



KUZEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİ
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RESVERATROLÜN HEPATOSELÜLER KARSİNOM
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK VE
ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİ**

NADİRE KIYAK

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DANIŞMAN

Prof. Dr. AYSEL KÜKNER

EŞ DANIŞMAN

Doç. Dr. EDA BECER

LEFKOŞA-2020

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlamasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Nadire Kıyak

TEŞEKKÜR

Tez süreci boyunca desteklerini ve yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Aysel Kükner'e,

Tez çalışması boyunca bana yol gösteren, konunun belirlenmesi ve uygulanması için elinden gelen tüm desteği ve emeği gösteren eş danışmanım Sayın Doç. Dr. Eda Becer'e,

Çalışmanın gerçekleşebilmesi için gerekli desteği sağlayan, tecrübeleriyle katkılarını koyan Sayın Prof. Dr. Seda Vatansever'e,

Hücrelerin fotoğraflanmasında desteklerinden ötürü Sayın Dr. Sonuç Büyük'e,

Çalışmanın laboratuvar aşamalarının yürütülmesinde destek veren DESAM Hücre Kültürü Laboratuvar sorumluları ve çalışanlarına,

Bana gösterdikleri manevi destek ve anlayış için arkadaşım Gökçen Kofalı ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Bu süreçte beni sürekli arayıp, destekleri ile kendimi iyi hissettiren çok sevgili ailem ve arkadaşlarıma,

Hayatımda attığım her adımda yanımda olan, üzerimde sonsuz emekleri olan, gökyüzünden beni izlediğini her an hissettiğim melek babam Derviş K1yak'a, canım annem Muazzez K1yak'a, her zaman sırtımı güvenle yasladığım, abim Özgür K1yak ve kardeşim Cemre K1yak'a

Son olarak bu süreçte bana gösterdiği sonsuz sevgi, sabır, anlayış ve desteği için verdiğim tüm kararlarda yanımda olan hayat ve yol arkadaşım canım eşim Özdemir Özoktaş'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Nadire K1yak

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Karaciğer Kanserinin Özellikleri.....	6
2.2. Resveratrol ve Hepatoselüler Karsinom.....	8
2.3. Apoptozis.....	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1. Resveratrolün Hücrelere Uygulanması.....	18
3.2. Hücre Kültürü ve Hücre Hattı	18
3.2.1 Hücre açma protokolü	18
3.2.2 Hücre hattı ve vasat hazırlığı.....	18
3.2.3 Hücre pasajlama protokolü.....	19
3.2.4. Hücre dondurma protokolü	19
3.2.5. Hücre fiksasyon protokolü	20
3.3. Hücre Canlılığı ve Büyümesi Analizi.....	20
3.4. İmmunohistokimya Protokolü	21
3.6. İstatistiksel Analiz	23
4. BULGULAR	24
4.1. Hücre Canlılığı ve Sitotoksitesitesi	24
4.2. Hücre Morfolojisi	25
4.3. İmmunohistokimyasal Değerlendirme	26
5. TARTIŞMA	29
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	34
7. KAYNAKLAR	35

KISALTMA ve SİMGELER

%: Yüzde

-: Negatif

+: Pozitif

<: Küçüktür işareti

>: Büyüktür işareti

±: Artı-eksi işareti

л: Yoğunluk

μl: Mikrolitre

μM: Mikromolar

AIF: Apoptoz İndükleyici Faktör

APAF1: Apoptotik Proteaz Aktive edici Faktör

ark.: Arkadaşları

Bcl-2: B hücreli lenfoma 2

°C: Santigrat

Ca⁺²: Kalsiyum

CO₂: Karbondioksit

DAB: Diaminobenzidin

DESAM: Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi

DISC: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi

dk: Dakika

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

Endo G: Endonükleaz G

ER: Endoplazmik retikulum

FADD: Fas-bağımlı ölüm domain proteini

Fas-L: FasLigand

FBS: Fetal sığır serumu

g: Gram

H: Hidrojen

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HBV: Hepatit B virüsü

HCV: Hepatit C virüsü

HEPG2: İnsan Hepatoselüler Karsinom hücreleri

HRP: Horseradish peroksidaz

HCC: Hepatoselüler karsinom

IAP: Apoptoz İnhibitörü proteinleri

IL-1: İnterlökin-1

IL-1 α : İnterlökin-1 alfa

IL-1 β : İnterlökin-1 beta

IL-6: İnterlökin-6

IL-8: İnterlökin-8

i: Yoğunluk

L: Litre

mg: Miligram

ml: Mililitre

MTT: 3- (4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür

O: Oksijen

-OH: Hidroksil

p53: Tümör baskılayıcı protein 53

PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

RNA: Ribonükleik asit

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SIRT1: Sirtuin 1

Sito-c: Sitokrom c

TNF- α : Tümör nekrozis faktör alfa

vb.: Ve benzeri

VEGF: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

YDÜ: Yakın Doğu Üniversitesi

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1. Resveratrolün kimyasal yapısı	9
Şekil 2. Resveratrolün kanser mekanizmalarına etkisi	11
Şekil 3. İçsel ve dışsal apoptozis yolu	17
Şekil 4. Resveratrolün hücre canlılığı-konsantrasyon sütunları	24
Şekil 5. İnverted mikroskopta görüntülenen HepG2 hücrelerin farklı büyüklüklerde morfolojik görüntüleri (A-B) ve resveratrol uygulandıktan sonra HepG2 hücreleri (C-D)	25
Şekil 6. Standart kültür şartlarında ve 100 µM resveratrol ile 48 saat kültüre edilen HepG2 hücrelerinde Fas-L, sitokrom-c, kaspaz-3 ve Ki-67 immunoreaktiviteleri (A-H)	28

TABLolar

	Sayfa
Tablo 1. Resveratrol'un fiziksel ve moleküler özellikleri	9
Tablo 2. Bazı besinlerin resveratrol içerikleri	11
Tablo 3. 100 µM resveratrol ile 48 saat inkübe edilmiş HepG2 hücrelerinde Fas-L, sitokrom-c, kaspaz-3 ve Ki-67 H-SKOR değerleri	37
Tablo 4. 100 µM resveratrol (48 saat) uygulanan HepG2 hücrelerinde Fas-L, sitokrom-c, kaspaz-3 ve Ki-67 immünoboyamaları. (+): zayıf, (++) : orta, (+++) : güçlü	37

Resveratrolün hepatoselüler karsinom hücreleri üzerindeki apoptotik ve anti-proliferatif etkileri.

ÖğrencininAdı: Nadire Kıyak

Danışmanı: Prof. Dr. Aysel Kükner

Eş Danışmanı: Doç. Dr. Eda Becer

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

ÖZET

Amaç: Resveratrol, insan sağlığını olumlu yönde etkileyen etkileyen flavonoid olmayan, polifenolik bir bileşiktir. Resveratrol anti-kanser, anti-inflamatuvar ve anti-mikrobiyal özelliklere sahiptir. Aynı zamanda resveratrolün kanser önleyici ve anti-kanser özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, resveratrolün insan hepatoselüler karsinom hücre (HepG2) hatlarında hücre canlılığı, apoptoz ve hücresele proliferasyonu üzerindeki etkilerini araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Proje için, insan primer karaciğer kanseri hepatoselüler karsinom hücre hattı olan HepG2 (ATCC® HB-8065™) hücreleri kullanılacaktır. Hücre çoğalması ve sitotoksitesi, MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) testi ile analiz edildi. HepG2 hücreleri, farklı resveratrol konsantrasyonlarıyla (5, 10, 25, 50 ve 100 µM) inkübe edildi. Resveratrolün antikanser ve proapoptotik özellikleri kaspaz-3, sitokrom-c, FasLigand ve Ki-67 antikorları kullanılarak immünositokimyal olarak ile belirlendi.

Bulgular: MTT test sonuçlarına göre HepG2 hücre popülasyonunun çoğalmasını inhibe eden etkin resveratrol dozu 48 saat sonucunda 100 µM olarak hesaplandı. Resveratrolün HepG2 hücrelerinde sitokrom-c immünoaktivitesini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı bulundu. Ayrıca resveratrolün HepG2 hücrelerinde Ki-67 immünoaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi.

Sonuç: Sonuçlarımız, resveratrolün insan hepatosellüler karsinom hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermektedir. Resveratrol, insan hepatoselüler karsinom hücrelerinde intrinsik apoptotik yolu tetiklemiştir. Ayrıca, HepG2 hücreleri üzerinde antiproliferatif etki göstererek Ki-67 immünoaktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır.

Anahtar kelimeler: resveratrol, apoptoz, insan hepatosellüler karsinom

Apoptotic and antiproliferative effects of resveratrol in hepatocellular carcinoma cell line.

Student's Name: Nadire Kıyak

Advisor: Prof. Dr. Aysel Kükner

Co-advisor: Assoc. Prof. Dr. Eda Becer

Department: Histology and Embryology

ABSTRACT

Objectives: Resveratrol is a polyphenol nonflavonoid compound which positively affects human health due to its anti-cancer, anti-inflammatory and anti-microbial properties. It had also been shown that resveratrol has role in preventive of cancer and anti-cancer properties. In this study, we aimed to investigate the effects of resveratrol on cell viability, apoptosis and cellular proliferation in human hepatocellular carcinoma cell (HepG2) line.

Materials and Methods: Cytotoxicity was analyzed via MTT assay on HepG2 cells. HepG2 were treated with different resveratrol concentrations (5, 10, 25, 50, and 100 mM). Anti-cancer and proapoptotic properties of resveratrol were determined by immunocytochemistry using antibodies against caspase-3, cytochrome-c, Fas Ligand and Ki-67.

Results: The effective dose for inhibition of cell growth in HepG2 cells was determined to be 100 μ M resveratrol for 48 hours. The immunoreactivity of cytochrome-c was significantly higher in resveratrol-treated HepG2 cells than the control group ($p < 0.05$). Also, immunoreactivity of Ki-67 in resveratrol-treated HepG2 cells was significantly lower than the control group ($p < 0.05$).

Conclusions: Our results suggested that resveratrol induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. Interestingly, resveratrol triggered intrinsic apoptotic pathway in human hepatocellular carcinoma cells. Moreover, resveratrol decreased significantly Ki-67 immunoreactivity and showed anti-proliferative effects in HepG2 cells.

Keywords: resveratrol, apoptosis, human hepatocellular carcinoma

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanserler, vücudun diğer bölgelerine istila ve yayılma potansiyeli olan anormal hücre büyümesini içeren geniş bir hastalık ailesidir. Normal bir hücrenin bir kanser hücresine dönüşmesi için, büyümesini ve farklılaşmasını düzenleyen genlerin değiştirilmesi gerekir. Kanserlerin çoğunluğu (% 90-95) çevresel faktörlerin neden olduğu genetik mutasyonlardan kaynaklanırken, geri kalan% 5-10 kalıtsal genlerden kaynaklanmaktadır (Elshaer ve ark., 2018).

Karaciğer kanseri, dünyada en sık görülen beşinci kanser türüdür. Kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır. Hepatoselüler karsinom, primer karaciğer kanserlerinin yaklaşık % 90'ını temsil eder ve önemli bir küresel sağlık problemini oluşturur (Galle ve ark., 2018). Kanser tedavi yöntemlerinde birçok fitokimyasalın koruyucu etki gösterdiği bir çok çalışmada görülmüştür. Primer karaciğer kanseri olan heparoselüler karsinom tedavisinde resveratrol ve kersetin gibi fitokimyasalların hücre aktivitesini inhibe edilmesinde rolü olduğu görülmüştür (Galinak ve ark., 2019; Andres ve ark.,2017). Bazı gıdalar karmaşık polifenol karışımları içermesine rağmen, çeşitli faktörler içeriklerini etkileyebilir. Bu moleküllerin antioksidanlar olarak iyi bilinen kapasitelerinin yanı sıra, hücre sinyal yollarıyla, gen ekspresyonunu modüle ederek, transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini ve mikroRNA'ları modüle edebilirler (Cione ve ark., 2020).

Resveratrol (3,4 5, 5-Trihidroksi-trans-stilben) bakteri ve mantarlar tarafından saldırıya uğradığında birkaç bitki tarafından doğal olarak üretilen bir polifenolik fitoaleksindir. Fitoaleksinler, patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı savunma için bitkiler tarafından üretilen antibakteriyel ve mantar önleyici kimyasallardır. Güçlü antioksidanlardan biri olan resveratrol, kırmızı üzüm, dut ve mavi çilek, yabanmersini içinde bulunur, ayrıca okaliptüs, ladin ve zambak gibi diğer bitkilerde ve yer fıstığı gibi diğer gıdalarda bulunur (Kim ve ark., 2016; Fu ve ark., 2019; Elshaer ve ark., 2018). Anti-oksidan, nöroprotektör, kardiyoprotektör ve anti-kanser ajan olarak hareket ederek insan sağlığında faydalı biyolojik aktivitelerin geniş spektrumuna sahip bir bileşiktir (Fu ve ark., 2019). Resveratrol, çeşitli in vitro ve in vivo deney modellerinde anti-glikasyon, antioksidan, anti-inflamasyon, nöroprotektif, anti-kanser ve yaşlanmaya karşı aktivitesi gibi çok çeşitli biyolojik özellikleri ortaya çıkarır (Galiniak ve ark., 2019).

