

**RESVERATROLÜN MEME KANSERİ HÜCRE
KÜLTÜRÜNDEKİ P53 ARACILI APOPTOZ
AKTİVASYONUNUN VE SİTOTOKSİSİTESİNİN POLİMERAZ
ZİNCİR REAKSİYONU (PCR), İMMUNSİTOKİMYA VE MTT
YÖNTEMLERİYLE ARAŞTIRILMASI**

Adem KARA

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Elvan ÖZBEK

İkinci Danışman

Doç.Dr. Nejdet ŞİMŞEK

Doktora Tezi - 2012

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RESVERATROLÜN MEME KANSERİ HÜCRE
KÜLTÜRÜNDEKİ P53 ARACILI APOPTOZ
AKTİVASYONUNUN VE SİTOTOKSİSİTESİNİN
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR),
İMMÜNSİTOKİMYA VE MTT YÖNTEMLERİYLE
ARAŞTIRILMASI**

Adem KARA

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Elvan ÖZBEK**

**İkinci Danışman
Doç.Dr. Nejdett ŞİMŞEK**

**ERZURUM
2012**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**RESVERATROLÜN MEME KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRÜNDEKİ
P53 ARACILI APOPTOZ AKTİVASYONUNUN VE
SİTOTOKSİSİTESİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU
(PCR), İMMUNSİTOKİMYA VE MTT YÖNTEMLERİYLE
ARAŞTIRILMASI**

Adem KARA

Tez Savunma Tarihi : 03.12.2012

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Elvan Özbek

Tez İkinci Danışman : Doç. Dr. Nejdet Şimşek

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Bünyami Ünal (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Turan Karaca (Trakya Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Abdulgani Tatar (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet Özbek (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Deniz Ünal (Atatürk Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitüsü Müdürü

**Doktora Tezi
ERZURUM 2012**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
TABLolar DİZİNİ.....	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser	3
2.2. Meme Kanseri ve Oluşumunda Etkili Faktörler	7
2.2.1. Östrojen.....	10
2.2.2. Oksidatif Stres.....	13
2.2.3. Apoptoz.....	17
2.3. Antikanserojenik Etkili Maddeler.....	18
2.3.1. Resveratrol	19
2.3.1.2. Resveratrolün Antikanserojenik ve Apoptotik Etkisi	20
2.3.1.3. Resveratrol ile İndüklenen Apoptozda p53'ün Rolü	22
3. MATERYAL VE METOT.....	26
3.1. Hücre Kültürü	26
3.1.1. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanışı	26
3.1.2. Hücre İnkübasyon Koşulları	26
3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması (Subculturing)	26

3.1.4. Hücre Dondurma ve Saklanması	27
3.1.5. Hücre Sayılarının Hesaplanması.....	27
3.2. Resveratrol Dozunun Belirlenmesi	28
3.3. Hücre Proliferasyon Analizi	28
3.4. Biyokimyasal TAS ve TOS Analizleri	30
3.5. İmmüsitokimyasal (ICC) Boyama Metodu.....	31
3.6. İmmüfloresan Boyama Metodu	33
3.7. İmmüsitokimyasal Değerlendirme.....	34
3.8. İmmüfloresan Değerlendirme	35
3.9. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PCR) Analizleri.....	36
3.9.1. mRNA Ekstraksiyonu	36
3.9.2. cDNA (Komplementer Zincir) Sentezlenmesi	37
4. BULGULAR.....	39
4.1. Etkin Dozun Belirlenmesi.....	39
4.2. Resveratrolün MCF-7 Hücre Hattı Üzerine Olası Sitotoksik Etkisinin MTT Yöntemiyle Belirlenmesi	40
4.3. Biyokimyasal Total Oksidan ve Antioksidan Miktarı	42
4.4. p53 İmmüpozitifliği	44
4.5. Bax İmmüpozitifliği.....	47
4.6. PCR Sonuçları.....	51
5. TARTIŞMA.....	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	63
KAYNAKLAR	65

EKLER	79
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	79
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	80

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve doktora eğitimim süresince gerek biçimsel eğitimim ve gerekse tez çalışmalarım sürecinde katkılarını tarafımdan esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Elvan Özbek ile ikinci danışmanım Doç. Dr. Nejdet Şimşek'e en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamın labaratuvar aşamasında laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan ve laboratuvardaki katkılarından dolayı Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ahmet Özbek'e, Biyolog Mehmet Beyhan Özkülekçi'ye, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Abdulgani Tatar, Biyolog Saltuk Buğra Karahan'a ve Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Doç. Dr. Ahmet Hacımüftüoğlu'na, akademik yaşamım boyunca desteğini hissettiğim, bilgi ve birikimlerinden ilham aldığım değerli hocam Prof. Dr. Bünyami Ünal'a, doktora eğitimim süresince dostluklarını ve desteklerini esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı akademik personeli Yrd. Doç. Dr. Deniz Ünal'a, Uzm. Dr. Jale Selli'ye, Yrd. Doç. Dr. İsmail Can'a, Dr. Osman Nuri Keleş'e, Dok. Öğr. Nurhan Akaras ve Arş. Gör. Selina Aksak'a, Yük. Lisans Öğr. Seçil Parlak'a, yaşamım boyunca her zaman maddi ve manevi her konuda yanımda olan anneme, babama ve kardeşlerime ve bu çalışmayı 2010/171 BAP proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne içtenlikle teşekkür ederim.

Adem KARA

ÖZET

Resveratrolün Meme Kanseri Hücre Kültüründeki p53 Aracılı Apoptoz Aktivasyonunun ve Sitotoksitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), İmmünohistokimya ve MTT Yöntemleriyle Araştırılması

Amaç. Meme kanseri tüm dünyada en sık görülen kanser tiplerinden birisidir. Meme kanseri tedavisinde ve tedavi sonrası yeniden nüksün önlenmesinde kemoterapi önemli bir etkiye sahiptir. Fakat meme kanseri tedavi etkinliğinin azalmasında ilaç direncinin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca kanser tedavisinde kullanılan kemoteropatiklerin yan etkileri tedavide istenmeyen bir durumdur. Bu durumun giderilmesi için yeni ilaçların kanser tedavisindeki etkinliğinin artırılması hedeflenmektedir. Son yıllarda kemoteropatik ajanlarla beraber resveratrol gibi birçok antioksidan maddenin etkilerinin araştırılmaktadır. Bu çalışmada farklı dozlarda ve sürelerde uygulanacak resveratrolün kanser hücrelerindeki olası apoptotik ve sitotoksik etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metot. Çalışmada insan meme kanseri MCF-7 hücre hattı kullanıldı. Resveratrolün sitotoksik dozlarını belirlemek için, 10-140 µM konsantrasyon aralığında resveratrol uygulanan hücre hatlarında MTT analizi (hücre canlılık testi) yapıldı. Etkin dozlar belirlendikten sonra resveratrol uygulanmayan 24 ve 48 saatlik inkübasyonda bekletilen 2 kontrol grubu, resveratrolün 20 ve 40 µM konsantrasyonlarda uygulandığı 24 ve 48 saat süreli inkübasyonda bekletilen 4 çalışma grubu olmak üzere 6 deney grubu oluşturuldu. Bütün deney gruplarındaki total antioksidan seviyesi (TAS), total oksidan seviyesi (TOS), apoptotik aktivite (Bax ve p53 immunpozitifliği) ve p53 gen ekspresyonu düzeyleri araştırıldı.

Bulgular. Çalışmamızda, MCF-7 hücrelerine uygulanan resveratrolün hücre çoğalmasını engellediği ya da başka deyişle sitotoksik etki yaptığı ve p53 protein sentezini 24 saatlik inkübasyon grubunda düşürdüğü, 48 saatlik inkübasyonun yüksek doz grubunda ise p53 gen ekspresyonunu arttırdığı belirlendi. İmmunfloresan boyamada, Bax immunpozitifliğinde artış, immunperoksidaz uygulaması sunucunda ise p53 immunpozitifliğinde artış saptandı. Ayrıca resveratrolün uygulaması ile total oksidan miktarı değişmezken ve total antioksidan düzeyleri değişmiştir.

Sonuç. Çalışma sonuçları, resveratrol uygulaması ile oluşan p53 genindeki artışın apoptotik aktiviteyi arttıracakını göstermektedir. Resveratrolün bu etkileri göz önüne alındığında kanser tedavisinde kullanılabilecek bir ajan olabileceği sonucuna varılabilir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Meme kanseri, p53, Resveratrol

ABSTRACT

The investigation of resveratrol treatment in breast cancer cell line for p53 mediated apoptotic activation and cytotoxicity via polymerase chain reaction (PCR), immunocytochemistry and MTT methods

Aim. Breast cancer is the most common type of cancer in the world. Breast cancer caused death and recurrence of breast cancer due to chemotherapy failure. However, acquired resistance remains a major challenge were known. In addition, the side effects of chemotherapeutics are the other major challenge during cancer treatment. Therefore, we aimed to enhance the therapeutic efficacy of cancer with the administration of new drugs and new drug combinations. Recently there are many antioxidants such as resveratrol were studied in the treatment of cancer therapy. In the present study, resveratrol treated MCF-7 cells at various dose and incubation periods of time were investigated for expression of p53 mediated apoptotic activation.

Material and Method. For this reason, in this study, human breast cancer MCF-7 was used. The cytotoxic doses of resveratrol, interval of 10-140 μ M concentration resveratrol administrated cell line were analyzed via MTT analysis (cell viability assay). After effective dosed were determined, 6 experiment groups were designed. These groups; untreated control incubated for 24 and 48 hours group- 2 groups, 20 ve 40 μ M resveratrol treatment incubated for 24 and 48 hours -4 treatment groups. In all groups, there examined the resveratrol cytotoxicity, total antioxidant status (TAS), total oxidant capacity (TOC), apoptotic activity (Bax and p53 immuno-positivity) and expression levels of p53 gene.

Results. In the present study, MCF-7 cell proliferation was inhibited by the treatment or cytotoxic effect of resveratrol and decreased the p53 protein synthesis in 24 hours group, increased the p53 gene expression in 48 hours incubation period. Increased Bax

immune-positivity in the immunofluorescent and increased p53 immune-positivity was determined in immunoperoxidase staining. Furthermore, breast cancer cells were affected by the total antioxidant depending on treatment of resveratrol, but oxidant status was not changed.

Conclusion. It can be concluded from the results that increase in the expression levels of p53 genes may contribute to apoptotic activation by resveratrol treatment. Above a certain effects of resveratrol, new therapeutic treatment strategies may contribute to develop higher efficiently treatment of breast cancer.

Key Words: Apoptosis, Breast cancer, p53, Resveratrol

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMPK	: 5' AMP-aktif edici kinaz (5' AMP-activated protein kinase)
BSA	: Sığır serum albümini (Bovine serum albumine)
CDK	: Siklin bağımlı kinaz (Cycline depending kinase)
COX-1	: Siklooksijenaz (Cyclooxygenase-1)
DHEA	: Dehidroepiandrosteron (Dehydroepiandrosterone)
DHEAS	: Dehidroepiandrosteron-sülfat (Dehydroepiandrosterone - sulphate)
DMSO	: Dimetil sülfoksit (Dimethyl sulphoxide)
DNA	: Deoksiribonükleik asit (Deoxyribonucleic acide)
E₁	: Östron (Ostrone)
E₂	: Östradiol (Estradiol)
E₃	: Östriol
E₁S	: Östron-sülfat (Ostrone-sulphate)
EGCG	: Epigallokatekin gallat (Epigallocatechin gallate)
EGF	: Epidermal büyüme faktör (Epidermal growth factor)
ER	: Östrojen-reseptör (Ostrogene receptor)
Erk1/2	: Ekstrasellüler düzenleyici kinaz 1/2 (Extracellular-regulated kinase)
FITC	: Floresan izotiosiyanat (Fluorescein Isothiocyanate)
FSH	: Folikül stimülan hormon (Follicul situmulating hormone)
GnRH	: Gonadları uyarıcı hormon (Gonadotropin-releasing hormon)
HDR	: N-(4-hidroksifenil) retinamid
HRP	: Horseradish peroksidaz (Horseradish peroxidase)
H₂O₂	: Hidrojen peroksit (Hydrogen peroxide)
IC₅₀	: Baskılayıcı konsantrasyon 50 (Inhibition concentration)
ICC	: İmmüsitokimyasal (Immunocytochemical)
JNKs	: C-Jun NH ₂ -terminal kinaz (C-Jun NH ₂ -terminal kinase)
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein (Low density lipoprotein)
LH	: Luteinizan hormon (Lutein hormone)
LPO	: Lipid peroksidasyonu (Lipid peroxydation)
MAPK	: Mitojen aktive edici protein kinaz (Mitogen-activated protein

	kinase)
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiytazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid, 1 sarı tetrazol (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, a yellow tetrazole)
μM	: Mikro molar
NO•	: Azot monoksit radikali
NO₂	: Azot dioksit
N₂O₂	: Dinitrojen dioksit (Dinitrogen dioxide)
O₂•⁻	: Süperoksit (Superoxide)
¹O²	: Singlet oksijen (Singlet oxygen)
O₃	: Trioksijen (Ozone)
•OH	: Hidroksil radikali (Hydrogen radical)
ONO⁻	: Hipoklorit nitrid (Hypochlorite nitride)
ONOO⁻	: Nitrosuperoksikarbonat anyon (Nitrosuperoxidecarbonat anion)
O₂NOCO₂⁻	: Nitrokarbonat anyon (Nitrocarbonate anion)
PBS	: Fosfat tamponlu solüsyon (Phosphate buffered saline)
PCNA	: Proliferasyon hücre nükleer antijen (Proliferating cell nuclear antigen)
PETC	: Fotosentetik elektron taşıma zinciri (Photosynthetic electron transport chain)
PI-3	: Fosfatidilinositol-3 (Phosphatidylinositol-3)
R•	: Organik radikali (Organic radical)
RO•	: Alkoksil radikali (Alcocyle radical)
ROO•	: Peroksil radikali (Peroxyle radical)
ROOH	: Organik hidroperoksit (Organic hydroperoxide)
RSOO•	: Tiylol peroksil radikali (Thiol peroxy radical)
ROT	: Reaktif oksijen türleri (Reactive oxygene species)
ROS•	: Sülfonil radikali (Sulphonile radical)
RS•	: Tiylol radikali (Thiol radical)
RSSR	: Disülfid (Disulfide)
RSVL-1	: 3,5,3',4'-tetrahidroksi-trans-stilben
RSVL-2	: 3,5,3',4',5'-fentahidroksi-trans-stilben
RT-PCR	: Gerçek zamanlı - polimeraz zincir reaksiyonu (Real time –

	polimerase chain reaction)
STS	: Steroid sülfataz (Steroid sulfatase)
TCH	: Tümör hücre büyümesi (Tumor cell growth)
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör- α (Tumor necrosis factor- α)
TPA	: Forbol ester 12-O-tetradekanoliforbol-13-asetat
WHO	: Dünya sağlık örgütünü (Whorld healty organisation)

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>		<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1.	Küresel yıllık kanser yükü tahmini	4
Şekil 2.2.	p53 gen bölgesinin genomik bütünlüğün korunmasındaki rolü	7
Şekil 2.3.	Meme duktusları ilerleme evreleri görünümü	8
Şekil 2.4.	ROT üretimi ve detoksifikasyonu mekanizması	15
Şekil 2.5.	Hücrel ROT etkileri, üretimi ve düzenlenmesi	17
Şekil 2.6.	Hücre siklusunu düzenleyen proteinlerde oluşan düzensizliklere bağlı hücre proliferasyonu	19
Şekil 3.1.	Stereolojik “Optik Fractionator Frame” metodu ile anti-p53 immunpozitifliğinin değerlendirilmesi	34
Şekil 4.1.	24 ve 48 saat periyotlu MCF-7 hücrelerine resveratrol uygulanan ve resveratrol tedavisi yapılmayan gruplara ait invert mikroskop görüntüsü	38
Şekil 4.2.	24 saatlik inkübasyon süresine ait baskılayıcı konsantrasyon 50 (IC50) dozu	39
Şekil 4.3.	48 saatlik inkübasyon süresine ait baskılayıcı konsantrasyon 50 (IC50) dozu	40
Şekil 4.4.	24 saatlik resveratrol uygulamasının MCF-7 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.....	41
Şekil 4.5.	48 saatlik resveratrol uygulamasının MCF-7 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi	41
Şekil 4.6.	Total oksidan seviyelerinin 24 ve 48 saat inkübasyon sürelerine göre karşılaştırmalı grafiği	43
Şekil 4.7.	Total antioksidan kapasitelerinin 24 ve 48 saat inkübasyon sürelerine göre karşılaştırmalı grafiği	43
Şekil 4.8.	24 saatlik resveratrol uygulanması yapılmayan MCF-7 hücre hattında p53 immun pozitifliği	44
Şekil 4.9.	20 µM konsantrasyonda 24 saat resveratrol uygulanan MCF-7 hücre hattında p53 immun pozitifliği	44
Şekil 4.10.	40 µM konsantrasyonda 24 saat resveratrol uygulanan	45

	MCF-7 hücre hattında p53 immun pozitifliği	
Şekil 4.11.	48 saatlik resveratrol uygulaması yapılmayan MCF-7 hücre hattında p53 immun pozitifliği	45
Şekil 4.12.	20 µM konsantrasyonda 48 saat resveratrol uygulanan MCF-7 hücre hattında p53 immun pozitifliği	42
Şekil 4.13	40 µM konsantrasyonda 48 saat resveratrol uygulanan MCF-7 hücre hattında p53 immun pozitifliği	46
Şekil 4.14.	24 saatlik resveratrol uygulaması yapılmayan MCF-7 hücre hattında Bax immunfloresan pozitifliği	47
Şekil 4.15.	20 µM konsantrasyonda 24 saat resveratrol uygulanan MCF-7 hücre hattında Bax immunfloresan pozitifliği	47
Şekil 4.16.	40 µM konsantrasyonda 24 saat resveratrol uygulanan MCF-7 hücre hattında Bax immunfloresan pozitifliği	47
Şekil 4.17.	48 saatlik resveratrol uygulaması yapılmayan MCF-7 hücre hattında Bax immunfloresan pozitifliği	47
Şekil 4.18.	20 µM konsantrasyonda 48 saat resveratrol uygulanan MCF-7 hücre hattında Bax immunfloresan pozitifliği	48
Şekil 4.19.	40 µM konsantrasyonda 48 saat resveratrol uygulanan MCF-7 hücre hattında Bax immunfloresan pozitifliği	48
Şekil 4.20.	p53 ve aktin gen bölgelerine ait erime (melting) sıcaklıklarının gösterimi: A; aktin ve B; p53 eğrisi	49
Şekil 4.21.	Aktin ve p53 logaritmik amplifikasyon eğrileri	50
Şekil 4.22.	Aktin ve p53 gen bölgeleri için lineer amplifikasyon eğrileri: A; aktin ve B: p53 eğrisi	50
Şekil 4.23.	Erime analizde aktin ve p53 bölgeleri için kırılma noktaları: A; aktin ve B; p53 kırılma noktası	51

TABLÖLER DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Pre- ve postmenoposal kadınlarda plazma Östron (E1), Östradiol (E2) ve Östron-sülfat (E1S) konsantrasyonları (pmol/ml)	12
Tablo 2.2. Malign meme dokuda E1, E2 ve E1S konsantrasyonu (pmol/g)	13
Tablo 3.1. cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar	37
Tablo 4.1. Baskılayıcı konsantrasyonun (IC50) değerlerinin gösterimi	39
Tablo 4.2. Resveratrol konsantrasyon ve viabilite oranı değerleri	40
Tablo 4.3 Total oksidan ve antioksidan miktarları	42
Tablo 4.4. İmmünsitokimyasal p53 pozitif hücre sayısının μm^2 alandaki değerleri	44
Tablo 4.5. İmmünofloresan Bax pozitif hücre değerlendirilmesi	46
Tablo 4.6. p53 ve aktin konsantrasyon değerleri (ml'de uluslararası ünite; IU/ml)	48

1. GİRİŞ

Hayat, normal şartlar altında doğma, büyüme, olgunlaşma ve ölümle son bulan bir olaylar bütünü olarak tanımlanmaktadır. Yaşam sürecinde ölüme neden olan birçok faktör bulunmaktadır. Bunların en önemlilerinden birisi kanser olarak tanımlanan yüksek mortaliye sahip hastalıktır. Dünya sağlık örgütünün (WHO) verilerine göre 2008 yılı itibari ile kanserden ölen insan sayısı tüm dünyada 7.6 milyon civarındayken, Türkiye’de 145.000-160.000 kadar olduğu tahmin edilmektedir. 2030 yılı itibari ile kanser sebepli ölümlerin sayısının dünyada 12 milyon olacağı tahmin edilmektedir. Hızla gelişen ve ilerleyen dünyada, teknolojik aletlerin yaygın kullanımı ya da ultra viyole ışık gibi sebeplerden kanserli vaka hızı giderek artmaktadır. Günümüzde kanser tedavilerinin oldukça kısıtlı olması sebebiyle kanser olgularının profilaksisi, erken tanı ve tedavisi üzerinde araştırmaların yapıldığı birçok çalışma bulunmaktadır.¹⁻³ Yapılan bu çalışmalarda daha çok hücre büyümesi, bölünmesi ve ölümü üzerine ilaçlar, beslenme alışkanlıkları, stres, cinsiyet, ultra viyole ışınlar, bitkisel ekstratlar gibi faktörlerin etkileri in vivo ve in vitro olarak araştırılmaktadır.

Meme kanseri, ülkemizde kadın nüfusunun %24’ünde görülen oldukça yaygın bir kanser tipi olup kemoterapötik tedavisi hayatı oldukça zorlaştıran bir klinik problemdir. Kemoterapinin yan etkilerinin önüne geçmek için günümüzde birtakım antioksidan ajanların kullanımıyla ilgili birçok araştırma mevcuttur.^{4, 5} Birçok çalışmada etkinliği araştırılan resveratrol maddesi; üzümde bulunan, bitkinin kendi savunma sisteminde kullandığı etkin bir antioksidan ve antikanserojen bir maddedir. Bu çalışmada; östrojen pozitif meme kanser hücre hattında (MCF-7) resveratrol maddesinin apoptotik mekanizma ve vahşi tip (wild) p53 ekspresyonunu uyarmadaki etkinliği ve etki mekanizması üzerinde durulacaktır.

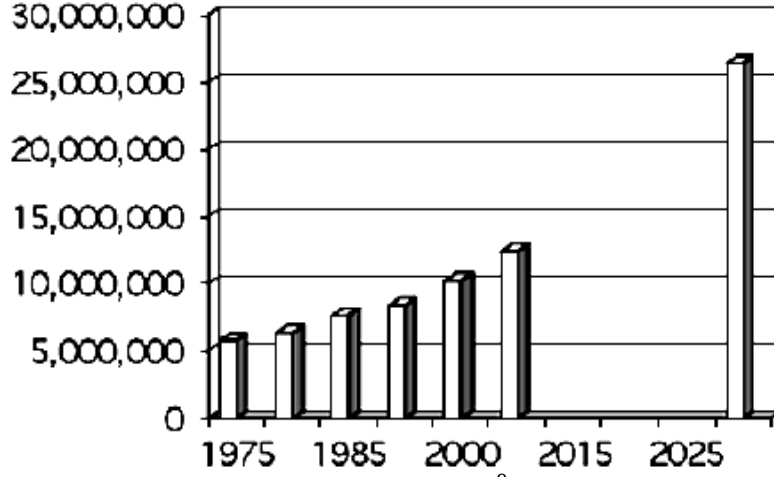
Özetle, çalışmamızda belirlenen konsatrasyonlarda resveratrol ile inkübasyona bırakılan meme kanseri hücreleri, zaman ve doz bağımlı olarak antioksidan ve oksidan kapasiteleri ile p53 gen ekspresyonu düzeyi ve apoptotik etkinliği araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Vücudu oluşturan hücrelerin kontrolsüz ve anormal şekilde çoğalmaları ile karakterize duruma kanser denir. Vücudun tüm doku ve organlarında kanser oluşabilir. Vücutta anormal hücre çoğalması veya inflamasyon sonucu ortaya çıkan lokalize şişkinlikler için tümör (neoplazi) terimi kullanılmaktadır. Kanser ve karsinoma ilk olarak Hipokrat (460-370 M.Ö.) tarafından karsinoma ve karsinoz ile ifade edilmiş iken, Romen fizikçi Galen (130-200 M.Ö) şişlik manasına gelen “onkos” terimini kullanmıştır.⁶ Bugün kanser terimi genetik ve epigenetik sonuçlara sebep olan büyümesi kontrol edilemeyen, çeşitli organ ve dokulara yayılım gösterebilen ve anormal büyüyen hastalık grupları ile karakterize bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanserin tanımının yapıldığı 3700 yıllık geçmişe baktığımızda, Mısır’lı bilim adamı Edwin Smith Papyrus (M.Ö. 1600) kanseri tedavi edilemez bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Oysaki kanserin ilk tanımlandığı günden bugüne yüzyıllar geçmesine rağmen bazı kanser tiplerinin tedavisinin çok kısıtlı ya da mümkün olmadığı, bazı kanser türlerinin ise büyük oranda tedavi edilebileceği bildirilmektedir. Kanser oluşum etiyolojisini edinsel ya da genetik mutasyona bağlı olarak bir takım farklılaşmalar şekillendirir.⁷ Bu gelişimde, hücreye dışardan etki edebilecek bazı dış genotoksik faktörler (sigara, irritasyon, virüs) ya da bazı iç faktörler (herediter mutasyonlar, kendini onarma mekanizması ve hormonlar gibi) kanser oluşumunda etkin rol almaktadırlar. Kansere neden olan bu maddelere kanserojen denilmektedir. Hücrelerin sürekli mutasyonel faktörlere ya da kanserojenlere maruz kalmaları, hücrelerde anormal bir karakteristiğin ortaya çıkmasına ve hücre büyümesinde rol alan bazı genlerin ekspresyonlarında anormalliklere sebep olmaktadır. Bu anormal değişimler, dokularda amaçsız çoğalan ve bölünmesi hücresel sinyal mekanizmalarının kontrolü dışında gerçekleşen kanser

tiplerinin oluşmasını sağlamaktadır. Ayrıca mutasyon geçirerek kontrolsüz çoğalan hücreler mutasyona bağımlı hücreler haline de gelirler.⁸



Şekil 2.1. Küresel yıllık kanser yükü tahmini.⁹

Tümör hücrelerinin tiplendirilmelerinde çevre dokulara yayılış özellikleri isimlendirmede önemli bir kriter olup, yayılış özelliğine göre iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) tümörler olarak adlandırılır. Benign tümörler çevre dokulara metastaz yapmaz ve cerrahi yolla uzaklaştırılabilmektedirler. Oysa malign tümörler, tümöral bölgeden vücudun çeşitli organ ve dokularına metastaz yapabilme, sürekli çoğalabilme, anjiyogenesis özelliğine sahip, apoptozdan korunan ve anti-büyüme sinyallerine duyarlılık göstermeyen kanser çeşitidir.¹⁰ Tümör hücrelerinin tiplendirilmesinde, bulundukları hücre, doku ya da organ çeşitleri de dikkate alınmaktadır. Bu kanser tipleri adlandırılırken köken aldığı yer ve nerede büyümeye başladığı gibi faktörler göz önünde bulundurulmaktadır. Lökositlerin kanseri (beyaz kan hücreleri) lösemi, bağdokuda özelleşmiş lenfositlerin tümörü lenfoma, derinin melanosit denilen pigment hücrelerinden köken alan kanserler melanoma, mide, akciğer gibi boşluklu organların epitelinden köken alan tipleri karsinoma, bağdoku ve kas dokudaki kanserler de sarcomas olarak adlandırılır.¹¹ Terminolojik olarak spesifik tip kanserler; meme, kolon, akciğer ve prostat kanserleri gibi organ adlarıyla da isimlendirilirler.

