

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RESVERATROL VE SİRTUİN1'İN
P53^(+/+) VE P53^(-/-)
KOLON KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

GÜNEŞ ÖZEN

**MOLEKÜLER TIP
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İzmir-2015

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2011970062

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RESVERATROL VE SİRTUİN1'İN
P53^(+/+) VE P53^(-/-)
KOLON KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

GÜNEŞ ÖZEN

**MOLEKÜLER TIP
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

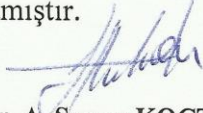
İzmir-2015

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. A. Semra KOÇTÜRK

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2013.KB.SAG.43
talep numarası ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2011970062

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Yüksek Lisans programı öğrencisi Güneş ÖZEN, ‘Resveratrol ve Sirtuin1’in p53^(+/+) ve p53^(-/-) Kolon Kanseri Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi’ konulu Yüksek Lisans tezini 21/12/2015 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Prof. Dr. A. Semra KOÇTÜRK

BAŞKAN

DEU Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyokimya AD.


Prof. Dr. Gül Hüray İŞLEKEL

ÜYE

DEU SBE Moleküler Tıp AD.


Doç. Dr. Zekiye Sultan ALTUN

ÜYE

DEU Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD.


Doç. Dr. Zahide ÇAVDAR

ÜYE

DEU SBE Moleküler Tıp AD.


Yrd. Doç. Dr. Mehtap YÜKSEL EĞRİLMEZ

ÜYE

DEU SBE Moleküler Tıp AD.

Doç. Dr. Zeynep YÜCE

YEDEK ÜYE

DEU Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.

Yrd. Doç. Dr. Özlenen ŞİMŞEK PAPUR

YEDEK ÜYE

DEU SBE Moleküler Tıp AD.

İÇİNDEKİLER

<u>BAŞLIK</u>	<u>Sayfa No</u>
İÇİNDEKİLER	i
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
KISALTMALAR	viii
TEŞEKKÜR	xi
ÖZET	1
ABSTRACT	4
 <u>1. GİRİŞ VE AMAÇ</u>	 6
 <u>2. GENEL BİLGİLER</u>	 7
2.1. Hücre Döngüsü ve Kanser Oluşumu ile İlişkisi	7
2.1.1. Hücre Döngüsü	7
2.1.2. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi	8
2.1.3. Hücre Döngüsünde Retinoblastoma ve p53'ün Rolü	9
2.2. Apoptotik Hücre Ölümü	13
2.3. Kolon Kanseri	15
2.3.1. Kolon Kanseri Oluşumu ve Moleküler Mekanizması	16
2.4. Kanser Progresyonunda Genel Epigenomik Düzenlenmeler	18
2.5. Histon Deasetilazlar	19
2.5.1. Sirtuin-1 ve Kolon Kanseri Önemi	21
2.6. Doğal Polifenollerden Resveratrol	23
2.6.1. Kolon Kanseri Resveratrolün Etkileri	25
 <u>3. GEREÇ VE YÖNTEM</u>	 30
3.1. Araştırmanın Tipi	30
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	30
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	30
3.4. Çalışma Materyali	30
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	30
3.6. Veri Toplama Araçları	31
3.6.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	31
3.6.2. Yöntemler	34
3.6.2.1. Deney Modelinin Planlanması	34
3.6.2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	34
3.6.2.2.1. Hücrelerin Çözülmesi	35
3.6.2.2.2. Hücrelerin Pasajlanması	35
3.6.2.2.3. Hücre Sayımı ve Canlılık Kontrolü	35
3.6.2.2.4. Hücrelerin Dondurulması	36

