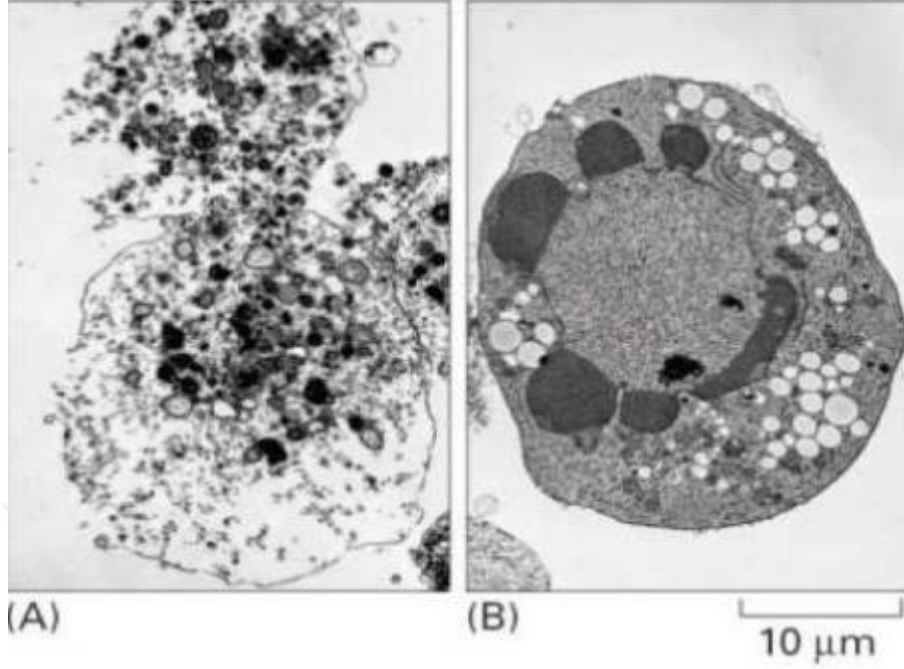
- 1- Nekroz sürecinde hücre zarı bütünlüğü bozulur, apoptoz da ise zarda kabarcıklar görülür fakat nekroz gibi asla zar bütünlüğü bozulmaz (Cohen, 1993; Spencer ve ark., 1996).

- 2- Nekroz ilk önce sitoplazma ve mitokondride görülen şişme ile başlar, apoptozda ise nekrozun tersine sitoplazmada büzülme ve çekirdek yoğunlaşması görülür (Cummings ve ark., 1997; Cohen, 1993).
- 3- Nekroz hücrenin tamamının parçalanması ile son bulur, apoptoz ise hücrenin daha ufak parçalara (fragmanlara) ayrılması ile son bulur. Bu küçük parçalara apoptotik cisimcikler adı verilir (Cummings ve ark., 1997).
- 4- Nekrozda hücre zarında vezikül oluşumu yoktur, total parçalanma olur; oysa apoptozda zara bağlı veziküller oluşur (Cohen, 1993)
- 5- Nekrozda organellerin devamlılığının bozulması söz konusudur, apoptozda; apoptozu başlatan bcl-2 gen ailesinin ürettiği por oluşturan proteinlerin etkisi ile organellerin devamlılığı bozulmaz yani bütünlüğü korunur, ancak delikli halde bir yapıya kavuşur (Cohen , 1993) (Şekil 4.4).

Biyokimyasal Farklar;

- 1- Nekrozda hücre içi iyon dengesinde farklılıklar meydana gelir, apoptozda hücre içinde sıkı bir şekilde denetlenen enzimatik olaylar mevcuttur (Wyllie, 1980).
- 2- Nekroz sürecinde hücre enerjiye ihtiyaç duymaz, nekroz pasif bir şekilde gerçekleşebildiği gibi +4 °C'de bile hücre nekroza uğrayabilir. Apoptoz sürecinde ise hücre enerjiye ihtiyaç duyar, aktiftir ve +4 °C'de sıcaklıkta gerçekleşemez (Cohen, 1993).
- 3- Agaroz jel elektroforezi yöntemiyle hücre DNA'sına bakıldığında, hücrede nekroz sürecinde DNA rastgele parçalanır. Oysa apoptozda DNA parçalanması rastgele değildir, DNA'da monooligonükleozomal parçalanma gerçekleşir. Bu da agaroz jel elektroforezinde apoptoz için karakteristik olan "ladder pattern" olarak adlandırılan merdiven şeklinde kırılmaların gözlemlenmesini sağlar (Wyllie, 1980; Estman, 1995).
- 4- Nekroz sürecinde, genetik materyal hücre bütünlüğü bozulmadan önce parçalanır (postlitik DNA parçalanması). Bu olay nekrotik hücre ölümünün geç bulgusudur. Ayrıca apoptozda enzimatik reaksiyonları katalizlemesi için mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c gibi birçok faktörün salınımı mevcuttur (Easman, 1995; Bortner ve ark., 1995).
- 5- Nekroz sürecinde hücre membranı spesifik olmadan parçalanır, apoptozda ise membran bileşenlerinin asimetrisinde değişiklikler meydana gelir (örn: Bir membran fosfolipidi olan fosfatidilserin zarın sitoplazmaya bakan yüzünden ekstraselüler yüzüne doğru yer değiştirir). Bu değişiklik apoptotik hücrenin nekrotik hücreden farklı olarak

inflamatuvar reaksiyon oluşturmada diğer hücrelerce tanınıp, fagosit edilmemesini sağlar (Cohen, 1993).



Şekil 4. 4: Nekroz ve Apoptozun Elektron Mikroskobu Görüntüleri A: Apoptoz, B: Nekroz

4.5.4. Apoptozun Genetik Kontrolü

4.5.4.1.1. Antiapoptotik Proteinler

Proto-onkogenlerin görevi normal hücre büyümesi ve gelişmesini düzenlemektir. Bu genlerin aktivasyonunda meydana gelen mutasyonla onkogen adını alır.

Onkogenler, hücreyi uyarak, hücrenin aşırı büyüme ve bölünmesini sağlar. Tümör baskılayıcı genler ise onkogenleri baskılar ve onları dengelerler (Akıns ve ark., 1996; Milerk ve ark., 1990; Nowell, 1990). Son yıllarda yapılan çalışmalar, bazı onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin apoptozun kontrolünü sağladıklarını göstermektedir (Caotes ve ark., 1996). C-myc, p-53 ve bcl-2 ailesi (bcl-2, bax ve bcl-x) genleri, omurgalı hücrelerinde apoptoz sürecinde gerçekleşen enzimatik reaksiyonları düzenleyen genler olarak bilinmektedir ve bu enzimatik reaksiyonlarda görev yapan proteinler de genler ile aynı adlarla anılmaktadır (Choi ve ark., 2001; Newton ve Strasser, 1998; Nakano, 1997; Wyllie, 1995)

p-53:

p-53 geni apoptozu düzenleyen tümör baskılayıcı bir gendir. Hücrede hipoksi ve serbest radikal oluşumu ile p-53 aracılı DNA onarımı ve apoptoz başlatılır (34). p53 proteini hücrenin interfazda DNA hasarı olduğu zaman G₁ fazından S fazına geçişini engeller. Bu gecikme ile hücrede DNA'nın onarılması için zaman kazanılır, eğer DNA'nın onarılması başılamıyorsa hasarlı hücreler apoptozu yönlendirilir (Nkano, 1997; Miyashita ve ark., 1994; Spencer ve ark., 1996).

c-myc:

c-myc proteini transkripsiyonda görev alan bir transkripsiyon düzenleyici proteindir. Görevi yardımcı diğer faktörlerle beraber hücre proliferasyonuna ve hücrenin apoptozu yönlendirilmesine sebep olmaktır (Miyashita ve ark., 1994). C-myc protoonkogeninin görevi; hücrede büyümenin programlanmasıdır. Eğer hücrede hem c-myc hem de uygun büyüme faktörleri yoksa büyüme durur, çoğalma sadece her ikisinin de yeterli olduğu durumlarda gerçekleşir. C-myc tek başına hücre proliferasyonunu sağlayamaz, hücrede yardımcı büyüme faktörleri yok ise hücrede apoptoz görülür (Schwartzman ve Cidloski, 1993; Evan ve ark., 1992; Wagner ve ark., 1993).

Bcl-2 ve Bcl-xl:

Bcl-2 protein ailesi, antiapoptotik protein ailesi olarak da adlandırılır. Bcl-2 protein ailesi apoptotik şelalenin kontrolünü sağlayan en önemli gruptur ve sayıları bir düzineden fazladır (Lu ve ark., 2000; Newton ve Strasser, 1998). Bax ve bad gibi bu ailenin bazıları apoptoz sürecinde öncül olarak görev yaparken, diğerleri antiapoptotik göreve yani hücre koruyucu görevleri olan proteinlerdir (Newton ve Strasser, 1998). Bu proteinlerin seviyeleri hücrenin öleceğine veya yaşayacağına dair kritik kararın verilmesini belirler.

Bcl-2 ailesi proteinlerinin hücredeki görev yeri mitokondridir. Bcl-2 güçlü bir ölüm inhibitörüdür (Newton ve Strasser, 1998). Bcl-2 ailesinin proteinleri apoptozu engellemek için antioksidan yolakta mitokondriden sitokrom-c salınımını engellemede de henüz aydınlatılamayan sebeplerden dolayı rol oynar. Bcl-2 mitokondri membranı dışında, hücrede endoplazmik retikulumda aynı zamanda nükleer membranlarda bulunur (Choi ve ark., 2001; Newton ve Strasser, 1998; Miyashita ve ark., 1994; Korsmeyer, 1992).

Bcl-xl proteini mitokondri dış membranında bulunur. Bcl-xl ve Bcl-2 beraber çalışarak mitokondri membranının geçirgenliğini korurlar. Proapoptotik proteinler olarak bilinen Bax ve Bad'i inhibe ederek apoptozu engellerler (Keane ve ark., 2001). Bcl-xl kaspaz aktivasyonunu sitokrom-c aracılığı ile Apaf-1 üzerinden önler (Lu ve ark., 2000; Hu ve ark., 1999; Newton ve Strasser, 1998).

Bax ve bad proteinleri pro-apoptotik proteinlerdir ve apoptozda önemli rolleri olan kaspaz protein ailesi üyelerindendir. Bunların da sayıları oldukça fazla olup, yaklaşık olarak bir düzineden fazladır. Kaspazlar sistein proteazlar ailesindendir ve aspartik asitten sonraki peptit bağlarını kırarlar. Kaspazların aktiviteleri apoptoz yolunda ortaya çıkar. Kaspaz 9'un uyarılması bcl-2 ailesi tarafından gerçekleştirilebildiği gibi inhibisyonu da yine bcl-2 ailesi tarafından gerçekleştirilir. Kaspaz şalesinin başka üyelerinden olan kaspaz-2 ve kaspaz-8, TNF- α gibi inflamatuvar sitokinler tarafından aktive edilir.

XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP:

Bazı memeli homologları; XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, Bruce, Survivin, pIAP olarak tanımlanan apoptoz protein inhibitörleri, antiapoptotik protein ailesindendir ve hem omurgalı hem de omurgasızlarda tanımlanmıştır. Bu ailenin üyelerinden birçoğu apoptozisi kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9'a direkt olarak bağlanarak ve onları inhibisyonunu sağlayarak gerçekleştirirler (Keane ve ark., 2001). Kaspazların bu süreçteki inhibisyonu, apoptoz protein inhibitörleri ve mitokondrial yol ile gerçekleşir (Li ve ark., 2000, Keane ve ark., 2001, Bao ve Liu, 2003).

4.5.4.2.Proapoptotik Proteinler

Bax, Bad ve Bid, Bcl-2 ailesinin en iyi bilinen proapoptotik proteinlerindendir. Sağlıklı bir hücrede bax proteini sitozolde bulunur. Apoptotik sinyaller ile sitozolde bulunan bax mitokondriye yönelir ve birtakım değişimler sonucunda bax'ın hidrofobik C terminal ucunun açığa çıkmasıyla sitokrom-c salınımına neden olur. Kalsiyum bağımlı doğal bir proteaz olan kalpain tarafından bax proteininin salınımı uyarılarak sitokrom-c açığa çıkar (Miyashita ve ark., 1994; Wingrave ve ark., 2003). Bad, sağlıklı hücrelerde mitokondri membranının dış zarında bulunur. Apoptoz sürecinde bax değişime uğrar ve N terminal uç açığa çıkarken bcl-xl bad'dan ayrılır (Korsmeyer, 1992; Wagner ve ark., 1993). Bid proteini, bcl-2'yi inaktive etmek veya bax'ı aktiflemek üzere mitokondriye yönelir (Newton ve Strasser, 1998). Endojen bid'in yarısı sitozolde erir. Diğer yarısı ise hücre içi membranlarda

özellikle de endoplazmik retikulumda bulunur (Li ve ark., 2000; Lu ve ark., 2000; Rao ve ark., 2001).

4.6.APOPTOZUN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Apoptozu belirlemek için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler, morfolojik, immünohistokimyasal, biyokimyasal ve immünolojik yöntemlerdir. Hücrede apoptozu belirleme yöntemlerini şu şekilde sınıflandırabiliriz (Derici, 2007);

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri;

- Işık mikroskopi

Hematoksilen-eosin boyama

Giemsa boyama

- Floresan mikroskopi / Lazerli konfokal mikroskop kullanımı

Hoechst boyası

DAPI

Propidium iyodür (PI)

- Elektron mikroskopi

- Faz kontras mikroskopi

2. İmmünohistokimyasal yöntemler;

- Anneksin V Yöntemi

- TUNEL Yöntemi

- M30 Yöntemi

- Kaspaz-3 Yöntemi

3. Biyokimyasal yöntemler;

- Agaroze Jel Elektroforezi-DNA Fragmentasyonu
- Western Blotting

Substrat kırılmaları

Aktif kaspazın belirlenmesi

Sitokrom-c saliverilmesi

- Flow Sitometri

DNA azalması

Anneksin V

4. İmmünolojik yöntemler;

- Enzim ilintili immün test (ELISA)
- Florimetrik yöntem

5. Moleküler biyoloji yöntemleri

Anneksin V Yöntemi:

Apoptoz sürecinde olmayan normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmaya bakan yüzünde bir fosfolipid olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde hücre membranının iç yüzünde bulunan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne geçiş yaparlar. Dış yüze geçen PS'ler, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilir. Anneksin V işaretleme yöntemi ile apoptotik hücreler saptanmış olur.