Vücut hücreleri yaşam fonksiyonları gereği hücresel bölünme siklusu içerisine girerler. Ayrıca hücreler üzerinde meydana gelen herhangi bir mekanik yorulma (kas hücrelerinde gerilme), doku hasarı (iskemi) ve hücre ölümü gibi sebepler de hücreleri siklus içerisine iterler. Hücrenin siklusa girmesiyle beraber dokuda sinyal hücreleri tarafından ligandlar salınır. Bu ligandlar sıklıkla büyüme faktörleri içerirler ve proto-onkogenlerin ekspresyonunu uyarır. Bu proto-onkogenler proliferasyonun kontrolünden sorumlu gen bölgeleridir ve istenmeyen kontrol dışı bölünmelere engel olur. Bazı durumlarda proto-onkogenlerde meydana gelen herhangi bir mutasyon, proliferasyon kontrolünün kaybolmasını ve kanser oluşabilmesini sağlamaktadır. Bu mutasyon geçiren proto-onkogenlere onkogen denilmektedir. Diğer bir değişle onkogenler, tümöral hücrelerin malignitesini artıran proteinleri kodlayan mutant genlerdir. Değişmiş onkogen aktivitesi, DNA sırasındaki değişiklik, gen sayısındaki artış (gen amplikasyonu) ve genlerin aktif bir promotor alan yakınında yeniden yerleşimiyle indüklenebilir. Onkogenlerdeki değişiklikler, hücre bölünmesinde aşırı bir uyarıma sebep olurken tümör süpressör genlerdeki değişiklikler hücre bölünmesini durdurma da yetersizliklere sebep olur. DNA hasarı sadece G_2 'deki hücreleri değil, G_1 'deki kontrol noktasındaki hücreleri de durdurmaktadır. G_1 tutulumu, DNA hasarını S fazında duplikasyondan önce tamirine olanak sağlar. DNA hasarı oluşan hücrelerde, DNA tamir yeteneği azalır. Bazı kanser hücreleri, onları bölünmede tutacak faktörleri devamlı olarak sentezlerler. Memeli hücrelerinde G_1 kontrol noktasında siklusun durdurulması p53 olarak bilinen bir proteinin hareketi ile olur. Kanser hücrelerinde p53 proteinini kodlayan gen bölgesi, insan kanserlerinde genellikle mutasyon geçirmiştir. Kanser tedavisinde radyasyon ve kemoterapi gibi ilaçların etki mekanizması siklusun durdurulması prensibine dayanmaktadır. Kanser hücreleri normal hücrelere göre daha sık bölündüklerinden radyasyondan daha çok etkilenir ve radyasyon hücre bölünmesini

kesintiye uğrattır. Kemoterapide kullanılan ilaçlar mitotik mekiğin oluşumunu yani mikrotubul sentezini baskırlarlar.

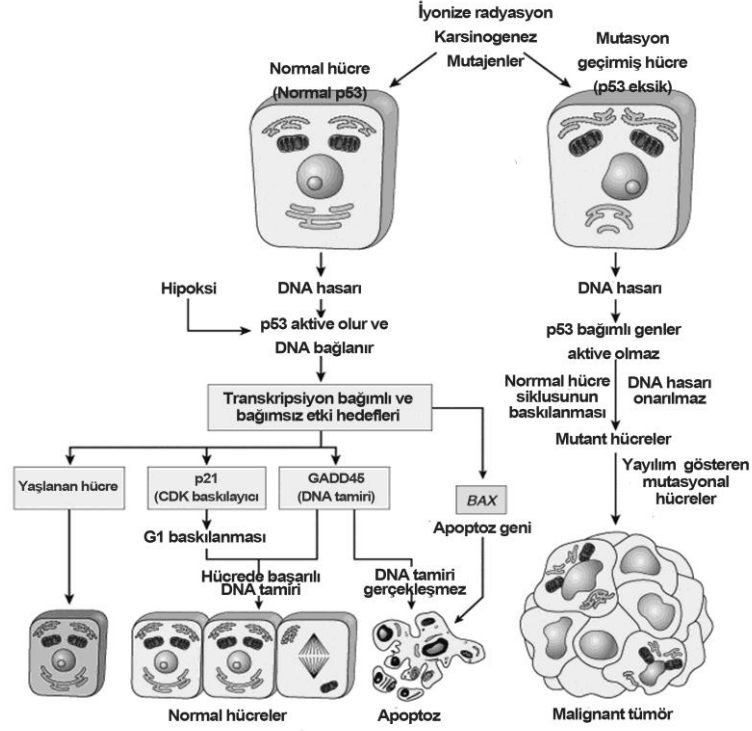
Hücre siklusunun kontrolü siklinler olarak bilinen proteinlerin bulunması ve siklinlerin, sikline bağılı kinazlarla (CDKs) etkileşimi ile sağılanır.

- Erken G_1 evresinde sentezlenen siklin D, CDK4 ve CDK6'ya bağılanır.
- Geç G_1 evresinde siklin E sentezlenir ve CDK2'ye bağılanır.
- Bu üç kompleks, diğler araçlarla birlikte hücrenin S evresine girmesine ve S evresinde ilerlemesini sağılar.
- Siklin A, CDK2 ve CDK1'e bağılanır ve bu kompleksler, hücrenin S fazını terk edip G_2 evresine girmesini sağılar ve Siklin B'nin oluşumunu indükler.
- Siklin B, CDK1'e bağılanır ve bu kompleks hücrenin G_2 fazını terk edip M evresine girmesine izin verir.

Siklinler, işlevlerini gerçekleştirdikten sonra, ubiquitin-proteazom yoluyla yıkımlanırlar.

Hücreler, evreler arasındaki geçişte kontrol noktaları (checkpoints) olarak bilinen kontrol mekanizmalarını kullanılır. Bu kontrol noktaları, G_1 , G_2 , ve M fazında aktivite göstermekte olup uygun hücre büyümesi, doğru DNA sentezi, mükemmel kromozom ayrılması gibi gerekli olayların titizlikle tamamlanmasını sağılarlar. Hücre, bunları hücre döngüsünde inhibitör yolların ve/veya aktive olmuş yolların baskılanması ile sağılar. Büyüme faktörleri, hücre siklusu kontrol sistemine sinyal göndererek hücre döngüsü olaylarını düzenler. Bu düzenlenme, bir tip sinyal transdüksiyonudur. Eğer bu kontrol noktalarında bir büyüme faktörü salınırsa, hücre döngüsü devam edecek, salınmazsa, hücre döngüsü duracaktır. DNA hasarı durumunda aktive olan p53 G_1 evresinde hücre siklusunu durdurarak DNA tamirini başlatır. Eğer DNA hasarı tamir edilemezse apoptoz tetiklenir. Örneğin sinir ve kas hücreleri, G_1 kontrol noktasında hiç

bölünmeyen hücrelerdir. Hücre kültürü çalışmalarında çok düşük oranlarda büyüme faktörleri eklenmezse hücreler genellikle M evresine geçemezler ve bölünme gerçekleşmez. (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. p53 gen bölgesinin genomik bütünlüğün korunmasındaki rolü.¹²

2.2. Meme Kanseri ve Oluşumunda Etkili Faktörler

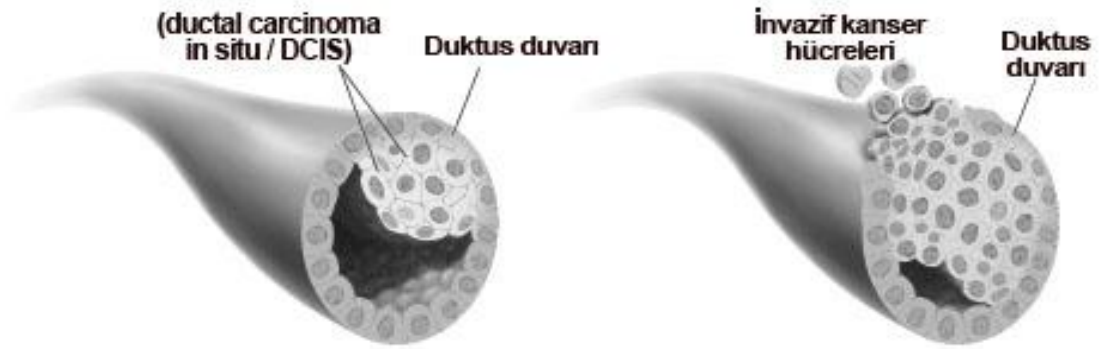
Kadınlarda görülen en sık kanser türünün %24'lük bir oranla meme kanseri olduğu belirtilmektedir. Yaş grupları içinde 100.000 kadında 45 yaşına kadar olanlarda 20.8'inde hastalık görülürken, bu değerin 45-60 yaş aralığında 186.7 kadında olduğu, 60-75 yaş aralığında ise 238.5 kadında olduğu belirlenmiştir.¹³

Meme kanseri risk faktörleri arasında genetik yatkınlık, BRCA1 ve BRCA2 genlerinin taşınması, önceden geçirilen diğer kötü huylu meme hastalıkları, erken menarş, geç menopoza, obesitesi olan postmenopozal kadınlar, alkol kullanımı, düşük doz radyasyon, diabetes mellitus, ilk doğumunu geç yaşta yapmış kadınlar, pestisitlere maruz kalma, uzun süreli oral kontraseptif ilaç alımı gibi durumlar yer almaktadır.¹⁴

Bunların yanı sıra östrojen, oksidatif stres, apoptozun engellenmesi de meme kanseri oluşumunda önemli rol oynayan faktörlerdir. Meme kanseri tümör oluşumu ve etrafındaki dokulara sıçrama özelliklerine göre çeşitli evrelere ayrılmıştır. Amerikan Ulusal Kanser Merkezine göre meme kanseri evreleri:¹⁵

Evre (Stage) 0

Bu aşama invaziv olmayan anormal hücreler ile karakterize evredir. Evre 0 hücre içi duktal karsinoma (ductal carcinoma in situ / DCIS) olarak tanımlanır. DCIS tedavi edilmediği durumlarda invaziv olabilir. DCIS tanısı konmuş hastalarda, kanser hücreleri oluştukları duktuslar içerisinde kalmış ve göğüsün yağ dokusuna ya da lenf düğümü gibi vücudun diğer organlarına yayılmıştır. DCIS genellikle (yaklaşık %80) mamogram üzerinde küçük kalsiyum birikimleri (mikrokalsifikasyonlar) olarak görünür. Daha az yaygın olmakla birlikte (yaklaşık %15), DCIS kalsifikasyonlar ve kitle olarak bulunurlar. Nadiren (yaklaşık %5) de olsa DCIS olarak tanımlanan kitlelerde mikrokalsifikasyonlara rastlanmaz.



Şekil 2.3. Meme duktusunda kanserin ilerleme evreleri görünümü.¹²

Evreleri (Stage) I

Evre I, invaziv meme kanserinin erken evresi olarak kabul edilir. Kanser başlangıcı sayılıp meme dokusuna yayılmamıştır. Tümoral doku büyüklüğü 2 cm den büyük değildir.

Evre (Stage) II

Bu evrede tümör en fazla 5 cm ebatında olup 4 farklı şekilde görülebilir;

1- Tümör 2 cm den büyük değildir. Kanser koltukaltı lenf düğümlerine metastaz yapmıştır.

2- Tümör 2-5 cm ebatlarındadır ve koltukaltı lenf düğümlerine metastaz yapmamıştır.

3- Tümör 2-5 cm ebatlarındadır ve koltukaltı lenf düğümlerine metastaz yapmıştır.

4- Tümör 5 cm ebadındadır ve koltukaltı lenf düğümlerine metastaz yapmamıştır.

Evre (Stage) III

Evre III ilerlemiş kanser olup 3 alt tipe ayrılır. Bunlar;

Evre IIIA: Tümör 5 cm'den büyüktür ve kanser koltukaltı lenf düğümüne metastaz yapmış ve etrafındaki dokulara tutunmuştur. Ya da kanser göğüs lenf düğümüne (pektoral) sıçramıştır.

Evre IIIB: Bu evrede göğüs duvarında ya da meme derisinde herhangi bir ebatta tümör ile karakterize evredir. Bu evrede koltukaltı len düğümüne kanser yayılmış olabilir. Kanser koltukaltı lenf düğümüne metastaz yapmış ve çevre dokulara tutunmuş olarak bulunurken, göğüs lenf düğümlerine de sıçramış olur.

- Enflamatuar meme kanseri olup meme kanserinin az görülen bir tipidir. Meme dokusu kırmızı renkte ve şişkin görünür. Bunun sebebi meme deri dokusu lenf damarları kapanmıştır.

Evre IIIC: Bu evrede tümör herhangi bir ebatta olabilir ve çeşitli dokulara metastaz yapmıştır. Bunlar;

- Kanser koltuklaltı ve göğüs lenf düğümlerine sıçramıştır.
- Kanser lenf düğümlerinin önüne ve arkasına sıçrayarak buralara yayılırlar.

Evre (Stage) IV

Bu evre uzak metastazik kanser olup vücudun çeşitli bölgelerine (karaciğer, kemik gibi) metastaz yapmıştır.

Tekrarlayan (Rekürrent) Kanser

Kanser tedavisi uygulanan ve kanserli dokusu uzaklaştırıldıktan sonra kanserin yeniden nüks etmesi durumudur.

2.2.1. Östrojen

Meme kanseri olgularında hormonların önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir.^{16,17} Meme kanserinin ortaya çıkmasında östrojenlerin yüksek düzeyde bir etkinliğe sahip olması,¹⁶ meme kanseri olgularının kadınlarda erkeklerden daha fazla (100 kat) görülmesine sebep olmaktadır.¹⁸ Östrojen, steroid yapıda olan bir cinsiyet hormonu olup E₁, E₂ ve Östriol (E₃) en önemli doğal östrojenler arasında yer alır. Östrojen hormonunun biyosentezi vücutta ovaryumlarda olgun foliküllerin granuloza hücreleri tarafından gerçekleşmektedir. Gebelik döneminde ise plasentadan östrojen sentezi olmaktadır. Vücut periferinde intrakrin östrojen sentezi premenopozal kadınlarda toplam östrojen oluşumunun %75'ni, postmenopozal dönemdeki kadınlarda %100'e yakınıni oluşturmaktadır.¹⁹ Menopoz öncesi östrojen ve progesterijen oluşumu ovaryumda gerçekleşmektedir. Bu hormonlar hipotalamik gonadotropin-tetikleyici

hormon (GnRH) ve hipofiz ön lobu formonlarından olan folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteal hormon (LH) tarafından kontrol edilmektedir. Postmenopozal dönemde ovaryum kaynaklı östrojen üretimi durmuştur ve serbest östrojen konsantrasyonu etki seviyesinin altındadır. Buna rağmen östrojen-bağımlı meme kanserlerinin büyük bölümü bu dönemde görülmektedir. Bunun sebebi olarak; gerekli hormonal aktif östrojenin tümör dokusunda steroid sülfatlardan oluşturulduğudur. Söz konusu ilk hormon dehidroepiandrosteron (DHEA) olup insanda ve diğer primatlarda kısmen böbrek üstü bezinde sülfotransferaz ve karaciğerde, yağda ve kas dokuda sülfokonjugasyon ile DHEA'dan dehidroepiandrosteron sülfata (DHEAS) dönüştürülür.²⁰ Analog olarak E_1 'de E_1S 'e metabolize edilir. Vücutta pre- veya postmenopozal dönemlerde bağımsız olarak sirküle olan östrojenin önemli bir kısmını E_1S oluşturmaktadır.²¹ Steroid sülfataz aracılığıyla konjugatın ayrılması sonrası östrojen tekrar biyolojik olarak hazır hale getirilir. Steroid sülfattan aktif östrojen sentezleme mekanizması “intrakrin östrojen sentezi” olarak adlandırılmaktadır. Östrojenlerin bu sentezi sitokrom peroksidazların bir üyesi olan aromataz enzimi ve steroid sülfataz (STS)'in katalizörlüğünde gerçekleşmektedir. Bu enzimler ise özellikle deri, kas, yağ, kemik ve meme bezi gibi perifer dokuda bulunmaktadır.²¹ E_1S perifer kanda (10-12 saat) E_2 'ye nispeten (20 dakika) daha uzun bir yarılanma ömrüne sahiptir.²² Ayrıca, E_1S plazma konsantrasyonu konjuge olmamış E_1 veya E_2 'ye göre 10 kat daha yüksektir.²³

Östrojen pozitif meme kanserlerinde, östrojenler ve östrojen-reseptör (ER)'lerinin önemli olduğu,^{24,25} östrojen-reseptör antagonistlerinin terapilerde oldukça başarılı sonuçlar gösterdiği bildirilmektedir.²⁶ Örneğin östrojen-reseptör antagonisti olan Tamoxifen ER'lerini bloke ederek östrojen-bağımlı hücre büyümesini baskılayabilmektedir.²⁷ ER pozitif meme kanseri olgularında östrojen, ER'lerini aktive

ederek hücre siklusundaki G₁-fazını kısaltarak hücrenin daha fazla ve hızlı bölünmesine, artan hücre bölünme sayısının artışı da kanser riskinin yükselmesine neden olur.¹⁸

Meme kanserleri ortalama olarak %75 oranda primer östrojen-bağımlı bir süreç gösterirken, bu özellik hastalığın ileri döneminde östrojen-bağımsız hale de gelebilmektedir. Östrojen-bağımlılığı ile menopozal dönem arasındaki ilişkiye bakıldığında, kadınlarda yaş grupları içinde en yüksek insidansın östrojen seviyelerinin en düşük olduğu yani postmenopozal dönemde olduğu dikkat çekmektedir. Yapılan birçok çalışmada da yine postmenopozal dönemdeki meme kanserli vakalarda dejenere olmuş dokuda E₂ seviyesi 1.4 pmol/g ile anlamlı olarak 0.06 pmol/ml’lik plazma östrojen seviyesinin üstünde olduğunu göstermişlerdir (Tablo 2.1 ve 2.2).

Tablo 2.1. Pre- ve post-menopozal kadınlarda plazma Östron (E₁), Östradiol (E₂) ve Östron-sülfat (E₁S) konsantrasyonları (pmol/ml).²⁸

	E ₁ (pmol/ml)		E ₂ (pmol/ml)		E ₁ S (pmol/ml)	
	Sağlıklı	Meme kanseri	Sağlıklı	Meme kanseri	Sağlıklı	Meme kanseri
remenopozal						
Foliküler Faz	0.16±0.04	0.19±0.08	0.25±0.07	0.21±0.13	1.86±0.50	3.64±1.17
Lüteal Faz	0.21±0.04	0.21±0.04	0.35±0.08	0.23±0.06	0.17±0.21	3.97±1.88
Postmenopozal						
	0.12±0.04	0.17±0.05	0.04±0.02	0.06±0.03	0.52±0.13	0.37±0.19

Tablo 2.2. Malign meme dokusunda E₁, E₂ ve E₁S konsantrasyonu (pmol/g).^{28,29}

	E ₁ (pmol/ml)	E ₂ (pmol/ml)	E ₁ S (pmol/ml)
Premenopozal	1.40±0.08	1.20±0.60	1.27±0.36
Postmenopozal	1.00±0.15	1.40±0.70	3.35±1.85

Yine yapılan çalışmalarda, intratümöral östradiol seviyesinin pre- ve postmenopozal meme kanseri hastalarında anlamlı bir farklılık göstermediği ve intratümöral östradiol/östron oranının ise postmenopozal meme kanserli dokulara göre premenopozal dönemde yüksek olduğu rapor edilmiştir.³⁰ Menopoz öncesi meme kanserlerinde, dejenere doku ve plazma E₂ konsantrasyonu oranı 5:1 iken, postmenopozal dönem meme kanserlerinde bu oran 23:1 olmaktadır.^{28,31} Morfolojik olarak sağlıklı görünen meme dokusu ile meme kanseri dokusu E₂ konsantrasyonlarının karşılaştırmalarında ise bu oranın meme kanseri dokusunda 2.3 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir.¹⁹ Meme kanserinin yaş insidansı ile östrojen-bağımlılığı arasındaki bu çelişkili ilişki, sağlıklı ve dejenere meme kanseri dokusunun, E₁S ve DHEAS gibi steroid sülfattan östrojen oluşturmak için gerekli enzim donanımını barındırdığı ile açıklanabilmektedir.

2.2.2. Oksidatif Stres

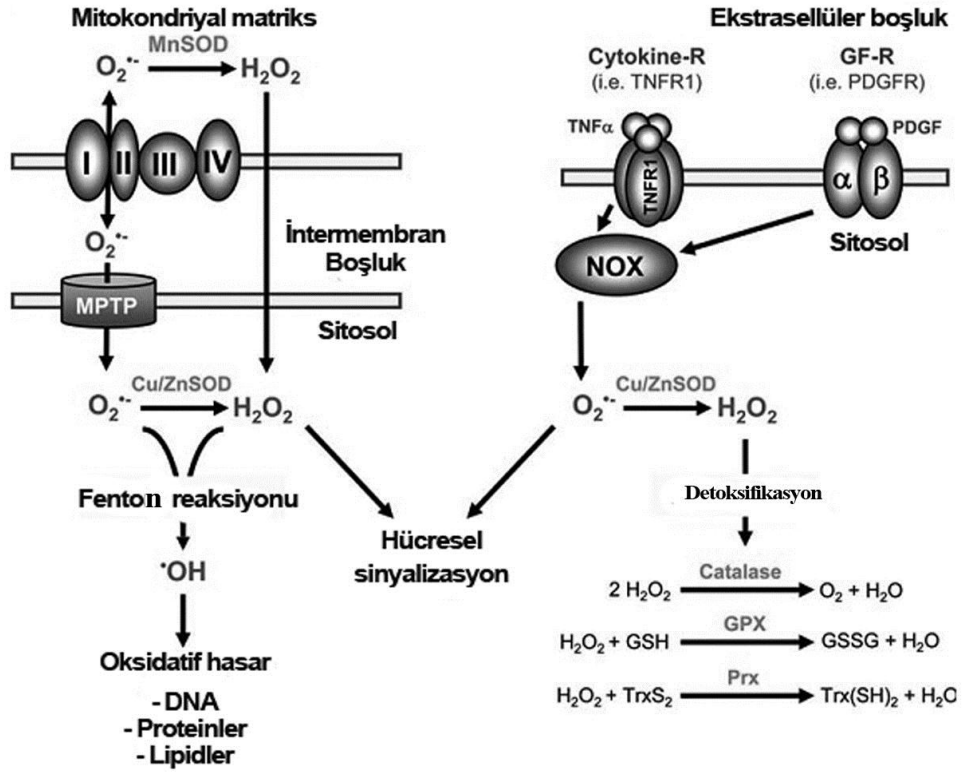
Aerobik organizmalar, sürekli olarak reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılan moleküler oksijenden türetilen reaktif molekülleri üretirler. İyon ya da moleküllerden oluştuğu bilinen ROT'lar çiftleşmemiş elektron yüklerine sahiptirler ve birçok madde ile reaksiyona girebilmektedirler. ROT'lar türüne göre değişen reaktif özelliklere sahip olup, serbest oksijen radikalleri ve radikal olamayan ROT olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Serbest oksijen radikalleri superoksit (O₂^{•-}), hidroksil radikal (•OH), nitrik oksit (NO•), organik radikal (R•), peroksil radikal (ROO•), alkoksil radikal (RO•), tiyol radikal (RS•), sülfonil radikal (ROS•), Tiyol peroksil radikali (RSOO•) ve disülfidler (RSSR)'dir. Radikal olmayanlar ise hidrojen peroksit (H₂O₂), singlet oksijen (¹O₂), ozon/trioksijen (O₃), organik hidroperoksit (ROOH), hipokloridnitrit (ONO⁻), nitrosoperoksikarbonat anyon (ONOOCO₂⁻), nitrokarbonat anyon (O₂NOCO₂⁻),

dinitrojen dioksit (N_2O_2), nitronium (NO_2)'dir. Bunlardan özellikle $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ve $\bullet OH$ 'nin kanser hücrelerinde arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir.³²

Kanser hücrelerinde artan metabolik aktiviteye, mitokondriyal disfonksiyon, peroksizom aktivesi, artan hücrel sinyalizasyon, onkogenik aktivite, oksidaz, siklooksigenazlar, lipoksigenenazlar ve timidine fosforilaz aktivesindeki artış ya da immun sistem hücresindeki artışa bağlı olarak vücutta yüksek miktarda ROT üretimi gerçekleşmektedir.³³⁻³⁵ Mitokondriyonlar hücrenin ATP ihtiyacının karşılanmasından sorumlu bir organelidir. Diğer taraftan mitokondriyonlarda hücrel fonksiyonların kaçınılmaz bir sonucu olarak ROT'da üretilmektedir. Biyolojik sistemlerdeki serbest oksijen radikallerin veya reaktif olan oksijen metabolitlerinin en yaygın kaynağı oksijendir. Bu serbest radikallerin üretildiği bir takım kaynaklar vardır. Bunların en önemlisi hücrede oksijenin suya kadar indirgendiği mitokondrilerdir. Fakat bu sırada moleküler oksijen, süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), H_2O_2 , hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) ve nitrik oksit ($NO^{\bullet}$) gibi aşırı derecede reaktif olan oksijen metabolitlerinin üretimine de neden olmaktadır. Ayrıca mitokondriyonların yanı sıra peroksizomlar da hücrede ROT üretim kaynağıdır. Bu solunum organellerinin içerisinde süperoksit ve H_2O_2 peroksizomal matriks ve peroksizomal membranda ksantin oksidaz aracılığıyla üretilmektedir.

Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) radikalleri elektron taşıma zincirinin bir ürünü olarak ya da mitokondriyal permeabilite geçiş porları aracılığıyla sitozolden mitokondriyal membranın iç yüzeyine salınır. Süperoksidaz NADPH oksidasyonunun aktivasyonu ile de üretilmektedir. Örneğin büyüme faktörleri reseptörleri ya da sitokin reseptör aktivasyonlarına cevaplarda ROT üretilmektedir. Mitokondriyal matriksteki MnSOD enzimi ya da sitozoldeki Cu/ZnSOD enzimi süperoksiti H_2O_2 'ye indirger. Hücrede birkaç antioksidan enzim sistemi [katalaz, glutatyon peroksidaz (GPX) ve preksidoksinler (Prx)] H_2O_2 'yi suya indirgeyerek detoksifikasyonu sağlar. Hem H_2O_2

hem de süperoksit hücreyel sinyalde görev alırlar fakat hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$) oluşur. Bu $\bullet\text{OH}$ fenton reaksiyonunda $\text{O}_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 'den oluşturulur. Bu hidroksil radikalleri de hücrede DNA, protein ve lipitlere zarar verir (Şekil 4).³²



Şekil 2.4. ROT üretimi ve detoksifikasyonu mekanizması.³²

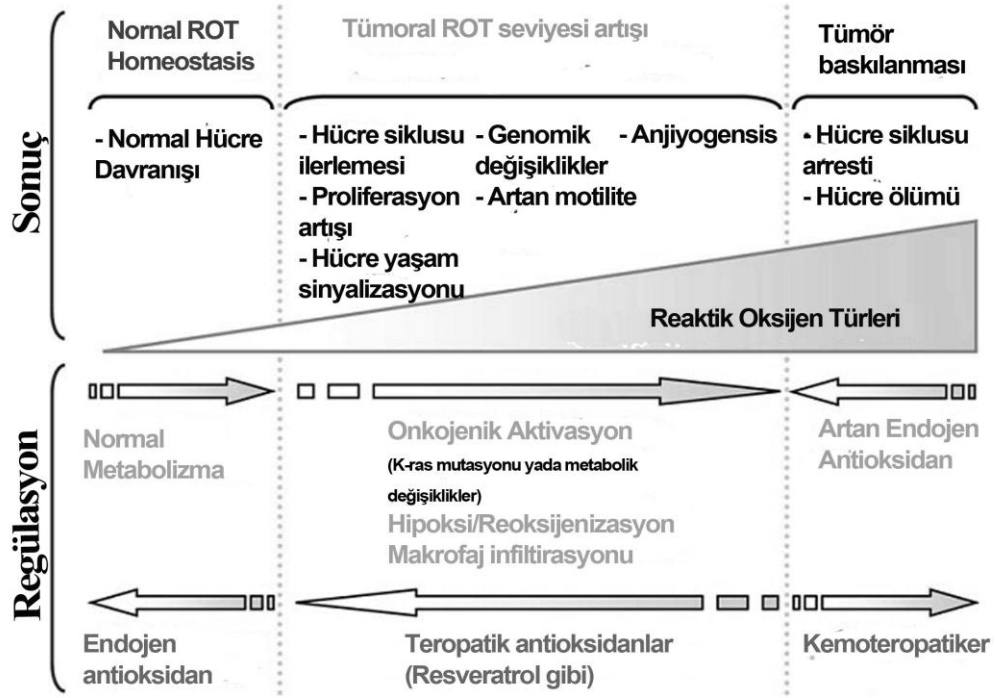
Kanser hücrelerinde ROT artışına sebep olan diğer faktörler ise çeşitli büyüme faktörleri ve artan sitokin aktivasyonudur. Birçok kanser türü, kronik iridasyon, enfeksiyon ya da enflamasyona bağlı olarak ortaya çıkmasının yanı sıra yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde interferon- γ (IFN- γ) ve tümör nekrozis faktor (TNF)- α H $_2$ O $_2$ ve NO seviyelerinin artışıyla da ilişkilendirilmektedir.^{36,37} Makrofajların TNF- α gibi sitokinlerin aktivasyonu üzerinden tümör hücrelerinde ROT üretimini uyardığı, yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.³⁸ Diğer yandan, vücut savunma hücrelerinden nötrofil ve makrofajların kanser hücrelerinin ölümünü uyarmak için ROT ürettiği de bildirilmektedir.³⁹⁻⁴¹ Enflamatuvar süreçte aktive olan makrofaj hücreleri nitrik oksit

 reterek H₂O₂ ile reaksiyona girmesine ve tümör h ccresinin apoptosizine aracılık edebilirler.⁴²

MAPK (mitogen-activated protein kinase)/Erk1/2 (extracellular-regulated kinase 1/2) metabolik yolaklarının kanserli h ccrelerdeki aktivasyonu büyüme faktörleri, K-Ras ve fonksiyonel proliferasyon artışı ile ilişkilidir.^{43,44} örneğin; insan meme kanseri h ccrelerinde Erk1/2 aktivasyonu, östrojen metabolizmasının h ccre proliferasyonunu uyarması ile ortaya çıkan H₂O₂ tarafından uyarılmaktadır.^{45,46} Vücutta kanser h ccrelerinde ROT aracılı Erk1/2 aktivasyonunu uyaran birkaç metabolik yolak (Ras, p90 RSK) bilinmektedir.⁴⁷⁻⁴⁹ Yapılan  alışmalarda, ROT'un aktive ettiği Erk1/2^{45,50,51} kanser h ccrelerinin yaşamını sürdürmelerini kontrol edebilmektedir.^{48,52,53} Diğer taraftan MCF-7 ve MDA-MB-435 gibi meme kanser h ccrelerine uygulanan ekzojen ROT süpürücü ya da baskılayıcı maddeler Erk1/2 ya da MAPK aracılı apoptoz ve h ccre adezyonunu arttırmaktadır.^{54,55} Bu yolla apoptotik aktivite artışının uyarılması kanser tedavilerinde ekzojen antioksidan maddelerin tek başına ve kombine kullanımlarını gündeme getirmiştir. Günümüzde antioksidan ve antikanserojen özellikleri araştırılan üzüm çekirdeği, ginseng, çörekotu, yeşil  ay, Vitamin E, melatonin ve resveratol gibi birçok madde bulunmaktadır.

Onkojenik aktivasyonu da içeren tümörojenik olaylarda (K-Ras mutasyonu gibi) h ccrelerde metabolik değişiklik, makrofaj infiltrasyonu ya da hipoksi/reoksijenizasyon gibi süreçlerde intrasellüler ROT artışı meydana gelmektedir. Tümoral h ccrelerde artan ROT seviyesine bağlı olarak h ccre siklusunun ilerlemesi, proliferasyon artışı ve h ccre yaşamı sinyalizasyonu, artan motilite hızı, genetik değişkenlikler ve artan anjiyogenez gibi durumlar resveratrol gibi terapötik antioksidanlar ile tedavi edilebilmektedir. Sonuç olarak kanser tedavisinde kullanılan aşırı miktarda ROT üretimiyle siklusun

durdurulması ya da hücre ölümünün uyarılması sağlanmaktadır. Ancak bu durum tümör hücrelerindeki endojen antioksidan artışı ile baskılanabilmektedir (Şekil 2.5).^{56,57}



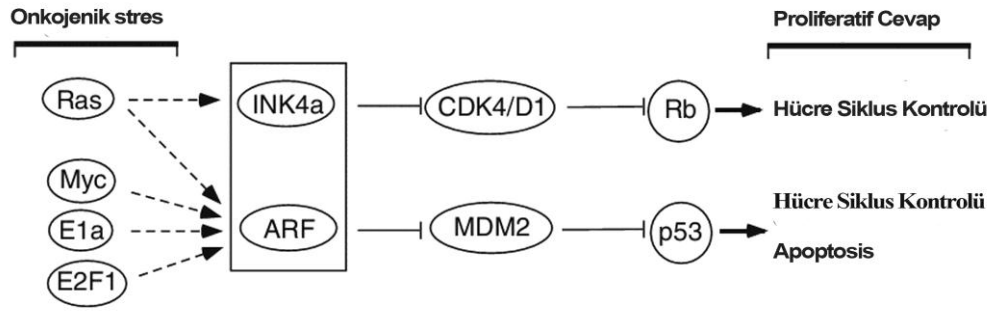
Şekil 2.5. Hücresel ROT etkileri, üretimi ve düzenlenmesi.

2.2.3. Apoptoz

Dokuları oluşturan hücrelerin fizyolojik yaşam süreleri sonucunda ölmelerine apoptoz ya da programlanmış hücre ölümü adı verilir. Bir diğer hücre ölüm türü ise nekroz olarak adlandırılır. Bu hücre ölüm tipleri birbirinden farklı mekanizmalar ve morfolojik değişikliklerle karakterizedir. Nekroz ölümü sonrası hücrede enflamasyon uyarılırken, apoptozda hücre ölümü fizyolojik bir süreç olarak uyarılır ve enflamatuvar yanıt oluşmadan gerçekleşir. Apoptotik süreçte proapoptotik genler olarak da bilinen genler (Bax, Bcl-xS, Bad, Bak, ve Bik) apoptozu uyarırken anti-apoptotik genler (Bcl-2, Bcl-xL, Bag-1, ve Mcl-1) apoptozun baskılanmasını sağlarlar.⁵⁸

Hücre siklusunun baskılanmasında ve apoptoz gibi önemli olayların tetiklenmesinde 17. kromozomda bulunan p53 geni görev alır. Bu gen tümör süpresör özellikle olup kanseröz ya da tümöral olgularda çoğunlukla bir takım mutasyonlar

geçirmektedir.⁵⁹ Bu mutasyonla oluşan mutant p53; hem bir fonksiyon kaybı hem de yeni bir onkojenik özellik kazanmış protein olarak karşımıza çıkabilmektedir.⁶⁰ p53 geni DNA-hasarı,⁶¹ hipoksi,⁶² ışın tedavisi⁶³ ve ısı şoku,^{64,65} gibi pek çok genotoksik stres faktörü aracılığıyla aktive edilebilen bir genidir. Bu aktivasyon, hücrelerde transkripsiyon faktörlerinin artmasına neden olmaktadır. Ayrıca p53 aracılı DNA onarımı, bunun sonucu genom-stabilitesi,⁶⁶ hem anjiyogenezin⁶⁷ hem de tümörde büyümenin inhibisyonu⁶⁸ gibi hücresel değişimde⁶⁹ önemli bir rol oynar. Böylece DNA-hasarı üzerine tepki gösterir ve hasarlı hücrenin apoptoz yolu ile yıkımlanması sağlanır.⁷⁰



Şekil 2.6. Hücre siklusunu düzenleyen proteinlerde oluşan düzensizliklere bağlı olarak hücre proliferasyonu.⁷¹

Hücresel proliferasyonda rol oynayan p16INK4a (INK4a) ve p19ARF olarak adlandırılan 2 metabolik yolak vardır. Bu yolların herhangi birinin inaktivasyonu ile [siklin D1 (D1)'in fazla ekspresyonu, CDK4'de mutasyon ya da pRB (Rb)'de mutasyonu] hücre siklusunda kontrol edilemeyen bir hücre siklusu meydana gelir. Bu metabolik yolların her ikisinin inaktivasyonunda ise tümöröenez uyarılmış olur.

2.3. Antikanserojenik Etkili Maddeler

Enzimatik olan ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi vücut içerisinde ROT'ların zararlı etkilerini en aza indiren sistemdir. Enzimatik olmayan yolda etkili olan vitamin E ve C, flavonoidler, karoten ve bazı küçük moleküllü

bitkisel antioksidanlar görev alırken enzimatik antioksidan savunma sisteminde katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), ve onarıcı enzimler görev almaktadır.⁷² Antioksidan maddeler vücutta bulunan oksijen radikallerini ortamdan süpürerek oksidan miktarını azaltırken, antioksidan enzimlerin aktivasyonunu da katalize ederek serbest radikal ve oksidan maddelerin ortamdan süpürülmesi indirekt olarak sağlanmış olur. Yapılan çalışmalarda, bazı ilaç ve diyetlerin enzimatik antioksidan sistemini uyardığı belirtilmiştir.⁷³ Enzimatik olmayan antioksidanlar daha çok vücudu endojen ve ekzojen oksidan maddelerin öldürücü etkilerinden korumaktadır. Örneğin vücut için gerekli olan ve mikroantioksidanlar olarak bilinen folik asit, vitamin B₁₂ ve B₆, niasin, vitamin C ve E, demir ve çinko gibi maddelerin eksikliğinde radyasyon ya da kimyasal maddelerin DNA üzerinde oluşturduğu hasarların tamiri pek mümkün olamamakta ve bu da tümörögenizde önemli bir rol oynamaktadır.⁷⁴ Kanserojen süreçte birçok antioksidan maddenin tedavi ve koruyucu amaçlı kullanımı gündeme gelmiştir.⁵⁷ Bunlardan en önemlilerinden birisi olan resveratrol güçlü bir antioksidan madde olup, birçok çalışmada antikanserojenik etkileri araştırılmaktadır.⁷⁵⁻⁷⁸

2.3.1. Resveratrol

Geleneksel Çin ve Japon tıbbında *kojo-kon* olarak isimlendirilen resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene), üzüm kabuğunda bulunan bir bileşik olup bitkilerde patojenik ataklara bağlı çevresel stresin olduğu dönemde üretilen fitoaleksinin olarak da bilinir.^{75,79} Fungal hastalıklar, yangısal deri hastalıkları, kalp-damar ve karaciğer hastalıklarında sıklıkla kullanılan resveratrolün özellikle antioksidan, antikanserojen ve fitoöstrojenik özelliklerinden faydalanılmaktadır.^{50,80-83}

Resveratrol, *vitis vinifera*, *labrusca* ve *muscadine* türü üzümlerde çok miktarda (50-100 mikrogram/gram) bulunmasının yanı sıra ökalıptus, alaçam, zambak, dut ve fıstık gibi yiyeceklerde de bulunduğu bildirilmiştir.^{75,80} Resveratrol, fitoaleksinin ve

antibiyotik bileşiklerinin bir sınıfı olup hastalıklara karşı bitki savunma sisteminin bir parçası olarak üretilir.⁷⁵

Resveratrolün trombosit agregasyonunu ve çökmesini engellediği, eicosanoid sentezini değiştirdiği ve lipoprotein mekanizmasının oluşmasında rol aldığı bildirilmiştir.^{78,84-86} Resveratrolün antikanserojenik etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte son zamanlarda yapılan çalışmalara göre, resveratrolün antikanserojen etkisinin apoptozun tetiklenmesi,⁸⁷⁻⁸⁹ karsinogenezin ilerlemesi ya da yükselmesi ve başlangıç evrelerini engellemesi ile olabileceği bildirilmektedir.⁸⁶

Son zamanlarda yapılan birçok çalışmaya göre resveratrol etkili bir antioksidan olup düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve lipid peroksidasyonunu (LPO) baskılar, oksitlenmiş LDL'nin sitotoksitesini önler. Resveratrol yüksek miktarlarda hidrofilik ve lipofilik özellikleriyle diğer iyi bilinen vitamin C ve E gibi antioksidanlardan daha etkili bir maddedir.⁵⁶ Resveratrolün antioksidan ve anti-platalet özellikleri üzerine birçok in vitro ve in vivo çalışma bulunmaktadır.^{78,88,90,91}

2.3.1.2. Resveratrolün Antikanserojenik ve Apoptotik Etkisi

Karsinogenez, genlerde değişikliklerin meydana geldiği ve normal hücresel büyüme süreçlerinin yaşandığı kompleks bir süreçtir.⁹² Karsinogenez sürecinde, tümör süpresör gen olarak da bilinen p53 gen bölgesinde mutasyonlarla sıkça karşılaşmaktadır. p53 geni DNA hasarı durumunda eksprese olarak ya DNA hasarının onarımını sağlar ya da hücrede apoptozun uyarılmasına aracılık etmektedir. Bu gen bölgesinde mutasyonların şekillenmesine bağlı olarak fazla miktarda mutant p53 eksprese edilir. Oysa mutant p53 hücrede ne siklusun kontrol edilebilmesinde ne de apoptozun tetiklenmesine aracılık edebilmektedir.^{93,94} Kimyasal karsinojenlerin etkileri ile kanserli hücre ya da kanserli hücre olmaya hazırlanan hücrelerin oluşumu tetiklenir. Bu hücrelerde klonal artışlarla birlikte normal büyümeyi kontrol eden genlerde

mutasyon gibi değişiklikler de görülebilmektedir.⁹² Mitotik bölünmelerin tetiklenmesiyle yani çok fazla bölünen hücrelerde genetik hasar oluşma riski artmaktadır. Bu gibi durumlarda, organizmada neoplastik gelişime karşı önleyici bir mekanizma olarak apoptoz devreye girmektedir. Hücre ölümünün bu formu genellikle kullanılan kemoterapotik ilaçlar ile desteklenmektedir.^{95,96} Apoptozun baskılanması genotoksik olmayan karsinogeneizde önemli bir rol oynar. Çünkü apoptotik sürecin bozulduğu ya da genetik hasar ile devre dışı kaldığı hücrelerin büyümeye devam etmesi ve yaşamını sürdürmesi ile malignant süreç başlamış olur. Bir çalışmada, C3H-10T1/2 hücre kültürlerinin tümörü ilerleten phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), akut serum türevleri ya da düşük enerjili β -radyasyon ve iyonize radyasyona maruziyetle apoptozun baskılandığı belirlenmiştir.⁹⁷ Kronik lenfositik lösemili hücrelerin tümör ilerleten faktör olan TPA ile tedavisinde ilaveten kolşisin, etoposide ve etilprednisol gibi çeşitli sitümölanlar da ilave edilmiştir. Bu maddelerin uygulanması neticesinde kronik lenfositik lösemili hücrelerde apoptozun indüklenmesinin yanı sıra bu hücrelerin kendiliğinden apoptoza uğramaları önemli oranda baskılanmıştır.⁹⁸ Hücrede normal p53 fonksiyonu, apoptozun görevini tamamlaması açısından ve insanlarda tümör gelişiminin önlenmesinde oldukça büyük öneme sahiptir.^{88,99} Farelerde yapılan bir çalışmada, kronik ışınlamaların, timosit ve intestinal kript hücrelerinin apoptozunda p53 fonksiyonunu baskıladığı tespit edilmiştir.^{89,100} Böylece, p53 eksikliğinde normal apoptotik süreçten kaçınılarak genetik zarar görmüş hücre miktarında artış meydana gelmiştir. Yine farelerde yapılan çalışmalarda, tümör destekleyicilerin potansiyel mutasyona uğrayan hücreleri apoptozdan koruyarak neoplastik klonlarla ya da preneoplastik süreçle bunların çoğalmalarına izin verdiği ve karsinogenezi tetiklediği belirlenmiştir.^{101, 102}

JB6 epidermal hücreleri, insan promyelosit lösemi HL-60 hücreleri, çeşitli kolon kanser hücre hatları, insan meme kanser hücre hatları ve insan prostat kanser hücrelerini kapsayan birçok çalışmada da resveratrol ile apoptoz oluşturulduğu bildirilmiştir.^{82,87,89} JB6 hücrelerinde resveratrolün bir takım metabolik yolların [2,3-40 µM bir doz aralığında TPA ya da epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi] aktivasyonunu sağlayarak tümöral hücre dönüşümünü uyarmadığı belirlenmiştir.⁷⁷ Yapılan bazı çalışmalarda, aynı dozda uygulanan resveratrolün tümöral hücrelerde seramid-sfingomiyelinaz bağımsız yolu kullanarak apoptozu uyardığı bildirilmektedir. Seramid-sfingomiyelinaz, yolu tümör nekroz faktör (TNF)-α, interferon ya da γ-iyonize-radyasyonla indüklenen hücrelerde, apoptozun uyarımı bu yaygın yola ihtiyaç duymaktadırlar. Bir diğer taraftan kimyasal terapotiklerin birçoğunun etki mekanizmalarında apoptoz vardır. Bu ajanlar retinoik asit, perilil alkol, aspirin, sulindak, sulindak sefon, glukokortikoid, querattin, d-limonen, feniletil-3-metilcafeate, fotosentetik elektron taşıma zinciri (PETC), epigallokatekin gallat (EGCG) ve çayda bulunan diğer kimyasallar, curcumin, N-(4-hidroksifenil) retinamid (HDR) ve diğer retinoidler.¹⁰³

2.3.1.3. Resveratrol ile İndüklenen Apoptozda p53'ün Rolü

p53 geni tümör baskılayan genlerin en önemlilerinden birisi olup, bu gen bölgesinde görülen mutasyonlar insan kanserlerinin yarısından fazlasında karşılaşılan bir durumdur. Resveratrolün p53-bağımlı kopyalama (transkripsiyonal) aktivasyonunu tetiklediği belirtilmiştir.⁷⁷ Fibroblast hücrelerinde apoptozun resveratrol ile indüklenmesi p53 aracılı gerçekleşmektedir.¹⁰⁴ Fakat bazı kanser hücrelerinde resveratrolün p53'den bağımsız bir şekilde apoptozu indüklediği tespit edilmiştir.^{104, 105} Bu değişiklikler göstermiştir ki, apoptotik aktivitenin resveratrol ile uyarılması hücre tipine bağlıdır.

Tümör oluşumu araştırmalarında sık kullanılan hücre hatlarından birisi fare JB6 epidermal hücre hattıdır.^{106, 107} Bu hücre hatlarında resveratrol aracılı p53 ekspresyonu artarak, hücrelerin değişimine sebep olan tümör ön maddelerin salgılanmasının baskılandığı ve hücrede apoptozun uyarıldığı bildirilmiştir.⁷⁷ Diğer taraftan, resveratrolün c-Jun NH2-terminal kinase (JNKs) aktivasyonunu da tetiklediği belirlenmiştir. Jnk1 ya da Jnk2 genlerinin hücrede bozulması veya Jnk1 dominant mutasyonu apoptozun başlamasını önlerken bu tür durumlarda p53 bağımlı transkripsiyon aktivasyonunun resveratrol ile indüklenmesi önemli oranda baskılanmıştır. Ayrıca resveratrolün aktive ettiği Jnk'ların in vitro ortamda p53'ü fosforladığı da tespit edilmiştir. Aktivite olan Jnk1 ya da Jnk2 (Jnk1-/- or Jnk2-/-) genleri ise hücrelerinin yıkımına neden olan dominant negatif mutasyonu baskılar. Ayrıca resveratrol uygulaması ile Erk'ler, p38 kinaz ve Jnk metabolik yolları apoptotik süreçte p53'ün resveratrol ile indüklenen aktivasyonunun aracıları gibi davranırlar, bunun da p53'ün fosforlanmasıyla kısmen meydana geldiğini belirlenmiştir.⁸⁸

Kanserin önlenmesi için daha etkili ajanların gelişimi açısından ve resveratrolün kemoprofilaktik özelliklerini daha iyi anlayabilmek için temel mekanizmayı iyi bilmek gerekir, resveratrolün 3,5,3',4'-tetrahydroxy-trans-stilbene (RSVL-1) ve 3,5,3',4',5'-phentahydroxy-trans-stilbene (RSVL-2) olarak bilinen 2 türevi sentezlenmektedir. Fare JB6 epidermal hücre hattı kullanılarak anti-tümör aktivitesi ve yapısının araştırıldığı birçok çalışmada, resveratrolün anti-tümör aktivitesi yapısal analogu olan RSVL-2 ile karşılaştırıldığında, aynı konsantrasyon dizisi içerisinde EGF metabolik yolağı ile hücre dönüşümünü üzerinde daha fazla potansiyel baskılayıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Özellikle düşük konsantrasyondaki (10 µM) RSVL-2, hücre dönüşümünün baskılanmasında ve tamamen durdurulmasında resveratrol'den daha fazla

etkili olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında diğer yapısal analogu olan 10 µM konsantrasyondaki RSVL-1'in etkisi önemli oranda azalır ve resveratrol ile karşılaştırıldığında 20-40 µM konsantrasyondaki etkisi daha düşük düzeyde hücre dönüşümünü baskılar. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, resveratrol türevlerinin, resveratrolün EGF metabolik yolağı ile hücre dönüşümünde daha fazla potansiyel baskılayıcı etkiye sahip olduğu görölmektedir. Fakat normal hücreler üzerinde sitotoksik etkisi yoktur. Bu bileşikler, resveratrol ile karşılaştırıldığında anti-tümör etkisini fosfatidilinositol-3 (PI-3) kinaz üzerinden gerçekleştirebileceğı düşünölmektedir.