3.6.2.3. Hücrelerin Katlanma Zamanlarının Belirlenmesi	36
3.6.2.4. Resveratrol ve Sirtinol Çözeltilerinin hazırlanması	36
3.6.2.5. Hücre Canlılık Analizi	37
3.6.2.6. Hücrelerden Nükleer ve Sitoplazmik Fraksiyon Eldesi	38
3.6.2.7. BCA Protein Tayini	39
3.6.2.8. SIRT1 Aktivite Analizi	39
3.6.2.9. Akış Sitometrik Apoptoz Analizi	41
3.6.2.10. Western Blot Analizi	42
3.6.2.10.1. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	42
3.6.2.11. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PZR)	46
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	50
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	51
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	51
3.10. Etik Kurul Onayı	51
<u>4. BULGULAR</u>	52
4.1. Hücre Karakteristiklerinin Belirlenmesi	52
4.1.1. HCT116 ^{p53(+/+)} ve HCT116 ^{p53(-/-)} Hücrelerinin Morfolojik Görünümü	52
4.1.2. HCT116 ^{p53(+/+)} ve HCT116 ^{p53(-/-)} Hücrelerinin Katlanma Zamanlarının Belirlenmesi	52
4.1.3. HCT116 Kolon Karsinoma Hücre Hatlarında p53 Protein Ekspresyonunun Western Blotlama Yöntemi İle Doğrulanması	53
4.2. HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} Hücre Hatlarında Hücre Canlılık Analizi	54
4.2.1. Resveratrolün Hücre Canlılığına Etkisi	54
4.2.2. Sirtinol'ün Hücre Canlılığına Etkisi	55
4.3. IC₅₀ Dozunda Resveratrolün Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi	57
4.3.1. HCT116 ^{p53(+/+)} ve HCT116 ^{p53(-/-)} Hücrelerinde 24 saat Uygulanan Resveratrolün Apoptotik Etkileri	57
4.3.2. HCT116 ^{p53(+/+)} ve HCT116 ^{p53(-/-)} Hücrelerinde 48 saat Uygulanan Resveratrolün Apoptotik Etkileri	60
4.4. BSA Standart Grafiği	62
4.5. SIRT1 Aktivitesinin Değerlendirilmesi	62
4.5.1. SIRT1 Enzim Aktivite Standart Grafiği	63
4.5.2. Hücrelerde SIRT1 İnhibisyon Düzeyleri	63
4.6. SIRT1 Protein Ekspresyon Değişimi	65
4.6.1. HCT116 ^{p53(+/+)} Hücrelerinde SIRT1 Protein Ekspresyon Değişimi	65
4.6.2. HCT116 ^{p53(-/-)} Hücrelerinde SIRT1 Protein Ekspresyon Değişimi	66
4.7. Sirtinol ve Resveratrol Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	67
4.7.1. HCT116 ^{p53(+/+)} Hücre Hattında Sirtinol ve Resveratrol Uygulamalarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	67
4.7.2. HCT116 ^{p53(-/-)} Hücre Hattında Sirtinol ve Resveratrol Uygulamalarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	68
4.8. Sirtinol ve Resveratrol Ardışık Uygulamasının Apoptotik Etkisi	69
4.8.1. HCT116 ^{p53(+/+)} Hücre Hattında Sirtinol ve Resveratrol Uygulamalarının Apoptotik Etkisi	69
4.8.2. HCT116 ^{p53(-/-)} Hücre Hattında Sirtinol ve Resveratrol Uygulamalarının Apoptotik Etkisi	71
4.9. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri	73
4.9.1. cDNA Sentezinin Kontrolü	73