Apoptoz, diğ er bir adıyla programlanmış hücre ölümü; hasarlı veya anormal hücreleri ortadan kaldırmak için genetik olarak düzenlenmiş bir fizyolojik mekanizmadır. Embriyonik, fetal ve erişkin dokularda fizyolojik büyüme kontrol düzenleyicisi ve doku-homeostaz moderatörü olarak da önemlidir. Apoptotik hücreler, membran sızması, hücre bü zülmesi, nükleer DNA parçalanması, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin oluşumu gibi düzenli biyokimyasal ve morfolojik özellikler ile tanımlanabilir. Apoptoz, mitokondri-apoptozom aracılı içsel (intrinsik) yol, ölüm reseptörünün indüklediğ i dışsal (ekstrinsik) yol ve T- hücre aracılı yol olmak üzere üç ana yol ile aktive edilebilir (Ko ve ark., 2017; Green, 2019). Apoptoza aracılık eden birçok faktör, memeli hücrelerindeki kaspaz kaskadındaki anahtar proteazlardan biri olarak kabul edilen kritik efektör kaspaz-3'ü aktifleştirmek için birleşir. Kaspaz-3 sitoplazmada 32 kD aktif olmayan bir öncü olarak bulunur ve apoptoz sırasında yukarı akış kaspaz, kaspaz-9 aktivasyonu ile bölünür ve aktive edilir. Kaspaza bağı lı apoptoz, mitokondriyal yol, ölüm reseptör yolu ve endoplazmik retikulum yolunu içerir. Mitokondri özellikle erken apoptotik süreçte etkilenir ve hücre ölümünün merkezi koordinatörü olarak hareket ettiğ i düşünölmektedir (Li ve ark., 2012). Tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörü süper familyasındaki ölüm reseptörlerinin tetiklenmesi, örneğ in Fas (CD95 / APO-1) veya TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) reseptörleri, başlatıcı kaspaz-8'in aktive olmasına neden olur. Apoptoz sinyaline, kaspaz-3 gibi akış aşığ ı efektör kaspazların doğrudan yarı lması yoluyla aracılık edebilir. İçsel yol, Omi / HtrA2, Smac / DIABLO, sitokrom c, apoptozu indükleyen faktörler (AIF'ler), endonükleaz G, kaspaz-2 veya kaspaz-9 gibi apoptojenik faktörlerin mitokondriyal intermembran boşluğ undan verilmesi ile tetiklenir. Sitokrom c'nin sitozole yayılması, sitokrom c / apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) / kaspaz-9 içeren apoptozom kompleksinin oluşturulması yoluyla kaspaz-3'ü aktive eder; Omi / HtrA2 ve Smac / DIABLO, apoptotik proteinlerin (IAP) inhibitörlerinin etkilerini nötralize ederek kaspaz aktivasyonunu teşvik eder ve apoptozun son basamağ ını başlatan apoptozomu tetiklemektedir (Ko ve ark., 2017). T hücre aracılı hücre ölümü, CD8+ yani sitotoksik T hücrelerinin antijen taşıyan hücreyi öldürmesidir. Bu sitotoksik T hücreleri genellikle dışsal yol ile hücreyi öldürürler. Ayrıca T hücresi doğrudan perforin salgılayarak hedef hücrenin membranında kanallar açılmasını sağ lar. Perforin salgısının ardından proteaz olan granzim A ve granzim B enzimlerini içeren sitoplazmik

granülleri hedef hücrenin içerisine girer. Böylelikle hücrenin ölümü gerçekleşmiş olur (Green, 2019; Martinez-Lostao ve ark., 2015)

Bu çalışmada, insan primer karaciğer kanseri olan hepatoselüler karsinom (HepG2) hücrelerinde resveratrolün anti-kanser aktivitelerini belirlemek için MTT testi ve immunositokimya boyamaları kullanılmıştır.

Bu çalışmanın amacı:

I. Resveratrolün HepG2 hücrelerinde, antiproliferatif ve apoptotik etkilerinin belirlenmesidir.

II. Klinik uygulamada resveratrolün etkilerinin belirlenebilmesi için ön verilerin elde edilmesidir. İn vitro ortamda yapılan bu çalışma, in vivo ortamda yapılacak çalışmalar için ön çalışma olma özelliğindedir.

Çalışma hipotezi şu şekildedir: Resveratrolün hepatoselüler karsinom hücrelerinde antiproliferatif etki gösterecek ve apoptozu indükleyecektir. Aynı zamanda doza bağlı olarak kanser hücre canlılığı da azalacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Kanserinin Özellikleri

Karaciğer, insan vücudunun en büyük iç organıdır. Sağ akciğerin hemen altında sağ kaburgaların altında bulunur. İki bölümü vardır. Karaciğer esas olarak hepatosit adı verilen hücrelerden oluşur. Safra kanalları safrayı karaciğerden safra kesesine veya doğrudan bağırsaklara taşır. Karaciğerdeki farklı hücre tipleri, çeşitli tiplerde malign (kanserli) ve iyi huylu (kanserli olmayan) tümörler oluşturabilir. Bu tümörlerin farklı nedenleri olmakla birlikte, tedavileri de farklı şekilde olabilmektedir (American Cancer Society, 2018). Kansere en sık teşhis edilen hastalıklardan biridir ve buna bağlı morbidite ve mortalite dünya çapında çok önemli bir sağlık problemidir. Kansere gelişimi, normal hücrelerin genetik yapılarında mutasyonlar aldığı, hücrelerin sürekli olarak büyümesine, kolonileşmesine ve karaciğer, akciğerler, kolon ve beyin gibi diğer organlara metastaz yapmasına neden olan bir şekilde düzenlenmiş bir ilerlemedir (Ko ve ark., 2017).

Karaciğer kanseri, dünyada en sık görülen beşinci kanser türüdür. Kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır (Galle ve ark., 2018). Karaciğer kanseri, başlangıçta karaciğerin dokusunda oluşan bir tümördür. Kansere hücre tipine göre farklı karaciğer kanseri türleri vardır (Trojan ve ark., 2016). Karaciğer kanseri primer ve sekonder olarak iki tipe ayrılır. Primer karaciğer kanseri, karaciğer hücresinden kaynaklanır. Sekonder karaciğer kanseri veya karaciğer metastazları olarak bilinen, vücudun diğer bölümlerinden yayılan kanser tipidir (Galle ve ark., 2018). Hepatoselüler karsinom (HCC), primer karaciğer kanserlerinin yaklaşık % 90'ını temsil eder ve önemli bir küresel sağlık problemini oluşturur (Galle ve ark., 2018). Hepatoselüler karsinom, yetişkinlerde en sık görülen karaciğer kanseri türüdür. Hepatoselüler kanserler farklı büyüme modellerine sahip olabilmektedir: Bazıları daha büyük büyüyen tek bir tümör olarak başlar. Hastalığın sadece geç döneminde karaciğerin diğer bölgelerine yayılır. İkinci bir tip, sadece tek bir tümör değil, karaciğer boyunca çok sayıda küçük kanser nodülü ile başlar. Bu en sık sirozlu (kronik karaciğer hasarı) kişilerde görülmektedir (American Cancer Society, 2018). HCC, en sık görülen primer karaciğer kanseri ve dünya çapında dördüncü ölümcül neoplazm olarak sıralanan, daha yüksek insidansa sahip altıncı tümördür. Başlıca hepatit B ve C virüsü (sırasıyla HBV ve HCV) olmak

üzere farklı etiyolojik ajanların neden olduğu karaciğer hasarı, yıllardan on yıllara kadar sürebilen karaciğer fibrozu ve sirozu aşamalarında HCC gelişimine katkıda bulunur (Palanca ve Ark., 2019). Hepatoselüler karsinom, karaciğerin ana hücreleri olan hepatositlerde başlar. HCC, karaciğer sirozunun sık görülen bir komplikasyonudur. Dünya çapında hepatoselüler karsinom, insidans artışı ile en yaygın kanserlerden biridir. HCC riski, altında yatan karaciğer hastalığının etiyolojisi, aktivitesi ve aşamasından etkilenir (Trojan ve ark., 2016). Hepatoselüler karsinom, hepatositlerin kontrolsüz büyümesine yol açan çoklu sinyalleme basamaklarını etkileyen genetik değişikliklerle karakterizedir (Jeon ve ark.,2018).

Karaciğer sirozu, kronik karaciğer hasarına yanıt olarak gelişen yoğun bağ doku ile çevrili rejeneratif nodüller ile ortaya çıkan fibrozisin ileri bir aşamasıdır. Alkol tüketimi, dünya çapında karaciğer sirozunun yaygın nedenlerinden biridir. Alkolik karaciğer sirozu, hepatoselüler karsinomun gelişmesinden ve ölüm oranının yüksek olmasından sorumludur (Shin ve ark., 2020). Hepatit B ve C virüsleri, karaciğer sirozuna ve hepatoselüler karsinom'a yol açabilen akut ve kronik enfeksiyonlara neden olan küresel bir sağlık sorunudur. Bu enfeksiyonlar dünya çapında HCC'un önde gelen nedenleri arasındadır. Yılda 1,3 milyondan fazla ölümün meydana gelmesiyle önemli mortalite ile ilişkilidir. HCC, erkeklere karşı belirgin bir cinsiyet farklılığı gösterir ve HBV yüzey antijeni prevalansı ile korelasyonu olan, az gelişmiş bölgelerde önemli bir kanserdir. Yüksek insidansı ve tedaviye direnci nedeniyle, karaciğer kanseri, kansere bağlı ölümün ikinci önde gelen nedenidir (Ringehan ve ark., 2017). Hepatit B virüsü (HBV) veya hepatit C virüsü (HCV) ile kronik enfeksiyona bağlı karaciğer sirozu olan hastalar en yüksek riske sahiptir (Trojan ve Ark., 2016). Hepatoselüler karsinom, klinik çalışma ve tanıdaki iyileşmelere rağmen, en sık görülen primer karaciğer kanseri türüdür. Cerrahi rezeksiyon sonrası %70 nüks ve akciğer metastazı nedeniyle HCC hala yüksek mortalite olmaya devam etmektedir. Tümör metastazı, kanser hücrelerinin, tümörün uzak organlara, kaynaklandığı primer bölgeden lenfatik ve kan damarları yoluyla yayılmasıdır. Hepatoselüler karsinomun metastazı, yalnızca karaciğer kanseri hücrelerinin apoptotik sinyallerden kaçmasını ve immün yanıtlara ev sahipliği yapmasını değil, aynı zamanda tümör mikro - ortamında hücreler arası iletişimin de gerekli olduğu çok adımlı bir süreçtir (Ge ve ark., 2020).

Hepatoselüler karsinom, tümörün yıkıcı etkilerini arttıran oksidatif stres ve inflamatuvar sitokinlerde yükselme ile karakterizedir (El-Far ve ark., 2020). Hücre dışı matriks; birçok heterojen molekülden oluşur. Nükleer faktörler, inflamatuvar hücreler, anjiyogenez destekleyiciler ve birçok biyolojik olarak aktif molekül için bir depo görevi görür (Kumar ve Santhi., 2012). Tüm bu makromoleküllerin salınması, hücrelerin proliferasyonunu ve tümör hücrelerinin invazyonuna ve metastazına yol açan farklılaşmayı kontrol ederek HCC'nin patogenezinin ve ilerlemesine yol açan bu yolları aktive eder (Gonzales ve ark., 2012). HCC, yüksek mortalite oranı ile bağlantılıdır (El-Far ve ark., 2020). Oksidatif stres, HCC'nin gelişiminde ve ilerlemesinde kilit bir oyuncudur. Oksidatif stresin hücre proliferasyonunu, apoptozu ve hücre döngüsünü etkilediği bildirilmiştir (Darweish ve ark., 2014; Marra ve ark., 2011). Oksidatif stres, hücre büyümesi ve transformasyonunun düzenlenmesi üzerinde daha sonra etki ederek mitojenle aktive edilen protein kinazları aktive eder. Oksidatif stres hücre dışı matriks oluşumunu ve hücre-hücre etkileşimini etkiler (Finkel ve Holbrook, 2000). HCC hastalarının % 90'ından fazlası kronik karaciğer hasarı geliştirdiğinden HCC, inflamasyon temelli kanserojen bir süreçtir. NFκB, pro-inflamatuvar sitokinlere aracılık eder ve HCC de dahil olmak üzere birçok kanser türüyle bağlantılıdır. Pro-inflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu indükler. Ek olarak, TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-6 ve IL-8, gibi birçok inflamatuvar sitokin, kronik karaciğer iltihabı ile ilişkilendirilmiştir (El-Far ve ark., 2020).