Yapılan birçok çalışmalarda resveratrolün kardiovasküler hastalıklardan ve kanserden korunmada yardımcı olduğu gösterilmiştir. Fakat popölasyon düzeyinde kullanımının tavsiye edilebilmesi için birçok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Resveratrolün geçişi ve emilimi, metabolik ürünlerinin tanınması ya da karaciğer üzerindeki etkileri hakkında çok az şey bilinmektedir.⁸¹ Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada resveratrolün bağırsaktan emildiğı, karaciğer ve kalp dokusuna affinite gösterdiğı rapor edilmiştir.^{90,108} Resveratrolün meme karsinomlarının terapilerindeki gibi faydaları kanıtlanmış olsa bile kullanımı önemli derecede kısıtlıdır. Diğer taraftan toksik olmayan doğıal maddelerin kullanımı ile karsinogenezin kemoproflaksisi insan kanserinin kontrolü için alternatif bir tedavi olarak değıerlendirilebilir. Son yıllarda, doğıal ürünlerin deneysel karsinogenezin önlenmesinde koruyucu etkiye sahip olduğunu gösterir ilgili çalışmalar belirtilmektedir. Resveratrol kanserin önlenmesinde çeşitli sistemleri etkileyerek siklooksijenaz (COX) -1 ve 2'i baskıladığı ve kemoprofilaktik etki gösterdiğı bildirilmiştir.¹⁰⁹ Yapılan bazı çalışmalarda hücre geçişindeki S-G₂ ya da G₁ fazında hücre siklusunun durmasına neden olduđu¹¹⁰ ya da çeşitli kanser hücresi hatlarında apoptozu tetiklediğı bildirilmiştir.^{82,88} Fakat antikanserojenik mekanizma tam

olarak ortaya konmamıştır. Son zamanlarda resveratrolün anti-kanserojenik etkisini apoptozun başlaması ve ERKs ve p38 kinaz aracılı p53 aktivasyonu aracılığıyla muhtemel bir moleküler mekanizma üzerinden oluşturduğu düşünülmektedir.^{4,77} Resveratrolün mekanizması ve aktivitesinin daha iyi anlaşılabilmesi ve herşeyden önemlisi anti-kanserojen bir ajan olarak kullanılabilmesi için yeni çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hücre Kültürü

3.1.1. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanışı

- 75 ml hazır amniyon hücre kültürü mediyumu (Bio-ANF-1)
- 15 ml suplament (Bio-ANF-1, 01-192-1)
- 1.5 ml Penisilin+Streptomisin+Amfoterisin B
- 2 ml L-glutamin

Maddeleri eklenerek kullanıma hazır hücre kültür medyumu elde edildi.

3.1.2. Hücre İnkübasyon Koşulları

Parental MCF7 monolayer hücre kültürü (4. pasaj) Tarım Bakanlığı Şap Enstitüsünden (Ankara) temin edildi. Hazır amniyon kültür hücresi mediyumu (BioANF-1, 01-190-1) içerisinde %5 CO₂ 37 °C'e sıcaklıktaki etüvde (Nuair) 25 cm²'lik flasklarda steril şartlarda inkübe edilerek hücrelerin çoğalması sağlandı.

3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması (Subculturing)

Üremekte olan hücre pasajları %80-90 doygunluğa (confluent) ulaşınca hücreler yeniden pasajlandı.¹¹¹ Bu amaçla üremekte olan hücreler istenen çoğunluğa ulaştığında;

- Üzerlerindeki besi yeri pipetle alınarak steril fostat tampon solüsyonu (PBS) (25 cm² için 2 ml) ile yıkandı.
- PBS pipetle uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin kaldırılması için 3 ml tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilerek etüvde 10 dk bekletildi.
- Tüm yüzeye yapışık hücrelerin kaldırılmasının ardından süspansiyon halindeki hücre tripsin-EDTA solüsyonu 15 ml hacimli bir tüp içerisine alınarak üzerine tripsinin inhibisyonu için tripsin hacminin 2 katı medyum eklendi.

- Tüpe alınan süspansiyon 1300 rpm de 10 dk santrifüj edilerek tripsin-EDTA solüsyonu uzaklaştırıldı ve hücreler taze hücre medyumuna ile süspanse edilerek 3 adet 25 cm²'lik flaska bölünerek yeniden pasajlandı.
- Yeniden pasajlanan hücreler 37 °C' de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.

3.1.4. Hücre Dondurma ve Saklanması

- Tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırılan hücreler santrifüj edildi ve tripsin besi yerinden uzaklaştırıldı. Sonra hücre pelleti 1 ml besi yeri ile sulandırılarak sayıldı.
- Tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besi yeriyle inhibe edildi.
- Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilip bir falkon tüpe aktarıldı. Üzerine 2-3 ml daha medyum ilave edildi.
- Hücre süspansiyonu santrifüjlenerek (1300 rpm 10 dakika), süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pelet 900 µl hücre medyumuna ile sulandırılarak sayıldı.
- Dondurma tüpleri içerisine 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO) ve 900 µl hücre medyumuna ile süspanse edilen hücre solüsyonu eklendi.
- Tüpler dondurma kabına yerleştirilerek - 80 °C'de derin dondurucuda gerektiğinde anızlilerin tekrarı için hücre hattı saklandı.

3.1.5. Hücre Sayılarının Hesaplanması

1 ml kültür medyumunda sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak ependorf tüpe kondu ve üzerine 90 µl tripan blue boyası eklenerek karıştırıldı. Bu karışım Neubauer lamı üzerine konularak 5 bölmedeki hücreler sayıldı, daha sonra bulunan bu sayı sulandırma miktarı x50.000 sayısı ile çarpıldı. Sonuç olarak 1 ml medyumda kaç milyon hücre olduğu bulundu. Böylece ekim yapılacak sayı belirlenip

hücrelerin petriye ekimleri yapıldı. 100 mm'lik kültür petrisine 5×10^6 hücre ve 96 kuyucuklu kültür plağının her kuyucuğuna 5000 hücre transfer edildi.

3.2. Resveratrol Dozunun Belirlenmesi

Resveratrol uygulaması için uygun dozun belirlenmesi amacıyla 96 kuyucuklu plağa eşit sayıda konulan hücreler; hücre kontrol, medyum kontrol, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120 ve 140 μM konsantrasyonlarda resveratrol hücre medyumlarına katılarak hücreler inkübe edildi. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin ardından 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid, sarı tetrazol (MTT) analiz yöntemi ile hücre viabilitesi (sitotoksosite durumu) değerlendirildi.

3.3. Hücre Proliferasyon Analizi

MTT yöntemi

MTT analizi, formazon boyalarının ya da MTT azalmasına bağlı olarak enzimatik aktivitenin kolorimetrik ölçümüne dayanan hücre çoğalma miktarının tespit edildiği yöntemdir. Bu yöntemle kullanılacak olan herhangi bir terapotik ajanın hücre üzerindeki sitotoksik ya da proliferatif etkileri belirlenebilmektedir.

Resveratrolün MCF-7 hücre hattı üzerindeki olası sitotoksik etkileri MTT kiti ile üretici firmanın (Sigma Co. Germany) kullanım talimatına göre uygulandı. Yöntem MTT ajanı ile inkübe edilen hücrelerde meydana gelen renk değişiminin kolorimetrik olarak belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Oluşan renk değişikliği sarı ile renklendirilmiş formazon tuzlarının aktif hücre mitokondrilerinde tetrazolyum tuzu azalmasıyla oluşmaktadır. Bu bileşiklerin absorbans değeri metabolik olarak aktivitelerinin belirlenebilmesi açısından orantılıdır.

Yapılış yöntemi;

MTT yönteminin uygulamasından 1 gün önce 96'lık plak içerisine sayımı yapılan 5000 hücre (5000/kuyu) ile 100 μl medyum hazırlanarak kuyulara ekimi

yapıldı. Mikroplak 24 saat 37°C ve %5 CO₂ ayarlı inkübatörde bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlandı. Bu yolla tripsin enziminin hücre membran proteinleri ve büyüme faktör reseptörleri üzerinde oluşturduğu zararlar ortadan kaldırılmış oldu. Bu protein ve faktörlerin yeniden sentezlenebilmesi için 24 saatlik bir süreye ihtiyaç duyulmaktadır.¹¹² Aynı zamanda bu yolla medyum içerisindeki terapotik ajanların hücreyle muamelesinden önce hücrelerin metabolik aktivite kazanması sağlanır.

24 saatlik inkübasyondan sonra seri dilusyonlar halinde hazırlanan resveratrol maddesi seriler halinde gruplara bölünen hücre hattı medyumuna ilave edildi (100 µl olan medyum ve hücre karışımı üzerine 100 µl içerisinde dilusyonu yapılan ve konsantrasyonu ayarlanan resveratrol eklendi). A serinin birinci sütunu hücre kontrol ve A serisinin ikinci sütunu medyum kontrol olarak ayarlandı.

Resveratrol uygulanan hücre hatlarına 24 ve 48 saat süreli inkübasyonlardan sonra MTT yöntemi uygulandı. Bu yöntem analizine başlanmadan önce 96'lık plaklarda bulunan medyumun 100 µl'si total antioksidan ve total oksidan miktarlarının belirlenmesi amacıyla başka bir 96'lık plak gruplar karışmayacak şekilde aktarıldı ve MTT analizine başlandı.

MTT analizi;

1- Doksan altılık plak kuyucuklarında bulunan 100 µl medyum ve hücre karışımı üzerine, hazırlanmış tiazolil mavi tetrazolium bromid solüsyonundan 10 µl ilave edildi. Bu solüsyon ilavesini takiben 96'lık plak inkübatöre alınarak 3 saat beklenildi.

2- Üç saatlik inkübasyonun ardından hücrelerin yüzeyinde bulunan medyum bir pipet ile alınarak MTT çözücü solüsyonundan 100 µl ilave edilip 20 dk inkübatörde bekletildi.

3- İnkübasyonu yapılan hücrelerin, mikropalak okuyucu spektrofotometre (μ -Quant, BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA) ile 570 nm absorbans değerinde ölçümleri 3 tekrarlı olarak yapıldı.

Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre viabilite eğrisi belirlenerek %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değeri logaritmik eğim grafiği ile hesaplandı.

3.4. Biyokimyasal TAS ve TOS Analizleri

TOS yöntemi;

1- Standart 2 solüsyonundan 50 μ l alınarak bir falkon tüpü içerisine konuldu. Bunun üzerine 10 ml deiyonize su ilave edildi.

2- Buradan da 50 μ l alınarak 10 ml deiyonize su ile dilue edildi. Böylece günlük çalışma standardının son konsantrasyonu 20 μ M H₂O₂ şeklinde ayarlanmış oldu.

3- Reagent 1'den 500 μ l ve hücre medyumundan 75 μ l alınarak plak üzerine eklendi. Hafifçe çalkalanarak boş kuyucuklara standart eklendi ve μ -Quant mikropalak okuyucuda 530 nm absorbans değerinde okutuldu. Bu ilk absorbans olarak kabul edildi.

4- Daha sonra Reagent 2'den 25 μ l alınarak plak üzerine ilave edildi. 5 dakika 37 °C'de inkübatörde bekletildikten sonra, 530 nm absorbansta mikropalak okuyucuda okutuldu. ıkan değer aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\text{Sonuç} = (\Delta \text{Absorb Örne} / \Delta \text{Absorb Standard 2}) \times 20 (\text{Standard 2 değeri})$$

$$\Delta \text{Örne Absorb} = (\text{Örne ikinci Absorb} - \text{ilk örne Absorb})$$

$$\Delta \text{Absorb Standard 2} = (\text{İkinci Absorb Standard 2} - \text{ilk Absorb Standard 2})$$

TAS yöntemi;

1- 500 μ l Reagent 1'den alınarak plağa konuldu. Üzerine 30 μ l standart ve numuneden eklenerek mikropalak okuyucu ile 660 nm absorbans değerinde okutuldu.

2- Daha sonra 75 µl reagent 2'den ilave edilerek 5 dakika 37 °C ortamında inkübatörde bekletildi ve 660 nm absorbans değerinde okutuldu.

3- Boş 3 kuyucuğa standart 1 ve boş 3 kuyucuğa standart 2'den ilave edilerek aynı absorbans değeri ile okutuldu. Çıkan değerler aşağıdaki formül ile hesaplanarak elde edilen son konsantrasyondaki çalışma standardı 20 µM H₂O₂ günlük çalışma solüsyonu şeklinde elde edilmiş oldu.

4- Sonuçlar mikropalak okuyucu'da 660 nm absorbans değeri ile okutuldu ve sonuçlar mmol Trolox Equiv/L olarak ifade edildi.

$$\text{Sonuç} = [(\Delta\text{Absorb Standard 1}) - (\Delta\text{Absorb Örnek})] / [(\Delta\text{Abs Standard 1}) - (\Delta\text{Abs Standard 2})]$$

$$\text{Sonuç} = \Delta\text{Absorb Standard 1} = (\text{İkinci Absorb Standard 1} - \text{ilk Absorb Standard 1})$$

$$\Delta\text{Absorb Standard 2} = (\text{İkinci Absorb Standard 2} - \text{ilk Absorb Standard 2})$$

$$\Delta\text{Örnek Absorb} = (\text{İkinci Absorb örnek} - \text{ilk örnek Absorb})$$

3.5. İmmüsitokimyasal (ICC) Boyama Metodu

Hücrelerin lamda üretilmesi

i. Poly-L-lysine kaplı lamalar (Thermo Fisher Scientific, USA) Lamlar, 10 cm çapındaki petri kutularına hücre ekimi yapılmadan önce yerleştirilerek class II tip biyogüvenlik kabini içerisinde 4 saat süreyle ultraviyole ışık altında sterilize edildi.

ii. 25 cm²'lik flasklarda çoğaltılan hücrelerden, UV ışık altında steril edilen petrilere herbir petri içerisindeki lamların üst yüzeylerine eşit miktarda (100 µL medyumda süspanse yaklaşık 5000) hücre gelecek şekilde ekim yapıldı.

iii. Lam üzerine hücrelerin yapışmasını takiben (ortalama 24 saat sonra), petrilere gruplara ayrıldı ve resveratrol uygulanacak olan grupların petrilere çeşitli

konsantrasyonlarda resveratrol eklenirken, kontrol grubundakilere aynı miktarda kültür medyumunu konuldu.

v. İnkübasyon sürelerinin bitimini takiben (24 ve 48 saat sonra) petri içindeki medyum pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve fosfat tampon solüsyonu (PBS) eklenerek hücre yıkama işlemi yapıldı.

Fiksasyon;

1. PBS ile yıkanan ve lam üzerinde yapışık bulunan hücreler petrilere çıkarılarak -20 °C’de soğutulmuş metanol içerisinde 10 dakika tespit edildi.

2. Tespit edilen lamlar PBS ile yıkandı kurutuldu ve boyama prosedürüne başlanıncaya kadar -20 °C’de saklandı.

ICC boyama;

- Boyama işlemine alınacak lamlar derin dondurucudan çıkarılarak oda ısısına gelinceye kadar bir süre bekletildi ve takiben PBS ile yıkandı.

- Endojen peroksitlerin bloklanması için %3’lük H₂O₂ solüsyonunda 10 dk bekletildi.

- Daha sonra 5 dk süre ile 3 kez PBS solüsyonuyla yıkandı.

- Permeabilizasyon için (intraseküller protein tespiti için oldukça önemlidir); lamlar %0.1Triton X-100-PBS solüsyonunda 10 dk bekletildi.

- Lamlar 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra %1 BSA – PBS (bloklama) solüsyonunda 30 dk bekletilerek non-spesifik bağlanmaların önüne geçildi.

- Daha sonra %1 BSA – PBS solüsyonu ile sulandırılan primer antikorda (p53, Mouse monoklonal, ab1101) 37 °C’de 1 saat nemlendirici kabinde bekletildi.

- Lamlar üzerindeki primer antikor solüsyonu lamı eğip kenarından döküldükten sonra, PBS solüsyonu ile her biri 5 dk olmak üzere 3 kez yıkandıktan sonra

üzerine sekonder antikör solüsyonu ile 1 saat boyunca nemlendiricili kabin içerisinde inkübe edildi.

- Sekonder antikör lamaların üzerinden uzaklaştırıldıktan sonra, her biri 5'er dk olacak şekilde PBS ile 3 kez yıkandı.
- Lamalar üzerine Horseradish peroksidaz (HRP) konjugeli streptavidin biotin ile 30 dk inkübe edildi.
- Streptavidin biotin solüsyonu lamalardan uzaklaştırıldıktan sonra 3 kez 5 dk süreli PBS ile yıkandı.
- Çekirdek boyaması için Harris'in Hematoksilen solüsyonunda 5 dk bekletildikten sonra dereceli alkol ve ksilol serilerinden geçirilip entellan (Merck, Germany) ile kapatıldı.

3.6. İmmunfloresan Boyama Metodu

- -20 °C'de saklanan lamalar oda ısısında bekletildikten sonra PBS ile yıkandı.
- Permeabilizasyon için; lamalar %0.25 Triton X-100- PBS solüsyonunda 10 dk bekletildi.
- Lamalar 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra %1 BSA – PBS (bloklama) solüsyonunda 30 dk bekletilerek non-spesifik bağlanmaların önüne geçildi.
- Daha sonra %1 BSA – PBS solüsyonu ile sulandırılan primer antikorda (Bax, Mouse monoclonal, ab5714) 4 °C'de 1 gece nemli bir kap içerisinde buzdolabında bekletildi.
- Lamaların üzerindeki solüsyon dökülerek 3 kez PBS solüsyonu ile 5 dk yıkandıktan sonra floresan izotiosiyanat (FITC) konjugeli sekonder antikör solüsyonunda 30 dk bekletildi.
- Lamalar üzerindeki sekonder antikör dökülerek PBS ile 5'er dk boyunca 3 kez yıkandı.

- Çekirdek boyaması için hücreler DNA boyası (DAPI, ab104139, Abcam, Germany) içerikli kapatma solüsyonuyla kapatılarak 1 saat +4 °C’de bekletilip floresan mikroskopta incelendi.

3.7. İmmüsitokimyasal Değerlendirme

İmmüsitokimyasal boyama sonuçlarının gruplar arası kıyaslamalarını yapabilmek için “Stereolojik Optic Fractionator Frame” metodu kullanıldı. Bu analizler stereoloji workstation sistemi (BioPrecision MAC 5000 controller system) ve stereoloji software (Stereo Investigator version 9.0, Microbrightfield, Colchester, VT) ataçmanlı ışık mikroskop (Leica DM4000 B, Tokyo, Japan) altında yapıldı.^{113,114}

Çalışmamızda MCF-7 hücre preparatları üzerinde p53 immün pozitifliği “Unbiased Counting Frame and Fractionator” metodu^{112,113} kullanılarak tüm gruplara ait herbir preparattaki pozitif hücre yoğunluğu aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Şekil 3.1):

$$PHY = PHS / (ÇA \times ÇS),$$

PHY; μm^2 alana düşen pozitif hücre yoğunluğu, PHS; pozitif hücre sayısı, ÇA; çerçeve alanı (μm^2) ve ÇS; çerçeve sayısı.

Elde edilen veriler herbir grup için iki tekrarlı ölçüme dayanmakta olup, her gruptan 4 paralel prerarat boyandı.

Yukarıdaki skorların bulgu ve tartışmada ifade edilmesinde düşük: +, orta: ++, yoğun: +++ ve çok yoğun: ++++ olarak değerlendirildi.

3.9. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PCR)

Analizleri

3.9.1. mRNA Ekstraksiyonu

- 1- +4 °C de çözölen hücre ve medyum karışımı ependorf tüplere aktarıldı. 450 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 2- Pelet medyumdan ayrıldı, üzerine 600 µl RLT buffer (lisis buffer) 600 µl %70 lik alkol eklendi. (Yaklaşık 1200 µl olan solüsyonun önce 700 µl si sonra kalan kısmı santrifüjlendi).
- 3- Alınan 700 µl spin columna aktarıldı. 8000 g'de 15 saniye santrifüjlendi. Dibe çöken sıvı dököldü. Üstteki filtre almak istediğimiz RNA yı bağlayan kısım. Solüsyonun geri kalanı tekrar aynı spin columna dököldü ve 8000 g'de 15 saniye santrifüjlendi. Dibe akan sıvı dököldü, üstteki filtre de RNA toplanmış oldu.
- 4- RNA artık spin columna bağlandı. Bu işlemde sonra yıkama işlemine geçildi. Bunun için spin columna 700 µl RW1 konulup 8000 g'de 15 saniye santrifüjlendi. Dibi dököldü.
- 5- Sonra 500 µl RPE konulup 8000 g'de 15 saniye santrifüjlendi.
- 6- Tekrar 500 µl RPE konulup 8000 g'de 2 dakika santrifüjlendi. Dibi dököldü kalanı 13000 g'de 2 dakika santrifüjlendi.
- 7- Spin column ters çevrilip ısıtıcının üzerine bırakılarak alkolün tamamen uzaklaşması sağlandı.
- 8- Spin columnlar yeni tüplere yerleştirilip üzerlerine 50 µl elution konulup yine ısıtıcıya konuldu. 1 dakika böyle bekledikten sonra 8000 g'de 1 dakika

santrifüjlendi. Böylece RNA alttaki toplama tüpüne geçmiş oldu. Spin column da atıldı.

3.9.2. cDNA (Komplementer Zincir) Sentezlenmesi

RNA izolasyonundan sonra kültüre edilmiş doku hücrelerinden elde edilen total RNA miktarları spektrofotometre kullanılarak 260/280 nm oranına göre hesaplandı ve sonuçlar ng/μl olarak bulundu. Tek zincirli total RNA zincirleri kullanılarak tamamlayıcı zincirleri (complementary), “QuantiTec® Reverse Transcriptase Kit Qiagen, Germany” ile sentezlendi ve cDNA yapılarına dönüştürüldü. İşlem, kit üreticisi firmanın kullanım kılavuzunda gösterdiği basamaklar izlenerek yapıldı. Evvelce derin dondurucudan (-20°C) çıkarılarak buz kabı içerisinde erimeye bırakılan kit içeriğinin yanına izole edilmiş RNA örnekleri de kondu ve kit içeriği ile RNA örneklerinin aynı sıcaklığa gelmeleri için 10 dakika beklendi. Her bir örnek için kit içeriğindeki “gDNA Wipeout buffer, X 7”den 2 μl, “template RNA”dan 1 μl ve kit içeriğindeki “RNase-free” sudan 11 μl’lik hacimler 200 μl’lik PCR tüplerine konarak pipetleme yoluyla iyice karıştırıldı. Her bir örnek için ayrı ayrı hazırlanan tüpler sıcaklığı 42°C’a getirilmiş ısı bloğuna konarak 10 dakika süreyle bekletildi. Bu aşamada örneklerden elde edilen total RNA’nın içerisinde yer alan genomik DNA yapıları uzaklaştırıldı. 10 dakikalık ısı bloğundaki inkübasyonu takiben örnekler hemen buz kabına aktarılarak reaksiyonun sonlandırılması sağlandı. Bu aşamayı takiben cDNA oluşturulması basamağına geçildi. Buz kabında bekletilen kit içeriği, aşağıdaki tabloda her bir örnek için belirtilen hacimlerde yeni bir 200 μl’lik PCR tüpü içerisinde hazırlandı.

Hazırlanan örnekler cDNA reaksiyonu için “Rotor Gene Q” PCR cihazına konarak, 42°C’da 15 dakika ve 95 °C’da 3 dakika inkübe edilerek cDNA’lar sentezlendi.

Tablo 3.1. cDNA sentezinde kullanılan kimyasallar.

Reverse-transcription master mix	1 µl
Quantiscript RT-Buffer, 5X	4 µl
RT Primer mix	1 µl
Template RNA (bir önceki basamakta elde edilen)	14 µl
Toplam	20 µl

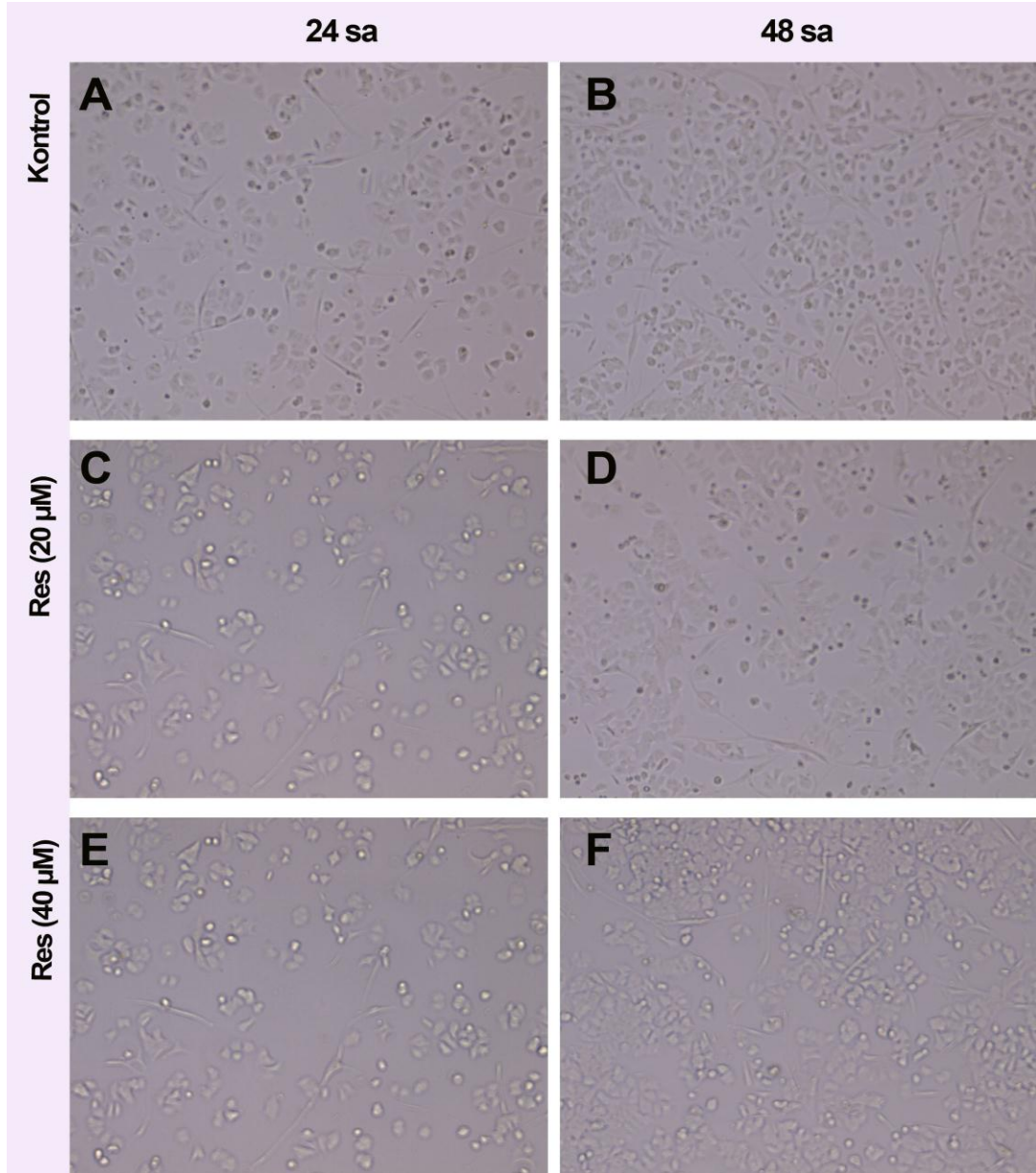
3.9.3. p53 Gen Ekspresyonunun Yarı Kantitatif Olarak Ölçülmesi

p53 ve Aktin proteinleri kodlayan mRNA'ların kantitatif olarak ölçülmeleri için "QuantiTec® Primer Assay, Qiagen kits for SYBR® Green-based real-time PCR" kitleri kullanıldı. p53 çalışması için QT00060235, internal kontrol ve sanal standart eğim hesaplaması için kullanılan aktin protein için QT01680476 katalog numaralı ürünler kullanıldı. Yapılan PCR amplifikasyonu üretici firmanın belirttiği protokollere uygun olarak "Rotor Gene Q" PCR cihazı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Etkin Dozun Belirlenmesi

MCF-7 hücre hattı üzerine en etkili dozun belirlenmesi amacıyla MTT yöntemiyle resveratrol konsantrasyonları uygulanarak hücre yoğunluğu belirlendi. Ayrıca hücre proliferasyonu flasklara ekilen hücreler gözlemlenerek resimleri çekildi (Şekil 4.1).