4.9.2. Sinyal İleti Yolak Genlerinin mRNA Ekspresyonu	74
4.9.2.1. TGF- β Yolak Genleri	74
4.9.2.1.1. P27 mRNA Ekspresyonu	74
4.9.2.1.2. ATF-4 mRNA Ekspresyonu	75
4.9.2.1.3. MYC mRNA Ekspresyonu	76
4.9.2.1.4. TRAIL mRNA Ekspresyonu	77
4.9.2.2. WNT Yolak Genleri	78
4.9.2.2.1. Siklin D1 mRNA Ekspresyonu	78
4.9.2.2.2. FRA-1 mRNA Ekspresyonu	79
4.9.2.2.3. PPARD mRNA Ekspresyonu	80
4.9.2.2.4. WISP1 mRNA Ekspresyonu	81
4.9.2.3. P53 Yolak Genleri	82
4.9.2.3.1. PUMA mRNA Ekspresyonu	82
4.9.2.3.2. EGFR mRNA Ekspresyonu	84
4.9.2.3.3. FAS mRNA Ekspresyonu	85
4.9.2.3.4. GADD45A mRNA Ekspresyonu	86
4.9.2.3.5. RBI mRNA Ekspresyonu	87
4.9.2.3.6. SURVIVIN mRNA Ekspresyonu	88
4.9.2.3.7. PCNA mRNA Ekspresyonu	89
4.9.2.3.8. FASLG mRNA Ekspresyonu	90
4.9.2.3.9. MCL-1 mRNA Ekspresyonu	91
4.9.2.4. NF- κ B Yolak Genleri	92
4.9.2.4.1. ICAM-1 mRNA Ekspresyonu	92
4.9.2.4.2. IFNG mRNA Ekspresyonu	93
4.9.2.4.3. STAT1 mRNA Ekspresyonu	94
4.9.2.4.4. TNF mRNA Ekspresyonu	95
4.9.2.5. JAK/STAT Yolak Genleri	96
4.9.2.5.1. IRF1 mRNA Ekspresyonu	96
4.9.2.5.2. SOCS3 mRNA Ekspresyonu	97
4.9.2.5.3. AKT1 mRNA Ekspresyonu	98
4.9.2.5.4. FOS mRNA Ekspresyonu	99
4.9.2.5.5. JUN mRNA Ekspresyonu	100
4.9.2.5.6. STAT3 mRNA Ekspresyonu	101
4.9.2.5.7. IL1A mRNA Ekspresyonu	102
4.9.2.5.8. IL8 mRNA Ekspresyonu	103
5. TARTIŞMA	107
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	115
7.KAYNAKLAR	116
8. EKLER	131
EK-1 Etik Kurul Onayı	131
EK-Özgeçmiş	134

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Sirtuin izoformları ve fonksiyonları	20
Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ve kitler	31
Tablo 3. Kullanılan Cihazların Marka ve Kod Numaraları	33
Tablo 4. cDNA sentezi için kullanılan reaktifler ve hacimleri	48
Tablo 5. PZR karışımı hazırlığı	48
Tablo 6. mRNA kat değişimleri	104

SEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Hücre döngüsü ve fazları	8
Şekil 2. Hücre döngüsünün CDK-siklin kompleksleri ile regülasyonu	9
Şekil 3. p53 ve Rb tarafından G ₁ /S evresi geçişinin düzenlenmesi	11
Şekil 4. Hücre içi p53 düzeyinin ve aktivitesinin düzenlenmesi	12
Şekil 5. Hücre içi ve hücre dışı etkenlerle tetiklenen apoptoz yolları	14
Şekil 6. İnsan kolorektal karsinogenezinin adenoma-karsinoma modeli	16
Şekil 7. Kolorektal kanserde görülen mutasyonlar	17
Şekil 8. HDAC ve HAT'ların genel fonksiyonları	19
Şekil 9. SIRT1 tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyon	21
Şekil 10. Resveratrolün kimyasal yapısı (trans-Resveratrol)	23
Şekil 11. Resveratrolün kolon kanserinde sinyal ileti yolak genleri üzerine etkisi	29
Şekil 12. WST-1 reaktifinin formazan yapısına dönüşümü	37
Şekil 13. Floresans temelli SIRT1 enzim aktivite reaksiyonunun şematik gösterimi	40
Şekil 14. Araştırma planı ve takvimi akış grafiği	50
Şekil 15. HCT116 ^{p53(+/+)} ve HCT116 ^{p53(-/-)} hücrelerinin mikroskop görüntüleri	52
Şekil 16. HCT116 ^{p53(+/+)} hücrelerinin katlanma zamanı	52
Şekil 17. HCT116 ^{p53(-/-)} hücrelerinin katlanma zamanı	53
Şekil 18. HCT116 ^{p53(+/+)} ve HCT116 ^{p53(-/-)} hücre hatlarında nükleer lizatlarda p53 protein ekspresyonu	53
Şekil 19. HCT116 ^{p53(+/+)} hücre hattında 0-80 µM Resveratrol konsantrasyonlarının 24-72 sa. inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi	54
Şekil 20. HCT116 ^{p53(-/-)} hücre hattında 0-80 µM Resveratrol konsantrasyonlarının 24-72 sa. inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi	55
Şekil 21. HCT116 ^{p53(+/+)} hücre hattında 0-80 µM Sirtinol konsantrasyonlarının 24-72 sa. inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi	56
Şekil 22. HCT116 ^{p53(-/-)} hücre hattında 0-80 µM Resveratrol konsantrasyonlarının 24-72 sa. inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi	56
Şekil 23. HCT116 ^{p53(+/+)} hücrelerinde 24 sa. Annexin-V/PI analizi	58
Şekil 24. HCT116 ^{p53(-/-)} hücrelerinde 24 sa. Annexin-V/PI analizi	59
Şekil 25. HCT116 ^{p53(+/+)} hücrelerinde 48 sa. Annexin-V/PI analizi	60