"Flow" Sitometri:

-DNA azalması

-Annexin V

Floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak, apoptozda hücrede salındığı bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması flow sitometri yardımıyla

Mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay ve kısa zamanda uygulanan bir yöntemdir. Ayrıca nicel olarak sonuç verebilmesi bakımından klinikte apoptozun belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir.

Apoptoz, flow sitometri ile iki şekilde belirlenir.

- a. Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak,
- b. Anneksin V antikoru kullanılarak

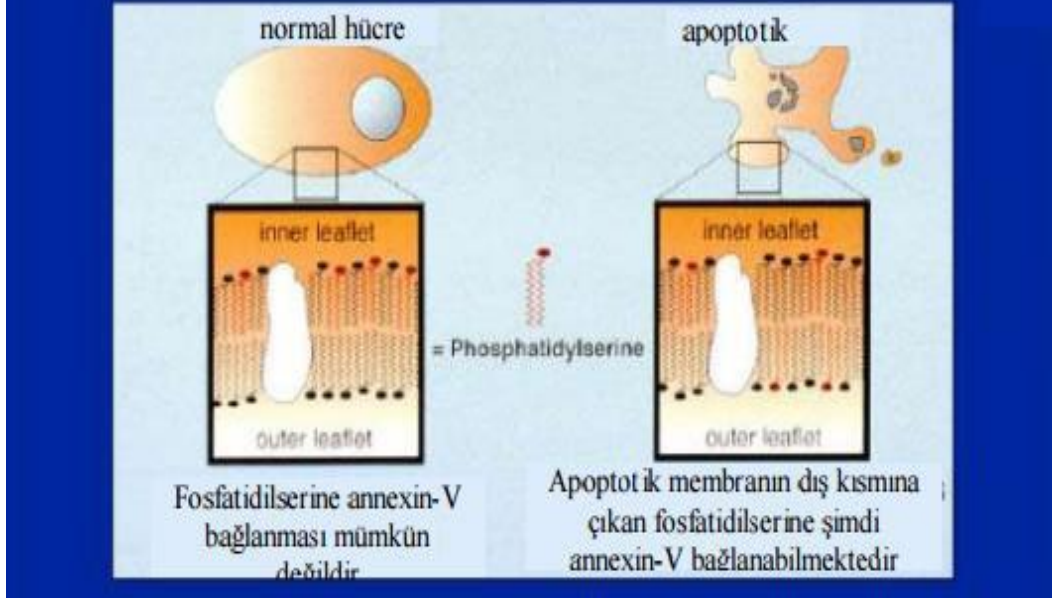
Anneksin V yöntemi apoptoza uğrayan hücreleri belirlememizi sağlayan bir metodudur. Apoptoza uğramış hücreler, apoptotik cisimcikler olarak da adlandırılan birçok veziküle dönüşmektedir ve bu yapılara “blebbing” adı verilir. Blebbinglerin dış kısımları yine hücre membranı ile kaplıdır. Fakat veziküllerin dışını kaplayan membran sağlıklı hücrelerin ki gibi değildir (Tesarik ve ark., 1999).

Membran fosfolipidlerinden bir tanesi olan fosfatidilserin, normal bir hücrede hücrenin plazma membranının sitoplazma kısmına bakan iç yüzünde bulunduğu halde, apoptotik sürecin başlaması ile birlikte hücrenin plazma membranının dış yüzeyine geçmeye başlar. Fosfatidilserinin bu membranın dış yüzeyine translokasyonu, hücrenin komşu hücreler tarafından tanınarak, fagosit edilmelerini sağlar.

Apoptotik hücrelerin tespitinde, apoptotik süreçte olan hücrelerde meydana gelen bu fizyolojik değişimlerden yararlanılır. Anneksin-V antikoru, apoptoz sürecindeki hücrelerin membranlarının ekstraselüler kısmında ortaya çıkan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğundan, hücre yüzeylerine Anneksin-V bağlanma oranıyla, o hücre popülasyonundaki apoptoza uğramış hücrelerin oranını belirlenebilmektedir (Overbeeke ve ark., 1998; Tesarik ve ark., 1999) (http://www.roche-applied-science.com/prod_inf/manuals/cell_man Erişim tarihi: 9 Ekim 2016).

Hücre Membranı Değişiklikleri

Apoptotik Hücrelerde Fosfatidilserin Dağılımı



Şekil 4.5: FITC ile işaretli Annexin-V hücre yüzeyine çıkan fosfatidilserine bağlanabilmektedir.

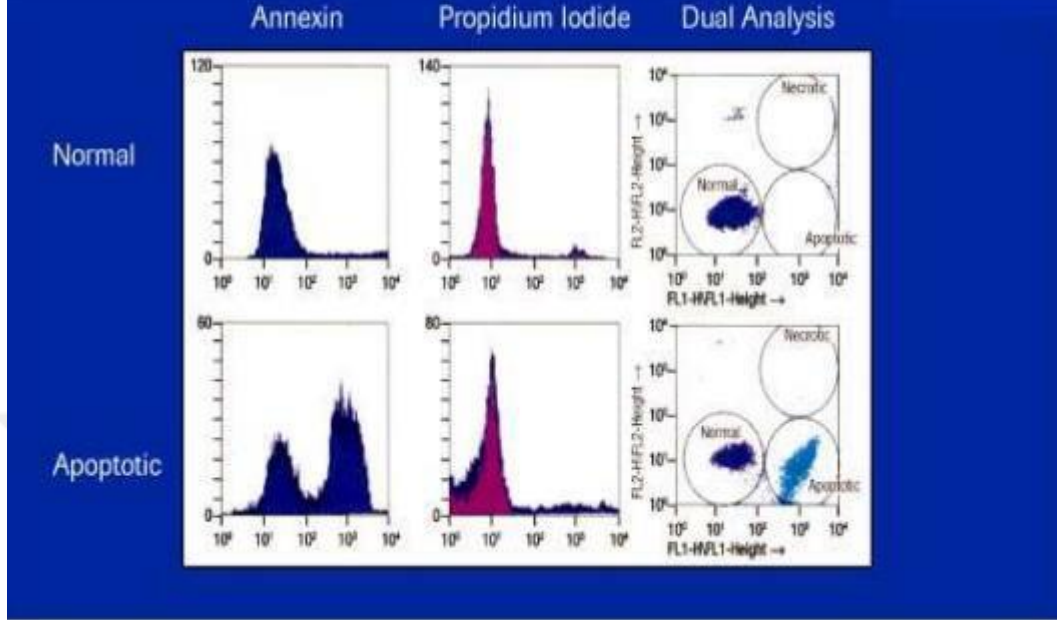
(http://www.roche-appliedscience.com/prod_inf/manuals/cell_man/p04.pdf Erişim tarihi: 9 Ekim 2016)

Fluoresan işaretli Anneksin-V kompleksinin hücrenin ekstraselüler yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow-sitometri yöntemi ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için flow-sitometri de ikinci bir boya olarak nekrotik hücre belirteci olarak tanımlanan propidium iyodür eklenmektedir (Overbeeke ve ark., 1998; Kockx ve ark., 1998; Tesarik ve ark., 1999).

Bu yöntemde Anneksin-V pozitif, Propidium iyodür negatif hücreler apoptozise uğramış hücreler olarak tanımlanmıştır. Hem Anneksin-V hemde Propidium iyodür pozitif hücreler de nekroza uğramış hücreler olarak değerlendirilmektedir.

Hücre Membran Değişiklikleri

FITC-Annexin-V ile Flow-cytometric tavin



Şekil 4.6: FITC-Anneksin V'in apoptotik hücelere bağlanması ile elde edilen hücre dağılımları flow-sitometrisinde normal ve apoptotik hüceleri birbirlerinden çok net olarak ayırabildiği gibi apoptoza uğramış hücre sayılarına kantitatif olarak ulaşabilme imkanı da sağlayabilmektedir. Aynı anda Propidium iyodür de eklendiğinde yüzde kaç hücrede aynı anda nekrotik ölümün de olduğunu anlama şansı ortaya çıkmaktadır.

(http://www.roche-applied-science.com/prod_inf/manuals/cell_man/p04.pdf Erişim tarihi: 9 Ekim 2016)

Hücre Membran Değişiklikleri

Anneksin-V yöntemi apoptoz ve nekrozu aynı örnekte gösterilebilir.

	Normal Hücreler	Apo ptotik Hücreler	Nekrotik hücreler
Anneksin V Boyaması	-	+	+
Propidyum İyodür Boyası	-	-	+

Tablo 4.1: Anneksin-V pozitif, Propidyum iyodür negatif hücreler apoptotik hücreler. Hem anneksin-V hem de propidyum iyodür pozitif hücreler de nekrotik hücrelerdir.

(http://www.roche-applied-science.com/prod_inf/manuals/cell_man/p04.pdf Erişim tarihi: 9

Ekim 2016)

5.MATERYAL VE YÖNTEM

5.1.ÇALIŞMADA KULLANILAN LABORATUVAR CİHAZ VE KİMYASALLARI

5.1.1 Kullanılan Cihazlar

Biyogüvenlik Kabini Class 2 (ESCO LABCULTURE CLASS II)

İnverted Mikroskop (OLYMPUS)

CO2 İnkübatör (SANYO)

Derin Dondurucu (SANYO)

Otoklav (ERNA)

Santrifüj (HERAUS)

Pipet Aid (LABNET)

Elektronik Hassas Terazî (RADWAG)

Otomatik Pipetler (AXYGEN)

Chem Analyzer-ELISA (CHEMWELL)

Azot Tankı(BIO-CANE 34)

Flow Sitometri Ölçüm Cihazı (BD ACCURI C6)

pH metre (METTER TOLEDO)

Vortex Mixer (LABNET)

Su Banyosu (MERMERT)

5.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Fetal Calf Serum (GIBCO)

Penicilin-Streptomycin (GIBCO)

Trypsin-EDTA %25 (STEMCELL)

DMEM-F12 Ham (MULTICELL)

MTT(3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide;Thiazolylblue)(SIGMA)

APC-Anneksin V (BD PHARMINGEN)

Propidium Iodide (LIFE TECHNOLOGIES)

PBS (BIOMATIK)

Resveratrol (SIGMA)

Dimetil sülfoksit (GIBCO)

5.1.3. Kullanılan gereçler:

Steril Filtre (BD FALCON)

Santrifüj Tüp 50 ml (NEST)

Santrifüj Tüp 15 ml (NEST)

Disposable Pipet (5-10 ml) (CAPP)

Vidalı Kapaklı Flasklar (T-25, T75 cm²/yüzey) (NEST)

Plate (96 kuyucuklu)(CITOTEST)

5.2.YÖNTEMLER

5.2.1.Hücre Kültürü Aşaması

5.2.1.1.Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı:

Deneyler İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Deneylerde İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Araştırma Laboratuvarından sağlanan MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) meme kanseri hücre soyu kullanıldı.

Hücreler, içerisinde inaktive edilmiş %10 fetal sıgır serumu (FCS), 0,2 mM glutamin, 100 µg/ml streptomisin, 100 IU/ml penisilin içeren DMEM-F12 Ham medyumunda (Dulbecco'nun Modifiye edilmiş Eagle Medyum, besleyici karışım F12 Ham medyum) 37 °C'de, % 5 CO₂ ve 1 atmosfer basınç altında 25 ve 75 cm²'lik steril flasklar içerisinde kültüre edildi. DMEM-F12 Ham medyum ticari olarak kullanıma hazır şekilde satın alındı. Hücreler rutin olarak haftada 2 kez pasajlandı. Hücreler, yoğunluk olarak flaskın yarı yüzeyini kapladıklarında deneylerde kullanıldı.

FCS'nin Kullanıma Hazırlanması:

FCS -20 °C'de saklandı ve taşınması soğuk zincirle yapıldı. Stok serum kullanılmadan önce 56 °C'de 1/2 saat ısı ile inaktive edildi.

Hücre Kültürü Deneylerinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması:

Kullanılan Tripsin-EDTA ticari olarak kullanıma hazır biçimde temin edildi. Kullanımdan önce 0,22 µm'lık milipor filtreden süzülerek steril hale getirildi ve -20 °C'de saklandı.

Penicilin-Streptomycin kullanıma hazır halde satın alındı ve -20 °C'de saklandı.

Fosfat tamponu ticari olarak tablet halinde kullanıma hazır biçimde temin edildi. +4 °C'de saklandı. Kullanılmadan önce bidistile su içerisinde çözüldü.

5.2.1.2.Hücre Soyunun Açılması

Uzun süre sıvı azot buharında saklanmış olan hücreler çözünmesi sağlanana kadar 37 °C'lik su banyosunda tutuldu. Çözünen hücre süspansiyonu %20 serumlu medyum içeren flasklara damla damla alınarak 3-4 saat 37 °C'de, %5 CO₂ ve 1 atm basınç altında

inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda hücre medyumunu % 10 serumlu medyumla değiştirildi.

5.2.1.3. Hücrelerin Çoğaltılması ve Sayımı

Hücreler 25 cm²'lik flasklarda 8-10 ml, 75 cm²'lik flasklarda ise 25 ml % 10 FCS ve 100 IU/penisilin-streptomisin içeren DMEM-F12 Ham medyumunu içerisinde % 80-90 yoğunluğa geldiklerinde pasajlanmak suretiyle üretildi.

Hücre sayımı;

Toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için, üzeri 4 adet 16 küçük kare içeren bölgeden oluşan 1 mm²'lik alan ve 0,1 mm derinliğe sahip hemasitometre kullanıldı. Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı.