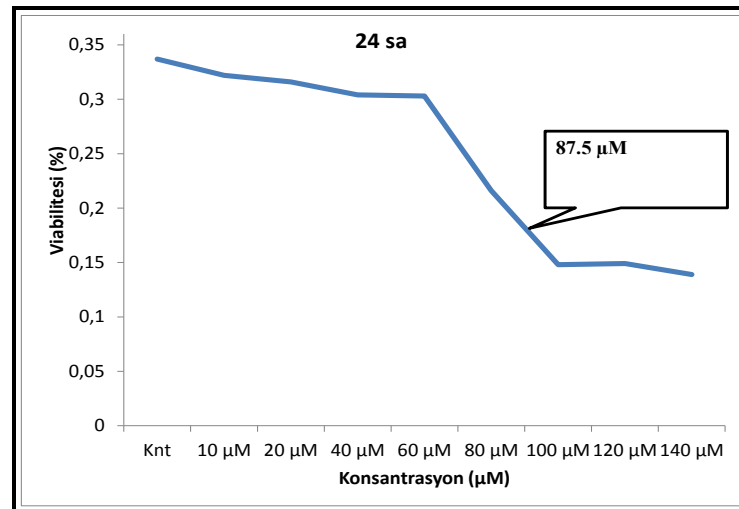
Şekil 4.1. 24 ve 48 saat periyotlu MCF-7 hücrelerine resveratrol uygulanan ve resveratrol tedavisi yapılmayan gruplara ait invert mikroskop görüntüsü.

4.2. Resveratrolün MCF-7 Hücre Hattı Üzerine Olası Sitotoksik Etkisinin MTT Yöntemiyle Belirlenmesi

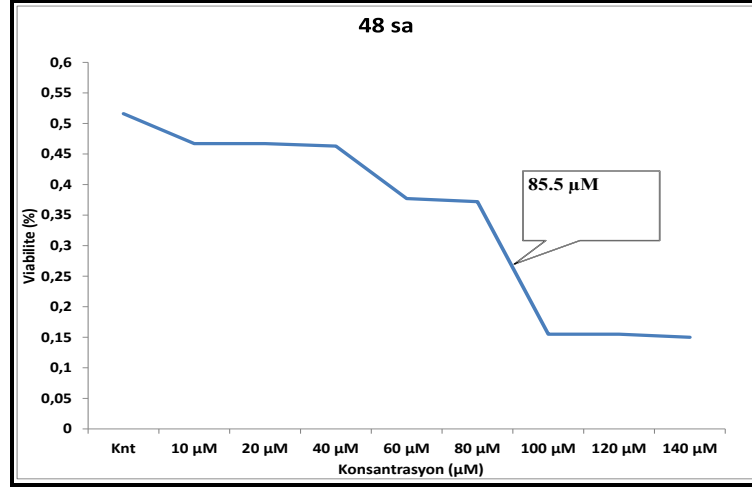
Hücre yoğunluğu spektrofotometrik ölçüm metotuna dayanan MTT yöntemi kiti ile belirlendi. MCF-7 hücre hattı 96'lık plak içerisine ekilerek 24 saat beklenildi. Daha sonra hücrelerin metabolik fonksiyonlarını düzenlemeleri sağlandı. Metabolik fonksiyonlarını düzenleyen hücrelerin kültür medyumuna içerisine kültür medyumuna ile dilue edilen çeşitli konsantrasyonlarda resveratrol ilavesi yapılarak 24 ve 48 saat süreli olarak inkübe edildi. Bu sürelerin sonunda, MTT yöntemi ile hücre yoğunluğu ya da resveratrolün hücreler üzerindeki olası etkisi mikropalak okuyucu ile okutularak logaritmik eğim çizgisi oluşturuldu. Logaritmik eğim çizgisinden resveratrolün baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değerleri her bir plak için belirlendi (Şekil 4.2 ve 4.3). Herbir ölçüm 2 farklı plakda tekrarlı olarak alındı. IC50 değeri $IC_{50} \pm SD$ olarak yazıldı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değerlerinin gösterimi.

Gruplar	IC50 Değeri
24 saat inkübasyon	$87.5 \pm 4.5 \mu M$
48 saat inkübasyon	$85.5 \pm 6.5 \mu M$



Şekil 4.2. 24 saatlik inkübasyon süresine ait baskılayıcı konsantrasyon 50 (IC50) değeri.

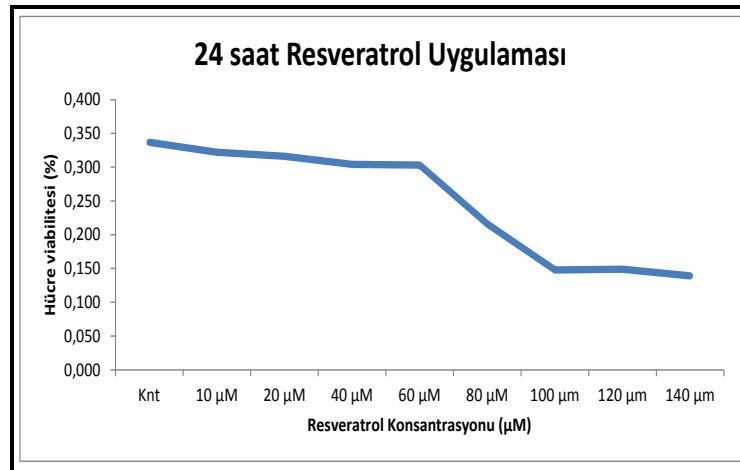


Şekil 4.3. 48 saatlik inkübasyon süresine ait baskılayıcı konsantrasyon 50 (IC50) değeri.

Tablo 4.2. Resveratrol konsantrasyon ve viabilite oranı değerleri.

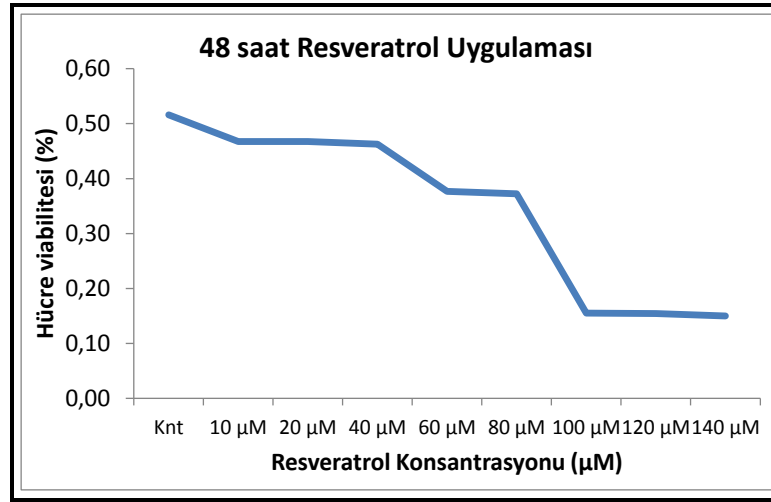
Konsantrasyon	24 sa	48 sa
Kontrol	0.337 ± 0.099 ^a	0.516 ± 0.114 ^a
10 µM	0.322 ± 0.127 ^a	0.467 ± 0.063 ^a
20 µM	0.316 ± 0.047 ^a	0.467 ± 0.022 ^a
40 µM	0.304 ± 0.072 ^a	0.463 ± 0.031 ^a
60 µM	0.303 ± 0.057 ^a	0.377 ± 0.033 ^b
80 µM	0.216 ± 0.027 ^b	0.372 ± 0.037 ^b
100 µm	0.148 ± 0.042 ^c	0.155 ± 0.024 ^c
120 µm	0.149 ± 0.023 ^c	0.155 ± 0.051 ^c
140 µm	0.139 ± 0.033 ^c	0.150 ± 0.041 ^c

Tüm veriler ortalama ± SD olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler düzenli dağılım gösterdiği için parametrik One-Way Anova, Post Hoc. Duncan Testi ile değerlendirildi. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel önemi göstermektedir. İstatistiksel önem $p < 0.05$ olarak kabul edildi.



Şekil 4.4. 24 saatlik resveratrol uygulamasının MCF-7 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.

Resveratrol uygulanan hücrelerden 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda elde edilen viabilite değerlerinin değerlendirmesinde; resveratrol uygulanmayan grubun hücre yoğunluğunun en yüksek olduğu ve bu değer konsantrasyon artışına bağlı olarak düştüğü görülürken IC50 değerinin 87.5 μ M olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1). Resveratrol konsantrasyonu artışına bağlı olarak hücre yoğunluğunun değiştiği tespit edildi (Tablo 4.2).



Şekil 4.5. 48 saatlik resveratrol uygulamasının MCF-7 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.

Resveratrol uygulanan grubun 48 saatlik inkübasyon süresi sonucunda ortaya çıkan viabilite oranına bakıldığında resveratrol uygulaması yapılmayan grupta en yüksek iken bu değer konsantrasyon artışına bağlı olarak azaldığı belirlendi. IC50 değeri ise 85.5 μ M olduğu logaritmik eğim grafiği oluşturularak belirlendi (Tablo 4.1 ve Şekil 4.3).

4.3. Biyokimyasal Total Oksidan ve Antioksidan Miktarı

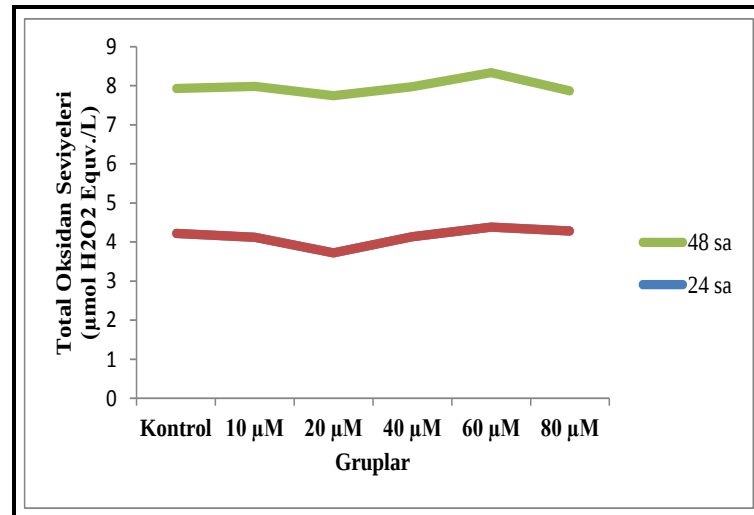
Total oksidan seviyesi değerlendirmesinde; 24 saatlik resveratrol uygulaması yapılan gruplardan en düşük seviyenin 20 μ M konsantrasyonda resveratrol uygulanan grupta olduğu görülmesine rağmen, gruplar arasında önemli bir farkın olmadığı belirlendi ($p>0.05$). 48 saatlik resveratrol uygulaması yapılan gruplarda ise total oksidan seviyelerinin doz artışına paralel olarak arttığı fakat bu değişimin istatistiksel olarak

önemli olmadığı belirlendi ($p>0.05$). Total antioksidan kapasitelerine baktığımızda ise 24 saat inkübasyon süresinde en düşük değerlerin 20 ve 40 μM konsantrasyonda olduğu görülürken en yüksek antioksidan kapasitesine 80 μM konsantrasyonda resveratrol uygulanan grupta olduğu görülmektedir. 48 saat inkübasyon süreli resveratrol uygulaması yapılan gruplardaki en düşük değer 10 ve 40 μM konsantrasyonlu gruplarda olduğu tespit edildi (Tablo 4.3, Şekil 4.6 ve 4.7).

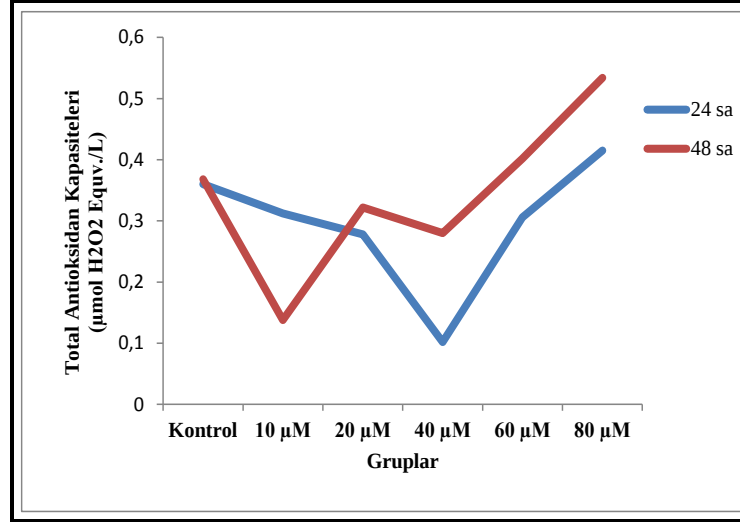
Tablo 4.3. Total oksidan ve antioksidan miktarları.

	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equv./L)		TAS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equv./L)	
	24 sa	48 sa	24 sa	48 sa
Kontrol	4.216 $\pm$ 0.55 ^a	3.712 $\pm$ 0.34 ^a	0.360 $\pm$ 0.03 ^a	0.368 $\pm$ 0.04 ^a
10 μM	4.118 $\pm$ 0.29 ^a	3.865 $\pm$ 0.67 ^a	0.312 $\pm$ 0.04 ^b	0.138 $\pm$ 0.07 ^b
20 μM	3.725 $\pm$ 0.41 ^a	4.018 $\pm$ 0.50 ^a	0.278 $\pm$ 0.03 ^b	0.322 $\pm$ 0.15 ^a
40 μM	4.139 $\pm$ 0.25 ^a	3.834 $\pm$ 0.82 ^a	0.102 $\pm$ 0.05 ^c	0.280 $\pm$ 0.11 ^b
60 μM	4.379 $\pm$ 0.17 ^a	3.957 $\pm$ 1.06 ^a	0.306 $\pm$ 0.14 ^b	0.402 $\pm$ 0.11 ^a
80 μM	4.281 $\pm$ 0.13 ^a	3.589 $\pm$ 0.58 ^a	0.415 $\pm$ 0.18 ^a	0.534 $\pm$ 0.16 ^c

Tüm veriler ortalama $\pm$ SD olarak belirtildi. İstatistiksel analizler düzenli dağılım gösterdiğinden parametrik One-Way Anova, Post Hoc. Duncan Testi ile değerlendirildi. Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel önemi göstermektedir. İstatistiksel önem $p<0.05$ olarak kabul edildi.



Şekil 4.6. Total oksidan seviyelerinin 24 ve 48 saat inkübasyon sürelerine göre karşılaştırmalı grafiği.



Şekil 4.7. Total antioksidan kapasitelerinin 24 ve 48 saat inkübasyon sürelerine göre karşılaştırmalı grafiği.

4.4. p53 İmmunpozitifliği

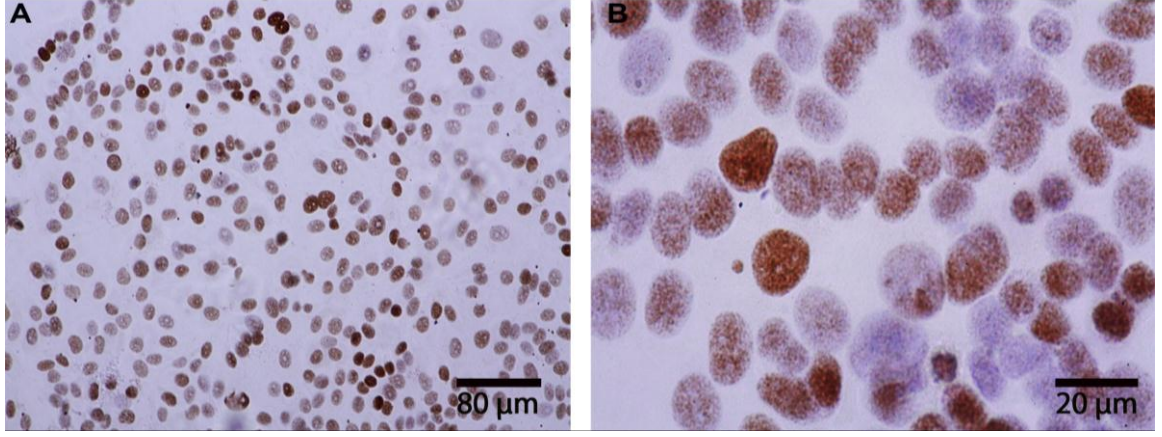
Tablo 4.4. İmmunsitokimyasal p53 pozitif hücre sayısının μm^2 alandaki değerleri.

Gruplar	24 sa	48 sa
Kontrol	0.000438 ^a	0.000389 ^a
Resveratrol (20 µM)	0.000293 ^b	0.000516 ^b
Resveratrol (40 µM)	0.000318 ^b	0.000508 ^b

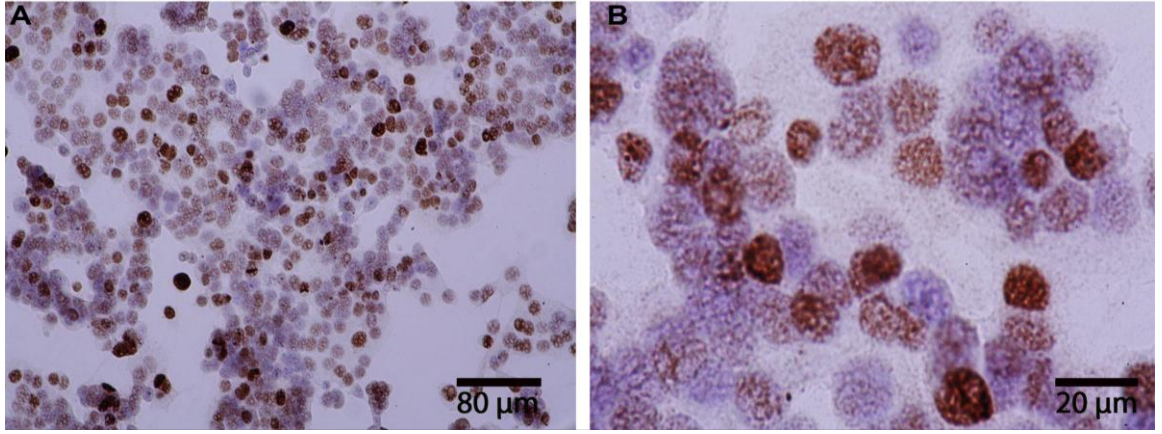
Tüm veriler μm^2 alana düşen hücre sayısı üzerinden verilmiştir.

^{abc} harflendirmeleri bulunduğu sütundaki istatistiksel farklılığı ifade etmektedir. Veriler düzenli dağılım gösterdiği için One way Anova (Duncan T test) ile analiz edilmiştir.

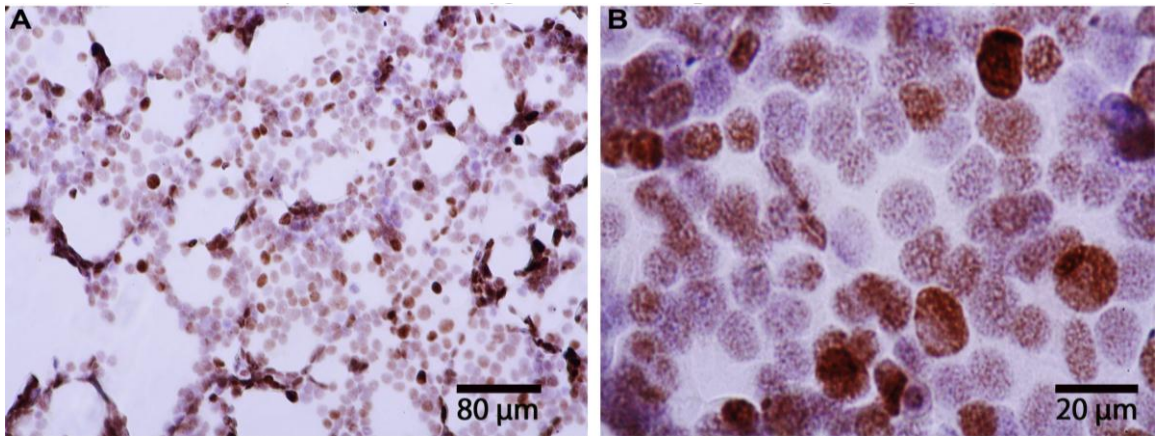
İmmunsitokimyasal p53 boyaması sonucunda oluşan immün pozitifliğin değerlendirilmesinde; 24 saatlik resveratrol uygulanmayan grupta immünpozitifliğin yüksek olduğu bu değer 20 μM konsantrasyonda resveratrol uygulanan grupta düştüğü fakat bu değerin 40 μM resveratrol uygulaması ile arttığı belirlenmiştir. 48 saatlik resveratrol uygulamasına baktığımızda ise resveratrol uygulaması yapılmayan grupta düşük iken resveratrol uygulaması yapılan gruplarda arttığı görüldü (Tablo 4.4).



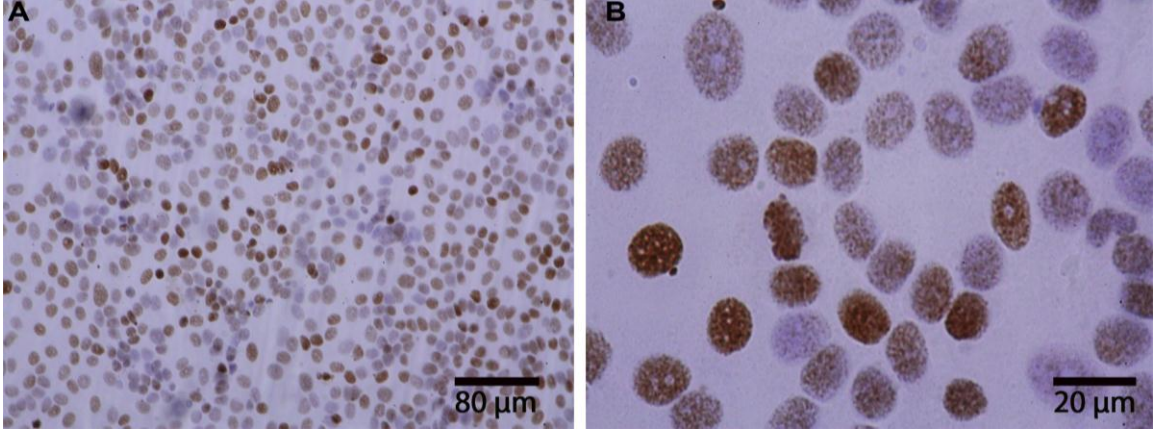
Şekil 4.8. 24 saatlik resveratrol uygulanması yapılmayan MCF-7 hücre hattında p53 immun pozitifliği.



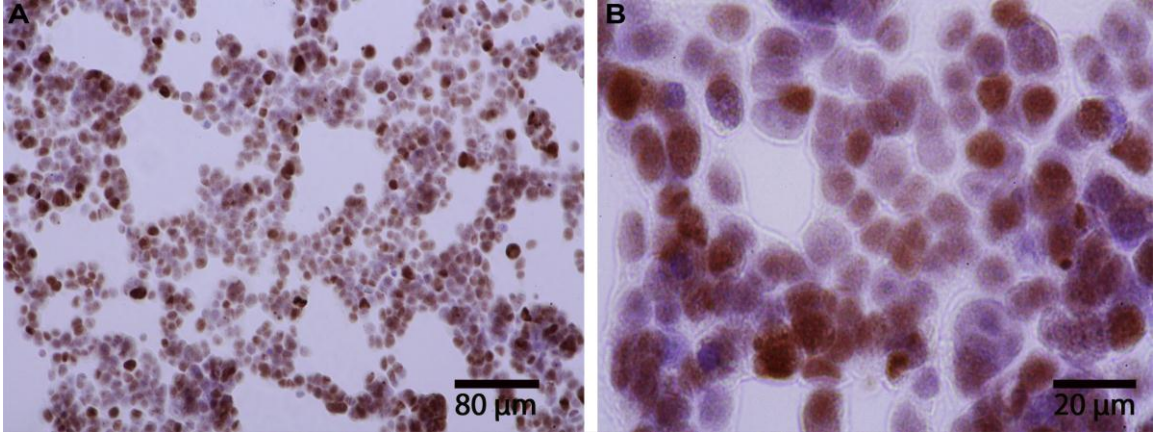
Şekil 4.9. 20 µM konsantrasyonda 24 saat resveratrol uygulanan MCF-7 hücre hattında p53 immun pozitifliği.