Şekil 26. HCT116 ^{p53(-/-)} hücrelerinde 48 sa. Annexin-V/PI analizi	61
Şekil 27. BSA protein standart grafiği	62
Şekil 28. Rekombinant SIRT1 enzim aktivite standart grafiği	63
Şekil 29. HCT116 ^{p53(+/+)} hücrelerinde SIRT1 enzim aktivite analizi	64
Şekil 30. HCT116 ^{p53(+/+)} hücrelerinde SIRT1 proteininin Western Blot analizi	65
Şekil 31. HCT116 ^{p53(-/-)} hücrelerinde SIRT1 proteininin Western Blot analizi	66
Şekil 32. HCT116 ^{p53(+/+)} hücrelerinde Sirtinol ve Resveratrol uygulamaları ile % canlılık değerlerinin değişimi	67
Şekil 33. HCT116 ^{p53(-/-)} hücrelerinde Sirtinol ve Resveratrol uygulamaları ile % canlılık değerlerinin değişimi	68
Şekil 34. HCT116 ^{p53(+/+)} hücrelerinde Sirtinol ve Resveratrol uygulamaları ile akış sitometrik analiz	69
Şekil 35. HCT116 ^{p53(-/-)} hücrelerinde Sirtinol ve Resveratrol uygulamaları ile akış sitometrik analiz	71
Şekil 36. Gen amplifikasyon eğrisi örnek gösterimi	73
Şekil 37. P27 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	74
Şekil 38. ATF4 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	75
Şekil 39. MYC mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	76
Şekil 40. TRAIL mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	77
Şekil 41. Siklin D1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	78
Şekil 42. FRA-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	79
Şekil 43. PPARD mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	80
Şekil 44. WISP1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	81
Şekil 45. PUMA mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	83
Şekil 46. EGFR mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	84
Şekil 47. FAS mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	85
Şekil 48. GADD45A mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	86
Şekil 49. RB1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	87
Şekil 50. SURVİVİN mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	88
Şekil 51. PCNA mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	89
Şekil 52. FASLG mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	90
Şekil 53. MCL-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	91

Şekil 54. ICAM-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	92
Şekil 55. IFNG mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	93
Şekil 56. STAT1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	94
Şekil 57. TNF mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	95
Şekil 58. IRF1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	96
Şekil 59. SOCS3 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	97
Şekil 60. AKT1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	98
Şekil 61. FOS mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	99
Şekil 62. JUN mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	100
Şekil 63. STAT3 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	101
Şekil 64. IL-1A mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	102
Şekil 65. IL-8 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	103

KISALTMALAR

SIRT1: Sirtuin-1

mRNA: Messenger RNA

WST: (4-(3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyum-1,3-benzen disülfonat)