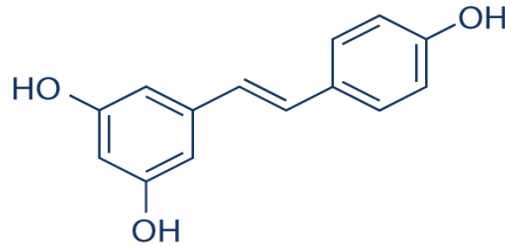
2.2. Resveratrol ve Hepatoselüler Karsinom

Resveratrol, (3,5,4'-trans-trihidroksstilben) stilben familyasına ait bir polifenolik bileşiktir (Galinak ve ark., 2019). Resveratrol, bakteri ve mantarlar tarafından saldırıya uğradığında birkaç bitki tarafından doğal olarak üretilen bir polifenolik fitoaleksindir. Fitoaleksinler, patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı savunma için bitkiler tarafından üretilen antibakteriyel ve mantar önleyici kimyasallardır (Kumar ve ark., 2009) (Tablo 1). Çoğunlukla üzüm kabuğunda ve tohumlarında oluşan doğal bir bileşiktir. Aynı zamanda şaraplarda ve diğer yer fıstığı, çilek, okaliptüs, ladin, zambak ve çay gibi çeşitli bitkisel gıdalarda bulunur (Galiniak ve ark., 2019) (Tablo 2).

Tablo 1. Resveratrol'un fiziksel ve moleküler özellikleri (Kumar ve ark., 2009).

Moleküler Formül	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Moleküler Ağırlık	228.24
Erime Noktası	253°C – 257°C
Çözünürlük	Suda zayıf çözünür. Kloroform, etanol, asetik asit ve asetonda çözünür.
Görünüm	İnce Kristal toz
Renk	Beyaz
Spesifik Rotasyon	[α]: - 77.5° (c=0.2, EtOH)

Resveratrol'un trans- ve cis-izomer formları da bulunur; bununla birlikte, cis-resveratrol izomeri kararsızdır ve ışığa reaksiyona girdiğinde kolaylıkla trans-forma dönüştürülür. Suda çözünmez ancak etanol ve dimetil sülfoksit gibi polar çözücülerde çözünür. Resveratrol suda düşük çözünürlüğe ve düşük oral biyoyararlanım ve sistemde hızla metabolize olur. Kötü biyoyararlanımı, karaciğerdeki hızlı metabolizmasına glukuronidlere ve sülfatlara bağlanır (Abba ve ark., 2015).



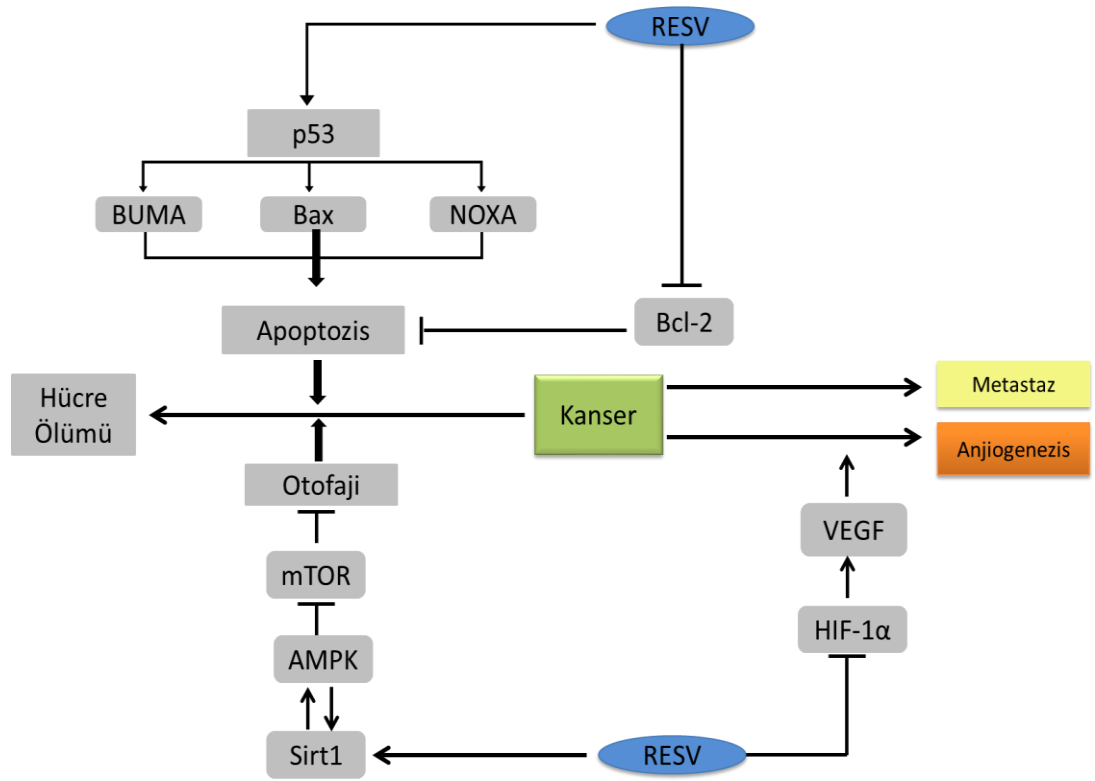
Şekil 1. Resveratrolün kimyasal yapısı (Kumar ve ark., 2009).

Doğal bir stilben ve flavonoid olmayan bir polifenol olan resveratrol, anti-oksidan, anti-inflamatuar, kardiyoprotektif ve anti-kanser özelliklerine sahip bir fitoöstrojendir. Resveratrol'ün kanser hücrelerinde çoklu ilaç direncini tersine çevirebildiği ve klinik olarak kullanılan ilaçlarla birlikte kullanıldığında kanser hücrelerini standart kemoterapötik ajanlara duyarlı hale getirebileceği bildirilmiştir. Geliştirilmiş anti-kanser aktivitesi, biyoyararlanım ve farmakokinetik profil ile çeşitli yeni resveratrol analogları geliştirilmiştir (Ko ve ark., 2017). Bu bileşik, glikasyon, oksidatif stres, inflamasyon, nörodejenerasyon, çeşitli kanser türleri ve yaşlanmaya karşı aktivite de dahil olmak üzere birçok özelliğe sahiptir. Fakat bu bileşik düşük biyoyararlanım ve çözünürlük sergiler. Resveratrol, enfeksiyon, stres, yaralanma, bakteri veya mantar enfeksiyonlarına ve UV ışınlamasına yanıt olarak 70'ten fazla bitki türü tarafından sentezlenir. Bu molekülün bitkilerdeki sentezi, flavonoidlerinkine benzer bir işlemde fenilpropanoid yolundaki resveratrol sentaz ile katalize edilir. Resveratrol, bir çift stiren bağı ile birbirine bağlanmış iki fenil halkasına (mono fenol ve fenol) sahiptir ve hem cis hem de trans izomerik formlarda bulunur (Galinak ve ark., 2019).

Tablo 2. Bazı besinlerin resveratrol içerikleri (Xiao ve ark., 2019; Cione ve ark., 2020).

Besin	Resveratrol Miktarı
Kırmızı şarap	0.27 mg/100ml
Kırmızı böğürtlen	3.0 mg/100g
Üzüm kabuğu	50- 100 µg/g
Yer fıstığı (Çiğ)	0.04 mg/100g
Yer fıstığı (Kaynanmış)	1.8 – 7.1 µg/g
Itadori yaprağı (Genç)	867 ± 17 µg/g
Siyah üzüm	0.15 mg/100g
Yaban mersini	0.67 mg/100g
Üzüm suyu (siyah)	0.05-0,5 mg/L
Itadori çayı	974 ± 2 µg/g

İnsan diyetinde düşük miktarlarda stilben bulunur ve ana temsilci resveratrol'dür. Bu bileşik ilk önce *Veratrum grandiflorum* köklerinden izole edilmiştir. 1940'ta Loes ve daha sonra *Polygonum cuspidatum* köklerinden izole edilmiştir. Patojenler veya çeşitli stres koşullarına bağlı enfeksiyona yanıt olarak bitkiler tarafından üretilir. Üzüm, çilek ve yer fıstığı da dahil olmak üzere 70'ten fazla bitki türünde tespit edilmiştir. Birçok çalışma bu bileşiğin çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğunu vurgulamıştır (Cione ve ark., 2020).



Şekil 2. Resveratrolün kanser mekanizmalarına etkisi (Elshaer ve ark., 2018)

Kanser büyümesini baskılama, apoptoz ve otofaji ile kanser hücresi ölümünü indükleme, ayrıca metastaz ve anjiyogenezis'i inhibe etme yeteneği de dahil olmak üzere resveratrolün terapötik etkisine çeşitli mekanizmalar katkıda bulunur (Şekil 2). Resveratrol, pro-apoptotik proteinlerin (Bax, NOXA, BUMA) p53'e bağlı aktivasyonu yoluyla apoptoz ile kanser hücresi ölümünü indükler. Ayrıca resveratrol, Sirt1 ve

AMPK'nın yukarı regülasyonu yoluyla otofaji ile kanser hücresi ölümünü indükler. Resveratrol, TGF- β 1 / Smads, Wnt / β -katenin, PI3K / Akt / NF- κ B ve Gli1 yollarının aşağı regülasyonu yoluyla EMT'nin inhibisyonu yoluyla metastazı inhibe eder. Resveratrol, VEGF'nin HIF-la'ya bağımlı inhibisyonu yoluyla anjiyogenezi inhibe eder (Elshaer ve ark., 2018). Otofaji, hücrel ortamlara önemli bir yanıttır ve stres, hasar, açlık, yaşlanma ve patojen enfeksiyonu sırasında hayatta kalma veya ölüm için hücrel süreçleri olumlu yönde düzenler. Sağlıklı dokularda otofaji, hasarlı, anormal ve uzun ömürlü organelleri ve proteinleri temizleme işlemidir. Resveratrol, mTOR'un SIRT1 / AMPK'ya bağımlı inhibisyonu yoluyla otofajiyi indükler. Resveratrolün çeşitli kanserlerde otofajiyi indükleyerek hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir. Çeşitli hücre hatları, resveratrolün çok çeşitli kanser hücrelerinde apoptozu indüklediğini, ancak altta yatan mekanizmanın farklı kanser hücresi tipleri arasında büyük ölçüde farklı olduğunu göstermiştir. Metastaz süreci karmaşıktır ve karsinom hücrelerinin primer bölgeden tümör oluşumu için uzak bölgelere yayılmasını içerir. Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), metastatik kaskatın ilk adımında önemli bir olaydır. Resveratrolün, EMT'yi düzenleyen ve kanser hücrelerinin hareketliliğinin ve invazivliğinin önlenmesine yol açan çeşitli sinyal yollarına müdahale ettiği bulunmuştur. Resveratrolün, E-cadherin ekspresyonunu arttıran ve vimentin ekspresyonunu baskılayan TGF β 1 / Smads yolunu aşağı regüle ederek CRC'nin karaciğer ve akciğer metastazını inhibe ettiği bildirilmiştir (Elshaer ve ark., 2018). Bu onkogenik süreçleri modüle eden bileşikler, klinik uygulamalar için potansiyel anti-kanser ajanları olarak düşünülebilir (Ko ve ark., 2017).

Resveratrol ayrıca hem asetile edilmiş substrat hem de NAD (+) için SIRT1'in (SIRT1 tarafından kodlanan bir protein olan sirtuin 1 Michaelis sabitini düşürür ve p53'ün SIRT1'e bağımlı deasetilasyonunu uyararak hücre sağ kalımını artırır. Mayada, Sir2'yi uyararak, DNA stabilitesini artırarak ve kullanım ömrünü% 70 oranında uzatarak kalori kısıtlamasını taklit eder ve siklooksijenaz1 (COX-1) veya siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi enzimleri baskılar. Birçok rapor resveratrolün farklı kanser türlerine karşı çok çeşitli önleyici ve terapötik seçenekler sunduğunu göstermiştir. Ayrıca resveratrol, diğer kemoterapötik ilaçlarla kombine edildiğinde antikanser terapisi için potansiyel olarak yararlı olarak düşünülmüştür ve insan kanserlerine karşı kemopreventif bir ajan olarak potansiyeline önemli ölçüde dikkat çekmiştir. Bu çizgiler boyunca resveratrolün

kanser hücrelerine karşı etkisi diğer araştırmaların konusu olmuştur (Rauf ve ark., 2018). Ayrıca kaspaz-3 ve 9'u aktive eder, Bax / Bcl-2 oranını yukarı doğru düzenler ve HepG2 hücrelerinde apoptoz yoluyla p53 ekspresyonunu indükler. Ayrıca, resveratrol apoptozu indükleyerek, kaspaz-3 ve kaspaz-9'u aktive ederek önemli çoğalmaya karşı etkiler göstermektedir (Ou ve ark., 2014).