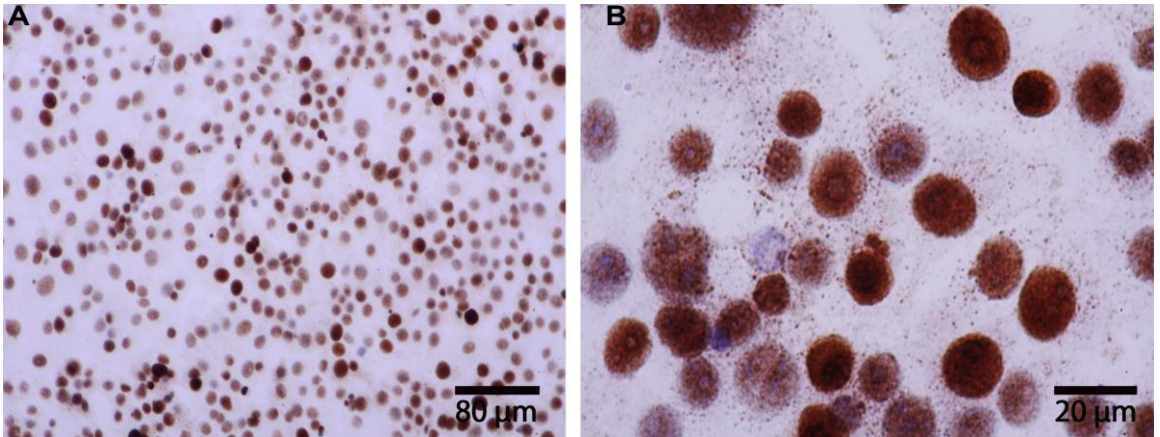
Şekil 4.10. 40 µM konsantrasyonda 24 saat resveratrol uygulanan MCF-7 hücre hattında p53 immun pozitifliği.



Şekil 4.11. 48 saatlik resveratrol uygulaması yapılmayan MCF-7 hücre hattında p53 immun pozitifliği.



Şekil 4.12. 20 µM konsantrasyonda 48 saat resveratrol uygulanan MCF-7 hücre hattında p53 immun pozitifliği.



Şekil 4.13. 40 µM konsantrasyonda 48 saat resveratrol uygulanan MCF-7 hücre hattında p53 immun pozitifliği.

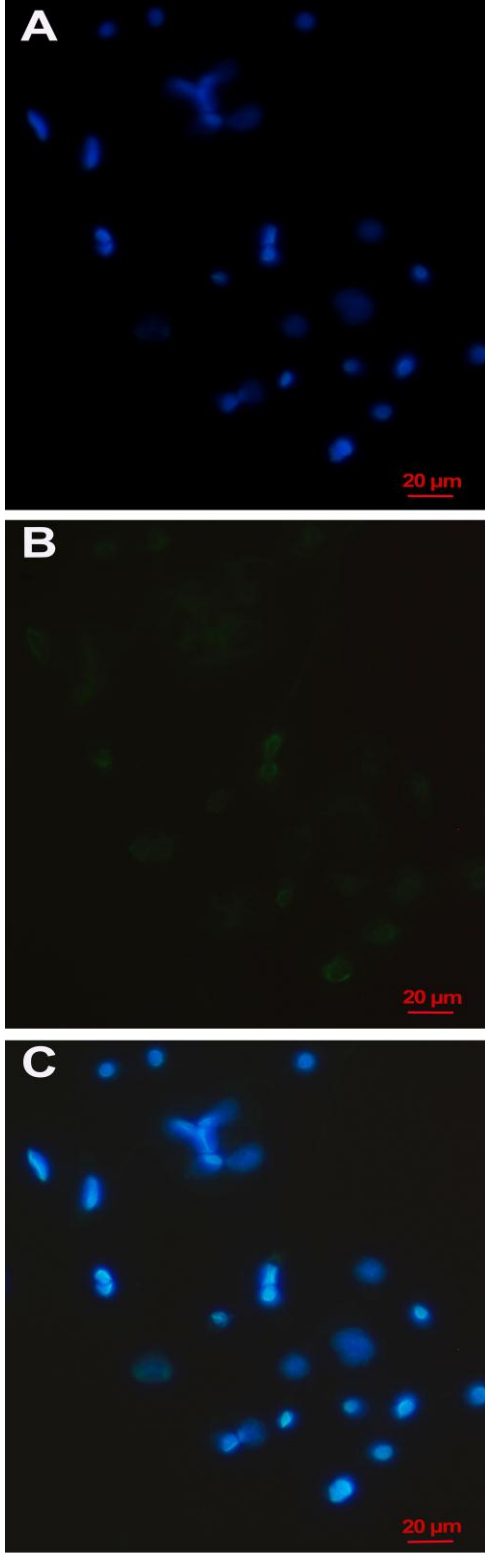
4.5. Bax İmmunpozitifliği

İmmunfloresan anti-Bax immün boyama sonucunda pozitif hücre yoğunluğunun yarı sayılabilir değerlendirmesinde; 24 saatlik inkübasyon periyodu tedavi uygulaması yapılmayan grup meme kanseri hücrelerinde immün pozitif hücrelere yer yer rastlanırken özellikle yüksek konsantrasyonda resveratrol uygulanan grupta immün pozitif hücre yoğunluğunun nispeten arttığı belirlendi. Kırksekiz saatlik inkübasyon periyodunda ise immün pozitif hücrelerin değerlendirmesinde en fazla pozitif hücrenin yüksek konsantrasyon uygulaması yapılan grupta olduğu görülürken, bu değer düşük konsantrasyon uygulanan MCF-7 hücrelerinde azaldığı tespit edildi (Tablo 4.5).

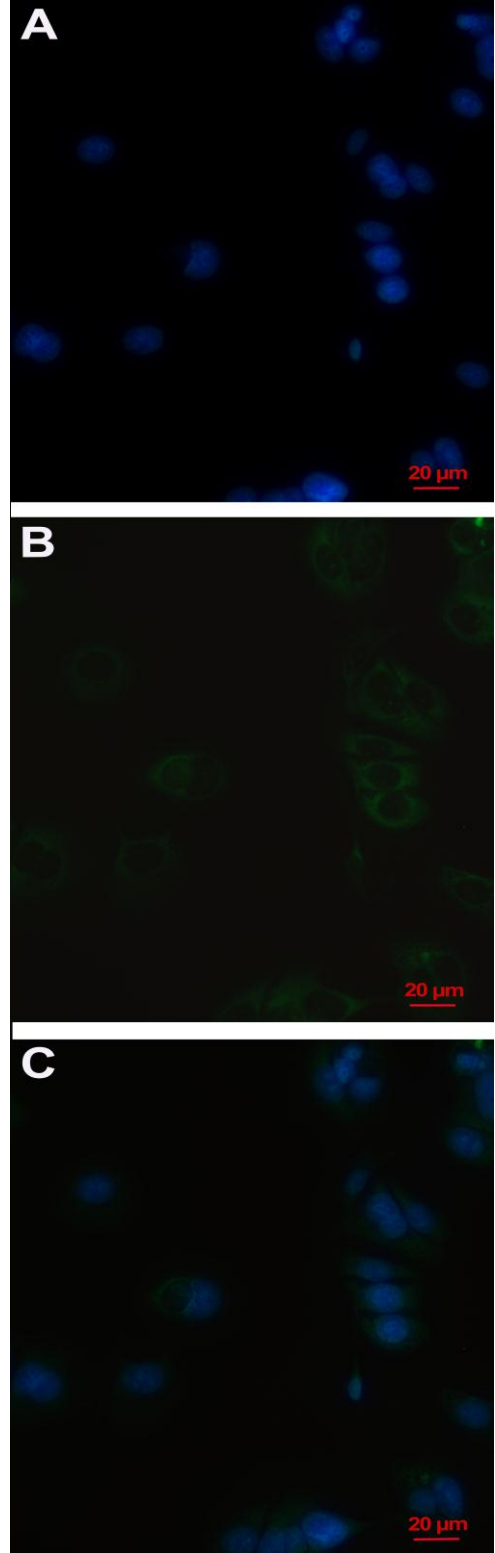
Tablo 4.5. İmmunfloresan Bax pozitif hücre yoğunluğunun semi-quantitative değerlendirilmesi.

	24 sa	48 sa
Kontrol	+	+
Resveratrol (20 µM)	++	++
Resveratrol (40 µM)	++	+++

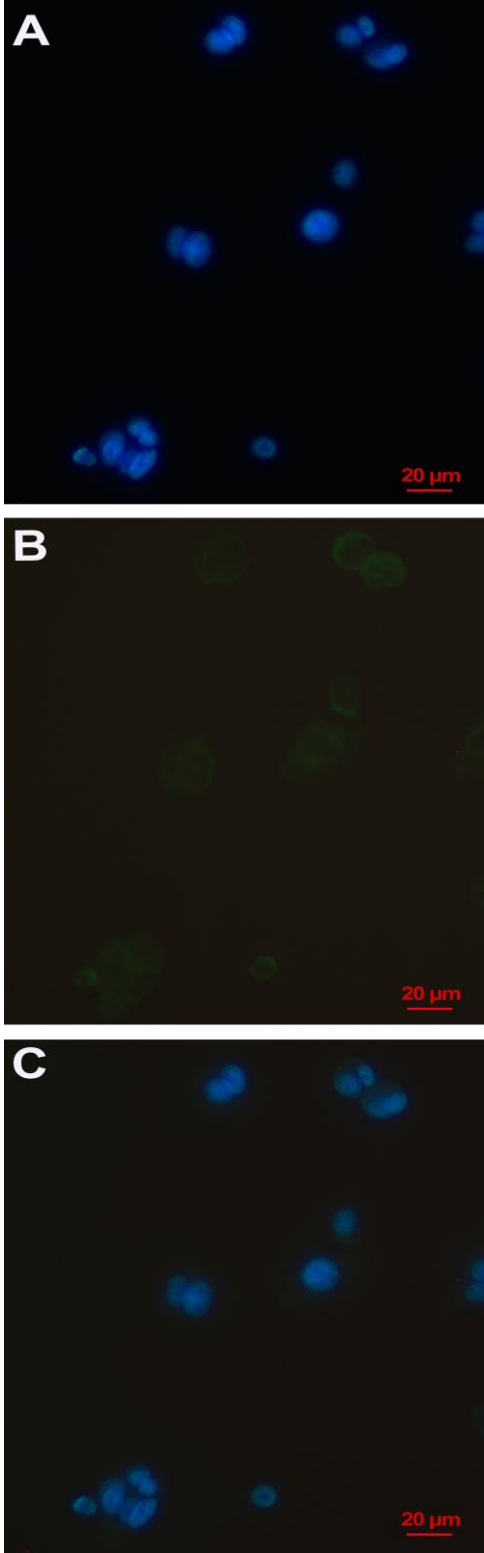
Düşük: +, orta: ++, yoğun: +++ ve çok yoğun: ++++ olduklarını ifade etmektedir.



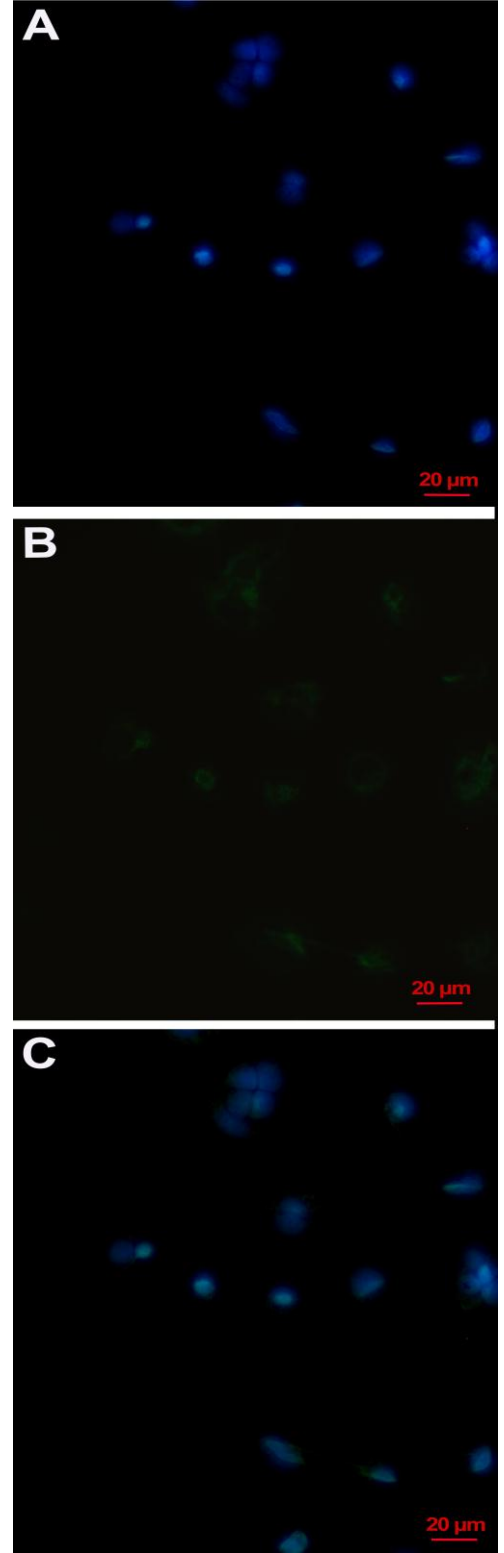
Şekil 4.14. 24 saatlik resveratrol uygulaması yapılmayan MCF-7 hücre hattında Bax immunfloresan pozitifliği (A; dapi boyası, B; bax immunpozitifliği ve C; dapi boyası ve bax immunpozitifliği).



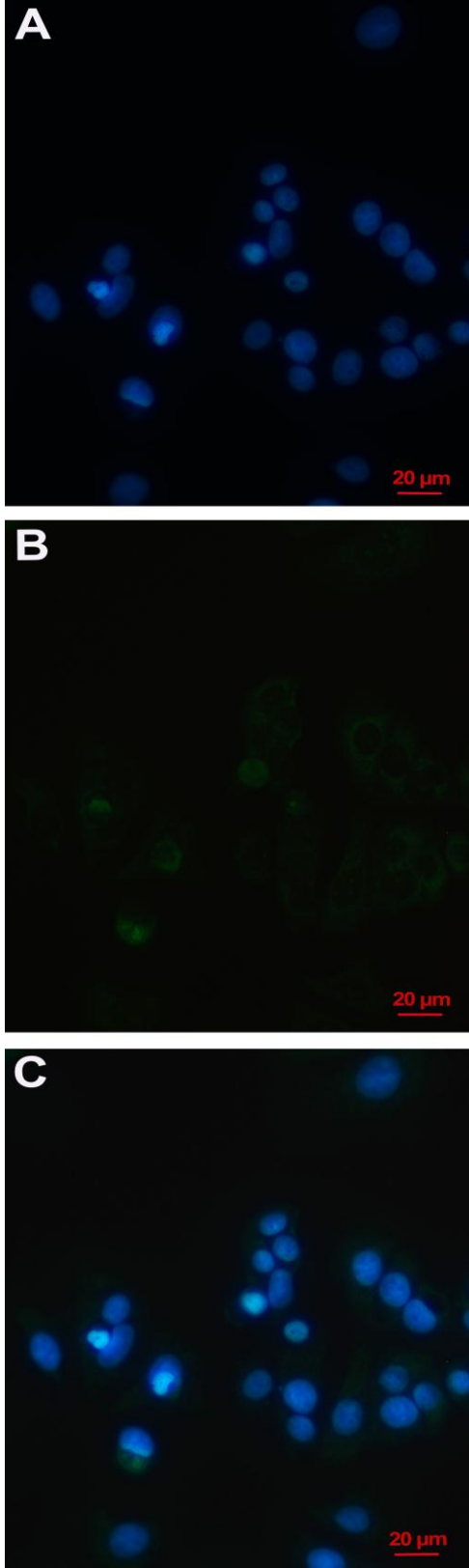
Şekil 4.15. 20 µM konsantrasyonda 24 saat resveratrol uygulanan MCF-7 hücre hattında Bax immunfloresan pozitifliği (A; dapi boyası, B; bax immunpozitifliği ve C; dapi boyası ve bax immunpozitifliği).



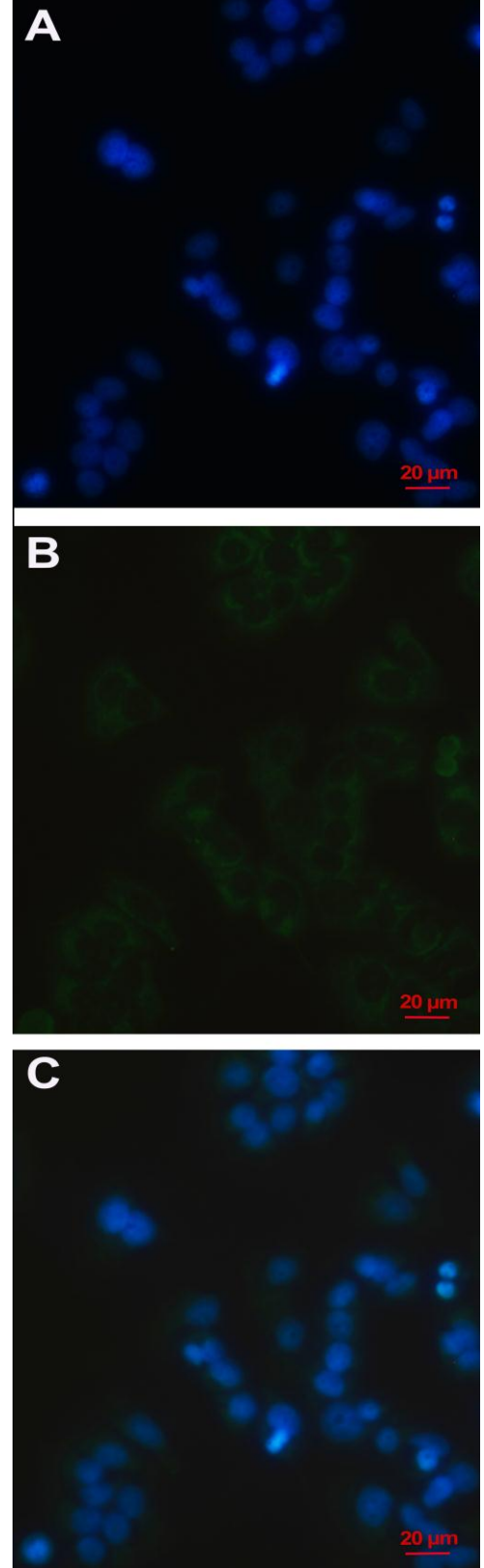
Şekil 4.16. 40 μ M konsantrasyonda 24 saat resveratrol uygulanan MCF-7 hücre hattında Bax immunfloresan pozitifliği (A; dapi boyası, B; bax immunpozitifliği ve C; dapi boyası ve bax immunpozitifliği).



Şekil 4.17. 48 saatlik resveratrol uygulaması yapılmayan MCF-7 hücre hattında Bax immunfloresan pozitifliği (A; dapi boyası, B; bax immunpozitifliği ve C; dapi boyası ve bax immunpozitifliği).



Şekil 4.18. 20 μ M konsantrasyonda 48 saat resveratrol uygulanan MCF-7 hücre hattında Bax immunfloresan pozitifliği (A; dapi boyası, B; bax immunpozitifliği ve C; dapi boyası ve bax immunpozitifliği).



Şekil 4.19. 40 μ M konsantrasyonda 48 saat resveratrol uygulanan MCF-7 hücre hattında Bax immunfloresan pozitifliği (A; dapi boyası, B; bax immunpozitifliği ve C; dapi boyası ve bax immunpozitifliği).

4.6. PCR Sonuçları

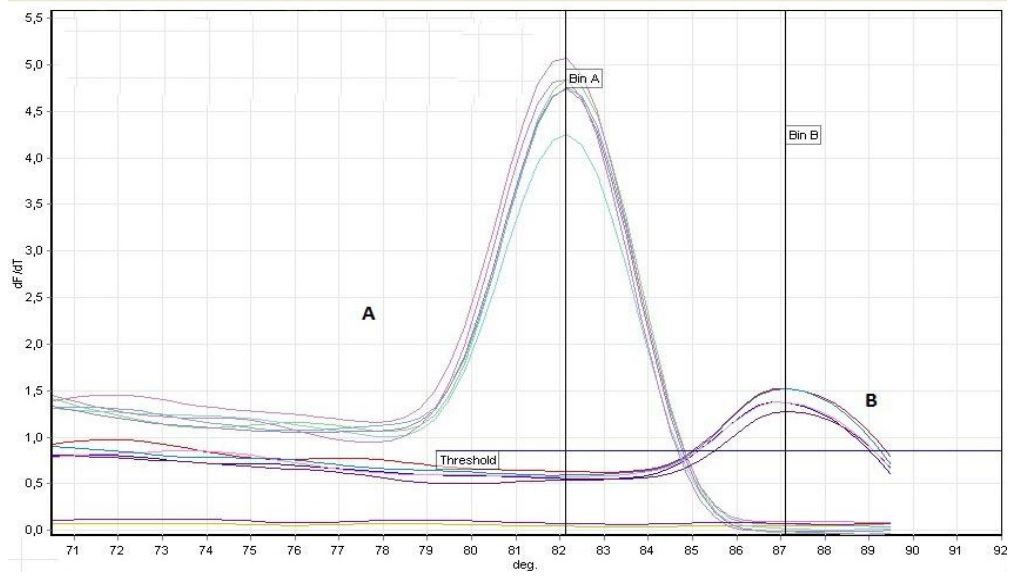
RNA eldesinden sonra spektrofotometre ile yapılan RNA yoğunluk ölçümleri 145-165 ng/mikrolitre arasında bulundu.

RT-PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde 24 saatlik resveratrol uygulaması ile p53 konsantrasyonunun azaldığı bu değerin düşük doz uygulanan grupta daha fazla olduğu belirlendi. Kırksekiz saatlik resveratrol uygulaması yapılan gruplarda ise en yüksek p53 konsantrasyonu yüksek doz resveratrol grubunda gözlenirken bu değer düşük doz resveratrol uygulanan grupta azaldığı fakat en düşük değerin herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubunda olduğu belirlendi.

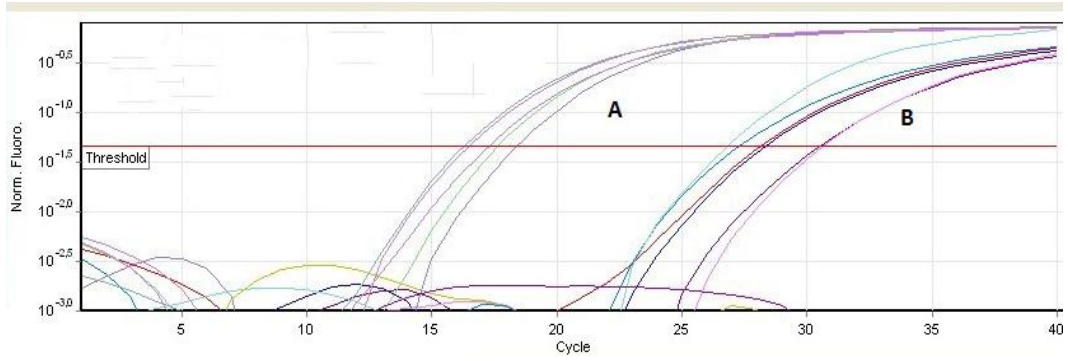
Tablo 4.6. p53 ve aktin konsantrasyon değerleri (ml’de uluslararası ünite; IU/ml).

Gruplar	p53 konsantrasyonu (IU/ml)	Aktin konsantrasyonu (IU/ml)	p53 Konsan./ İnternal kontrol Konsan. (IU/ml)
Kontrol (24 sa)	135	264259	0.000511
20 µM (24 sa)	39	363637	0.000110
40 µM (24 sa)	117	693891	0.000169
Kontrol (48 sa)	25	151127	0.000165
20 µM (48 sa)	23	343359	0.000067
40 µM (48 sa)	249	597186	0.000417

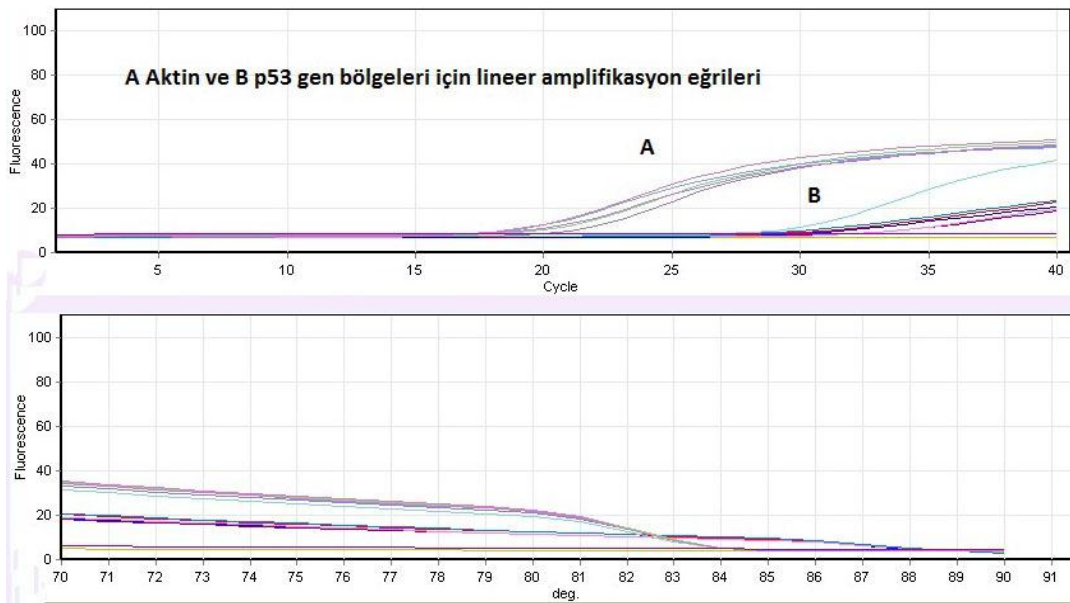
“Örnek Konsantrasyonu (IU/ml) / İnternal kontrol konsantrasyonu” formülü ile hesaplandı.