IC₅₀: half maximal inhibitory concentration

BCA: Bikinkoninik asit

BSA: Bovine Serum Albümin

FBS: Fetal Bovine Serum

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA: Deoksiribonükleik asit

CDK: Siklin Bağımlı Kinaz

KRAS: Kirsten rat sarkoma protein

APC: Adematöz polipozis koli

p53: Tümör supresör Protein 53

BCL-2: B-hücreci Lenfoma 2

BAX: Bcl-2-associated X protein

COX-2: Siklooksijenaz 2

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

UV: Ultraviyole

KASPAZ: Sistein-Aspartik Proteaz

TNF: Tümör Nekroz Faktörü

TNFr: TNF reseptör

FAS: Fas cell surface death receptor

FASLG: Fas ligandı

TRAIL: TNFr-apoptoz-tetikleyici ligand (TNFr-apoptosis-inducing ligand)

DISC: Ölüm-tetikleyici sinyal kompleksi (death-inducing signaling complex-)

FADD: Fas-ilişkili DD (*Fas-associated death domain*)

E2F: Elongasyon Faktör-2

Rb: Retinoblastoma

Cyt c: Sitokrom c

AIF: Apoptoz İndükleyici Faktör

Bid: BH3 etkileşimli ölüm domaini agonisti
MLH1: MutL homolog 1
ATP: Adenozin Trifosfat
cDNA: Komplementer DNA
DCC: Delete Kolorektal Kanseri Geni
iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
TGFβ: Transforming growth factor beta 1
WNT: Wingless, Wg
NFκB: Nükleer Faktör Kappa B
JAK: Janus kinaz
HAT: Histon Asetil Transferaz
HDAC: Histon Deasetilaz
HMT: Histon Metil Transferaz
DNMT: DNA Metil Transferaz
PUMA: p53-upregulated modulator of apoptosis
GADD45A: Growth Arrest and DNA Damage inducible Alpha
SOCS3: Suppressor Of Cytokine Signaling 3
IL8: İnterlökin 8
IL1A: İnterlökin 1 alfa
RB1:Retinoblastoma 1
APAF-1: Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
MCL-1: Myeloid Cell Leukemia 1
MYC: v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
ATF-4: Activating Transcription Factor 4
FRA-1: FOS-Like Antigen 1
PPARδ: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta
WISP-1: WNT1 İnducible Signaling Pathway Protein 1
PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen
ICAM-1: İntercellular Adhesion Molecule 1
IFNG: İnterferon Gamma
IRF-1: İnterferon Regulatory Factor 1

AKT1: V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1
FOS: FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog
JUN: Jun Proto-Oncogene
PTEN: phosphatase and tensin homolog
PIDD: P53-Induced Protein With Death Domain
FOXO: Forkhead Box O
Ku70: Lupus Ku Autoantigen Protein P70
PGC-1 α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 Alpha
MDM2: MDM2 Proto-Oncogene, E3 Ubiquitin Protein Ligase
ARF: Alternate Reading Frame
P300: E1A Binding Protein P300
MSH2: Muts Homolog 2
MSH6: Muts Homolog 6
PMS2: PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component
AFU: Arbitrary Fluorescence Units

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, laboratuvar çalışmalarında ve tez yazım aşamasında her türlü desteğini gördüğüm, her zaman bilimin öncülüğünü esas alarak bizlere bu konuda örnek olan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. A.Semra KOÇTÜRK'e,

Desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gül Hüray İŞLEKEL ve değerli hocam Prof. Dr. Gül Güner AKDOĞAN başta olmak üzere tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi ve öğrencilerine,

Laboratuvarlarında çalışma imkânı bulduğum Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Canan ÇOKER ve değerli hocam Prof. Dr. Banu ÖNVURAL başta olmak üzere tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve öğrencilerine,

Çalışmanın çeşitli aşamalarında fikirlerini paylaşan ve malzeme desteğini esirgemeyen Prof.Dr. Kemal Sami KORKMAZ ve Prof.Dr. Kemal BAYSAL'a,

Çalışmalarımızın en iyi şekilde sonuçlanması için bizimle aynı heyecanı paylaşan Hematoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Halil ATEŞ'e,

Ekip arkadaşım Belgin Sert SERDAR'a ve her konuda desteğini gördüğüm çok değerli arkadaşlarım, Tülay ÖNCÜ, Merve AKIŞ, Mehmet GÜRDAL, Ayşenur KARAKUŞ ve Didem KELEŞ'e,

Laboratuvar çalışmalarımızı kolaylaştırmak adına yardımlarını esirgemeyen Emin ÇAVUŞLU'ya,

Çok sevgili Biyokimya Anabilim Dalı sekreterimiz Eda Nesrin OLUM ve her zaman kalbimizde ayrı bir yeri olan ve pozitif enerji kaynağımız Fadime ENGİN'e,

Tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve bana sonsuz destek veren canım annem Erdan ÖZEN ve babam Salim ÖZEN başta olmak üzere sevgili aileme gönülden teşekkür ederim.