2.3.Apoptozis

Çok hücreli bir organizmanın hücreleri oldukça organize bir topluluğun üyeleridir. Bu topluluktaki hücre sayısı, hücre bölünme hızı ve hücre ölüm hızı kontrol edilerek sıkı bir şekilde düzenlenir . Organizma hücrelere artık ihtiyaç duyulmuyorsa, hücre içi ölüm programını aktif ederek intihar ederler. Bu nedenle bu işleme programlı hücre ölümü denir. Daha yaygın olarak bu işlem apoptoz olarak adlandırılır. "Apoptoz" terimi Yunanca kökenli bir kelimedir ve sonbaharda bir ağacın dalından yaprakların dökülmesi gibi “düşmek/dökülmek” anlamına gelmektedir (Alberts ve ark., 2002).

Farklı fonksiyonların hücreleri, tüm organizmanın hayatta kalmasını sağlamak için birlikte çalışır. Bu karmaşık işbirliği ağında, risk oluşturabilecek işlevsiz hücrelerin temizlenmesini sağlamak gereklidir. Böylece apoptoz olarak bilinen hücre intihar programını yürütmek için gerekli olan bilgi, genetik olarak her hücreye programlanır (Vo ve Letai, 2010). Yetişkin sağlıklı dokularda hücre ölümü, hücre bölünmesini tam olarak dengeler (Alberts ve ark., 2002). Apoptozis, enfekte olan, normal konumlarından çıkmış, hasar görmüş, gereksiz veya yararlı ömürlerinin sonuna ulaşmış olan hücrelerin temizlenmesinde gerekli olan bir programlı hücre ölümü türüdür (Vo ve Letai, 2010). Apoptozun düzensizliği, başta kanser olmak üzere birçok patolojik durumun ana özelliği olarak kabul edilmiştir (Bender ve Martinou, 2013). Apoptoz, fizyolojik ve patolojik koşullarda ortaya çıkan düzenli ve düzenlenmiş bir hücresel süreçtir. Apoptozisin altında yatan mekanizmanın anlaşılması, birçok hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynadığı için önemlidir (Wong, 2011). Apoptozisin düzenlenememesi, gelişimsel bozukluklar, kanser, otoimmün hastalıklar ve nörodejenerasyon gibi anormalliklere yol açar (Lee ve ark., 2010). Kanser, çok az apoptozun meydana geldiği durumlardan biridir ve ölmeyecek malign hücrelerle sonuçlanır. Apoptosis

mekanizması karmaşıktır ve birçok yolu içerir. Etkilenen hücrelerin malign transformasyonuna, tümör metastazına ve anti-kanser ilaçlara karşı dirence yol açan bu yollar boyunca herhangi bir noktada kusurlar meydana gelebilir. Hem çekirdeği hem de sitoplazmayı ilgilendiren apoptotik hücre ölümünün morfolojik değişiklikleri hücre tipleri ve türleri arasında oldukça benzerdir. Hücre ölümünün başlamasından, hücre parçalanmaya kadar genellikle birkaç saat gerekir. Ancak, geçen süre hücre tipine, uyarana ve apoptotik yola bağlıdır (Wong, 2011).

Genel olarak programlı hücre öümü sırasında; kaspazların aktivasyonu, DNA ve protein parçalanması ve membran değişiklikleri ve fagositik hücreler tarafından tanınması olmak üzere üç ana tip biyokimyasal değişiklik gözlenebilir (Wong, 2011). Apoptozun bir başka spesifik özelliği, apoptozun uygulayıcıları olarak bilinen, çeşitli hücre hedefleri parçalayan, morfolojik değişikliklere, genomik DNA'nın parçalanmasına ve nihayetinde apoptotik hücrenin fagositik olarak çıkarılmasına neden olan kaspaz adı verilen bir sistein proteaz ailesidir (Bender ve Martinou, 2013). Aktive edilmiş kaspazlar birçok hayati hücre proteinini ayırır ve nükleer iskeleti ve hücre iskeletini parçalar. Ayrıca DNAAz enzimini aktive etmektedirler (Wong, 2011). Kaspazlar, hem başlatıcılar hem de uygulayıcılar oldukları için apoptoz mekanizmasının merkezindedir. Kaspazların aktive edilebileceği üç yol vardır. Yaygın olarak tarif edilen iki başlatma yolu, apoptozun içsel (veya mitokondriyel) ve dışsal (veya ölüm reseptörü) yollarıdır. Her iki yol da sonunda ortak bir yola veya apoptozun yürütme aşamasına yol açar. Daha az bilinen üçüncü bir başlangıç yolu, T-hücre aracılı yoldur (Wong, 2011).

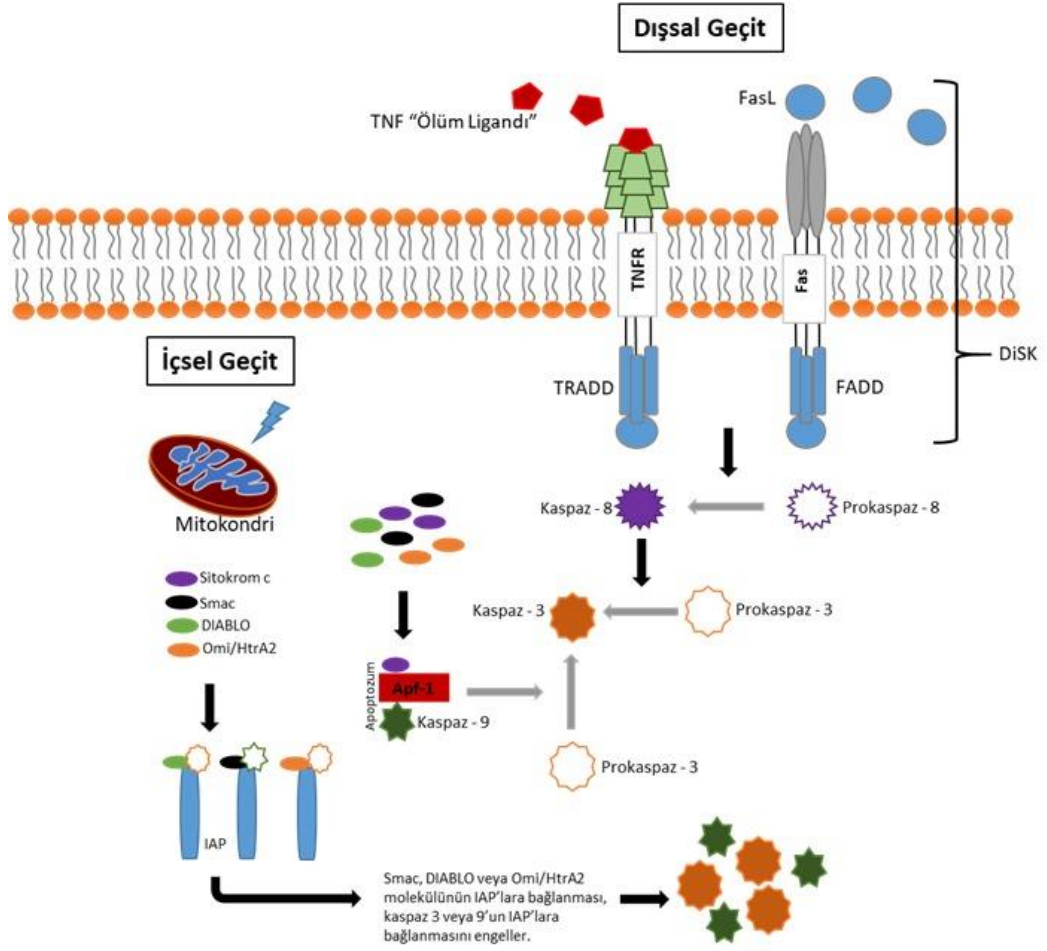
Dışsal ölüm reseptörü yolu, adından da anlaşılacağı gibi, ölüm ligandları bir ölüm reseptörüne bağlandığında başlar. Birkaç ölüm reseptörü tanımlanmış olmasına rağmen, en iyi bilinen ölüm reseptörleri tip 1 TNF reseptörü (TNFR1) ve Fas (CD95) olarak adlandırılan ilgili bir proteindir ve bunların ligandlarına sırasıyla TNF- α ve Fas ligandı (FasL) denir (Wong, 2011). Dışsal yolda, FasL veya TNF- α gibi ligandların plazma membranı üzerindeki bir ölüm reseptörüne bağlanması, başlatıcı kaspaz 8'in aktivasyonuna yol açar (Bender ve Martinou, 2013). Bu ölüm reseptörleri, TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) gibi adaptör proteinleri ve kaspaz 8 gibi sistein proteazları içeren hücre içi bir ölüm alanına sahiptir. Ölüm ligandının ölüm reseptörüne bağlanması, bir adaptör proteini ve tüm

ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi için bir bağlanma yeri oluşumuyla sonuçlanır, ölüm tetikleyici sinyal kompleksi (DISC) olarak bilinir. DISC daha sonra pro-kaspaz 8'in birleştirilmesini ve aktivasyonunu başlatır. Enzimin aktive edilmiş formu, kaspaz 8, uygulayıcı kaspazları parçalayarak apoptozu başlatan bir başlatıcı bir kaspazdır (Wong, 2011).

İçsel veya mitokondriyal yol, hücre içinde başlatılır. Onarılamaz genetik hasar, hipoksi, aşırı yüksek sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonları ve şiddetli oksidatif stres gibi iç uyaranlar, içsel mitokondriyal yolun başlatılmasının bazı tetikleyicileridir (Wong, 2011). İçsel apoptotik yolda, sadece BH3 proteinleri adı verilen BCL-2 ailesi proteinlerinin bir alt sınıfı, çeşitli hücrel stres ipuçlarına yanıt olarak apoptozu tetiklemekten sorumludur (Vo ve Letai, 2010). BH3 proteinleri, bir iç stres uyarıcısından sonra aktive olur ve mitokondriyal dış zar geçirgenliği adı verilen bir işlemi düzenledikleri dış mitokondriyal membrana yer değiştirir. Bu işlemin bir sonucu olarak, dış mitokondriyal membranda gözenekler oluşur, membran bütünlüğü kaybolur ve zarlar arası boşluğun içeriği sitozole erişir. Sitozole hızla salınan moleküllerden biri sitokrom c'dir. Normal olarak solunum kompleksleri III ve IV arasında çözünür bir elektron taşıyıcısıdır. Pro-apoptotik sitosolik faktör APAF1 ile birlikte, sitokrom c, "apoptozom" olarak adlandırılan bir kaspaz aktive edici kompleks haline gelir (Bender ve Martinou, 2013). Ölüm işaretlerini doğru şekilde algılayamamak ve ölüm sinyalini iletmemek kanser üzerinde büyük bir etkiye sahip olabilmektedir (Vo ve Letai, 2010). Uyaranlardan bağımsız olarak, bu yol artmış mitokondriyal geçirgenliğin ve sitokrom-c gibi pro-apoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınmasının bir sonucudur. Bu yol, başlangıçta foliküler Hodgkin olmayan lenfomada 18 ila 14 kromozomunun translokasyonunun kromozomal kırılma noktasında gözlemlenen BCL2 geninden sonra adlandırılan Bcl-2 ailesine ait bir grup protein tarafından yakından düzenlenir. Bcl-2 proteinlerinin; pro-apoptotik proteinler (örn. Bax, Bak, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk) ve anti-apoptotik proteinler (örn. Bcl-2, Bcl-XL L Bcl-W, Bff-1 ve Mcl-1) olmak üzere iki ana grubu vardır. Anti-apoptotik proteinler, sitokrom-c'nin mitokondriyal salımını bloke ederek apoptozu düzenlerken, pro-apoptotik proteinler bu salımı teşvik ederek hareket eder. Mitokondriyal intermembran boşluğundan sitoplazmaya salınan diğer apoptotik faktörler arasında apoptoz indükleme faktörü (AIF), ikinci mitokondriden türetilmiş kaspaz (Smac) aktivatörü, Düşük pI (DIABLO) ile doğrudan IAP Bağlama

proteini ve Omi / yüksek sıcaklık gereksinimli protein bulunur. Sitokrom-c'nin sitoplazmik salımı, sitokrom-c, Apaf-1 ve kaspaz 9'dan oluşan apoptozom olarak bilinen bir kompleksin oluşturulması yoluyla kaspaz 3'ü aktive eder. Diğer yandan, Smac / DIABLO veya Omi / HtrA2 apoptoz proteinlerinin (IAP) inhibitörüne bağlanarak kaspaz aktivasyonunu teşvik eder, bu da daha sonra IAP'lerin kaspaz-3 veya -9 ile etkileşimlerinde bozulmaya yol açar (Wong, 2011).