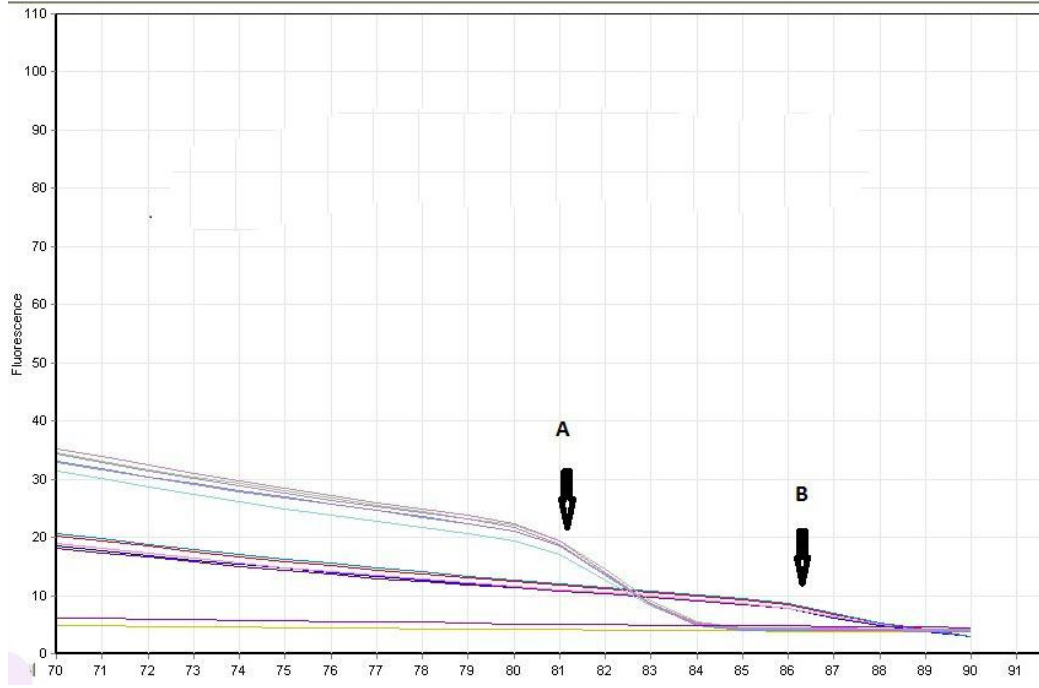
Şekil 4.20. p53 ve aktin gen bölgelerine ait erime (melting) sıcaklıklarının gösterimi: A; aktin ve B; p53 eğrisi.



Şekil 4.21. Aktin ve p53 logaritmik amplifikasyon eğrileri: A; aktin ve B; p53 eğrisi.



Şekil 4.22. Aktin ve p53 gen bölgeleri için lineer amplifikasyon eğrileri: A; aktin ve B; p53 eğrisi.



Şekil 4.23. Erime analizde aktin ve p53 bölgeleri için kırılma noktaları: A; aktin ve B; p53 kırılma noktası.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, sıklıkla kadınlarda görülen, yaygın kanser türlerinden biri olup, yüksek bir mortaliteye [gelişmiş ülkelerde %30 (190.000 ölüm / 636.000 olgu), az gelişmiş ülkelerde ise %43'dür (221.000 ölüm / 514.000 olgu)] sahiptir. Meme kanseri tedavisinde kemoterapi süresince, hastaların tedaviye cevap vermemesi veya tedavi sonrası kanserin tekrarlaması sıklıkla görülen bir durumdur.³ Diğer taraftan meme kanseri tedavisinde klinikte sıkça kullanılan ilaçların direnç geliştirme özelliklerinin olduğu, bu yolla meme kanseri tedavisinde bir takım başarısızlıkların yaşandığı bilinmektedir. Yapılan araştırmalar, yeni terapötik yöntemlerin geliştirilmesine olan ihtiyacı ortaya koymaktadır.

Bu amaç doğrultusunda; kanser öncesi ve sonrası doğal antioksidan ve antikanserojen maddelerin kullanımı ile normal olmayan hücrelerin ortadan kaldırılması için apoptoz tetiklenmeye çalışılmaktadır. Günümüzde kanser tedavisinde etkin olarak kullanılan birçok kemoteropatik ajanların da (Doksetel ve Cisplatin gibi) apoptotik etkilerinden yararlanıldığı bilinmektedir. Hücre döngüsünde ve kanser hücresi apoptotik yollarında etkin rol alan büyüme faktörlerini ve reseptörlerini kodlayan bazı genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişim, hücrelerin kanserojenik süreçteki bölünme hızına önemli katkıları bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda da antioksidan ve antikanserojen özellikli resveratrolün in-vitro ortamda kanser hücrelerine uygulanması ile hücrelerde redoks dengesini değiştirdiği, tümör supresör gen olarak bilinen p53 ekspresyonunu ve apoptotik aktiviteyi de artırabileceği belirlendi.

Antikanserojenik etkileri birçok araştırmada bildirilen resveratrol, karsinogenezisin başlangıç, yayılım ve ilerleme gibi üç önemli aşamasında da hücre çoğalmasını baskılayıcı etkisini gösterebilmektedir.⁸⁰ Ayrıca, antiproliferatif etkisi birçok çalışmada da rapor edilen resveratrolün,^{89,116} bu tez çalışmasında da doz ve zaman bağımlı sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Yapılan bazı araştırmalarda, resveratrolün sitotoksik (IC50) değerinin 10 ile

100 nmol/L olduğunu, bu değerin kanser hücre tipleri arasında (lösemi, prostat, meme ve kolon) farklılık gösterebileceği de bildirilmiştir.¹¹⁷ Bu çalışmadan elde edilen deneme sonuçlarına göre; resveratrolün IC50 değeri, 24 saat inkübasyon süresi için 87.5 µM, 48 saat inkübasyon süresi için 85.5 µM konsantrasyonlarında belirlenmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında, yapılan uygulamadan önce veya sonra hücre viabilitesi ya da yoğunluğu MTT analizleriyle belirlenerek ortaya çıkan değişimler hakkında yorumlar yapılabilmektedir. Bu çalışmada, çeşitli konsantrasyonlarda resveratrol ile 24 ve 48 saat inkübe edilen gruplardan elde edilen hücrelere uygulanan MTT analizlerine göre hücre viabilitesinin ya da yoğunluğunun kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir. Bu değer azalışını, Della Ragione ve ark. resveratrol uygulamasının hücrelerde G₂/S fazına geçişi ve DNA sentezinin engellenmesini sağlayarak hücre siklusunun baskılanmış olabileceğini rapor etmişlerdir.¹¹⁶ Fontcave ve ark. ise resveratrolün ribonükleotid reduktaz ve DNA polimeraz aktivitesini baskılayarak, DNA sentezini indirek olarak engellendiği ifade etmişlerdir.¹⁰⁸ Yapılan bazı çalışmalar ise resveratrol uygulamasının G₂/M fazına geçişi kısa bir süreliğine baskıladığı ve hücrelerin belirli bir zaman sonra tekrar çoğalmasını devam ettirdiğini rapor etmişlerdir.¹¹⁸ Bizim çalışma bulgularımızda ise 48 saat inkübasyonlu gruplarda hücre yoğunluğunun ya da viabilitesinin 24 saat inkübasyonlu gruplara göre arttığı fakat bu değerin resveratrol uygulamasına ve uygulanan resveratrolün konsantrasyon artışına bağlı olarak azaldığı belirlendi.

Tümör başlangıcında bir antimitojen ve serbest radikal baskılayıcı etkiyi gösteren resveratrol,⁸⁰ COX-1'i baskılayarak tümöral ilerlemeyi durdurabilir.^{80,119,120} Kopp ve ark. aradoşidonik asiti proinflatuar maddelere dönüştürerek tümör hücre büyümelerini uyarıcı etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.¹²¹ Clement ve ark. ilerlemiş kanser hastalarında resveratrolün insan promyelositik lösemi hücre farklılaşmalarını indüklediği⁸⁰ ve hücre çoğalımında DNA sentezi için gerek duyulan ribonükleotid reduktazı baskıladığını

bildirilmiştir.¹²⁰ Resveratrolün antikanserojen potansiyelinin karakteristik bir özelliği de kan hücreleri için toksisitesi minimal düzeyde olmasıdır.¹¹⁹

Östrojen pozitif meme kanserlerinde, östrojenler ve östrojen-reseptör (ER)'lerinin önemli olduğu,^{24,25} Tamoxifen gibi östrojen-reseptör antagonistlerinin terapilerde östrojen-bağımlı hücre büyümesini baskılayarak tümöral büyümeyi durdurduğu bildirilmektedir.^{26,27} ER pozitif meme kanseri olgularında östrojen, ER'lerini aktive ederek hücre siklusundaki G₁-fazını kısaltarak hücrenin daha fazla ve hızlı bölünmesine, artan hücre bölünme sayısının artışı da kanser riskinin yükselmesine neden olur.¹⁸ Meme kanserleri ortalama olarak %75 oranda primer östrojen-bağımlı bir süreç gösterirken, bu özellik hastalığın ileri döneminde östrojen-bağımsız hale de gelebilmektedir. Postmenopozal dönemde ovaryum kaynaklı östrojen üretiminin minimum seviyeye inmesine rağmen östrojen-bağımlı meme kanserlerinin büyük bölümünün bu dönemde ortaya çıktığı bildirilmektedir. Özellikle deri, kas, yağ, kemik ve meme bezi gibi perifer dokuda bol miktarda bulunan aromataz ve steroid sülfataz gibi enzimlerin tümöral dokulardan östrojen sentezlenmesine sebep olduğu bildirilmektedir.²¹ Sentetik östrojen özelliğine sahip olan dietilstilbestrol ile resveratrol arasındaki yapı benzerliğinin meme kanserlerinde resveratrolün etkinliğini önemli hale getirmektedir.¹²² Yapılan bazı çalışmalarda resveratrolün meme kanserli hastalarda antikanserojenik etkileri rapor edilmiştir.^{4,121}

Hücre siklusunun baskılanmasında ve apoptozun tetiklenmesinde 17. kromozom üzerinde bulunan tümör süpresör özellikteki p53 geni önemli bir görev üstlenmektedir. Bu gen; DNA-hasarı,⁶¹ hipoksi,⁶² ışın tedavisi⁶³ ve ısı şoku,^{64,65} gibi pek çok genotoksik stres faktörü aracılığıyla aktive edilerek hücrelerde transkripsiyon faktörlerinin artmasına neden olmaktadır. Ayrıca, p53 aracılı DNA onarımı hem anjiyogenezin⁶⁷ hem de tümörde büyümenin inhibisyonunda önemli bir rol oynayarak^{68,69} DNA-hasarlı hücrenin apoptoz yolu ile yıkımlanması sağlar.⁷⁰ Bu genin mutasyona uğraması kanseröz ya da tümöral olguların

meydana gelmesine neden olmaktadır.⁵⁹ Bu mutasyonla oluşan mutant p53; hem bir fonksiyon kaybı hem de yeni bir onkojenik özellik kazanmış protein olarak karşımıza çıkabilmektedir.⁶⁰ Rapor edilen birçok çalışmada, kanser hücrelerinde p53 mutasyonları aracılı apoptoz mekanizmasının devre dışı kaldığını bildirilmiştir.¹²³ Bu gen bölgesi tarafından sentezi kontrol edilen p21 geni de hücre siklusunu kontrol eden CDK'ların sentezini sağlamaktadır. Bu sebeple p53 gen bölgesinde mutasyon geçirmiş hücreler üzerinde kontrolsüz bir çoğalmanın gerçekleştiği bildirilmiştir.¹²⁴ p53 geni mutasyonları birçok kanser türünde sık görülen (meme kanserlerinin 2/3'ünde) bir durumdur.¹²³ Bu gen, sitotoksik ajanlara karşı tümör hücrelerinin duyarlılığının önemli bir belirteci ve DNA hasarında hücrel cevabın oluşmasını sağlamaktadır. p53 gen bölgesinin sentezlediği p53 proteini, hücrede kısa süreli sentezlendiği için normal hücrelerde çok fazla birikmemektedir. Fakat tümör hücrelerinde mutant p53 miktarı, DNA hasarına bağlı olarak çok miktarda sentezlenmektedir.¹²⁵ Vahşi tip p53, bazı DNA hasarlı hücrelerde uzun süre eksprese edilirken, bazı durumlarda da sentezlendikten sonra diğer hücrel proteinlere yapışarak RT-PCR ve ICC boyamalarda tespit edilebilmektedir.¹²⁶

Bu çalışmada, resveratrolün doz ve zamana bağlı olarak apoptotik aktivasyonu üzerine etkileri araştırıldı. Resveratrol uygulaması neticesinde p53 ekspresyon düzeyinin 24 saat inkübasyonlu periyotta azaldığı (0.000511-0.000169) ve 48 saat inkübasyonlu periyotta arttığı (0.000165-0.000417) RT-PCR ile belirlendi. Kaabinejadian ve ark. MCF-7 hücre hattına adriamisin uygulaması ile p53 miktarının azaldığını belirlerken¹²⁷ Singh ve ark. resveratrol ve siklofosfamid (cyclophosphamide) uygulamasının yine p53 ekspresyonunu arttırdığını rapor etmişlerdir.⁴ Resveratrol, apoptozu p53 bağımlı¹⁰⁴ ve p53'den bağımsız bir şekilde indüklenmektedir.^{104,105} Resveratrol, fibroblast hücrelerinde¹⁰⁴ ve fare JB6 epidermal hücre hattında,^{106,107} p53 ekspresyonunu artırarak tümör ön maddelerin salgılanmasını baskılandığı ve hücrede apoptozu uyardığı,⁷⁷ diğer taraftan, c-Jun NH2-terminal kinase

(JNKs) aktivasyonunu da tetikleyerek apoptozun başlamasını önlediği bildirilmektedir. Lee ve ark. çalışmalarında antioksidan uygulaması ile p53 gen ekspresyonundaki artışı rapor etmiştir.¹²⁸ Kaabinejadian ve ark. çalışmalarında Adriyaminin uygulaması ile p53 miktarının arttığı ve bu yolla apoptotik aktivasyonun da arttığını göstermişlerdir.¹²⁷ Bizim bulgularımızda resveratrol uygulamasının literatürün aksine p53 gen ekspresyonun 24 saat süreli uygulamada azaldığı belirlenirken, 48 saat uygulamalı grupta ise literatüre paralel olarak gen ekspresyonu artışı tespit etmiştir.

Yapılan çalışmada metabolik yollarda rol alan birçok proteinin tespiti için ICC metodu kullanılırken özellikle son yıllarda kanser hücrelerinde p53 aktivasyonunun belirlenmesi için ICC tercih edilen bir yöntemdir.^{63,129,130} Çalışmada immunohistokimyasal p53 boyamalarımız sonucunda kontrol gruplarına göre uygulama yapılan gruplarda pozitif hücre yoğunluğunun arttığı belirlenmiştir. Balcer-Kubicze ve ark. adriyaminin uygulaması yapmış oldukları çalışmada, p53 immunpozitif hücre sayısının artışı göstermiştir.¹³¹ Vladislava ve ark. ultraviyole ışığa maruz bırakılan meme kanseri hücrelerinde p53 gen bölgesi mutasyonunun olduğu ve bu mutant p53 geninin fazla miktarda eksprese edildiğini rapor etmiştir.¹³² Bizim çalışmamızda ise resveratrol uygulaması ile p53 aktivasyonun arttığı ve bu yolla tümöral hücrelerde apoptozisin uyarılmış olabileceği düşünülmektedir. Fakat bu yolak ve mekanizmasının tam olarak ortaya konulabilmesi için daha detaylı moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Hücreler ya fizyolojik yaşam süreleri sonunda apoptozla ya da patolojik faktörlerin etkisiyle nekrozla ölürlür. Nekrozla ölüm sonrası hücrede enflamasyon uyarılırken, apoptozda hücre ölümü fizyolojik bir süreç olarak uyarılır ve enflamatuvar yanıt oluşmadan gerçekleşir. Apoptotik süreçte Bax, Bcl-xS, Bad, Bak ve Bik gibi proapoptotik genler apoptozu uyarırken, Bcl-2, Bcl-xL, Bag-1, ve Mcl-1 gibi anti-apoptotik genler apoptozun baskılanmasını sağlarlar.⁵⁸ Son yıllarda yapılan çalışmalarda, tümör hücrelerinde apoptozun

uyarılmasında pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin, mitokondriyal disfonksiyonun, hücre ölüm reseptör sentezinin, kaspaz aktivasyonlarının ve ROT'ların üretimi artışı gibi birçok hücrel faktör üzerinde önemli rol oynadığı rapor edilmiştir.^{133,134} Hücrelerdeki pro-apoptotik faktörler p42/44, ERK1/2, JNK ve p38/MAPK kinazlar ile düzenlenirken,^{135,136} p21 ve p27 gibi genler de p53 aracılı hücre siklusunun baskılanmasında görev alan metabolik yollardır. Ayrıca p21 proteini ekspresyonu CDK aktivitesini ve hücre proliferasyonu nükleer antijeni (PCNA) ekspresyonunu baskılayarak DNA sentezi engellemiş olur.¹³⁷⁻¹³⁹ Çalışmamızda da, apoptotik bir protein olan Bax'a yönelik immunfloresan boyama neticesinde resveratrol uygulanan gruplarda apoptotik aktivitenin arttığı, bu değerin özellikle 48 saat inkubasyona bırakılan hücrelerde en fazla olduğu bulundu. Qiao ve ark. oridonin uygulaması ile bax ekspresyonunun arttığını rapor etmişlerdir.¹⁴⁰ Singh ve ark. çalışmalarında, resveratrol uygulanan meme kanser hücrelerinde pro-apoptotik proteinlerin artışıyla beraber MAPK aktivasyonu artışı da belirlemişlerdir.⁴ Osone ve ark. ise, antioksidan madde verilen nöroblastoma hücrelerinde p38/MAPK ve JNK aktivasyonunun arttığı ve bu yolla apoptozu uyardığı rapor edilmiştir.¹⁴¹ Özetle, resveratrolün meme kanseri üzerindeki apoptotik etki mekanizmasının MAPK aktivasyonuna dayalı olduğu ve bu yolla kanser hücreleri üzerine antikanserojen etki gösterdiği söylenebilir.

Antioksidan maddeler, antioksidan enzimlerin aktivasyonunu katalize ederek serbest radikal ve oksidan maddelerin ortamdan süpürülmesini indirekt olarak sağlamış olur. Kanserogenez sürecinde birçok antioksidan madde tedavi ve koruyucu amaçlı kullanılmaktadır.⁵⁷ Bunların en önemlilerinden birisi olan resveratrolün antioksidan özellikleri üzerine birçok in vitro ve in vivo çalışma bulunmaktadır.^{78,88,90,91} Son yıllarda yapılan birçok çalışmaya göre resveratrol; LDL ve LPO'yu baskılamakta, oksitlenmiş LDL'nin sitotoksitesini de önlemektedir.⁵⁶ Kanser hücresi tedavisinde ROT üretimindeki

artıŖa baēlı olarak apoptozun uyarılması, p38 ve MAPK aktivasyonu üzerinden saēlanmaktadır.¹⁴² Hücrede ROT üretimi ve MAPK aktivasyonunun apoptotik sinyallere cevabın oluşmasında önemli rol oynadıēı bilinmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan ve ROT üretimini uyararak antioksidan kapasitesinin tüketilmesi ile apoptozu uyarın antikanserojen ilaçların etkinliēi bu prensibe dayanmaktadır. Yapılan çalışmalarda, hücre ölümü miktarı ile mitokondriyal membran potansiyeli ve redoks seviyesindeki deēişimin etkili olduēu belirtilmiştir.⁴ Osone ve ark. antioksidan uygulaması ile nöroblastoma hücrelerinde ROT baēımlı apoptoz yolaēı olan p38 ve MAPK aktivasyonunun uyarıldığını tespit etmişlerdir.¹⁴¹ Garcia Santos ve ark. çalışmalarda, melatonin uygulanan nöroblastoma hücre hattında apoptotik aktive artışını rapor etmişlerdir.⁵ Yapılan bazı çalışmalarda ise p38 ve MAPK aktivasyonunun ROT üretiminden baēımsız olduēu rapor edilmiştir.¹⁴³ Bizim çalışma hipotezimiz, güçlü bir antioksidan özelliēe sahip resveratrol uygulaması ile apoptozisin uyarılması ve hücre proliferasyonun azaltılması temeline dayanmaktadır. Resveratrolün antioksidan etkisinin p38 ve MAPK yolakları üzerinden tetiklendiēi yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. ROT'lar hücrede siklin mRNA seviyesini arttıran hücre siklusunda G₁-S fazına geēiş gibi önemli görevleri yerine getirmektedir. Bu durumun hücrede oluşan bir redoks kontrolü kaybını saēladığı ve kontrolsüz çoēalmaların önüne geēilemediēi belirlenmiştir. Oysa yapılan bazı çalışmalarda, MCF-10A kanser hücre hattı gibi hücrelerin antioksidan madde uygulaması ile proliferasyonun azaldığı G₁-S fazına geēişin engellendiēi ve siklin D1'in sentezinin azaldığı belirtilmiştir.¹⁴⁴

Diēer taraftan çevresel kanserojen sodyum arsenitin meme kanser hücrelerinde ROT üretimini uyararak hücre siklusunda S fazına geēişi hızlandırdığı tespit edilmiştir.¹⁴⁵ Benzer olarak benzo (a) piren kinonlar (BPQs) büyüme faktörlerinin sinyallerini taklit ederek memeli epitel hücrelerinde H₂O₂ ve SOD sentezi üzerinden proliferasyonu arttıēı gösterilmiştir.¹⁴⁶ Ayrıca pankreas kanser hücreleri ile normal pankreas hücresi ROT

seviyelerinin karşılaştırılması ile yüksek ROT seviyesinin hücrelerin çok hızlı olarak bölünmesi sonucu olduğu belirlenmiştir.³⁸ Yine yapılan çalışmalarda, endojen antioksidanlardan MnSOD, Cu/ZnSOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin pankreas tümör hücrelerinde bölünme hızını azalttığı rapor edilmiştir.^{147,148} Bizim çalışmamızın biyokimyasal total antioksidan ve oksidan miktarlarının değerlendirmesinde; total antioksidan miktarında çok büyük bir değişiklik görülmezken total antioksidan miktarlarının 24 ve 48 saat resveratrol uygulaması yapılan gruplarda değiştiği belirlendi. Verilerimizin değerlendirilmesine baktığımızda resveratrol uygulaması ile hücresel ROT üretimin azaldığı ve literatürle benzerlik gösterdiği tespit edildi.

Özetle; resveratrol uygulaması ile hücrede endojen antioksidan miktarının artışı indüklenmektedir. Bu endojen antioksidan maddelerin hücresel siklusda özellikle G₁-S fazına geçişi engellediği yapılan birçok çalışma ile de gösterilmiştir. Ayrıca antioksidan uygulamalarının hücrede apoptoz aktivitesi üzerine pozitif etki göstermiş olması antioksidanların antikanserojen etkisini ortaya koymaktadır. Bu etki birçok kemoterapötik olarak da kullanılan ilaçların etki mekanizmasına benzer olarak hücre içi ROT artışıyla tetiklenen p38 ve MAPK metabolik yolağı üzerinden hücre içi ROT artışı oluşturmada sağladığı belirlenmiştir. Yine hücresel siklusta ve apoptotik aktivitede önemli rolleri bulunan p53 geni ekspresyon düzeyindeki artışta resveratrolün kanser tedavisinde kullanımının önemli sebeplerinden birisidir. Hücrede meydana gelen özellikle DNA hasarı durumunda uyarılan p53 geni çoğu tümör hücresinde mutant olarak sentezlenir ve hem DNA hasarının tamirini hem de apoptozun uyarılmasını yerine getirememektedir. Oysa resveratrol uygulamasının vahşi tip p53 ekspresyon miktarını arttırdığı belirlenmiştir. Bu yolla DNA hasarı oluşmuş kontrolsüz çoğalan kanser hücrelerinde, hücre siklusunun kontrolü ve apoptozisin uyarılmasını sağlayabileceği düşünülebilir.

Sonuç olarak, östrojen pozitif meme kanser hücrelerinin çeşitli dozlarda ve sürelerde resveratrol uygulaması neticesinde hücresel total antioksidan madde miktarının artışı, total oksidan madde miktarının değişmemediği belirlenirken p53 gen ekspresyonundaki artış yapılan RT-PCR ve immunsitokimyasal analizler sonucunda tespit edilmiştir. Ayrıca pro-apoptotik proteinlerden Bax aktivitesinin artışı tespit edilmiştir. Resveratrol uygulamasının bu etkilerine bakıldığında, meme kanseri tedavisinde koruyucu ve tedavi amaçlı olarak kullanılabilecek bir ajan olabileceği sonucuna varılabilmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmadan elde edilen sonuçları özetleyecek olursak;

1- Resveratrol maddesi sitotoksitite analizleri yapılarak çalışmamız için en etkili dozlar belirlenirken resveratrolün baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değerleri (24 saat için; 87.5 μ M ve 48 saat için 85.5 μ M) belirlendi.

2- Antioksidan bir madde olan resveratrolün hızlı çoğalan tümör hücreleri ile muamelesinde antioksidan ve oksidan seviyelerinde oluşan değişim belirlenirken bunların hücre çoğalımı ile olan etkileşimi korrele edildi.

3- Çalışmada tümör süpresör gen olarak bilinen p53 geni ekspresyonu hem immunsitokimyasal hem de RT-PCR metotları ile belirlendi.

4- Resveratrolün MCF-7 hücre hattı üzerindeki apoptotik değer artışı Bax immunfloresan boyaması ile tespit edildi.

5- Çalışmadan elde edilen bulguların değerlendirilmesi, yeni ilaç tedavi stratejilerinin ya da yeni tedavi ajanlarının geliştirilmesine katkıda bulunabilecektir. Özellikle meme kanserli hastalarda tedavide başarısızlıklar sık rastlanan bir durumdur. Bu tür durumların önlenmesi amacıyla güçlü antioksidan ve antikanserojen ilaçların kullanımının önemi tekrar edilmiş oldu.