Toplam hücre sayısı/ml = Hemasitometre sayım sonucu x 10⁴ x Medyum Miktarı (ml)

5.2.1.4. Resveratrolün Hücrelere Verilecek Dozlarının Ayarlanması;

Resveratrol, dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Resveratrol 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM son konsantrasyonları olacak şekilde ana stoktan DMSO ile dilüsyon yapılarak hazırlandı.

Sitotoksik Dozların Değerlendirilmesi:

Hücrelerin verilen etken maddenin her konsantrasyonu için tüm sürelerin sonunda invert mikroskop altında fotoğrafları çekildi ve sitotoksik doz alanları fotoğraflar üzerinde belirtildi.

5.2.2. MTT Ölçümü

Bu ölçüm için 96 kuyucuklu mikrolate kullanıldı. MCF-7 hücrelerinin 24 saat süre ile mikrolatelere tutunması beklendikten sonra hücreler her kuyucuğa 100 µl hücre süspansiyonu olacak şekilde aktarıldı. Test periyodunun sonunda üst medyum kuyucuklardan çekildi ve üzerlerine 100 µl MTT solüsyonu eklendi ve 4 saat süre ile 37 °C'de % 5 CO₂'de inkübasyona bırakıldı. MTT solüsyonu 5 mg/ml olacak şekilde PBS içinde çözülüp steril filtrasyon ile bir şişeye transfer edilerek hazırlandı. 4 saat inkübasyon sonunda MTT solüsyonu kuyucuklardan çekildive kuyucukların üzerine MTT ile oluşan formazon kristallerini çözmek için 200 µl DMSO eklendi, hemen ardından 540 nm dalga boyunda elisa okuyucuda okutuldu. Okunan absorbans değerine göre sitotoksosite düzeyi belirlendi. Sitotoksosite düzeyleri aşağıdaki formül ile hesaplandı.

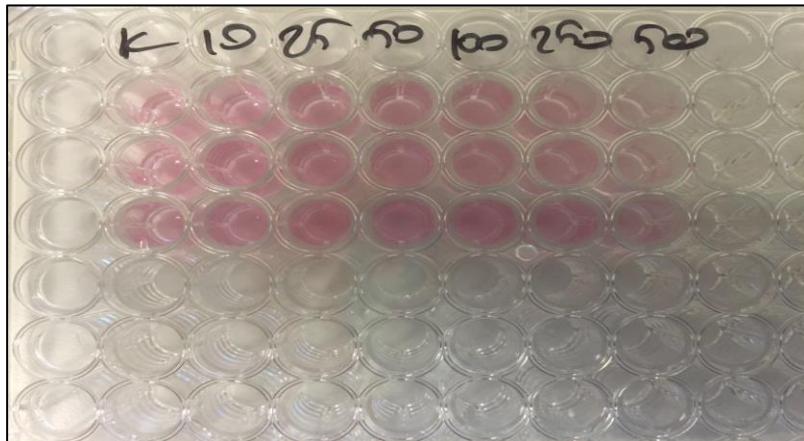
$$1-(\text{test kuyucuğunun absorbansı}/\text{kontrol kuyucuğunun absorbansı}) \times 100$$

Kontrole göre %50 oranında sitotoksik etki gösteren konsantrasyon sitotoksik doz olarak kabul edildi.

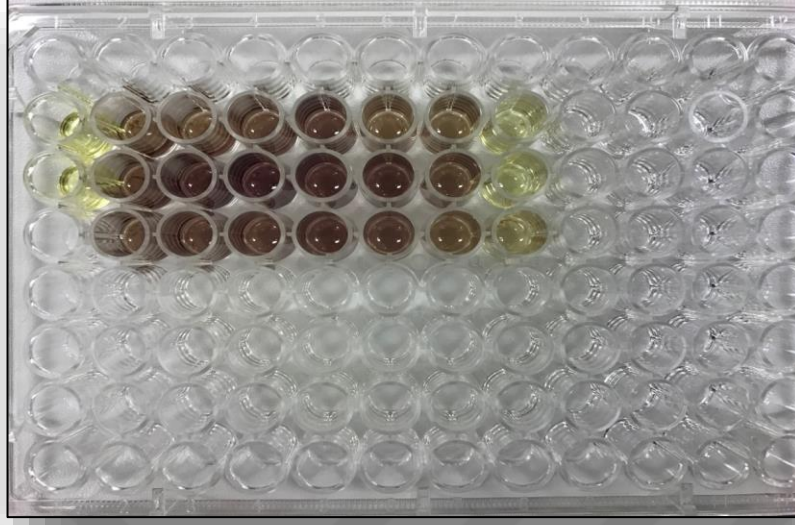
MTT ölçümünde etken maddenin her konsantrasyonu için 3 kuyucuk kullanıldı ve her konsantrasyon için 12, 24 ve 48 saatlik deney grupları oluşturuldu.

B,C,D-2 kontrol grubu, B,C,D-3 10 µM resveratrol, B,C,D-4 25 µM resveratrol, B,C,D-5 50 µM resveratrol, B,C,D-6 100 µM resveratrol, B, C,D-7 250 µM resveratrol, B,C,D-8 500 µM resveratrol konsantrasyonları olacak şekilde MCF-7 hücreleri 96 kuyucuklu mikrolatelere ekildi. (Şekil 5.7, 5.8, 5.9, 5.10)

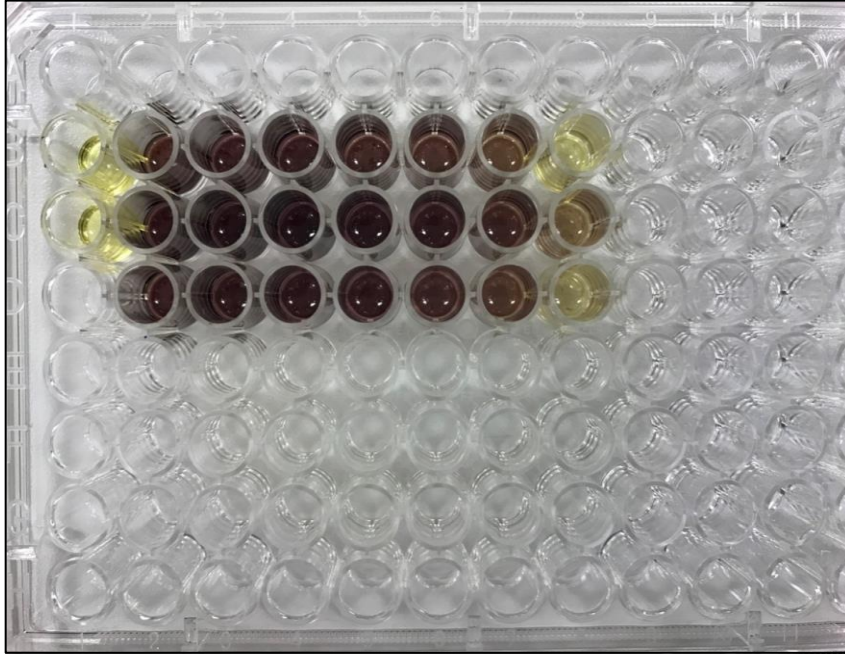
Şekil 5.7 :MTT Testi Öncesi 96 Kuyucuklara Ekilmiş Hücreler



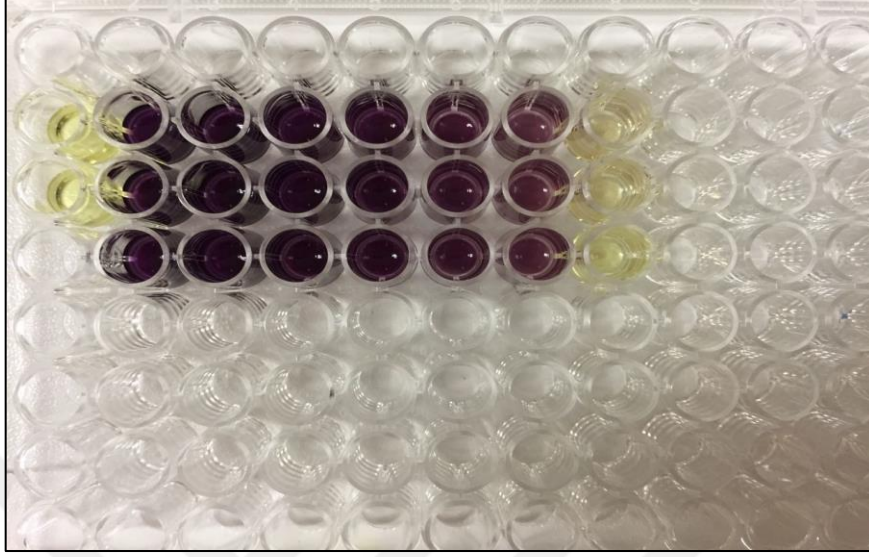
Şekil 5.8: 12. saat MTT Sonuç Görüntüleri:



Şekil 5. 9: 24. saat MTT Sonuç Görüntüleri:



Şekil 5. 10 :48. saat MTT Sonuç Görüntüleri:



5.2.3.Apc Anneksin V İle Flow Sitometri Ölçümü

- 1) Trypsin-EDTA ile flasktan kaldırılan hücreler falkona alındı. Falkona alınan hücreler iyice süspanse edilerek sayım için 10 µl çekilerek ependorfa alınarak 10 µl trypan blue ile karıştırılıp Thoma Lamı ile sayıldı ve toplam hücre (TOTAL) sayıları hesaplandı.
- 2) Her hücre hattı için 3×10^5 hücre (TOTAL) alınarak santrifüj edilir ve üst sıvı vakumla atıldı
- 3) Hücre pelleti 1 ml PBS ile sulandırılıp santrifüj edilerek yıkandı.
- 4) Üst sıvı vakumla atıldıktan sonra hücre pelleti 100 µl Annexin Binding Buffer ile sulandırılarak ependorf tüplere alındı.
- 5) Her bir örneğe 5 µl Annexin-V-APC boyası eklenerek kısaca vortekslendi ve 30 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
- 6) İnkübasyon sonunda 300 µl soğuk Annexin Binding Buffer ilave edildi, örnekler buz üzerine alındı.
- 7) 2µg/ml Propodium Iodide (PI) eklendi ve 10 dakika bekletildi.

8) Örnekler 40 µm lik filtrelerden geçirilerek BD Accuri C6 akım sitometri cihazı ile analiz edildi.

NOT: Apoptoz analizlerinde; Annexin-V ve hücre canlılık belirteci olan PI boyası ile ikili boyama yapılarak erken/geç apoptotik hücre ayrımı mümkün olmaktadır.

Deneyler için her dozdan iki adet 25 cm²'lik flasklara hücre ekimi yapıldı.

Anneksin Binding Buffer Hazırlanışı

0,1 M HEPES (pH: 7,4)

1,4 M NaCl

25mM CaCl₂

50 ml hacimde hazırlandı. 0,22 µm filtreden geçirilip +4 °C de saklandı.

6. BULGULAR

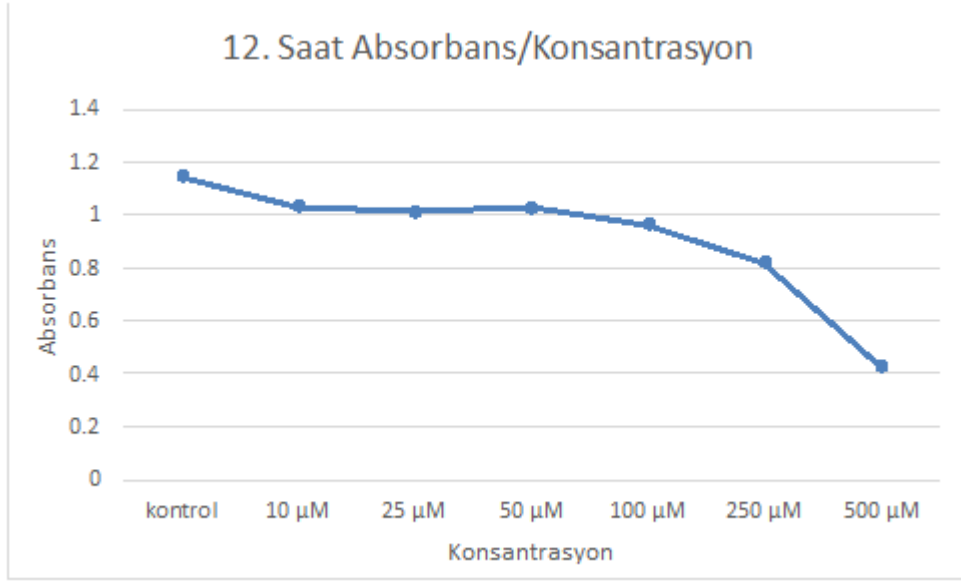
Çalışmamızda MTT ölçümü için 96 kuyucuklu mikrotipler kullanıldı. Resveratrolün uygulanacak tüm dozlarının herbiri için 3 kuyucuğa ekim yapıldı. Kontrol grubuna resveratrol uygulanmadı. 12, 24 ve 48 saat zaman aralıklarında deney tekrarlandı (Tablo :6.2, 6.3, 6.4, 6.5).