T hücre aracılı hücre ölümü, CD8+ yani sitotoksik T hücrelerinin antijen taşıyan hücreyi öldürmesidir. Bu sitotoksik T hücreleri genellikle dışsal yol ile hücreyi öldürürler. Ayrıca T hücresi doğrudan perforin salgılayarak hedef hücrenin membranında kanallar açılmasını sağlar. Perforin salgısının ardından proteaz olan granzim A ve granzim B enzimlerini içeren sitoplazmik granülleri hedef hücrenin içerisine girer. Böylelikle hücrenin ölümü gerçekleşmiş olur (Green, 2019; Martinez-Lostao ve ark., 2015)



Şekil 3. İçsel ve dışsal apoptozis yolu (Wong, 2011 modifiye edilmiştir).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Resveratrolün Hücrelere Uygulanması

Resveratrol (3,4 5, 5-Trihidroksi-trans-stilben, 5- ((E) -2- (4-Hidroksifenil) etenil)-1,3-benzendiol; \geq %99 saflık (HPLC)) (Sigma, R5010), Dimetil Sülfoksit (DMSO) (DMSO - Sigma-Aldrich) ile çözülmüştür. Resveratrol deney sırasında kullanıldığında RPMI 1640 (Capricorn Scientific) ile seyreltilerek kullanılmıştır. Etkin dozu belirlemek için farklı konsantrasyonlar (5, 10, 25, 50, ve 100 μ M) hücrelere uygulanmıştır.

3.2. Hücre Kültürü ve Hücre Hattı

3.2.1 Hücre açma protokolü

Açılacak olan viyal sayısına göre, her bir viyal için 15 ml'lik falkonlara daha önce hazırlanmış olan vasat 2 ml eklenmiştir. -80 °C'de olan hücrelerin içerisinde bulunduğu viyal, 37°C'lik su banyosu içerisinde hızlı bir şekilde çözdürülmüş ve falkondaki 2 ml vasat içerisine eklenmiştir. Hücreler alt-üst edilerek karıştırılmış ve 5 dk boyunca 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Hücreler santrifüj edilirken 25 cm² flask içerisine 3 ml vasat eklenmiştir. Santrifüjden alınan hücrelerin üzerindeki süpernatant atılmıştır ve üzerine 2 ml vasat eklenilerek alt-üst edilerek hücreler homojen olacak şekilde karıştırılarak flaska eklenmiştir. Hücreler inkübatör içerisinde 37°C, %5 karbondiyoksit (CO₂) olan nemli ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2 Hücre hattı ve vasat hazırlığı

Bu çalışma için HepG2 (ATCC® HB-8065™) hücre hattı kullanılmıştır. HepG2, bir insan karaciğer kanseri hücre dizisidir. HepG2, iyi diferansiye hepatoselüler karsinomu olan 15 yaşındaki bir siyahi Amerikalı erkek çocuğunun karaciğer

dokusundan alınmıştır. Hücrelerin morfolojileri epitel benzeri olup flaska yapışık olarak çoğalmaktadır. Proje başlangıcında HepG2 hücreleri 6. pasajda bulunmaktaydılar.

Hücreler için, RPMI 1640 (Capricorn Scientific, RPMI-HA) büyüme ortamına, %1 penisilin-streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B), %1 L-glutamin (Capricorn Scientific, GLN-B), %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS) (Capricorn Scientific, FBS-HI-11B) ilave edilerek hazırlanan vasat içerisinde kültüre edilmiştir.

3.2.3 Hücre pasajlama protokolü

Hücreler, flask içerisinde %80 - %90 yoğunluk oranına ulaştığında hücre pasajlama protokolü uygulanmıştır. Flaskın içerisindeki hücrelerin üst vasat toplanmıştır. Flask içerisine 2.5 ml %0.25 tripsin EDTA (Capricorn Scientific, TRY-1B) eklenerek 37°C ve %5 CO₂ ortamında 10 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübatörden alınan hücrelerin üzerine 2 ml vasat eklenerek tripsin etkisi sonlandırılmıştır. Flaskın içerisinden toplanan hücreler, 15 ml'lik falkona alınarak 5 dakika boyunca 1000 rpm'de santrifüj edildikten sonra üzerindeki süpernatant atılmıştır. 4 ml vasat eklendikten sonra al-üst edilerek homojenize olan hücreler, içerisinde 3'er ml vasat olan flaskların içerisine eklenip, 37°C'de %5 CO₂ inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler 1:2 oranında pasajlanmıştır.

3.2.4. Hücre dondurma protokolü

Hücre pasajlama protokolünün santrifüj sonrası dibe çöken hücrelerin süpernatantının atılması aşamasına kadar aynı olan hücre dondurma protokolünde, hücreler santrifüj edilirken hücre dondurma vasatı hazırlanmıştır. Dondurma vasatı 1:9 oranında Dimetil sülfoksit (DMSO-Sigma-Aldrich) ve FBS'den (Capricorn Scientific, FBS-HI-11B) oluşmaktadır. Dondurma vasatı her viyal için; 100 µl DMSO ve 900 µl

FBS olacak şekilde hazırlanmıştır. Dondurma vasatı eklenen hücreler hemen -80 °C'ye kaldırılarak dondurulmuştur.

3.2.5. Hücre fiksasyon protokolü

Hücrelerin fikse edilmesi, belirlenen bir andaki durumunun yakalanması ve görüntülenmesi amacıyla yapılmıştır. Hücre fiksasyon protokolü için 100 ml distile su içerisinde bir tablet phosphate-buffered saline (PBS) çözdürülmüştür. Daha sonra paraformaldehit (Sigma – STBH3693) konsantrasyonu %4 olacak şekilde hassas terazide tartılıp hazırlanan PBS içerisinde 2 saat boyunca 60°C'de çözdürülmüştür. Hazırlanan %4'lük paraformaldehit soğuduktan sonra pH 7.2 – 7.4 olacak şekilde pH metrede pH ölçümü yapılmıştır. Hazırlanan PBS ve paraformaldehit +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Hücreler; 48 saat, 24 gözlü ekim kablarında inkübe edildikten sonra, deske çıkartılarak üst vasatları toplanmıştır. Daha sonra her göz için 400 µl PBS ile yıkama yapılmıştır. Eklenen PBS toplanıp atıldıktan sonra, 300 µl %4'lük paraformaldehit eklenerek 30 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında paraformaldehit atılmıştır. Fikse edilen hücreler PBS ile tekrar yıkanarak, her göze 400 µl PBS eklenerek 24 gözlü ekim kabı, parafilmlemlenip +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3. Hücre Canlılığı ve Büyümesi Analizi

MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2ly)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Glentham Life Sciences 471OVO) testi, sitotoksosite analizi için yapılmıştır. Resveratrol (Sigma, R5010) konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözdürülmüştür. Resveratrol vasat ile seri sulandırma yapılarak beş farklı konsantrasyon (5, 10, 25, 50, 100 µM) hazırlanmıştır.

Hücreler, 96 gözlü kapların içerisine her bir kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde bir gün önceden ekilmiştir. 4 göz negatif kontrol, 4 göz pozitif kontrol ekilmiştir. Negatif kontrol grubunda sadece vasat, pozitif kontrol grubunda ise sadece hepatoselüler karsinom hücreleri mevcuttur. Hücre ekimi yapıldıktan sonra ilk gün 48 saat uygulanacak olan resveratrol, ikinci gün ise 24 saat uygulanacak olan resveratrol inkübasyonları yapılmıştır.

MTT solüsyonu, 1:9 oranında thiazolyl blue tetrazolium ve PBS karıştırılıp hazırlanmıştır. Daha sonra her bir göze 1:9 oranı olacak şekilde vasat ile sulandırılmıştır. Hücrelerin üst vasatları toplanıp atılmıştır. Her göze 10 μ l MTT solüsyonu, 90 μ l vasat olacak şekilde toplam 100 μ l eklenmiştir ve 4 saat boyunca 37°C 'de bekletilmiştir.

İnkübasyon sonrasında, hücrelerin üzerindeki üst vasat toplanıp atılmıştır. Formazon kristallerinin açığa çıkması amacı ile 50 μ l DMSO eklenerek, absorbans sinyali 540nm'de spektrofotometre (VersaMax, Molecular Device, Sunnyvale, USA) ile ölçülmüştür. Tüm deneyler üç kez tekrar edilmiştir.

3.4. İmmunohistokimya Protokolü

Paraformaldehit (%4) ile fikse edilen HepG2 hücreleri, immunohistokimya protokolü uygulanacağı güne kadar 24 gözlü ekim kapları ile PBS içerisinde $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır. Uygulama günü, hücrelerin üzerindeki PBS toplanarak atılmıştır. Hücre membranında delikler açılması amacıyla permeabilizasyon işlemi yapılmıştır. Bu işlem için %0.1 Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T8532) PBS ile 1:1000 ml oranında dilüe edilerek hazırlanıp hücrelere eklenmiştir ve 15 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyonu yapılmıştır. Permeabilizasyon işlemi sonrasında Triton X-100 atılarak PBS ile 3'er defa 5'er dakika boyunca yıkanmıştır. Daha sonra %3 hidrojen peroksit (H_2O_2) (Riedel-de Haen, 70570) ile 10 dakika boyunca oda sıcaklığında endojen hücre peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için inkübe edilmiştir. Bu işlem sonrasında hücreler 3 kez 5 dakika boyunca PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra ortamdaki proteinlerin bloke edilerek primer antikorun istenilen antijene bağlanması için bloke

edici solüsyon (Blocking Solution) (Histostain - Plus Kit HRP,859043, Thermo Fisher) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Bloklama işleminden sonra hücrelere PBS ile yıkama işlemi yapılmayarak lamellerin etrafı immunositokimya kalemi (Elite PAP Pen – K039) ile çizilmiştir. Daha sonra kontrol grubuna sadece PBS diğer gruplara ise uygulanacak olan primer antikorlar PBS ile dilüe edilerek primer antikor uygulaması yapılmıştır. Primer antikorlar; kaspaz-3, Fas-L, sitokrom-c ve Ki67 toplam 100 µl olacak şekilde PBS ile dilüe edilerek eklenmiş ve 24 gözlü ekim kapları nemli ortamda 4°C’de 1 gece inkübasyona alınmıştır. Bir gece buzdolabında bekletildikten sonra primer antikorlar atılmış ve 3x5 dakika boyunca PBS yıkaması yapılmıştır. Biyotinlenmiş sekonder antikor (Protein Novex Life Technologies, 1666262A) eklenerek 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır ve daha sonra 3x5 dakika PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra (HRP)-Streptavidin enzim kompleksi (Protein Novex Life Technologies, 1666262A) ile tekrar 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. PBS ile tekrar 3x5 dakika boyunca yıkanan hücrelere, immunositokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak için Diaminobenzidin (DAB) (ScyTek Laboratories ACK125) eklenerek 45 saniye bekletilmiştir. Kahverengi renk kaybolana kadar iyice distile su (dH2O) ile yıkanan hücrelerin üzerine çekirdeği görmek amacıyla Mayer’s hematoksilen (Merck Millipore, 109249) ile boyama yapılmıştır. 30 saniyelik inkübasyon sonrasında hücreler dH2O ile iyice yıkanmıştır. Son olarak, 24 gözlü ekim kapları içerisinde bulunan yuvarlak lameller mounting medium (ScyTek- AML030) ile lam üzerinde ters kapatılarak tüm örnekler ışık mikroskobu (Olympus BX46, Tokyo, Japonya) ile incenmiştir. Fas-L, sitokrom-c, kaspaz-3 ve Ki-67 boyanmaları, yarı kantitatif Histolojik-Skor (H-SKOR) kullanılarak derecelendirilmiştir. H-SKOR= $\sum \pi (i+1)$ denklemine göre hesaplama yapılmıştır. Denklemdaki i, boyanmanın yoğunluğunu göstermektedir. i: 1, 2 ve 3 (sırasıyla, zayıf, orta ve güçlü) değerlerini alabilmektedir. π ise, %0 ile %100 arasında değişen yoğunlukta boyanmış hücrelerin yüzdesini göstermektedir.