Çalışmamızda elde edilebilecek çıkarımları özetlediğimizde ise;

Son yıllarda kanser tedavisi için dünyada birçok yeni stratejileri çalışılmaktadır. Kanser tedavilerinde kullanılan kemoteropatiklerin hedef hücrelerden başka özellikle karaciğer ve böbrek gibi hayati organlar üzerinde de oldukça toksik etkileri bulunmaktadır. Bu etkiler göz önüne alındığında, antikanserojen özellik taşıyan maddelerin farmakolojik ajanlar ile kombine kullanımının önemi ortaya çıkmaktadır.

Bunlara ek olarak, kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ROT artışı ile hücre ölümünün tetiklendiği bilinmektedir. Bu durumda, hedef hücrelerde daha fazla DNA hasarı

ve mutasyon oluşumu tetiklenebilmektedir. Bu durumda hücrelerde proliferasyonu arttıran bir diğer faktör gelişebilmektedir.

Bizim çalışmamız, kanser tedavisinde etkinliğin artırılması, DNA hasarlarının önlenmesi ve birtakım ilaç dirençlerinin gelişiminin engellenmesinde etkili olabilecek redoks dengesi tabanlı yeni terapötik ajanların geliştirilmesine katkıda bulunabilecektir. Ayrıca, tümör hücrelerinin seçici ölümünün uyarılması için yeni bir bakış açısı sağlayarak, yapılacak olan daha detaylı moleküler çalışmalara kaynak teşkil edecektir.

KAYNAKLAR

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008. *International Journal of Cancer*, 2010, 127: 2893-2917.
2. Aslan FE, Gürkan A. Kadınlarda meme kanseri risk düzeyi. *Meme Sağlığı Dergisi*, 2007, 3: 63-68.
3. Özmen V. Dünya’da ve Türkiye’de meme kanseri. *Meme Sağlığı Dergisi*, 2008, 4: 7-9.
4. Singh N, Nigam M, Ranjan V, Zaidi D, Garg VK, Sharma S, Chaturvedi R, Shankar R, Kumar S, Sharma R. Resveratrol as an adjunct therapy in cyclophosphamide-treated MCF-7 cells and breast tumor explants. *Cancer Science*, 2011, 102: 1059-1067.
5. García-Santos G, Antolín I, Herrera F, Martín V, Rodríguez-Blanco J, Carrera MP, Rodríguez C. Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells. *Journal of Pineal Research*, 2006, 41: 130-135.
6. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2000, 279: L1005-L1028.
7. Weinberg RA. The biology of cancer. 1. Baskı. Garland Science New York, 2007.
8. Ruddon RW. Cancer biology. 3. Baskı. Oxford University Press, USA, 2007.
9. Türkiye Onkoloji Hizmetleri Yeniden Yapılanma Programı kitapçığı http://www.kanser.org/saglik/userfiles/file/11Mayis2011/turkiye_onkoloji_hizmetleri_kitapcik.pdf, 22.08.2012.
10. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 2011, 144: 646-674.
11. Salyers AA, Whitt DD. A molecular approach. Bacterial pathogenesis, 2. baskı. Washington, DC: ASM Press, 2002.
12. Kumar V, Abbas AK, Aster J. Robbins basic pathology. 8. Baskı. WB saunders company, 2012.

13. Kai K. Survival Models with Gene Groups as Covariates. Department of Statistics. Dortmund: Dortmund University, 2012.
14. Kosova F, Arı Z. Adipositokinler ve Meme Kanseri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2008, 22: 377-384.
15. ABD Ulusal Kanser Enstitüsü <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>. 21.08.2012.
16. Meites J. Relation of prolactin and estrogen to mammary tumorigenesis in the rat. *Journal of the National Cancer Institute*, 1972, 48: 1217.
17. Cuzick J, Powles T, Veronesi U, Forbes J, Edwards R, Ashley S, Boyle P. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *The Lancet*, 2003, 361: 296-300.
18. Santen R, Cavalieri E, Rogan E, Russo J, Guttenplan J, Ingle J, Yue W. Estrogen Mediation of Breast Tumor Formation Involves Estrogen Receptor-Dependent, as Well as Independent, Genotoxic Effects. *Steroid Enzymes and Cancer*, 2009, 1155: 132-140.
19. Chetrite GS, Cortes-Prieto J, Philippe JC, Wright F, Pasqualini JR. Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 72: 23-27.
20. Satoh H, Yamashita F, Tsujimoto M, Murakami H, Koyabu N, Ohtani H, Sawada Y. Citrus juices inhibit the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B. *Drug Metabolism and Disposition*, 2005, 33: 518-523.
21. Sasano H, Frost AR, Saitoh R, Harada N, Poutanen M, Vihko R, Bulun SE, Silverberg SG, Nagura H. Aromatase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human breast carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1996, 81: 4042-4046.
22. Woo LWL, Purohit A, Reed MJ, Potter BVL. Active site directed inhibition of estrone sulfatase by nonsteroidal coumarin sulfamates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1996, 39: 1349-1351.
23. Suzuki T, Moriya T, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H. Intracrine mechanism of estrogen synthesis in breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2003, 57: 460-462.

24. Henderson BE, Ross R, Bernstein L. Estrogens as a Cause of Human Cancer - the Richard-and-Hinda-Rosenthal-Foundation Award Lecture. *Cancer Research*, 1988, 48: 246-253.
25. Carlstrom K. Influence of Intratumoral Estradiol Biosynthesis on Estrogen-Receptors. *Recent Results in Cancer Research*, 1984, 91: 145-149.
26. Duffy MJ. Predictive markers in breast and other cancers: A review. *Clinical Chemistry*, 2005, 51: 494-503.
27. Osborne CK. Drug therapy - Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 1998, 339: 1609-1618.
28. Pasqualini JR, Chetrite G, Blacker C, Feinstein MC, Delalonde L, Talbi M, Maloche C. Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1996, 81: 1460-1464.
29. Pasqualini JR, Maloche C, Maroni M, Chetrite G. Effect of the Progestagen Promegestone (R-5020) on Messenger-Rna of the Estrone Sulfatase in the Mcf-7 Human Mammary-Cancer Cells. *Anticancer Research*, 1994, 14: 1589-1593.
30. Miyoshi Y, Ando A, Shiba E, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Involvement of up-regulation of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in maintenance of intratumoral high estradiol levels in postmenopausal breast cancers. *International Journal of Cancer*, 2001, 94: 685-689.
31. Pasqualini JR. The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: a review. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 2004, 1654: 123-143.
32. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free radical research*, 2010, 44: 479-496.
33. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers in Bioscience*, 2005, 10: 1881-96.
34. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Research*, 1991, 51: 794-8.

35. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*, 1999, 93: 1464-1476.
36. Tikun ML, Liesch JB, Robertson FM. Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines. *Journal of immunology*, 1990, 145: 690-6.
37. Lo YY, Cruz TF. Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270: 11727-30.
38. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers in Bioscience*, 2005, 10: 1881-1896.
39. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9: 361-71.
40. Berasain C, Castillo J, Perugorria M, Latasa M, Prieto J, Avila M. Inflammation and liver cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009, 1155: 206-221.
41. Xiao H, Yang CS. Combination regimen with statins and NSAIDs: a promising strategy for cancer chemoprevention. *International Journal of Cancer*, 2008, 123: 983-990.
42. Cui S, Reichner JS, Mateo RB, Albina JE. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or-independent mechanisms. *Cancer Research*, 1994, 54: 2462-2467.
43. Khavari TA, Rinn JL. Ras/Erk MAPK signaling in epidermal homeostasis and neoplasia. *Cell Cycle*, 2007, 6: 2928-2931.
44. Roberts P, Der C. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 2007, 26: 3291-3310.
45. Irani K, Xia Y, Zweier JL, SolloTT SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science*, 1997, 275: 1649-52.
46. Reddy KB, Glaros S. Inhibition of the MAP kinase activity suppresses estrogen-induced breast tumor growth both in vitro and in vivo. *International Journal of Oncology*, 2007, 30: 971-975.

47. Lander HM, Hajjar DP, Hempstead BL, Mirza UA, Chait BT, Campbell S, Quilliam LA. A molecular redox switch on p21ras. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 4323-4326.
48. Chan DW, Liu VW, Tsao GS, Yao KM, Furukawa T, Chan KK, Ngan HY. Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*, 2008, 29: 1742-50.
49. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2007, 1773: 1263-84.
50. Wattenberg LW. Prevention - Therapy - Basic Science and the Resolution of the Cancer Problem - Presidential-Address. *Cancer Research*, 1993, 53: 5890-5896.
51. Kumar B, Koul S, Khandrika L, Meacham RB, Koul HK. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Research*, 2008, 68: 1777-1785.
52. Lee WC, Choi CH, Cha SH, Oh HL, Kim YK. Role of ERK in hydrogen peroxide-induced cell death of human glioma cells. *Neurochemical Research*, 2005, 30: 263-70.
53. Rygiel TP, Mertens AE, Strumane K, van der Kammen R, Collard JG. The Rac activator Tiam1 prevents keratinocyte apoptosis by controlling ROS-mediated ERK phosphorylation. *Journal of Cell Science*, 2008, 121: 1183-1192.
54. Ostrakhovitch EA, Cherian MG. Inhibition of extracellular signal regulated kinase (ERK) leads to apoptosis inducing factor (AIF) mediated apoptosis in epithelial breast cancer cells: the lack of effect of ERK in p53 mediated copper induced apoptosis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2005, 95: 1120-34.
55. Zhou J, Chen Y, Lang JY, Lu JJ, Ding J. Salvicine inactivates beta 1 integrin and inhibits adhesion of MDA-MB-435 cells to fibronectin via reactive oxygen species signaling. *Molecular Cancer Research*, 2008, 6: 194-204.
56. Chanvitayapongs S, DraczynskaLusiak B, Sun AY. Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. *Neuroreport*, 1997, 8: 1499-1502.

57. Khan NA. Antioxidants and cancer. *The Sciences*, 2002, 2: 38-43.
58. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92: 7162-7166.
59. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 *Mutations in Human Cancers*. *Science*, 1991, 253: 49-53.
60. Roemer K. Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biological Chemistry*, 2005, 380: 879-887.
61. Nelson WG, Kastan MB. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14: 1815-1823.
62. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*, 1996, 379: 88-91.
63. Lowe SW, Ruley HE. Stabilization of the P53 Tumor Suppressor Is Induced by Adenovirus-5 E1a and Accompanies Apoptosis. *Genes & Development*, 1993, 7: 535-545.
64. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*, 2000, 408: 307-310.
65. Vousden KH. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 2002, 1602: 47-59.
66. Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y, Nakamura Y. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature*, 2000, 404: 42-49.
67. El-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. *Seminars in Cancer Biology*, 1998, 8: 345-357.
68. Zhu KC, Wang J, Zhu JH, Jiang JY, Shou J, Chen XB. p53 induces TAP1 and enhances the transport of MHC class I peptides. *Oncogene*, 1999, 18: 7740-7747.

69. Almog N, Li RZ, Peled A, Schwartz D, Wolkowicz R, Goldfinger N, Pei HP, Rotter V. The murine C'-terminally alternatively spliced form of p53 induces attenuated apoptosis in myeloid cells. *Molecular And Cellular Biology*, 1997, 17: 713-722.
70. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 1997, 88: 323-331.
71. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*, 1999, 13: 1501-12.
72. Scandalios JG. Oxidative stress and defense mechanisms in plants: introduction. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, 23: 471-2.
73. Mura CV, Gong X, Taylor A, Villalobos-Molina R, Scrofano MM. Effects of calorie restriction and aging on the expression of antioxidant enzymes and ubiquitin in the liver of Emory mice. *Mechanisms of Ageing and Development*, 1996, 91: 115-29.
74. Ames BN. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutation Research*, 2001, 475: 7.
75. Celotti E, Ferrarini R, Zironi R, Conte LS. Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amarone. *Journal of Chromatography A*, 1996, 730: 47-52.
76. Dasgupta B, Milbrandt J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104: 7217-7222.
77. Huang C, Ma W, Goranson A, Dong Z. Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis*, 1999, 20: 237-242.
78. Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, Jang MS, Pezzuto JM, Dannenberg AJ. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273: 21875-21882.
79. Dercks W, Creasy LL. The Significance of Stilbene Phytoalexins in the Plasmopara-Viticola Grapevine Interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1989, 34: 189-202.

80. Jang MS, Cai EN, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 1997, 275: 218-220.
81. Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94: 14138-14143.
82. Surh YJ. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1999, 428: 305-327.
83. Sporn MB, Suh N. Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis*, 2000, 21: 525-30.
84. Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S. Effects of Stilbene Components of the Roots of *Polygonum-Cuspidatum* Sieb Et Zucc on Lipid-Metabolism. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1982, 30: 1766-1770.
85. Paceasciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The Red Wine Phenolics Trans-Resveratrol and Quercetin Block Human Platelet-Aggregation and Eicosanoid Synthesis - Implications for Protection against Coronary Heart-Disease. *Clinica Chimica Acta*, 1995, 235: 207-219.
86. PaceAsciak CR, Rounova O, Hahn SE, Diamandis EP, Goldberg DM. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clinica Chimica Acta*, 1996, 246: 163-182.
87. Bode AM, Dong Z. Signal transduction pathways: targets for chemoprevention of skin cancer. *The Lancet Oncology*, 2000, 1: 181-8.
88. She QB, Bode AM, Ma WY, Chen NY, Dong ZG. Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Research*, 2001, 61: 1604-1610.
89. Ahmad N, Adhami VM, Afaq F, Feyes DK, Mukhtar H. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G1-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clinical Cancer Research*, 2001, 7: 1466-1473.

90. Bertelli AAE, Giovannini L, Stradi R, Urien S, Tillement JP, Bertelli A. Evaluation of kinetic parameters of natural phytoalexin in resveratrol orally administered in wine to rats. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 1998, 24: 51-55.
91. Henry LA, Witt DM. Resveratrol: phytoestrogen effects on reproductive physiology and behavior in female rats. *Hormones and behavior*, 2002, 41: 220-228.
92. Pitot HC, Sirica AE. The Stages of Initiation and Promotion in Hepatocarcinogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1980, 605: 191-215.
93. Downer EJ, Gowran A, Murphy AC, Campbell VA. The tumour suppressor protein, p53, is involved in the activation of the apoptotic cascade by Delta(9)-tetrahydrocannabinol in cultured cortical neurons. *European Journal of Pharmacology*, 2007, 564: 57-65.
94. Gulati AP, Yang YM, Harter D, Mukhopadhyay A, Aggarwal BA, Benzil DL, Whysner J, Albino AP, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. Mutant human tumor suppressor p53 modulates the activation of mitogen-activated protein kinase and nuclear Factor-kappa B, but not C-Jun N-terminal kinase and activated protein-1. *Molecular Carcinogenesis*, 2006, 45: 26-37.
95. Cunningham ML. Role of increased DNA replication in the carcinogenic risk of nonmutagenic chemical carcinogens. *Mutation Research-Reviews in Genetic Toxicology*, 1996, 365: 59-69.
96. Barry MA, Behnke CA, Eastman A. Activation of Programmed Cell-Death (Apoptosis) by Cisplatin, Other Anticancer Drugs, Toxins and Hyperthermia. *Biochemical Pharmacology*, 1990, 40: 2353-2362.
97. Hickman JA. Apoptosis Induced by Anticancer Drugs. *Cancer and Metastasis Reviews*, 1992, 11: 121-139.
98. Tomei LD, Kanter P, Wenner CE. Inhibition of radiation-induced apoptosis in vitro by tumor promoters. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 1988, 155: 324-331.
99. Surh YJ, Hurh YJ, Kang JY, Lee E, Kong G, Lee SJ. Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Letters*, 1999, 140: 1-10.

100. Merritt AJ, Potten CS, Kemp CJ, Hickman JA, Balmain A, Lane DP, Hall PA. The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Research*, 1994, 54: 614.
101. McCarthy SA, Symonds HS, Vandyke T. Regulation of Apoptosis in Transgenic Mice by Simian-Virus-40 T-Antigen-Mediated Inactivation of P53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91: 3979-3983.
102. Wright SC, Zhong J, Zheng H, Larrick JW. Nicotine Inhibition of Apoptosis Suggests a Role in Tumor Promotion. *Faseb Journal*, 1993, 7: 1045-1051.
103. Wright SC, Zhong J, Larrick JW. Inhibition of Apoptosis as a Mechanism of Tumor Promotion. *Faseb Journal*, 1994, 8: 654-660.
104. Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Crowell JA, Lubet RA, Greenwald P, Hawk ET, Fay JR, Sigman CC. Mechanistic considerations in the evaluation of chemopreventive data. *Use of Short- and Medium-Term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation*, 1996: 203-19.
105. Reddy BS, Wang CX, Samaha H, Lubet R, Steele VE, Kelloff GJ, Rao CV. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. *Cancer Research*, 1997, 57: 420-425.
106. Bode AM, Dong Z. Signal transduction pathways: targets for chemoprevention of skin cancer. *Lancet Oncology*, 2000, 1: 181-188.
107. Song K, Milner JA. The influence of heating on the anticancer properties of garlic. *J Nutr*, 2001, 131: 1054S-1057S.
108. Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, Gerez C, Guittet O. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *Febs Letters*, 1998, 421: 277-279.
109. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 1997, 275: 218-220.
110. Bhat KPL, Lantvit D, Christov K, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models. *Cancer Research*, 2001, 61: 7456-7463.

111. Freshney I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 5th Edition. John Wiley and Sons, Inc., New Jersey, 2005.
112. Huang HL, Hsing HW, Lai TC, Chen YW, Lee TR, Chan HT, Lyu PC, Wu CL, Lu YC, Lin ST, Lin CW, Lai CH, Chang HT, Chou HC, Chan HL. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *Journal of Biomedical Science*, 2010, 17: 36.
113. Kalkan Y, Kapakin KAT, Kara A, Atabay T, Karadeniz A, Simsek N, Karakus E, Can I, Yildirim S, Ozkanlar S. Protective effect of Panax ginseng against serum biochemical changes and apoptosis in kidney of rats treated with gentamicin sulphate. *Journal of Molecular Histology*, 2012: 1-11.
114. Akman S, Canakci V, Kara A, Tozoglu U, Arabaci T, Dagsuyu İM. Therapeutic Effects of Alpha-lipoic Acid and Vitamin C on Alveolar Bone Resorption After Experimental Periodontitis in Rats. A Biochemical, Histochemical and Stereologic Study. *Journal of Periodontology*, 2012: 1-10.
115. Karadeniz A, Simsek N, Karakus E, Yildirim S, Kara A, Can I, Kisa F, Emre H, Turkeli M. Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 2011: 981793.
116. Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, Pietra VD, Racioppi L, Soldati G, Manna C, Galletti P, Zappia V. Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 250: 53-58.
117. Chen Y, Tseng SH, Lai HS, Chen WJ. Resveratrol-induced cellular apoptosis and cell cycle arrest in neuroblastoma cells and antitumor effects on neuroblastoma in mice. *Surgery*, 2004, 136: 57-66.
118. Linden M, Anehus S, Langstrom E, Baldetorp B, Heby O. Cell-Cycle Phase-Dependent Induction of Ornithine Decarboxylase-Antizyme. *Journal of Cellular Physiology*, 1985, 125: 273-276.
119. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of Human Ldl Oxidation by Resveratrol. *Lancet*, 1993, 341: 1103-1104.

120. Clément MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, Pervaiz S. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood*, 1998, 92: 996-1002.
121. Kopp P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *European Journal of Endocrinology*, 1998, 138: 619-620.
122. Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94: 14138.
123. Cetin-Atalay R, Ozturk M. p53 mutations as fingerprints of environmental carcinogens. *Pure and Applied Chemistry*, 2000, 72: 995-1000.
124. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 2003, 22: 9030-9040.
125. Montero S, Guzman C, Vargas C, Ballestin C, Cortes-Funes H, Colomer R. Prognostic value of cytosolic p53 protein in breast cancer. *Tumor Biology*, 2001, 22: 337-344.
126. Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. P53 and breast cancer, an update. *Endocrine-Related Cancer*, 2006, 13: 293-325.
127. Kaabinejadian S, Fouladdel S, Ramezani M, Azizi E. p53 expression in MCF7, T47D and MDA-MB 468 breast cancer cell lines treated with adriamycin using RT-PCR and immunocytochemistry. *Journal of Biological Sciences*, 2008, 8: 380-385.
128. Lee J, Cho K. Flaxseed sprouts induce apoptosis and inhibit growth in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2012, 48: 244-250.
129. Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, Tanaka K, Masuyama N, Gotoh Y. Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 21843-21850.
130. Garcia-Santos G, Antolin I, Herrera F, Martin V, Rodriguez-Blanco J, del Pilar Carrera M, Rodriguez C. Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells. *Journal of Pineal Research*, 2006, 41: 130-135.

131. Balcerkubiczek EK, Yin J, Lin K, Harrison GH, Abraham JM, Meltzer SJ. P53 Mutational Status and Survival of Human Breast-Cancer MCF-7 Cell Variants after Exposure to X-Rays or Fission Neutrons. *Radiation Research*, 1995, 142: 256-262.
132. Melnikova VO, Santamaria AB, Bolshakov SV, Ananthaswamy HN. Mutant p53 is constitutively phosphorylated at Serine 15 in UV-induced mouse skin tumors: involvement of ERK1/2 MAP kinase. *Oncogene*, 2003, 22: 5958-5966.
133. D'Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8: 813-824.
134. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 2007, 35: 495-516.
135. Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Disulfide relays and phosphorylative cascades: partners in redox-mediated signaling pathways. *Cell Death & Differentiation*, 2005, 12: 1555-1563.
136. Matsuzawa A, Ichijo H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2005, 7: 472-481.
137. Chopin V, Toillon RA, Jouy N, Le Bourhis X. P21WAF1/CIP1 is dispensable for G1 arrest, but indispensable for apoptosis induced by sodium butyrate in MCF-7 breast cancer cells. *Oncogene*, 2004, 23: 21-29.
138. Blundell RA. The Biology of p21 Waf1/Cip1-Review Paper. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2006, 2: 33-40.
139. Cayrol C, Knibiehler M, Ducommun B. p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene*, 1998, 16: 311.
140. Cui Q, Yu JH, Wu JN, Tashiro SI, Onodera S, Minami M, Ikejima T. P53-mediated cell cycle arrest and apoptosis through a caspase-3-independent, but caspase-9-dependent pathway in oridonin-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2007, 28: 1057-1066.
141. Osone S, Hosoi H, Kuwahara Y, Matsumoto Y, Iehara T, Sugimoto T. Fenretinide induces sustained-activation of JNK/p38 MAPK and apoptosis in a reactive oxygen

species-dependent manner in neuroblastoma cells. *International Journal of Cancer*, 2004, 112: 219-224.

142. Lenassi M, Plemenitas A. The role of p38 MAP kinase in cancer cell apoptosis. *Radiology and Oncology*, 2006, 40: 51.

143. Zarubin T, Jiahuai H. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research*, 2005, 15: 11-18.

144. Menon SG, Coleman MC, Walsh SA, Spitz DR, Goswami PC. Differential susceptibility of nonmalignant human breast epithelial cells and breast cancer cells to thiol antioxidant-induced G1-delay. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2005, 7: 711-718.

145. Ruiz-Ramos R, Lopez-Carrillo L, Rios-Perez AD, De Vizcaya-Ruiz A, Cebrian ME. Sodium arsenite induces ROS generation, DNA oxidative damage, HO-1 and c-Myc proteins, NF- κ B activation and cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2009, 674: 109-115.

146. Burdick AD, Davis JW, Liu KJ, Hudson LG, Shi H, Monske ML, Burchiel SW. Benzo (a) pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells. *Cancer Research*, 2003, 63: 7825-7833.

147. Cullen JJ, Weydert C, Hinkhouse MM, Ritchie J, Domann FE, Spitz D, Oberley LW. The role of manganese superoxide dismutase in the growth of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Research*, 2003, 63: 1297-1303.

148. Lewis A, Du J, Liu J, Ritchie JM, Oberley LW, Cullen JJ. Metastatic progression of pancreatic cancer: changes in antioxidant enzymes and cell growth. *Clinical and Experimental Metastasis*, 2005, 22: 523-532.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

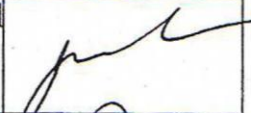
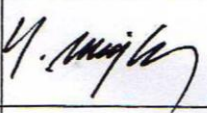
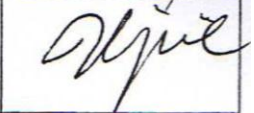
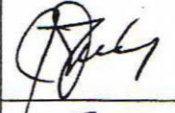
KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Adem Kara
Doğum Tarihi	: 1982
Doğum Yeri	: Kars
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Kampüs/Erzurum
Telefon	: +90 442 231 5538
Fax	: +90 442 236 08 81
E- Posta	: ademkara_36@hotmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Alpaslan Lisesi
Lisans	: Van Yüzüncü Yıl Veteriner Fakültesi
Yüksek Lisans	: Yok
Doktora	: Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU

“2012. 2.10 “SAĞLIK BİLİMLERİ ETİK KURUL KARARI 08.05.2012

2/10 -Enstitümüz Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Adem KARA’ nın “ Resveratrolün Meme Kanseri Hücre Kültüründeki p53 Aracılı Apoptoz Aktivasyonunun ve Sitotoksitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), İmmünohistokimya ve MTT Yöntemleriyle Araştırılması” tez konusu görüşüldü;

İlgilinin tez konusunun etik değerlere uygun olduğu mevcudun oybirliği ile,

ADI SOYADI	GÖREVİ	İMZA
Prof. Dr. Funda BAYINDIR	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkanı	
Doç. Dr. Ayşe OKANLI	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Başkan Yardımcısı	
Prof. Dr. Samih DİYARBAKIR	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	Katılmadı
Prof.Dr.Yavuz Selim SAĞLAM	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Prof. Dr. H. İnci GÜL	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Doç.Dr.Ahmet YILDIZ	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	Katılmadı
Doç. Dr.Abdulkadir YILDIRIM	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Yrd.Doç.Dr.Engin SAYGIN	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi	
Yrd. Doç. Dr. İlhan ŞEN	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurul Üyesi ve Raportör	