6.1. MTT SONUÇLARI

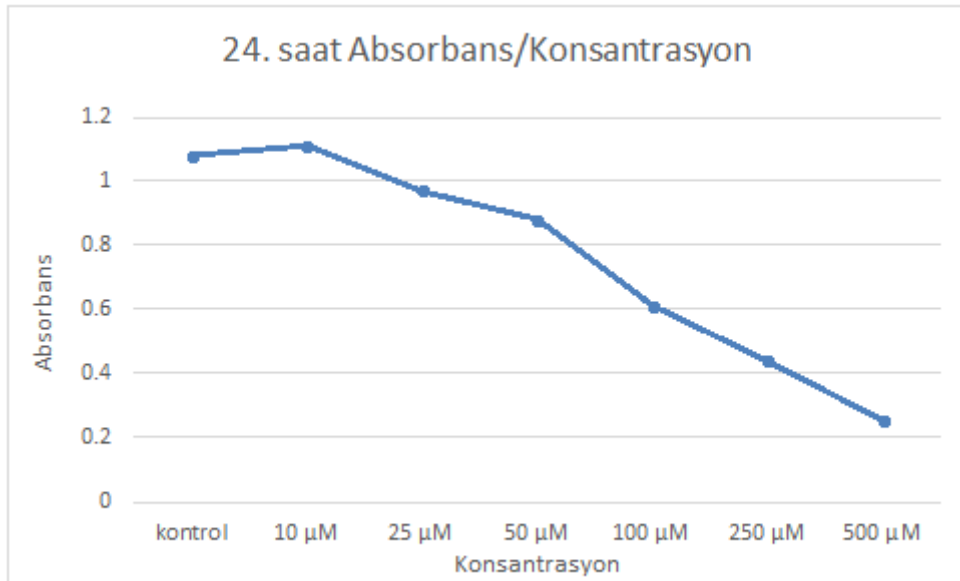


Resveratrol	12.Saat absorbens değeri	24.Saat absorbens değeri	48.Saat absorbens değeri
Kontrol	1,1458	1,0827	2,2779
10 µM	1,0322	1,1143	2,2813
25 µM	1,0132	0,9724	1,9517
50 µM	1,0287	0,8812	1,644
100 µM	0,9663	0,614	1,1569
250 µM	0,8221	0,4412	0,7646
500 µM	0,4276	0,2552	0,1812

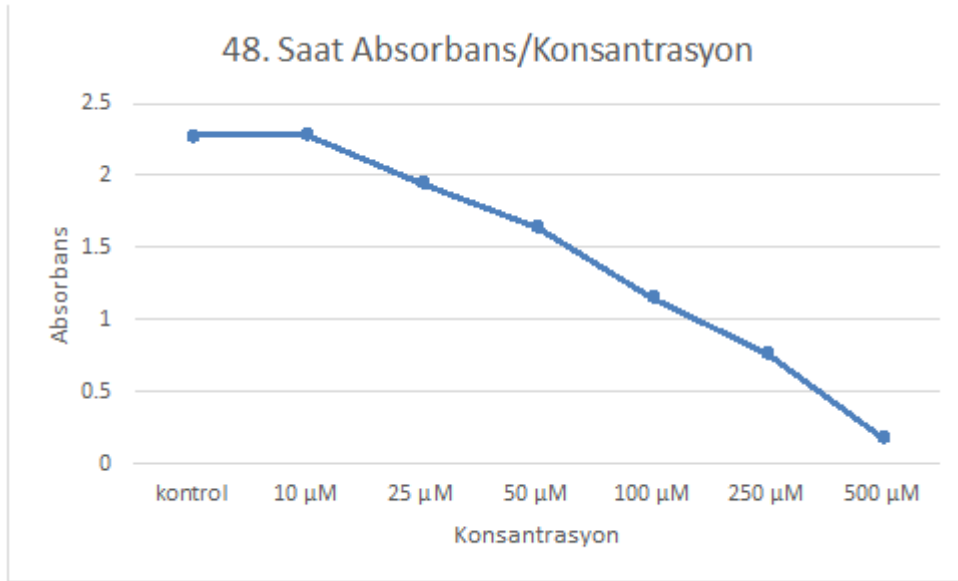
Tablo 6.2: 10, 25, 50, 100, 250, 500 µM Resveratrol Verilmiş ve Hiç Resveratrol verilmemiş (Kontrol) MCF-7 Hücre Soyunun 12, 24 ve 48. Saatlerindeki MTT Absorbans Değerleri.



Tablo 6.3: MCF-7 Hücre Soyunda Resveratrolün Kontrol Grubu, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM Konsantrasyonlarında 12. Saat Absorbans/Konsantrasyon Grafiği



Tablo 6.4: MCF-7 Hücre Soyunda Resveratrolün Kontrol Grubu, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM Konsantrasyonlarında 24. Saat Absorbans/Konsantrasyon Grafiği



Tablo 6.5: MCF-7 Hücre Soyunda Resveratrolün Kontrol Grubu, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM Konsantrasyonlarında 48. Saat Absorbans/Konsantrasyon Grafiği

MTT analizlerinde, kontrol grubuna göre % 50 absorbans azalmasına yol açan resveratrol dozu sitotoksik doz olarak belirlenmiştir. 12. saatte ölçülen analizlerde sitotoksik doz 250-500 µM arasında, 24. saatteki ölçümlerde 100-250 µM arasında, 48. saatteki ölçümlerde ise 100 µM olarak belirlenmiştir. Bu sayede MTT analizi ile hücre sayısı da değerlendirilmiştir.

6.2. ANNEKSİN V FLOW SİTOMETRİ SONUÇLARI

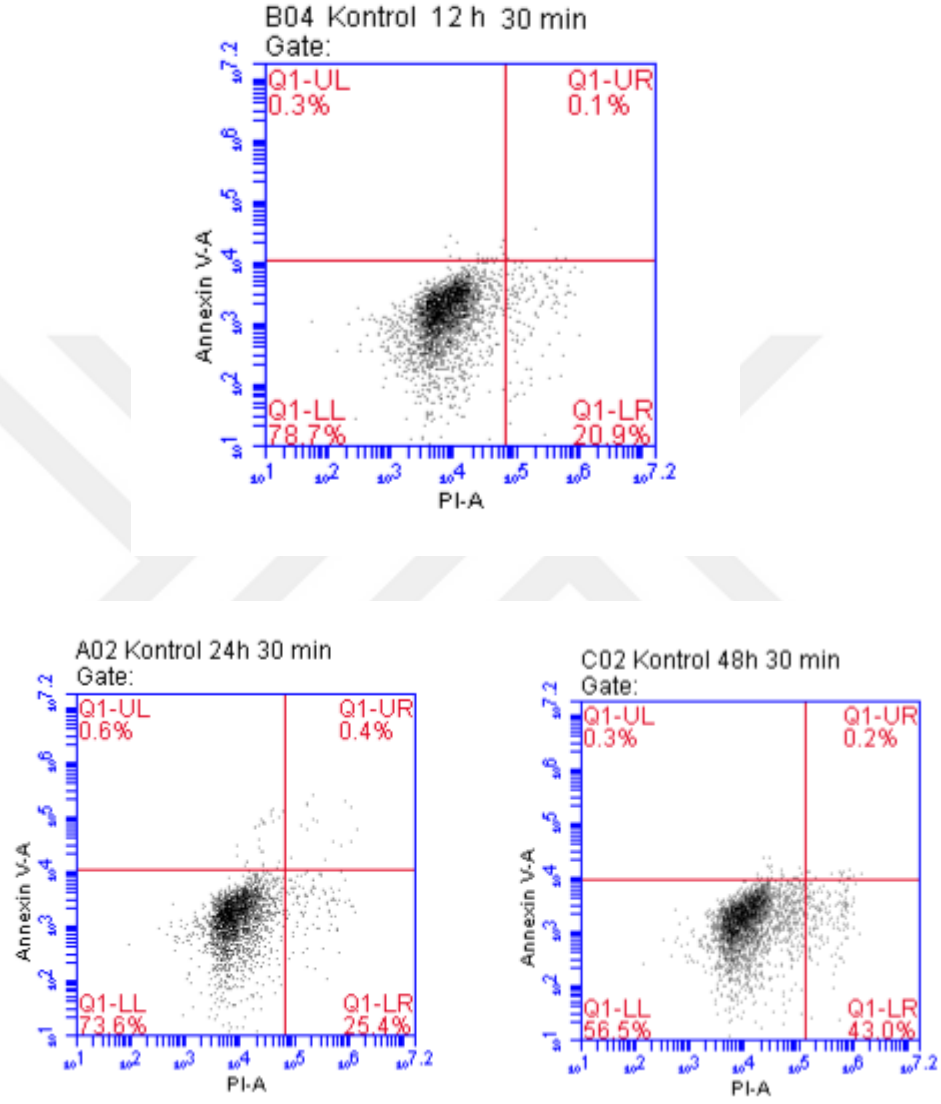
	Anneksin V (-) PI (-)	Anneksin V (+) PI (-)	Anneksin V (-) PI (+)	Anneksin V (+) PI (+)
100 µM 12. Saat	%75.5	%0.8	%23.3	%0.4
100 µM 24. Saat	%71.1	%1.5	%25.8	%1.6
100 µM 48. Saat	%50.9	%3.3	%42.5	%3.4
250 µM 12. Saat	%77.3	%1.8	%19.5	%1.4
250 µM 24. Saat	%77.0	%0.9	%21.7	%0.4
250 µM 48. Saat	%42.5	%3.9	%47.8	%6.0
Kontrol 12. Saat	%78.7	%0.3	%20.9	%0.1
Kontrol 24. Saat	%73.6	%0.6	%25.4	%0.4
Kontrol 48. Saat	%56.5	%0.3	%43.0	%0.2

Tablo 6.6: Kontrol Grubu 24 ve 48. Saat MCF-7 Hücre Soy ve 100 ve 250 µM Resveratrol Verilmiş. MCF-7 Hücre soyunda 12, 24 ve 48 Saatlerdeki canlı Hücre (Anneksin V (-) PI (-)), Erken

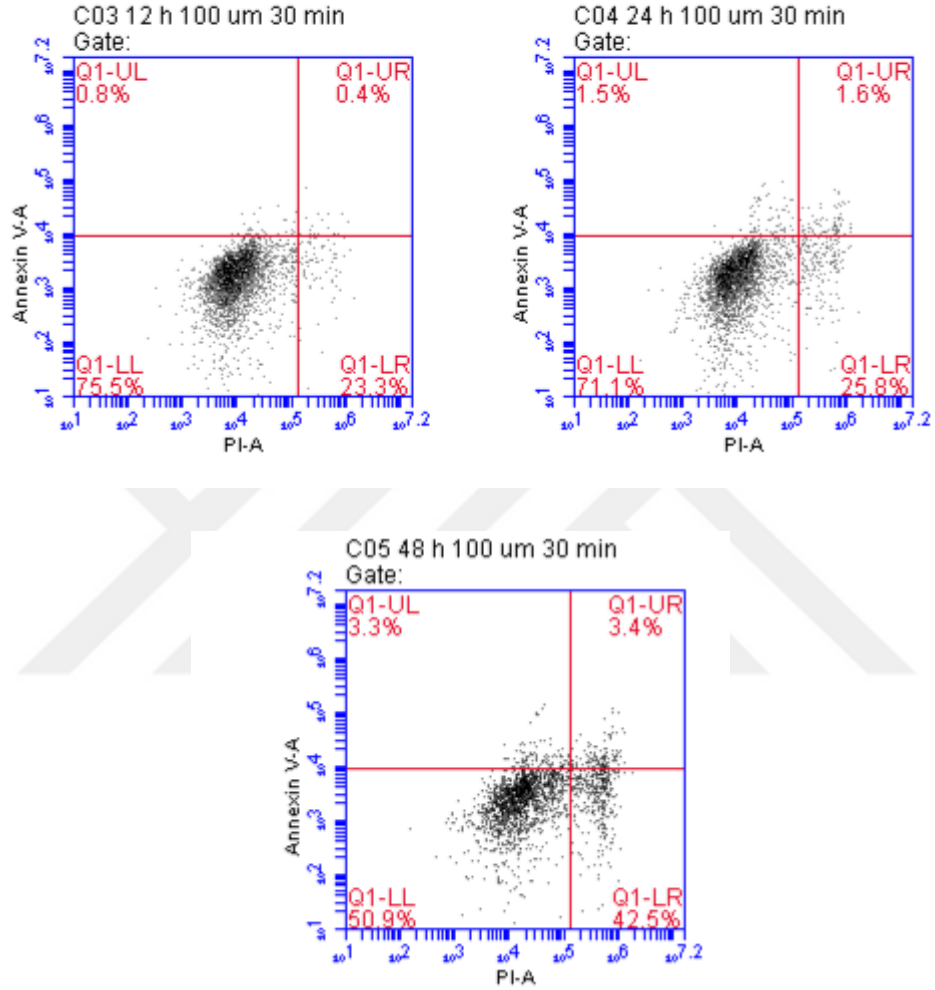
Apoptotik hücre {Anneksin V (+) PI (-)}, Nekrotik Hücre (Anneksin V (-) PI (+)) ve Geç Apoptotik ve Nekrotik Hücre (Anneksin V (+) PI (+)) Yüzde Değerleri.