3.5. Araştırma Türü ve Araştırma Yeri

Bu tez çalışması deneysel araştırma türü kullanılarak yapılmıştır. Çalışmanın laboratuvar uygulamaları Yakın Doğu Üniversitesi- Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi (DESAM) Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

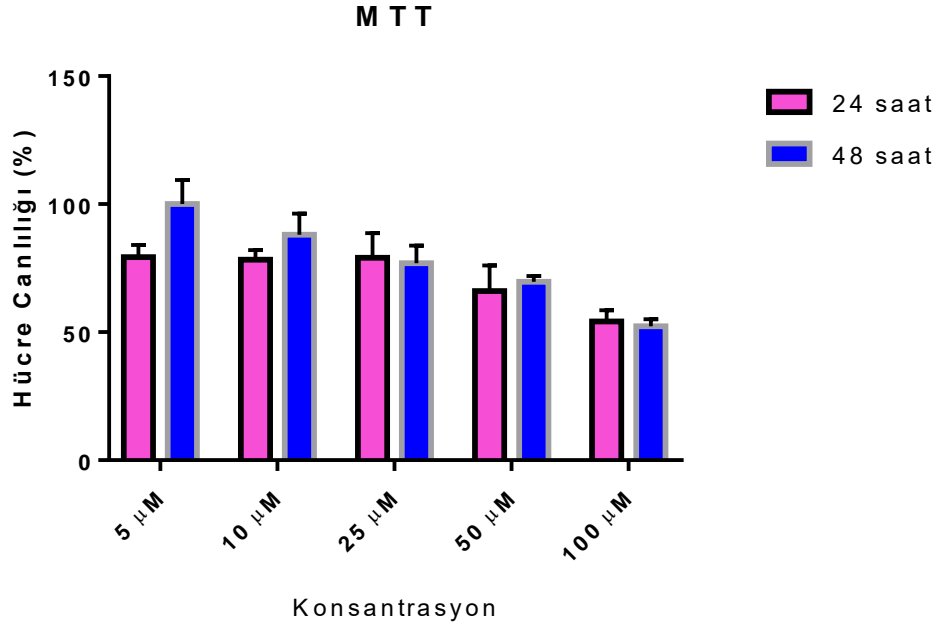
3.6. İstatistiksel Analiz

Veriler, ortalama \pm Standart Sapma (Standard Deviation, SD) olarak ifade edilmiştir. Araştırmada verilerin istatistiksel analizi için GraphPad Prism 7 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı ve Sitotoksitesi

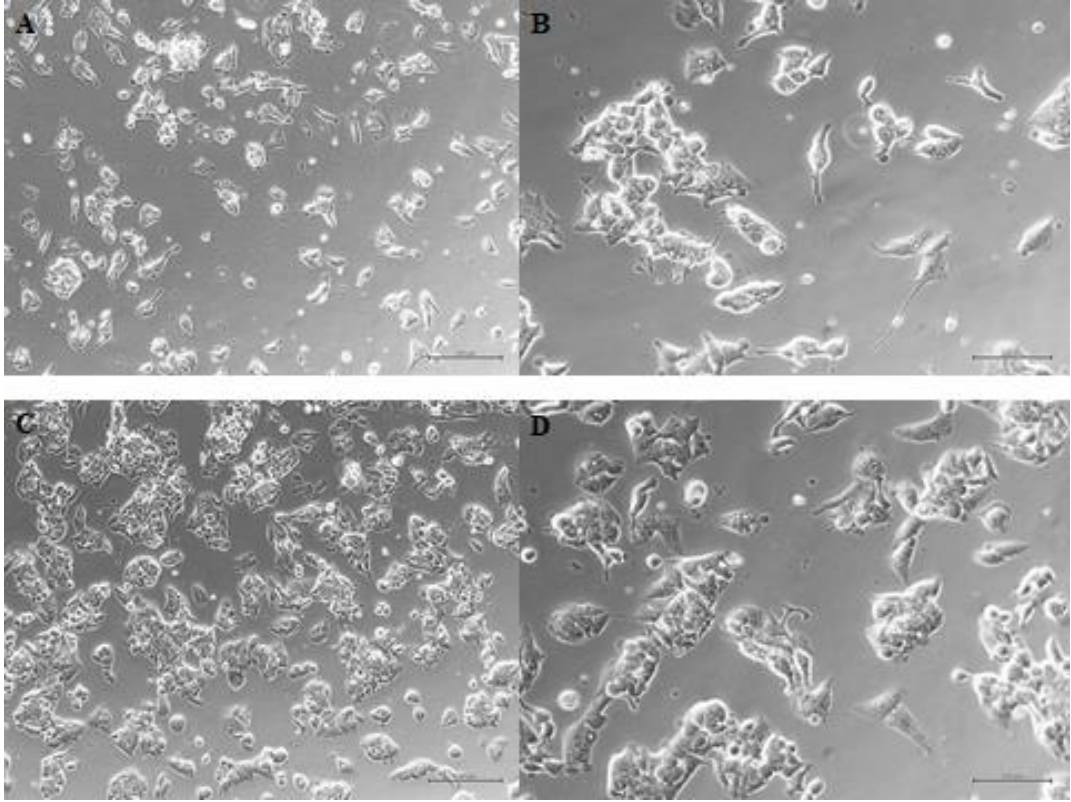
Beş farklı konsantrasyonlardaki (5, 10, 25, 50 ve 100 μM) resveratrol, HepG2 hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. Hücre canlılığı, MTT testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Diğer dozlara kıyasla 48 saat boyunca uygulanan 100 μM dozunun %50 oranında proliferasyonu azalttığı ve hücreler üzerinde daha etkili olduğu saptanmıştır.



Şekil 4. Resveratrolün hücre canlılığı-konsantrasyon sütunları. Hücre canlılığı, MTT testi ile ölçülmüştür. HepG2 hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50 ve 100 μM) resveratrol uygulanmıştır.

4.2. Hücre Morfolojisi

Primer karaciğer kanseri olan HepG2 hücreleri epitelyal morfolojiye sahiptir. Tek tabakalı yapılaşma özelliklerine sahip ortamda kültüre edilir. Resveratrol ile inkübe edilen hücrelerin morfolojik yapıları ovalleşme ve kenarlarında tırtıklanmalar gözlemlenmiştir. (Şekil 5).



Şekil 5. İverted mikroskopta görüntülenen HepG2 hücrelerin farklı büyüklüklerde morfolojik görüntüleri (A-B) ve resveratrol uygulandıktan sonra HepG2 hücreleri (C-D). Ölçek: A-C 200 μm ve B-D 100 μm

4.3. İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Resveratrol uygulanan HepG2 hücrelerinde Fas-L immünoboyamasının yoğunluğu güçlü-orta derece olarak gösterilmiştir. Kontrol grubunun immünoboyanması orta derece bulunmuştur (Şekil 5 B, Şekil 5 A, Tablo 4). Fas-L'nin H-SKOR değerleri; 282.9 ± 47.4 ve 238.6 ± 22.08 olarak belirlenmiştir (sırasıyla, resveratrol uygulanan HepG2 hücreler ve HepG2 kontrol). Resveratrol uygulanan HepG2 hücrelerinde Fas-L'nin H-SKOR'u, kontrol grubuna göre yüksek ama aralarında anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p > 0.05$, Tablo 3).

Resveratrol uygulanan HepG2 hücrelerinde sitokrom-c immünoboyaması yoğunluğu güçlü olarak bulunmuştur. Kontrol grubundaki immünoboyama ise orta-zayıf olarak görülmüştür (Şekil 5 D, Şekil 5 C, Tablo 4). Sitokrom-c için H-SKOR değerleri; 310.3 ± 31.67 ve 244.5 ± 20.64 olarak belirlenmiştir (sırasıyla, resveratrol uygulanan HepG2 hücreler ve HepG2 kontrol). Resveratrol uygulanan HepG2 hücrelerinde sitokrom-c'nin H-SKOR'u kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha fazla bulunmuştur ($p < 0.05$, Tablo 3).

Resveratrol uygulanan HepG2 hücrelerinde kaspaz-3 immünoboyaması zayıf olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ise boyanma görülmemiştir (Şekil 5 F, Şekil 5 E, Tablo 4). Kaspaz-3 için H-SKOR değerleri; 120.5 ± 5.4 ve 106.6 ± 8.36 olarak bulunmuştur (sırasıyla resveratrol uygulanan HepG2 hücreler ve HepG2 kontrol). Resveratrol uygulanan HepG2 hücrelerinde kaspaz-3 H-SKOR'u kontrol grubundan daha fazla bulunmuş fakat aralarında anlamlı fark tespit edilememiştir ($p > 0.05$ Tablo 3).

Resveratrol uygulanan HepG2 hücrelerinde Ki-67 immünoboyaması zayıf olarak bulunmuştur. Kontrol grubunun immünoboyaması ise güçlü olarak belirlenmiştir (Şekil 5 H, Şekil 5 G, Tablo 4). Ki-67'nin H-SKOR değerleri; 120.4 ± 17.44 ve 319.5 ± 27.18 olarak belirlenmiştir (sırasıyla resveratrol uygulanan HepG2 hücreler ve HepG2 kontrol). Resveratrol uygulanan HepG2 hücrelerinde Ki-67 H-SKOR'u kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$, Tablo 3).

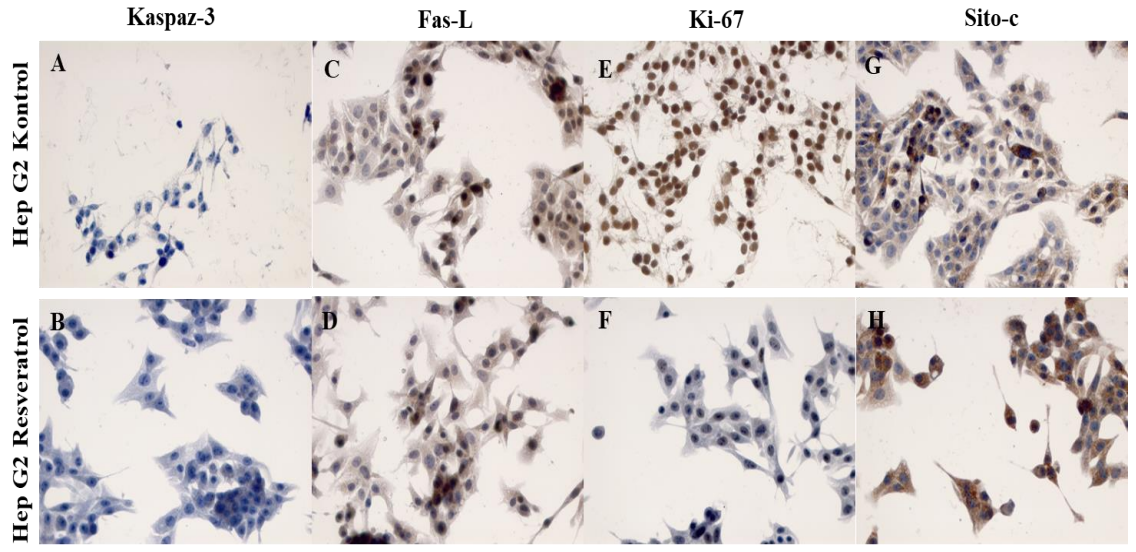
Tablo 3. 100 µM resveratrol ile 48 saat inkübe edilmiş HepG2 hücrelerinde Fas-L, sitokrom-c, kaspaz-3 ve Ki-67 H-SKOR değerleri

	Fas-L	Sitokrom-c	Kaspaz-3	Ki-67
HepG2				
Resveratrol	282.9±47.4	310.3±31.67*	120.5±5.4	120.4±17.44
HepG2				
Kontrol	238.6±22.08	244.5±20.64	106.6±8.36	319.5±27.18*

* p<0.05

Tablo 4. 100 µM resveratrol (48 saat) uygulanan HepG2 hücrelerinde Fas-L, sitokrom-c, kaspaz-3 ve Ki-67 immünoboyamaları. (+): zayıf, (++): orta, (+++): güçlü

	Fas-L	Sitokrom-c	Kaspaz-3	Ki-67
HepG2				
Resveratrol	+++ / ++	+++	+/-	+/-
HepG2				
Kontrol	++	++ / +	-	+++



Şekil 6. Standart kültür şartlarında ve 100 µM resveratrol ile 48 saat kültüre edilen HepG2 hücrelerinde Kaspaz-3, Fas-L, Ki-67 ve sitokrom-c immunoreaktiviteleri (A-H, Ölçek: 40µm).

5. TARTIŞMA

Resveratrolün, miyeloid, lenfoid, meme, deri, serviks, yumurtalık, mide, prostat, kolon, karaciğer, pankreas ve tiroid karsinom hücreleri olmak üzere çok çeşitli insan tümör hücrelerine karşı anti-proliferatif ve apoptotik etkilere sahip olduğu birçok çalışma tarafından gösterilmiştir (Ko ve ark., 2017; Cione ve ark., 2020; Galinak ve ark., 2019). Doğal olarak oluşan bir fitokimyasal olan resveratrolün, güçlü antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklere sahip olup kullanılması, HCC'yi önlemek ve kontrol etmek için yeni bir yaklaşımı ortaya çıkarmıştır (Bishayee ve ark., 2010).

Yaptığımız çalışma kapsamında, MTT sonuçlarına bakılarak HepG2 hücrelerinde yüksek doz resveratrolün daha fazla etkili olduğu görülmüştür. Konsantrasyonlar ve inkübasyon süreleri arasında kıyaslama yapıldığında 48 saatteki 100 µM resveratrol dozunda, hücre canlılığı diğer dozlara göre %50 oranında azalmasından dolayı immunohistokimyasal analizler 100 µM resveratrol ve 48 saat sonucunda değerlendirilmiştir. Bu tercih yapılırken 100 µM konsantrasyonundan az olan dozların kanser hücrelerinde apoptozu indükleyemeyeceği göz önünde bulundurulmuştur. HepG2 hücrelerinde resveratrolün sitotoksosite, hücre proliferasyon aktivitesi ve apoptoz üzerindeki etkilerinin konsantrasyona ve zamana bağlı incelendiği bir başka çalışmada ise, sitotoksosite 48 saatten uzun inkübasyonda, 50 µM ve 100 µM resveratrol konsantrasyonlarında görülmüştür. Hücre döngüsü analizi, düşük resveratrol konsantrasyonlarında (10–50 µM) S-fazı hücrelerinde artış ve yüksek konsantrasyonlarda (100–200 µM) azalma göstermiştir. (Kocsis ve ark., 2005).

Apoptoz, diğer bir adıyla programlanmış hücre ölümü; hasarlı veya anormal hücreleri ortadan kaldırmak için genetik olarak düzenlenmiş bir fizyolojik mekanizmadır. Apoptoz, mitokondri-apoptozom aracılı içsel (intrinsik) yol, ölüm reseptörünün indüklediği dışsal yol ve T-hücre aracılı yol olmak üzere üç ana yol ile aktive edilebilir (Ko ve ark., 2017; Green, 2019).

Dışsal ölüm reseptörü yolu, adından da anlaşılacağı gibi, ölüm ligandları bir ölüm reseptörüne bağlandığında başlar. Birkaç ölüm reseptörü tanımlanmış olmasına rağmen, en iyi bilinen ölüm reseptörleri tip 1 TNF reseptörü (TNFR1) ve Fas (CD95) olarak adlandırılan ilgili bir proteindir ve bunların ligandlarına sırasıyla TNF-α ve Fas ligandı (FasL) denir (Wong, 2011). Dışsal yolda, FasL veya TNF-α gibi ligandların plazma

membranı üzerindeki bir ölüm reseptörüne bağlanması, başlatıcı kaspaz 8'in aktivasyonuna yol açar (Bender ve Martinou, 2013).

Yapılan bir çok çalışmaya göre, resveratrol kanser hücreleri üzerinde Fas ve Fas-L seviyelerinde sağlamış olduğu değişiklikler ile sinyal iletim yollarında hücre ölümünü destekleyen modülasyonlar yapmaktadır (Ko ve ark., 2017; Delmas ve ark., 2003). Örneğin, HL-60 hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada resveratrolün Fas-L ekspresyonunu artırdığı ve Fas sinyaline bağlı olan dışsal yol ile apoptozu indüklediğini saptanmıştır (Ko ve ark., 2017). Buna ek olarak, paklitaksel ve resveratrol kombinasyonu ile HepG2 hücrelerinde hücre ölümünü tetiklemeyi amaçlayan bir başka çalışma, yalnız paklitaksel tedavisi ile artmış olan Fas ve Fas-L mRNA ve protein ekspresyonlarının, ortama resveratrol eklenmesi sonucunda dikkate değer şekilde daha da arttığını belirtmiştir (Jiang ve ark., 2017). Buna rağmen kolon karsinom hücrelerinde resveratrolün etkilerini araştıran bir başka çalışmada ise Fas-L ve Fas arasındaki hiçbir etkileşimin resveratrol kaynaklı hücre ölümüne dahil olmadığı bildirilmiştir. Sadece Fas'ın kolon karsinom hücrelerinde translokasyon ve membran geçişine kapatılması yoluyla resveratrol kaynaklı hücre ölümüne katkıda bulunduğu bildirilmiştir. (Delmas ve ark., 2003). Yapılan bu çalışmada, resveratrol uygulanan HepG2 hücrelerinde FasL'nin immunoreaktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüksek ama anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Bu sonuçlara göre resveratrolün HepG2 hücrelerinde dışsal yol ile apoptozu yeterince indükleyemediği sonucuna varılmıştır. Bu sebeple, bu çalışma daha önce elde edilen sonuçlarla uyumsuzluk göstermekte ve gelecek çalışmalar bu alandaki boşluğu anlamlandırmak için önemli yer tutmaktadır.

Mitokondriyal yol, hücre içinde başlatılır. Bu yol artmış mitokondriyal geçirgenliğin ve sitokrom-c gibi pro-apoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınmasının bir sonucudur. Sitokrom-c'nin sitoplazmik salımı, sitokrom-c, Apaf-1 ve kaspaz 9'dan oluşan apoptozom olarak bilinen bir kompleksin oluşturulması yoluyla kaspaz 3'ü aktive eder. Bu da apoptozun mitokondriyal yol ile indüklenmesini sağlamaktadır (Wong, 2011).

Ma ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 100- 200 μM resveratrolün 24 saatte HepG2 hücrelerinde sitokrom-c salınımı sonucunda mitokondriyal hücre ölümünü indüklediği sonucuna varılmıştır (Ma ve ark., 2007). Benzer olarak, Tinhofer ve arkadaşları akut lenfoblastik lösemi hücrelerin (T-ALL hücre kültüründe) de resveratrol

tedavisi sonucunda mitokondriyal yol ile apoptozis gerçekleştiği sonucuna varmıştır (Tinhofer ve ark., 2001).

Fakat, MCF-7 hucelerinin resveratrol ile 100 ve 150 μ M konsantrasyonlarda 36 saat tedavi edildiği bir başka çalışma da ise, sitokrom-c salınımında bir değişiklik olmadığı belirtilmiştir (Benitez ve ark., 2007). Bu anlamda, resveratrolün mitokondriyal yol ile apoptozu sağlayabildiği fakat farklı hucelerde ve farklı dozlara bağlı olarak sonuçların değişiklik gösterdiği öngörülebilmektedir (de Oliveira ve ark., 2016).

Bu çalışmada, resveratrol uygulanan HepG2 hucelerinde sitokrom-c'nin immunoreaktivitesinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede artış gösterdiği saptanmıştır ($p < 0,05$). Bu sonuca göre HepG2 hucelerinde sitokrom-c artışı ile bağdaştırabileceğimiz intrinsik yolağı indüklemiştir. Bu sonuç resveratrolün mitokondriyal aktivite ile apoptozu indüklemek için bir aracı olabileceğini gösterebilir. Bu sonuç, bu alanda yapılan bazı çalışmaları destekler niteliktedir. Resveratrolün sitokrom-c ve mitokondriyal yol ile indüklenen apoptoz üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için gelecek çalışmalar önemli yer tutmaktadır.

Apoptozun ilerlemesi, belirli koşullar altında bir dizi sinyal kaskadıyla düzenli bir şekilde gerçekleşir. Kaspaz-kaskad sistemi, hücre içi apoptotik sinyallerin indüksiyonunda, transdksiyonunda ve amplifikasyonunda önemli rol oynamaktadır. Apoptoz ile yakından ilişkili kaspazlar, aspartata özgü sistein proteazları ve interlökin-1 beta dönüştürücü enzim ailesinin üyeleridir (Fan ve ark., 2005). Kaspazlar, apoptozu dışsal yol veya mitokondriyal yol ile tetikleyerek aktive edilebilmektedir (Fulda ve ark., 2006).

Yapılan bir çalışmada ise resveratrolün HepG2 hucelerinde kaspaz-3 ve kaspaz-9'u aktive ederek hücre içerisinde apoptozda önemli rolü olan Bax/Bcl-2 oranını artırdığı ve apoptozu indüklediği görülmüştür. Ayrıca aynı çalışmada p53 ekspresyonunun da apoptoz indklenmesinden dolayı arttığı saptanmıştır (Ou ve ark., 2014). Bir başka çalışmada ise, SW480 kolon karsinom huceleri resveratrol varlığında kültürlendiğinde, doza ve zamana bağlı bir şekilde kaspaz aracılı apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada resveratrolün mitokondriden sitokrom-c salımını da indüklediği sonucuna varılmıştır. SW620, HT29 ve HCT116 olmak üzere diğer üç kolon karsinom hücresinde de benzer gözlemler yapılmıştır (Delmas ve ark., 2003).

Bu çalışmada, resveratrol uygulanan HepG2 hücrelerinde kaspaz-3'ün immunoreaktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüksek ama anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Sonuç olarak resveratrolün HepG2 hücrelerinde kaspaz-3 immunoreaktivitesi üzerine etkisi olduğu ancak yeterli olmadığı saptanmıştır. Hücrelerin resveratrol ile inkübasyon süresi artırılırsa daha etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Ki-67, aktif olarak bölünen hücrelerde yalnızca hücrenin DNA'sının çoğunun bulunduğu çekirdekte yer alan bir proteindir. Araştırmacılar, kanser hastalarından alınan doku örneklerinde hangi hücrelerin aktif olarak bölündüğünü belirlemek için sıklıkla Ki-67'yi bir belirteç olarak kullanırlar ve önceki çalışmalarda, hücrelerin bölünmesi için Ki-67'nin gerekli olduğunu gösterilmiştir (Sobecki ve ark., 2016). Ki-67'nin, GO fazı hariç, hücre döngüsünün tüm fazları üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu iyi bilinmektedir ve genellikle hücre proliferasyonunun bir işareti olarak kabul edilmektedir. Çeşitli araştırmalar, hepatositlerdeki büyüme fraksiyonundaki artışın, hepatokarsinom üzerinde önemli bir etki yapabileceğini ve Ki-67 pozitif hücresel indeksinin, HCC'de en yüksek, ancak normal karaciğer dokusunda en düşük olduğunu göstermiştir (Li ve ark., 2018).

Aziz ve arkadaşları, resveratrol tedavisinin, doza bağlı bir şekilde HCC hücre dizilerinde hücre çoğalmasını önemli ölçüde engellediğini sonucuna varmıştır (Aziz ve ark., 2004). Resveratrolün insan hepatom hücre hattı olan Huh-7 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif özelliklerinin ve moleküler etki mekanizmalarının incelendiği bir başka çalışmada da resveratrolün Huh-7 hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği, etkili bir şekilde hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozu indüklediği saptanmıştır (Liao ve ark., 2010).

Kuo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, resveratrolün iki insan karaciğer kanseri hücrelerinde, HepG2 ve Hep3B, anti-proliferatif etkileri incelenmiş ve resveratrolün HepG2 hücrelerinde hücre büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca, resveratrol ile indüklenen apoptoz, HepG2 hücrelerinde p53'e bağlı yol aracılık ettiği bulunmuştur. Sonuç olarak bu çalışma da, resveratrolün hücre büyümesini etkili bir şekilde inhibe ettiğini ve hepatoma hücrelerinde moleküler bazda programlanmış hücre ölümünü indüklediği sonucuna varılmıştır (Kuo ve ark., 2002).

Ayrı bir çalışmada, resveratrolün H 22 hepatom hücrelerinin büyümesini doza ve zamana bağlı bir şekilde inhibe ettiği MTT yöntemi ile bulunmuştur. Resveratrolün, H 22 hücrelerinin in vitro büyümesini baskılayabildiği, anti-tümör aktivitesi apoptozun indüksiyonu ile ortaya çıkabildiği tespit edilmiştir (Sun ve ark., 2002).