Çalışmalarımızdan elde edilen Anneksin V Flow-Sitometri ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde;

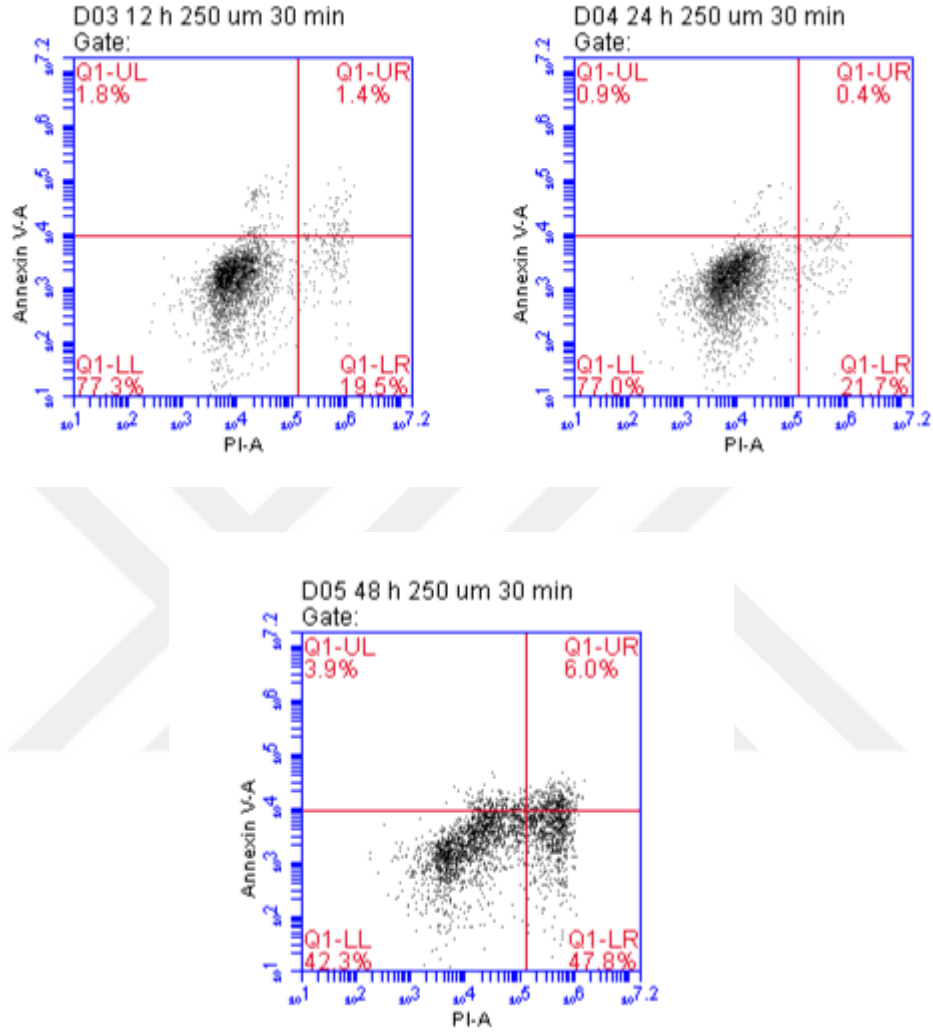
- 1- 12 saat sonunda 100 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde canlılık % 75,5 iken 250 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde canlılık % 7,3, kontrol grubunda ise % 78,7, 12 saat sonunda erken apoptotik hücre oranları 100 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde % 0,8, 250 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde % 1,8, kontrol grubunda ise % 0,3 olarak değerlendirilmiştir. Geç apoptotik hücre yüzdeleri, 100 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde % 23,3, 250 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde canlılık % 19,5, kontrol grubunda ise % 20,9. Nekrotik hücre yüzdeleri ise, 100 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde % 0,4, 250 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde canlılık % 1,4, kontrol grubunda ise % 0,1 olarak belirlenmiştir (Şekil 6. 11,Şekil 6. 12, Şekil 6. 13).
- 2- 24. Saatin sonunda 100 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde canlılık % 71,1 iken 250 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde canlılık % 77, kontrol grubunda ise % 73,6 olarak belirlenmiştir.Erken apoptotik hücre oranları 100 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde % 1,5, 250 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde % 0,9, kontrol grubunda ise % 0,6 olarak değerlendirilmiştir. Geç apoptotik hücre yüzdeleri, 100 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde % 25,8, 250 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde canlılık % 21,7, kontrol grubunda ise % 25,4. Nekrotik hücre yüzdeleri ise, 100 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde % 1,6, 250 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde canlılık % 0,4, kontrol grubunda ise % 0,4 olarak belirlenmiştir (Şekil 6. 11, Şekil 6. 12, Şekil 6.13).
- 3- 48. Saatin sonunda 100 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde canlılık % 71,1 iken 250 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde canlılık % 77, kontrol grubunda ise % 73,6 olarak belirlenmiştir. Erken apoptotik hücre oranları 100 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde % 3,3, 250 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde % 3,9, kontrol grubunda ise % 0,3 olarak belirlenmiştir. Geç apoptotik hücre yüzdeleri, 100 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde % 42,5, 250 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde canlılık % 47,8, kontrol grubunda ise % 43 olarak belirlenmiştir. Nekrotik hücre yüzdeleri ise, 100 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde % 3,4, 250 μ M resveratrol verdiğimiz hücrelerde canlılık % 6, kontrol grubunda ise % 0,2 olarak belirlenmiştir (Şekil 6. 11, Şekil 6. 12, Şekil 6.13).



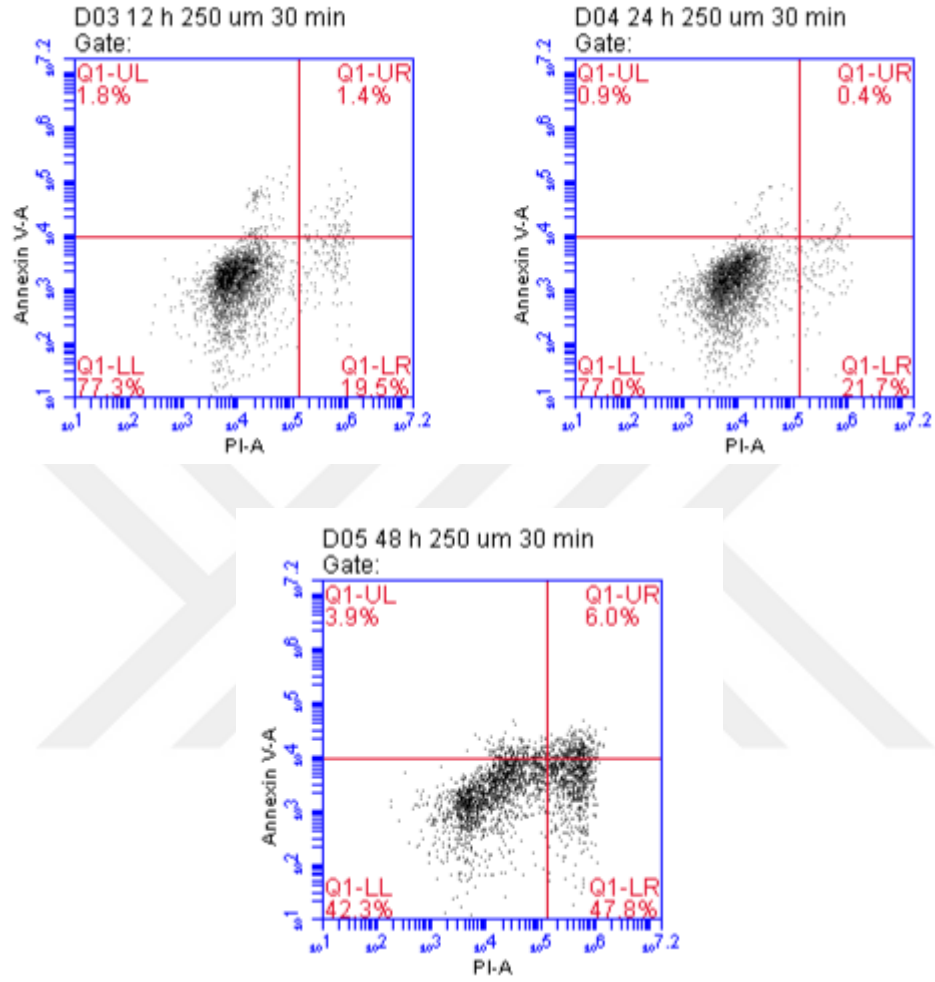
Şekil 6.11: 12, 24 ve 48. Saatlerdeki Resveratrol Verilmemiş Kontrol Gruplarının Flow Sitometrik Ölçüm Grafikleri



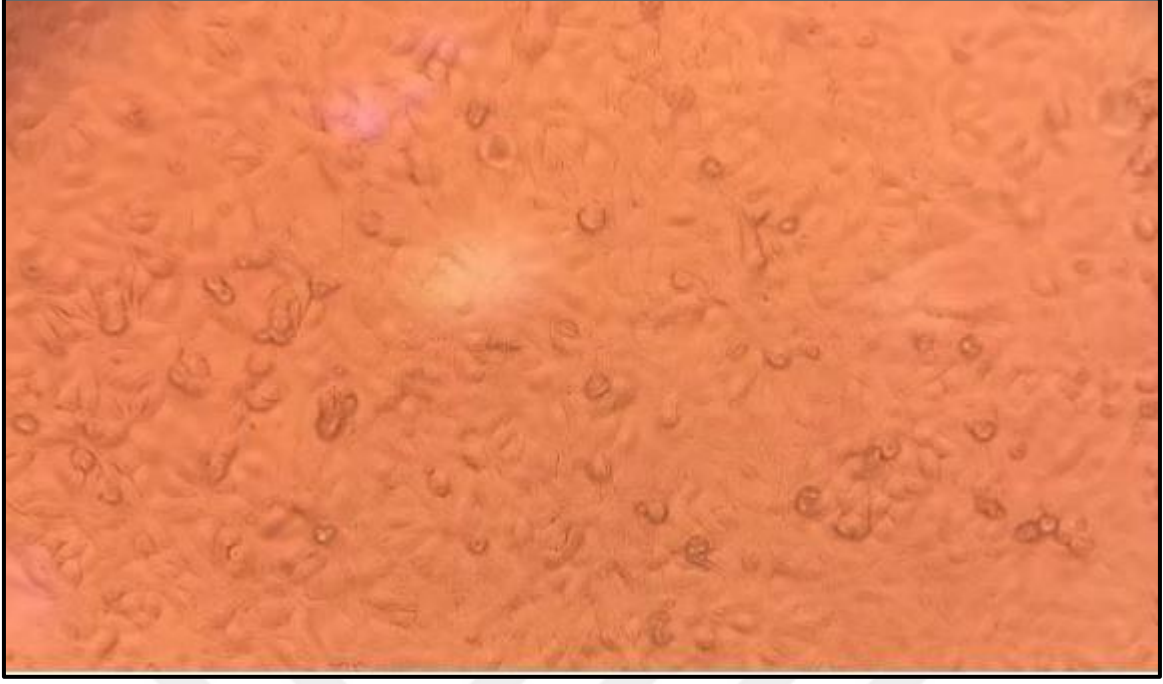
Şekil 6.12:100 μ M Resveratrol Verilmiş MCF-7 Hücre Soyunda 12, 24 ve 48. Saatlerdeki Flow Sitometrik Ölçüm Grafikleri.



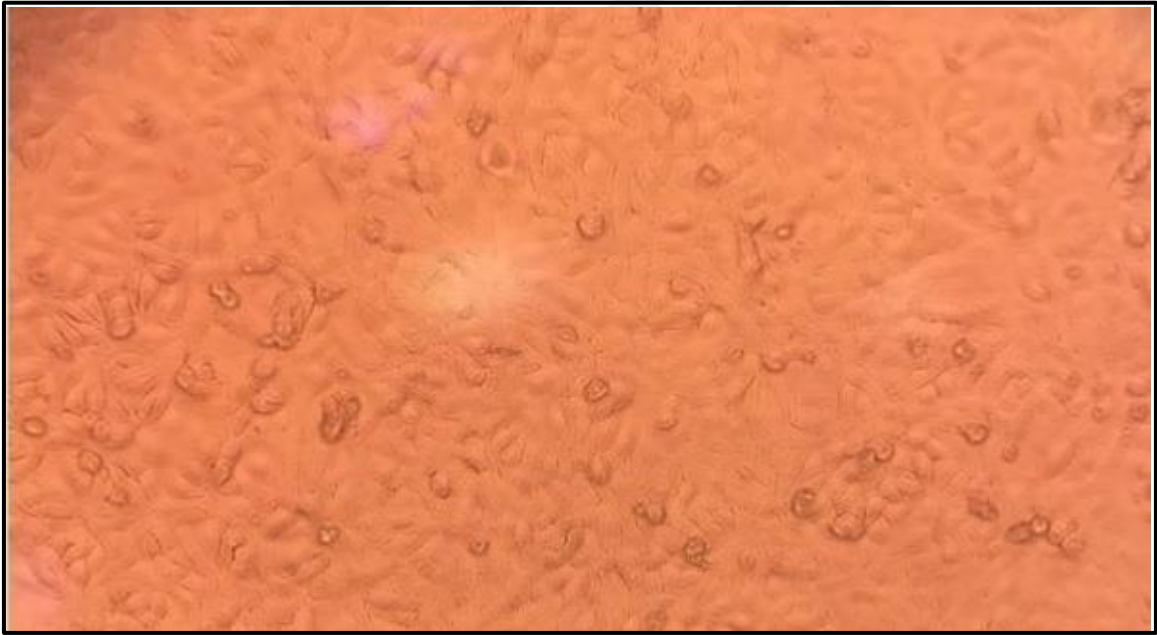
Şekil 6.13: 100 μ M Resveratrol Verilmiş MCF-7 Hücre Soyunda 12, 24 ve 48. Saatlerdeki Flow Sitometrik Ölçüm Grafikleri.



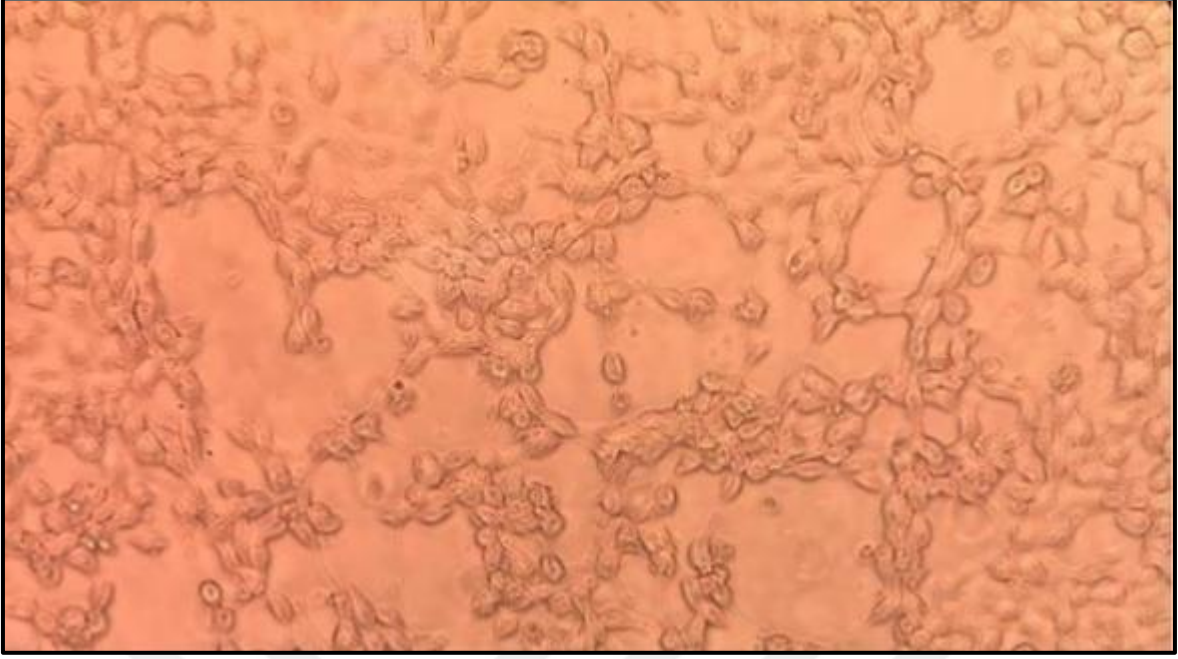
Şekil 6. 14: 250 μ M Resveratrol Verilmiş MCF-7 Hücre Soyunda 12, 24 ve 48. Saatlerdeki Flow Sitometri Ölçüm Grafikleri.



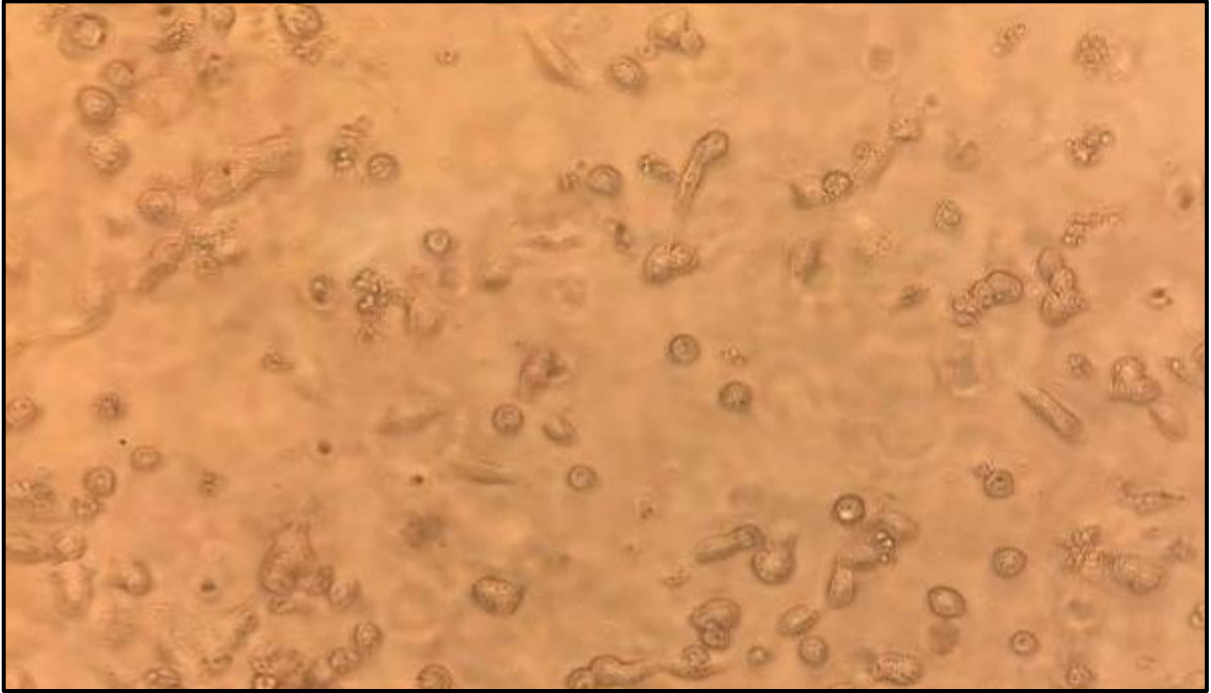
Şekil 6.15: MCF-7 Hücre Soyu Kontrol Grubu 10x40 Mikroskop Görüntüsüdür.



Şekil 6.16: 250 µM Resveratrol Verilmiş MCF-7 Hücre Soyunun 12. Saat 10x40 Mikroskop Görüntüsüdür.



Şekil 6.17: 250 μ M Resveratrol Verilmiş MCF-7 Hücre Soyunun 24. Saat 10x40 Mikroskop Görüntüsüdür.



Şekil 6.18: 250 μ M Resveratrol Verilmiş MCF-7 Hücre Soyunun 48. Saat 10x40 Mikroskop Görüntüsüdür.

7. TARTIŞMA

Hem dünyada hem de ülkemizde % 22'lik oran ile kardiyovasküler hastalıklardan sonra gelen ikinci ölüm nedeni kanserdir. 2000'li yılların başında dünyada yılda 6 milyon insan kansere yakalanırken bu sayının önümüzdeki yirmi yıl içerisinde daha da artacağı tahmin edilmektedir. 12 milyon kişi 2005 yılında kansere yakalanmış, kanser nedeni ile 7 milyon insan yaşamını yitirmiştir. 2030 yılında 24 milyon insanın kansere yakalanacağı, 17 milyon insanın ise aynı yıl kanser nedeniyle yaşamını yitireceği Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın verilerine göre tahmin edilmektedir (<http://onkofar.com/vimages/pdfiler>, Erişim tarihi: 15 Temmuz 2016).

Kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanserinin, dünya genelinde 2008 yılı itibariyle diğer kanser türlerine oranla görülme oranının % 23'ünü, (Duijts ve ark., 2011; Jermal ve ark., 2011,) kanser nedeniyle gerçekleşen ölüm oranlarının ise %14'ünü oluşturduğu tespit edilmiştir (Jermal ve ark., 2011). Son 20 yıl içerisinde bu hastalıktan kaynaklanan ölüm oranları artış göstermesine rağmen, meme kanserinin tedavisinde ve teşhisinde oldukça önemli gelişmeler kaydedilmiştir (Al-Hajj ve ark., 2003; Andre ve ark., 2010).

Hastalığa objektif bir sonuç elde edilmesi ve çözüm olabilmesi için endokrin tedavinin ya da kemoterapinin tek tek veya beraber uygulanması sonucunda bile süreç ölümle sonuçlanabilmektedir (Muss ve ark., 1991).

Son on yıl boyunca bu hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere pek çok ilaç geliştirilmiştir. Vinorelbin, paklitaksel, dosetaksel, letrozol, anastrozol bu ilaçlar arasında sayılabilirler (Andre ve ark., 2004). Bu ilaçlar ve yeni uygulanan anti-tümör ilaçlar ile kanser kemoterapisi hızla gelişmekte ve böylelikle pek çok kanser türü üzerinde daha pozitif sonuçlar elde edilmektedir. Bazı durumlarda bu ilaçlar normal doku ve hücreler üzerinde yan etkiler oluşturabilmektedir. Fakat çoğunlukla çeşitli kanser türleri üzerinde uygulanan kemoterapi başarılı sonuçlar vermektedir. İlaça karşı vücudun geliştirdiği direnç sonucunda da tedavi etkili olamamaktadır. İlaç direncinin sebepleri ve mekanizmaları uzun zamandır araştırılmakta ve klinik olarak çok ciddi bir konu olarak önem arz etmektedir. Hücrenin antiapoptoz veya apoptoz yolunu seçmesi tamamen ilaca karşı göstermiş olduğu hassasiyetle ya da dirençle ilgilidir (Tsuro ve ark., 2003).

Kanser hücrelerinde aktif hücre ölüm mekanizması olan apoptoz bazen çeşitli anti-tümör ajanları vasıtasıyla başlatılabilmektedir (Kaufmann ve Earnhaw, 2000). Ancak apoptozun durdurulması ya da engellenmesi bazı durumlarda söz konusu olmakta ve meydana gelen ilaç direncinin nedeninin ne olduğunu ortaya koymaktadır (Tsuruo ve ark., 2003). Normal hücrelere göre oldukça hızlı büyüyen ve çoğalan neoplastik hücreleri proliferatif dönemde iken tahrip edip ortadan kaldırmak kemoterapötik ajanların amacıdır. Ancak bu etkileri yaparken bazı normal hücreler bile kemoterapiden etkilenmekte ve bu durum da yan etkilere neden olmaktadır. Yan etkilerden en çok kan hücreleri, gastrointestinal sistemdeki hücreler, kıl folikülleri, spermiler, kalp, mesane, böbrekler, akciğerler ve sinir sistemi organları gibi hayati organlar etkilenmektedir (Türk, 2013).

Aerobik organizmalar yaşam boyu oksijene ihtiyaç duymakta, metabolizmanın normal işleyişi için oksijen kullanılmakta fakat bundan dolayı hücre ve dokular için oldukça zararlı olan serbest radikaller (ROS) (<http://tapdk.gov.tr>, Erişim tarihi: 17 ekim 2016) ve oksidatif stres meydana gelmektedir (Karbownik ve ark., 2001). Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$), en çok bulunan serbest radikaldir. Mitokondri ve endoplazmik retikulumdaki elektron transportu sırasında ortaya çıkan süperoksit radikalidir. Canlı hücrelerdeki lipid, şeker, amino asit, nükleotid ve DNA gibi hemen hemen bütün moleküllerle reaksiyona girerek oluşan radikaller hücreye zarar vermektedir. Sonuçta kanser, nörodejenerasyon ve otoimmün hastalıklar gibi pek çok hastalığın gelişimine sebep olmaktadır (Rodriguez ve ark., 2004; Karbownik ve ark. 2001).

Organizmalar bazı savunma sistemleri geliştirerek serbest radikallerin ve onlara ait reaktantların neden olduğu hasarlardan hücreyi korumak için hücre içi ortamı serbest radikallerin zararlı etkilerinden korumak isterler ve bunu gerçekleştirmek için de hemen antioksidan sistemleri devreye sokarlar (Mats, 2000).

İlaçların yarattığı güçlü yan etkiler ve kanserli hastaların tedavi sürecinde yaşadığı olumsuzluklar düşünüldüğünde, antioksidan ve antikanserojen etkisi olan yeni ilaçların geliştirilmesi ve kullanılması önem arz etmektedir.

Ayrıca kemoterapi ilaçları hem antioksidanlarda (GSH, GSH-Px, katalaz, vitamin A, E, C, çinko ve sitokrom C) azalmalara hem de ROS düzeylerinde artışa neden olmaktadır (Gündüz ve ark., 2009). Bu nedenle parenteral veya oral yolla alınan farklı yapı ve özellikteki antioksidan maddeler yardımıyla ROS düzeyleri azaltılmaya çalışılmakta ve antioksidan

aktiviteleri artırılarak kemoterapötiklerin neden olduğu yan etkiler azaltılmaya veya tamamen önlenmeye çalışılmaktadır (Türk, 2013).

Jang ve arkadaşları tarafından yayınlanan ilk makaleden sonra resveratrolun anti-kanser potansiyeli kanser araştırmacıları tarafından büyük ilgi görmüştür (Jang ve Pezzuto, 1997).

Tümör hücrelerinin hücre döngüsü süreci, proliferasyonu, apoptozu, metastazı, anjiyogenezi ve invazyonunu düzenleyen çeşitli hücre sinyal moleküllerinin modülasyonu aracılığı ile resveratrolün anti-kanser etkisi görülmektedir. Resveratrolün kemoterapiye direnç mekanizmalarının üstesinden gelerek kemoterapötik ajanlara karşı dirençli hücreleri duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Gupta ve ark.,2011).

Çalışmamızda, yan etkisi olmayan, ilaç direnci geliştirmeyen, antioksidan ve anti-kanserojenik etkileri bilinen resveratrolun MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisinin in-vitro ortamda gösterilmesi amaçlandı.

APC ile işaretli Annexin-V antikorunun apoptoz sürecinde hücre yüzeyine çıkan fosfatidilserine bağlanabilme özelliğinden yola çıkılarak, MCF-7 meme kanseri hücrelerine farklı dozlarda resveratrol verilerek, resveratrolün apoptoz üzerine etkilerinin zamana bağlı olarak oluşturduğu değişiklikler ve dozlar arasındaki farklılıkları araştırıldı.

Hücelere verilecek resveratrol dozları MTT analizi ile belirlendi. 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) yöntemi, ilk olarak Mosmann tarafından uygulanmıştır (Mosman, 1983; Alley ve ark., 1988). Daha sonra Alley ve ark. tarafından geliştirilen bu yöntem, hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir (Mosman, 1983; Alley ve ark., 1988). Hücelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir madde olan MTT, (Alley ve ark., 1988; Carmichael ve ark., 1987) hücre canlılığının ölçütü olarak alındı. MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon göstermektedir (Abe ve Matsuki, 2004). MTT analizlerinde sitotoksik doz, kontrol grubuna göre % 50 absorbans azalmasına yol açan resveratrol dozu olarak tespit edildi. 12. saatte ölçülen analizlerde sitotoksik doz 250-500 μ M arasında, 24. saatteki ölçümlerde 100-250 μ M arasında, 48. Saatteki ölçümlerde ise 100 μ M olarak belirlendi. Bu sayede MTT analizi ile hücre sayısı da değerlendirildi. Çalışmada, hücre yoğunluğunun kontrol grubuna

göre azaldığı, 12, 24 ve 48 saat süreyle resveratrol ile inkübe ettiğimiz MCF-7 hücrelerine uyguladığımız MTT analizi sonuçlarından tespit edildi.

MTT sonuçlarına göre MCF-7 meme kanseri hücrelerini hem 100, hem de 250 μ M resveratrol ile 12, 24 ve 48 saat süre ile inkübe edildi. Sonuçları kontrol grubuna göre karşılaştırıldı.

Çalışmada elde edilen Anneksin V Flow-Sitometri ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde; MCF-7 hücrelerine verilen 100 ve 250 μ M resveratrolün kontrol grubuna göre erken apoptozu arttırdığı gözlemlendi. Özellikle 48 saat sonunda erken apoptoz görülen hücrelerin yüzde oranının kontrol grubuna kıyasla fazla oranda arttığı görüldü.

Canlı hücre yüzdeleri değerlendirildiğinde; MCF-7 hücrelerine verilen 100 ve 250 μ M resveratrolün kontrol grubuna göre 12. ve 24. saatlerdeki canlı hücre sayısı ile 48. Saatteki canlı hücre sayısı arasında oldukça fazla fark olduğu saptandı.

Geç apoptotik hücre yüzdeleri değerlendirildiğinde; 12, 24 ve 48. saatler sonunda hem kontrol grubunda hem de 100 ve 250 μ M resveratrol verilen hücre gruplarında zamana bağlı olarak geç apoptozun arttığı gözlemlendi.