Bu çalışmada, resveratrol uygulanan HepG2 hücrelerinde Ki-67'nin immunoreaktivitesinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede azalma gösterdiği saptanmıştır ($p<0,05$). Bu sonuca göre resveratrolün hücrelerin proliferasyonunu durdurduğu öngörülmüştür. Bu alanda yapılan birçok çalışma bu çalışmanın sonucu desteklemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Karaciğer kanseri, diğer kanser türlerine göre minimum sağkalımı ve mortalitesi yüksek olan bir kanser türüdür. Son zamanlarda yapılan çalışmalar doğrultusunda birçok fitokimyasalın kanser hücrelerinin aktivitesini baskılayarak koruyucu etki gösterdiği ileri sürülmüştür. Kemoterapiye destek olarak, daha az hasar verici bitkisel ilaçlar ile tedaviye yaklaşım fikri son dönemlerde öne çıkmaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında resveratrolün HepG2 hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve pro-apoptotik etkileri in vitro olarak belirlemek için MTT testi ve immunohistokimya boyaması kullanılmıştır. Resveratrolün, HepG2 hücrelerinde 100 µM konsantrasyonunda apoptozu indüklediği görülmüştür. Sonuç olarak resveratrolün HepG2 hücrelerinde apoptoza neden olduğu saptanmıştır. Bu çalışma resveratrolün anti-kanser etkilerine ve hepatoselüler karsinom karaciğer kanseri tedavisine destek olarak kullanılma olasılığına sahip olabileceğini göstermektedir. Farklı hücrelerde, resveratrolün farklı etkileri olabilir. Resveratrol, hücre canlılığı ve dolayısıyla hücre morfolojisinde değişikliklere neden olabilir. Yapılan bu tez çalışması, resveratrolün apoptotik etkileri farklı kanser hücre hatları ve in vivo çalışmalarla desteklenmelidir.

Yapılan tez çalışmasının sonuçları doğrultusunda belirlenen öneriler aşağıda verilmiştir:

- Resveratrolün hepatoselüler karsinom karaciğer kanseri üzerindeki etkilerini in vivo ortamda araştırmak
- Resveratrolün hepatoselüler karsinom karaciğer kanseri hücrelerindeki etkilerini klinik uygulamalar kapsamında araştırmak
- Resveratrolün apoptotik etkilerinin farklı hücre hatları ve farklı yollar üzerindeki etkilerini araştırmak
- MTT ve immunohistokimya testleri için resveratrolün farklı inkübasyon sürelerinde uygulamak

7. KAYNAKLAR

- Abba, Y., Hassim, H., Hamzah, H., & Noordin, M. M. (2015). Antiviral Activity of Resveratrol against Human and Animal Viruses. *Advances in Virology*, 2015, 1–7.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., et al. (2002). Programmed Cell Death (Apoptosis). Chapter or article title. In Editor First Initial. Second Initial. Editor Last Name (Ed.). *Molecular Biology of the Cell*. (4th edition). New York: Garland Science.
- Aziz, M., Afaq, F., & Ahmad, N. (2004). Prevention of ultraviolet B radiation - damage by resveratrol in mouse skin is mediated via modulation in Survivin. *Photochemistry and Photobiology*. <https://doi.org/10.1562/2004-08-13-ra-274>
- Bender, T., & Martinou, J.-C. (2013). Where Killers Meet--Permeabilization of the Outer Mitochondrial Membrane during Apoptosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(1), a011106–a011106
- Benitez, D. A., Pozo-Guisado, E., Alvarez-Barrientos, A., Fernandez-Salguero, P. M., & Castellón, E. A. (2007). Mechanisms Involved in Resveratrol-Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Prostate Cancer—Derived Cell Lines. *Journal of andrology*, 28(2), 282-293.
- Bishayee, A., Politis, T., & Darvesh, A. S. (2010). Resveratrol in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Treatment Reviews*, 36(1), 43–53.
- Chien, S.-Y., Wu, Y.-C., Chung, J.-G., Yang, J.-S., Lu, H.-F., Tsou, M.-F., ve arkadaşları (2009). Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Human & Experimental Toxicology*, 28(8), 493–503.
- Cione, E., La Torre, C., Cannataro, R., Caroleo, M. C., Plastina, P., & Gallelli, L. (2020). Quercetin, Epigallocatechin Gallate, Curcumin, and Resveratrol: From Dietary Sources to Human MicroRNA Modulation. *Molecules*, 25(1), 63.

- Darweish, M. M., Abbas, A., Ebrahim, M. A., & Al-Gayyar, M. M. H. (2014). Chemopreventive and hepatoprotective effects of Epigallocatechin-gallate against hepatocellular carcinoma: role of heparan sulfate proteoglycans pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(7), 1032–1045.
- de Oliveira, M. R., Nabavi, S. F., Manayi, A., Daglia, M., Hajheydari, Z., & Nabavi, S. M. (2016). Resveratrol and the mitochondria: From triggering the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogenesis, a mechanistic view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1860(4), 727–745.
- Delmas, D., Rébé, C., Lacour, S., Filomenko, R., Athias, A., Gambert, P ve arkadaşları (2003). Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41482-41490.
- El-Far, Y. M., Khodir, A. E., Noor, A. O., Almasri, D. M., Bagalagel, A. A., Diri, R. M., Kutbi, H. I., & Al-Gayyar, M. M. H. (2020). Selective cytotoxic activity and protective effects of sodium ascorbate against hepatocellular carcinoma through its effect on oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Redox Report*, 25(1), 17–25.
- Elshaer, M., Chen, Y., Wang, X. J., & Tang, X. (2018). Resveratrol: An overview of its anti-cancer mechanisms. *Life Sciences*, 207, 340–349.
- Fan, T.-J., Han, L.-H., Cong, R.-S., & Liang, J. (2005). Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11), 719–727. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x>
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239–247.
- Fu, J., Shrivastava, A., Shrivastava, S., Srivastava, R., & Shankar, S. (2019). Triacetyl resveratrol upregulates miRNA 200 and suppresses the Shh pathway in pancreatic cancer: A potential therapeutic agent. *International Journal of Oncology*.

- Fulda, S., & Debatin, K.-M. (2006). Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: A mini-review. *Cancer Detection and Prevention*, 30(3), 217–223.
- Galiniak, S., Aebischer, D., & Bartusik-Aebischer, D. (2019). Health benefits of resveratrol administration. *Acta Biochimica Polonica*.
- Galle, P. R., Forner, A., Llovet, J. M., Mazzaferro, V., Piscaglia, F., Raoul, J.-L., Schirmacher, P ve arkadaşları (2018). EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 69(1), 182–236.
- Ge, Y., Mu, W., Ba, Q., Li, J., Jiang, Y., Xia, Q., & Wang, H. (2020). Hepatocellular carcinoma-derived exosomes in organotropic metastasis, recurrence and early diagnosis application. *Cancer Letters*, 477, 41–48.
- Gonzales, M., Mitsumori, L. M., Kushleika, J. V., Rosenfeld, M. E., & Krishnan, K. M. (2010). Cytotoxicity of iron oxide nanoparticles made from the thermal decomposition of organometallics and aqueous phase transfer with Pluronic F127. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 5(5), 286–293.
- Green, D. R. (2019). The Coming Decade of Cell Death Research: Five Riddles. *Cell*, 177(5), 1094–1107.
- Jeon, J.-S., Kwon, S., Ban, K., Kwon Hong, Y.-, Ahn, C., Sung, J.-S., & Choi, I. (2019). Regulation of the Intracellular ROS Level Is Critical for the Antiproliferative Effect of Quercetin in the Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2. *Nutrition and Cancer*, 71(5), 861–869.
- Jiang, Q., Yang, M., Qu, Z., Zhou, J., & Zhang, Q. (2017). Resveratrol enhances anticancer effects of paclitaxel in HepG2 human liver cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 477.
- Kim, C.-W., Hwang, K.-A., & Choi, K.-C. (2016). Anti-metastatic potential of resveratrol and its metabolites by the inhibition of epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion of malignant cancer cells. *Phytomedicine*, 23(14), 1787–1796.

Ko, J.-H., Sethi, G., Um, J.-Y., Shanmugam, M. K., Arfuso, F., Kumar ve arkadaşları (2017). The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2589.

Kocsis, Z., Marcsek, Z. L., Jakab, M. G., Szende, B., & Tompa, A. (2005). Chemopreventive properties of trans - resveratrol against the cytotoxicity of chloroacetanilide herbicides in vitro. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 208(3), 211–218.

Kumar, D. J., & Santhi, R. J. (2012). Antioxidant and cytotoxic effects of hexane extract of *Morinda pubescens* leaves in human liver cancer cell line. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(5), 362–366.

Kumar, D. S., Shankar, P., & Rao, G. U. (2009). Health benefits of resveratrol. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 2, 407-412.

Kuo, P.-L., Chiang, L.-C., & Lin, C.-C. (2002). Resveratrol- induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in HepG2 cells. *Life Sciences*, 72(1), 23–34.

Lee, J. K., Lu, S., & Madhukar, A. (2010). Real-Time Dynamics of Ca²⁺, Caspase-3/7, and Morphological Changes in Retinal Ganglion Cell Apoptosis under Elevated Pressure. *PLoS ONE*, 5(10), e13437.

Li CJ, Huang SY, Wu MY, Chen YC, Tsang SF, Chyuan JH ve arkadaşları (2012). Induction of apoptosis by ethanolic extract of *Corchorus olitorius* leaf in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells via a mitochondria-dependent pathway. *Molecules*.17(8):9348–60.

Li, H.-H., Qi, L.-N., Ma, L., Chen, Z.-S., Xiang, B.-D., & Li, L.-Q. (2018). Effect of KI-67 positive cellular index on prognosis after hepatectomy in Barcelona Clinic Liver Cancer stage A and B hepatocellular carcinoma with microvascular invasion. *OncoTargets and Therapy*, Volume 11, 4747–4754.

- Liao, P.-C., Ng, L.-T., Lin, L.-T., Richardson, C. D., Wang, G.-H., & Lin, C.-C. (2010). Resveratrol Arrests Cell Cycle and Induces Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Huh-7 Cells. *Journal of Medicinal Food*, 13(6), 1415–1423.
- Ma, X., Tian, X., Huang, X., Yan, F., & Qiao, D. (2007). Resveratrol-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis are associated with Ca²⁺ and mCICR-mediated MPT activation in HepG2 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 302(1–2), 99–109.
- Marra, M., Sordelli, I. M., Lombardi, A., Lamberti, M., Tarantino, L., Giudice, A ve arkadaşları (2011). Molecular targets and oxidative stress biomarkers in hepatocellular carcinoma: an overview. *Journal of Translational Medicine*, 9(1), 171.
- Martinez-Lostao, L., Anel, A., & Pardo, J. (2015). How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clinical Cancer Research*, 21(22), 5047–5056.
- Ou, X., Chen, Y., Cheng, X., Zhang, X., & He, Q. (2014). Potentiation of resveratrol-induced apoptosis by matrine in human hepatoma HepG2 cells. *Oncology Reports*, 32(6), 2803–2809.
- Rauf, A., Imran, M., Butt, M. S., Nadeem, M., Peters, D. G., & Mubarak, M. S. (2018). Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(9), 1428-1447.
- Ringehan, M., McKeating, J. A., & Protzer, U. (2017). Viral hepatitis and liver cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1732), 20160274
- Shin, S., Lee, S. H., Lee, M., Kim, J. H., Lee, W., Lee, H. W ve arkadaşları (2020). Aspirin and the risk of hepatocellular carcinoma development in patients with alcoholic cirrhosis. *Medicine*, 99(9), e19008.

- Sobecki, M., Mrouj, K., Camasses, A., Parisis, N., Nicolas, E., Llères, D ve arkadaşları (2016). The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *Elife*, 5, e13722.
- Sun, Z.-J. (2002). Anti-hepatoma activity of resveratrolin vitro. *World Journal of Gastroenterology*, 8(1), 79.
- Tinhofer, I., Bernhard, D., Senfter, M., Anether, G., Loeffler, M., Kroemer, G., Kofler, R., Csordas, A., & Greil, R. (2001). Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2. *The FASEB Journal*, 15(9), 1613–1615.
- Trojan, J., Zangos, S., & Schnitzbauer, A. A. (2016). Diagnostics and Treatment of Hepatocellular Carcinoma in 2016: Standards and Developments. *Visceral Medicine*, 32(2), 116–120.
- Vo, T. T., & Letai, A. (2010). BH3-only proteins and their effects on cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 687, 49–63.
- Wang, R., Yang, L., Li, S., Ye, D., Yang, L., Liu, Q ve arkadaşları (2018). Quercetin Inhibits Breast Cancer Stem Cells via Downregulation of Aldehyde Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1), Chemokine Receptor Type 4 (CXCR4), Mucin 1 (MUC1), and Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM). *Medical Science Monitor*, 24, 412–420.
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1),87.
- Xiao, Q., Zhu, W., Feng, W., Lee, S. S., Leung, A. W., Shen, J., ve arkadaşları (2019). A Review of Resveratrol as a Potent Chemoprotective and Synergistic Agent in Cancer Chemotherapy. *Frontiers in Pharmacology*, 9.
- Yu, H. B., Zhang, H. F., Zhang, X., Li, D. Y., Xue, H. Z., Pan, C. E., & Zhao, S. H. (2010). Resveratrol inhibits VEGF expression of human hepatocellular carcinoma cells through a NF-kappa B-mediated mechanism. *Hepato-gastroenterology*, 57(102-103), 1241-1246.