Nekrotik hücre gruplarında ise, 100 μ M resveratrol verilen MCF-7 hücrelerinde zamana bağlı olarak bir yüzde artışı gözlemlenirken, kontrol ve 250 μ M resveratrol verilen MCF-7 hücrelerinde ise zamana bağlı olarak düzenli bir yüzde artışı gözlemlenmemiştir.

Özellikle hem 100 hem de 250 μ M resveratrol verilen MCF-7 hücrelerinde erken ve geç apoptozun zamana bağlı olarak artması, resveratrolün MCF-7 hücrelerinde apoptozu tetiklediğini açıklayabilir. Yine resveratrol apoptozu 48. saatin sonunda, 12 ve 24. saatlere göre daha çok tetiklediği görüldü. Bu da zaman içinde resveratrolün MCF-7 hücrelerinde apoptozu daha da hızlandırdığını gösterdi.

Kontrol grubu, 100 ve 250 μ M resveratrol uygulanan gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında 100 ve 250 μ M resveratrol uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre apoptozun daha da tetiklendiği, ayrıca 250 μ M resveratrol uygulanan hücrelerde 100 μ M resveratrol uygulanan hücrelere göre apoptozun daha da arttığı görüldü. Resveratrolün hücrelere verilen doz miktarı arttıkça MCF-7 hücrelerinde erken apoptoz daha da tetiklenmekteydi.

Resveratrolün kanser kemopreventif aktivitesiyle bilinen bir doğal polifenolik bileşik olduğunu belirterek meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği Shi ve arkadaşları

tarafından yapılan çalışmada belirtilmiştir. Aynı çalışmada Yujie, Shi ve arkadaşları resveratrolün başka bir apoptoz düzenleyici protein olan p53'ün, apoptozu uyarıcı protein ailesinden (ASPP) olan ASPP1'in ekspresyonunu indüklediğini bildirmişlerdir (Yujie ve ark., 2011).

Venkatadri ve ark., hem MCF-7 hem de başka bir meme kanseri türü olan MDA-MB-213 hücreleri ile yaptıkları çalışmalarda resveratrolün hem kaspaz-8 hem de kaspaz-9 aktivasyonunu indüklediğini doğrulamışlardır. Her iki meme kanseri hücresinde de mitokondrial kaspaz-9 yolu temel apoptotik yololarak belirtilmiştir (Venkatadri ve ark., 2016).

Yukarıdaki gibi birçok çalışma resveratrolün normal insan fizyolojisine uygun çeşitli hedef moleküllere ve hücresel sinyal yollarına tutunduğunu ve direkt olarak patolojik hastalıklarda kullanılabileceğini meydana çıkarmıştır. Resveratrol güçlü kemopreventif ve antitümör etkileri ile son yıllarda oldukça dikkati çekmiştir. Sadece meme kanseri hücrelerinde değil K-562 lösemi hücre soyunda da mitokondri yolağı aracılığı ile apoptozu indüklemiştir (Binghua ve ark., 2003).

Resveratrol antikanser özelliklerini, kemoprevensiyon, hücre çoğalmasının inhibisyonu, apoptoz, terapötik etkiler ve duyarlılaştırma etkileri ile gerçekleştirmektedir (Cal ve ark., 2003). Çalışmamızda resveratrolün tüm bu antikanser etkilerinden apoptotik etkisi üzerinde durulmuş olup, hem doz hem de zamana bağlı olarak MCF-7 hücre soyunda özellikle erken apoptozu indüklediği gözlemlenmiştir.

Dünyada pek çok laboratuarda kanser hastalığının tedavisi için hastanede araştırmalar yapılmakta, alternatif tedavi yolları üretilmeye ve ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Gösterilen çabaların ne kadar yerinde olduğu şu an tedavide kullanılan kemoterapötiklerin hedef organ ve doku dışında hayati pek çok organı kötü yönde etkilediği de düşünülünce anlaşılmaktadır. Hücrede serbest radikallerin artmasına kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar neden olmaktadır. Dolayısıyla hücre ölümünü tetiklemekte ve sonuçta hedef hücrelerde daha fazla DNA hasarının ve mutasyonun oluşmasına neden olmaktadır. Bütün bu etkiler dikkate alındığında, antikanserojen özellik taşıyan bitkisel polifenolik resveratrol gibi farmakolojik ajanlar ile kombine kullanımının önemi ortaya çıkmaktadır.

8. SONUÇ

Bu çalışmada MCF-7 göğüs kanseri hücre soyuna 12, 24 ve 48 saat süre ile 100 ve 250 μ M dozlarında resveratrol verilmiştir. Resveratrolün hücreler üzerindeki apoptotik etkisi Anneksin V antikoru kullanarak Flow-Sitometrik olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak resveratrolün hem 100 hem de 250 μ M'lık dozlarının hem doz artımıyla hem de zamana bağlı olarak da apoptozisi indüklediği görülmektedir.

Son yıllarda yapılmış in vitro çalışmalara benzer sonuçlar aldığımız bu çalışmamız, resveratrolün hem zaman, hem de doz artımıyla apoptotik etkilerinin ortaya konulmasında literatüre destek sağlamaktadır. Belirlenen bu özellikleriyle meme kanseri hastalarında diğer tedavilere ek olarak destek tedavi niteliğinde kullanılabileceği görüşünü desteklenmektedir.

Ancak yapılmış çalışmalarda apoptozunkaspaz aktivasyonundan ziyade artmış reaktif oksijen türleri ve nitrik oksit üretimiyle de indüklendiği belirtilmiştir. Resveratrolün MCF-7 hücrelerindeki apoptotik etkisinin apoptozisi indükleyen başka mekanizmalar ile açıklanarak desteklenmesine ihtiyaç vardır.

9. KAYNAKLAR

Abe K, Matsuki N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. Neuroscience Research, 2000, 38: 325-329.

Aggarwal BB, Shishir S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. J Biochem Pharmacol. 2006, 71:1397-1421

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.

Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2008, 1: 15-24.

Akins P T, Liu P K, Hsu C Y. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia: Friend or Foe? Stroke 27: 1682- 1687, 1996.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100: 3983-3988. 75

Alıcı S, İzmirli M, Doğan E. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'na başvuran kanser hastalarının epidemiyolojik değerlendirilmesi. Türk Onkoloji Dergisi, 2006, 21: 87-97.

Alkan R. Natural plant antibiotics: resveratrol. Gıda. 2007, 32(5):259-262.

Alley MC, Scudiere DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drugs creening with panels of human tumor celllines using a micro culture tetrazolium assay. Cancer Research, 1988, 48: 589-601.

Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. Türk Biyokimya Dergisi, 2006, 31: 51-56.

Altunkaynak BZ, Ünal D, Aksak S, Ünal B. Östrojen hormonu ve menopoz. Deneyisel ve Klinik Tıp Dergisi, 2012, 29: 252-256.

Ameisen J S. The origin of programmed cell death. Science 272: 1278, 1996.

Andre F, Broghio K, Pusztai L, Berrada N, Mackey JR, Nabholz JM, Chan S, Hortobagyi GN. Estrogen receptor expression and docetaxel efficacy in patients with metastatic breast cancer: Apooled analysis of four randomized trials. The Oncologist, 2010, 15: 476-483.

Andre F, Slimane K, Bachelot T, Dunant A, Namer M, Barrelier A, Kabbaj O, Spano JP, Marsiglia H, Rouzier R, Delaloge S, Spielmann M. Breast cancer with synchronous metastases: trends in survival during a 14-year period. Journal Of Clinical Oncology, 2004, 22: 3302-3308.

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.

Arslan S, Bölükbaş N. Kanserli hastalarda yaşam kalitesinin değerlendirilmesi. Atatürk Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi, 2003, 6: 38-47.

Asensi, M., Medina, I., Ortega, A., (2002) Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability Free Radic. Biol. Med., 33; 387-398.

Aslan G. Tümör immünolojisi. Turkish Journal of Immunology, 2010, 15: 7-13.

Atıcı E. Tıp tarihinde kanser ve lösemi. Türk Onkoloji Dergisi, 2007, 22: 197-204.

Atmaca E, Aksoy A. Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi. YYU Veteriner Fakültesi Dergisi, 2009, 20: 79-83.

Aydemir B, Sarı EK. Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. Kocatepe Veteriner Dergisi, 2009, 2: 56-60.

Bao F and Liu D. Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptosis cell death and activates caspase-3. Neuroscience 116: 59-70, 2003.

Başkol M, Başkol G, Koçer D, Artış T, Z Yılmaz. Mide kanserli hastalarda oksidan ve antioksidan parametreler ve birbiriyle ilişkileri. Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 2007, 5: 83-89.

Bellamy C O, Malcomson R D, Harrison D J, Wyllie A H. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology* 6: 3-16, 1995.

Binghua wang, jiao Liu,Zhanfeng Gong, *Int J Clin Exp Med* 2015;8(9):16926-16933

Blanch A, Liu H, Goodyer C. Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis and Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 274(33):23426-23436, 1999.

Bortner C D, Odehburg N B E, Crdowski J A. The role of fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology* 5: 21-28, 1995

Cal, C¹, Garban,H², Jazirehi,A.³, Yed, C.³,Mizutani,Y.⁴, and, Bonavida, B.³ *Curr.Med .chem.-Anti-Cancer Agents*, 2003, 3, 77-93

Can, G., Cakir, Z., Kartal, M., Gunduz, U., Baran, Y. 2012. Apoptotic effects of resveratrol, a grape polyphenol, on imatinib-sensitive and resistant K562 chronic myeloid leukemia cells. *Anticancer Research*, 32: 2673-2678.

Caotes P J, Hales S A, Hall P A. The association between cell proliferation and apoptosis; studies using cell cycle-associated proteins Ki67 and DNA polymerase alpha. *J Pathol* 178: 71-7, 1996.

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semi automated colorimetric assay: assessment of chemo sensitivity testing. *Cancer Research*, 1987, 47: 936-942.

Casper R.F., Quesne M., Rogers I.M., et al. (1999) Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity Mol Pharmacol. 56; 784-90.

Chakraborty, P. K., Mustafi, S. B., Ganguly, S., Chatterjee, M., Raha, S. 2008. Resveratrol induces apoptosis in K562 (chronic myelogenous leukemia) cells by targeting a key survival protein, heat shock protein 70. Cancer Science, 99: 1109-1116.

Chan SW, Nguyen PN, Ayele D, Chevalier S, Aprikian A, Chen JZ. Mitochondrial DNA damage is sensitive to exogenous H₂O₂ but independent of cellular ROS production in prostate cancer cells. Mutation Research, 2011, 716: 40-50.

Choi W S, Lee E H, Chung C W. Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2. J Neurochem 77:1531-1541, 2001

Cichewicz HR, Kouzi AS. Resveratrol oligomers: Structure, chemistry and biological activity. Natural Products Chemistry. 2002, 26(7):507-579.

Cohen J J. Apoptosis. Immunol Today 14: 126-130, 1993.

Cohen J J. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. Hosp Pract 15: 35-43, 1993.

Coşkun H. (2004), Osteoartritte caffeic acid phenethyl ester ve resveratrolün eklem kıkırdağına etkileri (tavşanlarda deneysel çalışma) T.C. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi

Cummings M C, Winterford C M, Walker N I. Apoptosis. Am J Surg Pathol 21: 88-101, 1997.

Derici E. Rho kinaz ve siklooksijenaz inhibitörleri ile siklofosamid kombinasyonlarının çeşitli tümör hücre serilerine etkileri. Mersin, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2007.

Duijts SFA, Faber MM, Oldenburg HSA, Beurden M, Aaronson NK. Effectiveness of behavioral technique sand physical exercise on psycho social functioning and health-related quality of life in breast cancer patients and survivors-a meta-analysis. Psycho-Oncology, 2011, 20: 115-126.

Eastman A. Survival factors, intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis. Cancer Biology 6: 45-52, 1995.

Eng E.T., Williams D., Mandava U. Et al. (2001) Supression of aromatase (estrojen synthetase) by red wine phytochemicals Breast Cancer Res. Treat., 67; 133-146.

Erman Y. Erkek ve kadınların diyet-kanser ilişkisi hakkında bilgi ve inanışları. Ev Ekonomisi Yüksekokulu, Beslenme Bilimleri Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2007.

Evan G L, Wyllie A H, Gilbert G S, Littlewood T D, Lond H, Breaks M. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. Cell 69: 119-128, 1992

Fed Monografları, Tedavide Kullanılan Bitkiler, Demirezer LÖ. (Edt), MN Medikal & Nobel Yayıncılık, Ankara 2011

Ford WCL. Biological mechanisms of male infertility. The Lancet. 357:21.1223-1224, 2001.

Franz TA, Kidson SH. Mapping of interdigital apoptosis in the chick and duck hindlimb. Embryology. 93(2):85-94. 1997.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119: 493-501, 1992.

Gölbaşı Z, Çetin R, Kalkan S, Durmuş T. Üniversite öğrencisi kızların meme kanseri ve kendi kendine meme muayenesi ile ilgili bilgi ve davranışları. The Journal of Breast Health, 2010, 6: 69-73. 66

Gupta, S. C., Kannappan, R., Reuter, S., Kim, J. H., Aggarwal, B. B. 2011. Chemosensitization of tumors by resveratrol. Annals of the New York Academy of Sciences, 1215: 150-160.

Gusman J., Malonne H. and Atassi G., (2001) A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol Carcinogenesis. 22; 1111-17.

Gündüz E, Gündüz M, Beder L, Yamanaka N, Shıımızu K, Nagatsuka H. p53 tümör baskılayıcı genin 72. kodon polimorfizminin baş-boyun kanserlerindeki prognostik rolü. Yeni Tıp Dergisi, 2009, 26: 96-101. 65

Gürel DK. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Erişkin Onkoloji, Hematoloji Kliniklerinde Kemoterapi Uygulanan Hastaların Yaşam Kalitesi Ve Bunu Etkileyen Faktörlerin İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hemşirelik Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2007.

Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. Federation of European Biochemical Societies, 1991, 281: 9-19.

Hekimoğlu A. Likopenin antikarsinojenik etki mekanizmaları. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi, 2010, 25: 57-62.

Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JPL. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. OsteoArthritis and Cartilage, 2003, 11: 747-755.

Hu Y M, Benedict M A, Ding L Y. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-I-mediated caspase-9 activation and apoptosis. EMBO J. 18: 3586- 3595, 1999.

Huang C., Ma W.Y., Goranson A., Dong Z. (1999) Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a P53-dependent pathway Carcinogenesis. 20; 237-42

Hughes Fm, Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. Endocrinology. 129(5): 2415- 2422, 1991

Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. Circulation Research, 2001, 88: 529-535.

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.

Jang M, Cai L, Udeani GO et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science. 1997, 275:218-220.

Jang, M, and Pezzuto, J. M 1997. assessment of cytoooxygenase inhibitors using in vitro assay systems. Meth. Cell Sci. 19, 25-31.

Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., Pezzuto, J. M. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science, 275: 218-220.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2011, 61: 69-90.

Kannan K, Jain Sk. Oxidative stress and apoptosis. Pathophysiology. 7(27):153-163, 2000.

Karakuş E. Östrojen-bağımlı meme kanseri ve sodyum-bağımlı organik anyon taşıyıcı. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 2010, 5: 155-166.

Karaman A. Mide kanserinde p53 tümör supresör geninin rolü. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 2003, 23: 67-73.

Karbownik M, Lewinski A, Reiter RJ. Anti carcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. The International Journal of Biochemistry& Cell Biology, 2001, 33: 735-753.

Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*, 2000, 256: 42-49.

Keane R W, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea J R, Krajewski S, Reed J C, Dietrich W D. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 422-429, 2001.

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.

Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-245, 1972.

Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death apoptosis. *Eur J Endocrin* 18: 482-491, 1998.

Kim YA, Rhee SH, Park KY, Choi YH. Antiproliferative effect of resveratrol in human prostate carcinoma cells. *J Med Food*. 2003, 6:273-280.

King RE, Bomser JA, Min DB. Bioactivity of resveratrol. *Compreh Rev Food Sci Food Safety*. 2006, 5:65-70.

Koca Ğ, Evren M. Resveratrol ve Sağlık Üzerine Etkisi. Türkiye 10. Gıda Kongresi. 2008, 1099-1102.

Kockx MM, Muhring J, Knaapen MWM, de Meyer GRY: RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol*, 152: 885, 1998.

Korsmeyer S J. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes; regulators of cell death. *Blood* 80: 879-886, 1992.

Kosova F, Arı Z. Adipositokinler ve meme kanseri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2008, 22: 377-384.

Kömürcü HE. Memenin Malign Epitelyal Tümörlerinde İmmünohistokimyasal Olarak Saptanan pS2 Proteininin Östrojen Ve Progesteron Reseptörleriyle Karşılaştırması. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı Başkanlığı. Uzmanlık Tezi, Ankara: Genelkurmay Başkanlığı, 1995.

Langcake P, Pryce RJ. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*. 1997, 33:151-152.

Li M, Ona V O, Chen M, Kaul M, Tenneti L, Zhang X, Stieg P E, Lipton S A, Friedlander R M. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience* 99: 333-342, 2000.

Liao, P. C., Ng, L. T., Lin, L. T., Richardson, C. D., Wang, G. H., Lin, C. C. 2010. Resveratrol arrests cell cycle and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells. *Journal of Medical Food*, 13: 1415-1423.

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.

Lu J, Ashwell K, Ken W S, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. Spine 25: 1859-1866, 2000.

Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. Am J Pathol 146: 3-15, 1995

Marti A, Ritter PM, Jager R. Mouse mammary gland involution is associated with cytochrome-c release and caspase activation. Mech Dev. 104(1-2):89-98.2001.

Martin AM, Weber BL. Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. Journal of the National Cancer Institute, 2000, 92: 1126-1135.

Martin SP, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE. Increased cell division as a cause of human cancer. Cancer Research, 1990, 50: 7415-7421.

Matès JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology, 2000, 153: 83-104.

Millerk D M, Blume S, Borst M. Oncogenes: Malignant transformation and modern medicine. Am J Med Sci 300: 59-65, 1990.

Miyashita T, Krajewski S, Krajewsko M. Tumor supressor p53 is a regülator of bcl-2 bax gene expression in vivo. Oncogene 9: 1799- 1805, 1994.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular grow than survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, 1983, 65: 55-63.

Muss HB, Case LD, Richards F, White DR, Cooper MR, Cruz JM, Powell BL, Spurr CL, Capizzi RL. Interrupted versus continuous chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. The New England Journal Of Medicine, 1991, 325: 1342-1348.

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.

Nakano R. Apoptosis: Gene directed cell death. Horm Res 48: 2-4, 1997.

Newton K, Strasser A: The Bcl-2 family and cell death regulation. Curr Opin Genet Dev 8: 68-75, 1998

Nowell P C. Cytogenetics of tumor progression. Cancer 65: 2172-2175, 1990.

Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Haanen C: Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. Apoptosis, 3:115,1998

Ozan ST, Yaralıoğlu S, İleri T, Halifeoğlu İ. Akkaraman ve ivesi koyunlarında, gebelikte ve doğumdan sonra eritrosit, tükürük ve serum arginaz aktiviteleri ile serum üre ve östrojen düzeyleri. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 1999, 23: 345-350.

Öncel M. Isı şok proteinleri ve kanser. European Journal of Basic Medical Sciences, 2012, 2: 16-23.

Özel Y. Ratlarda Karaciğer İskemi/Reperfüzyon Hasarında Grape Seed Proanthocyanidinin Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi. Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, 5. Genel Cerrahi Kliniği. Uzmanlık Tezi, İstanbul: Sağlık Bakanlığı, 2006.

Rao R V, Hermel E, Castro-Obregon S, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. J Biol Chem 276: 869-874, 2001.

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.

Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. Journal of Pineal Research, 2004, 36: 1-9.

Russo J, Lareef MH, Balogh G, Guo S, Russo IH. Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 2003, 87: 1-25.

Saip P, Keskin S, Özkan M, Kaplan MA, Aydoğan F, Demirağ GG, Uzunoğlu S, Engin H, Başaran G, Güler N, Uygun K, Demirkan B, Özdemir F, Çubukçu E, Salepçi T, Çiçin İ. Türkiye’de meme kanserli hastaların tanı ve tedavi yöntemlerine ulaşım hızı; çok merkezli gözlemsel çalışma. The Journal of Breast Health, 2011, 7: 109-117.

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.

Schwartzman R A, Cidloski J A. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocrine Reviews 14: 133-144, 1993.

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. 65

Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come And gone?. Clin Biochem. 1997, 30:91-113.

Somunoğlu S. Meme kanseri: Belirtileri ve erken tanıda kullanılan tarama yöntemleri. Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi, 2009, 4: 103-122.

Somunoğlu S. Meme kanserinde risk faktörleri. Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi, 2007, 2: 1-12.

Spencer S, Cataldo N A, Jaffe R B. Apoptosis in the human female reproductive tract. Obstetrical and Gynecological Survey 5: 314-323, 1996.

Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. Frontiers in Bioscience, 2005, 10: 1881-1896.

Sun, W., Wang, W., Kim, J., Keng, P., Yang, S., Zhang, H., Liu, C., Okunieff, P., Zhang, L. 2008. Anti-cancer effect of resveratrol is associated with induction of apoptosis via a mitochondrial pathway alignment. Advances in Experimental Medicine and Biology, 614: 179-186.

Takahaski K, Schwarz E, Ljubetic C, Murray M, Tessler A, Saavedra RA. DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adults rats. J Comp Neurol 404: 159-71, 1999.

Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B, Atik U. Serbest radikaller. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2000, 1: 52-58.

Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C: Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. Mol Hum Reprod, 4: 757, 1999

Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267: 1456-1462, 1995.

Topal T, Öter Ş, Korkmaz A. Melatonin ve kanserle ilişkisi. Genel Tıp Dergisi, 2009, 19: 137-143.

Touchette N, Fogle S. Apoptosis: it chimes with mitosis. JNH Res 3:75, 1991.

Tsuruo T, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, sakamoto H, Haga N. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. Cancer Science, 2003, 94: 15-21.

Türk G. Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etkileri ve koruyucu stratejiler. Marmara Pharmaceutical Journal, 2013, 17: 73-92.

Tüzüner MB. Östrojen Metabolizması Genlerinden CYP 17 ve CYP 19 Polimorfizmlerinin Meme Kanseri İle İlişkisinin İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 2008.

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.

Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. Cell. 96:245-254; 1999.

Venkatadri R¹, Muni T¹, Iyer AK¹, Yakisich JS¹, Azad N¹. Role of apoptosis-related miRNAs in resveratrol-induced breast cancer cell death. 2016 18;7:e2104.

Wagner A J, Small M B, Itoy N. Myc-mediated apoptosis is blocked by ectopic expression of bcl-2. Mol Cell Biol 13: 2432-2440, 1993.

Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. Journal of Carcinogenesis, 2006, 5: 14-22. 68

Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. Mol. Nutr. Food Res. 2005, 49:472-481.

Wingrave J M, Schaecher K E, Sribnick E A. Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. Journal of Neuroscience Res. 73: 95-104, 2003

Wyllie A H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 284: 555- 556, 1980.

Wyllie A H. The genetic regulation of apoptosis. Curr. Opin. Genet. Dev. 5: 97-104, 1995

Yılmaz E, Altunok V. Kanser ve p53 geni. Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2011, 1: 19-23.

Yokuş B, Çakır DÜ. Kanser biyokimyası. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2012, 1: 7-18.

Yujie Shi^{1,2}, Shi he Yang², Sandi Troup², Xin Lu³, Steve Callaghan⁴, David S. Park⁴, Ying Xing¹ and Xiaohe Yang², 2011, Resveratrol induces apoptosis in breast cancer cells by E2F1-mediated up-regulation of ASPP1. Oncology Reports, 25, 6

ÖZGEÇMİŞ

Adı	Gülten	Soyadı	Kara bekir
Doğum Yeri	Pazar	Doğum Tarihi	22/08/1971
Tel	05334378229	E-Mail	GuJten92@hotmail.com

Eğitim Durumu

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	1992
Lise	Pazar Lisesi	1988

Yabancı Dil / Diller Sınav Puanı

YDS	UDS	IETLS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	CPE	CAE	FCE
-----	-----	-------	-----------	-----------	-----------	-----	-----	-----

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	58,47071	58,88454	68,26212
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi*

Program	Kullanma becerisi
Excel, word	orta

*Çok iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre(Yıl-Yıl)
Y.Eczacı	Aras Eczanesi	1992-1993
Y.Eczacı	Merkez Eczanesi	1993-1994
Ürün Müdürü	Biosel İlaç Sanayi	1994-1997



T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

Sayı : 44140529 / 2016-31

25.03.2016

Konu : Tez çalışması

Sayın Yard. Doç. Dr. Günnur DEMİRCAN
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Aşağıda belirtilen çalışmanız 22.03.2016 tarihli Üniversitemiz Klinik Araştırmaları Etik Kurulu toplantısında incelenmiş, çalışmanın yapılmasında etik ve bilimsel açıdan bir sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir. Kurul kararı ilişikte sunulmuştur.

Gereğini bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof. Dr. Reyhan DİZ KÜÇÜKKAYA
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Çalışmanın Adı: “MCF7 Hücre Soyunda Resveratrölün Apoptoz Mekanizması Üzerine Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez çalışması.

Sorumlu Araştırmacı: Yard. Doç. Dr. Günnur DEMİRCAN, İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Diğer Araştırmacılar: Gülten KARABEKİR, İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi

Proje İle İlgili Temas Kurulacak Kişi: Yard. Doç. Dr. Günnur DEMİRCAN, İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Merkez sayısı: Tek merkez



T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

İstanbul Bilim Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu
Karar No : 22.03.2016/47-01

Çalışmanın Adı: "MCF7 Hücre Soyunda Resveratrölün Apoptoz Mekanizması Üzerine Etkisinin Araştırılması"
başlıklı tez çalışması.

Sorumlu Araştırmacı: Yard. Doç. Dr. Günnur DEMİRCAN, İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Başkan
Prof. Dr. Reyhan DİZ KÜÇÜKKAYA

Başkan Yardımcısı
Prof. Dr. Numan ERGUTLU

Üye
Prof. Dr. Tufan PAKER

Üye
Prof. Dr. Işın BARAL KULAKSIZOĞLU

Üye
Doç. Dr. Semiha AKIN

Üye
Yard. Doç. Dr. Suzan BOZKURT

Üye
Ecz. Pınar DEMİR ÖZKER

Raportör
Doç. Dr. Berrin TELATAR

Üye
Prof. Dr. Ali Seyfi Yalın YALÇIN

Üye
Doç. Dr. Demet AKIN

Üye
Yard. Doç. Dr. Ersan EROĞLU

Üye
Dr. Özlem ÖZTÜRK

Üye
Cafer KILIÇ



T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

SAYI : 50400462/291
KONU: Tez çalışması hk.

TARİH :15/12/2016

T.C. İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
MULTİDİSİPLİNER ARAŞTIRMA LABORATUVARI SORUMLUSU'NA,

İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Gülten KARABEKİR'in "MCF7 Hücre Soyunda Resveratrölün Apoptoz Mekanizması Üzerine Etkisinin Araştırılması" başlıklı tez çalışmasını gerçekleştirebilmesi için müsaadelerinizi saygılarımla rica ederim.

Prof. Dr. Vildan KARPUZ
Müdür



T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SAYI : 99007275-111

TARİH : 20/12/2016

KONU: Gülten KARABEKİR Laboratuvar kullanımı hk.

T.C. İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE,

İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Gülten KARABEKİR'in "MCF7 Hücre soyunda Resveratrolin Apoptoz Mekanizması Üzerine Etkisinin Araştırılması" konulu tez çalışmasını yapabilmesi için Multidisipliner Laboratuvarın tarafından kullanılması uygun görülmüştür.

Saygılarımla

Prof. Dr. Canan HURDAĞ

Multidisipliner Laboratuvar sorumlusu