Güneş ÖZEN

RESVERATROL VE SİRTUİN1'İN P53^(+/+) VE P53^(-/-) KOLON KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Güneş Özen, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Moleküler Tıp Anabilim Dalı, 35340, Inciraltı, İzmir

ÖZET

Giriş: Kanser birden fazla kompleks moleküler değişikliklerden oluşan heterojen bir hastalıktır. Resveratrol, 70'ten fazla bitki türü tarafından sentezlenen doğal bir polifenoldür. Günümüzde resveratrolün anti-kanserojen etki gösterdiği ve çeşitli kanser hücreleri üzerinde anti-proliferatif ve apoptozu indükleyici etkilerinin olduğu bilinmektedir. Resveratrol ile ilgili yapılan son araştırmalar incelendiğinde; resveratrolün bir histon deasetilaz enzimi olan sirtuin1(SIRT1) aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. SIRT1'in tümör baskılayıcı molekül olan p53'ü deasetile ettiği de bilinmektedir. p53 mutasyonu kanser olgularının %50'sinden fazlasında görülmektedir; ancak teröpatik ajanların veya polifenollerin kanser hücrelerindeki etkileri çok farklı olabilmektedir. Bunun yanı sıra, kolon kanser hücrelerinde artmış SIRT1 ekspresyonu olduğu da bildirilmektedir. Resveratrolün SIRT1 ekspresyonu ve sinyal ileti yolları üzerindeki etkileri düşünüldüğünde, kolon kanser hücrelerinin p53 mutasyonu taşıyıp taşımadığı önem kazanmaktadır. Yapılan literatür çalışmasında resveratrolün p53 varlığı ve yokluğunda kolon kanser hücrelerindeki sinyal ileti yollarına etkileri ve SIRT1 ilişkisine yönelik yeterli bilgi bulunamamıştır.

Amaç: Bu çalışmada amacımız, p53(+/+) ve p53(-/-) kolon kanser hücrelerinde resveratrolün SIRT1 aktivasyonu ve inhibisyonu şartlarında hücre canlılığı, apoptotik hücre ölümü ve çeşitli sinyal ileti yolları üzerindeki etkilerinin incelenmesidir.

Materyal ve Yöntem: HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} kolon kanser hücrelerinde resveratrolün ve SIRT1 inhibitörü olan sirtinolün hücre canlılığına etkisi ve IC₅₀ dozları WST-1 analizi ile değerlendirildi. IC₅₀ dozlarında resveratrol ve sirtinol ile 24 ve 48 saat inkübasyon süresinde gerçekleşen hücre ölüm tipi (apoptotik/nekrotik) akış sitometrik Annexin-V/PI yöntemi ile incelendi. SIRT1 enzim aktivitesi fluorometrik aktivite kiti kullanılarak değerlendirildi. Hücre hatlarında SIRT1 ve p53 protein ekspresyon düzeyleri

Western Blot yöntemi ile belirlendi. TGF β , WNT, p53, NF κ B ve JAK/STAT yollarında bulunan 29 adet gen ekspresyon değişimi Gerçek Zamanlı PZR Yöntemi ile tüm deney gruplarında incelendi. Elde edilen veriler *Student's t* testi ile istatistiksel analizi yapılarak $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde resveratrolün sinyal ileti yollarındaki gen ekspresyonları üzerindeki etkileri, SIRT1 aktivitesi ve p53 bağımlılığı değerlendirildi.

Bulgular: HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} kolon kanser hücrelerinde resveratrolün IC₅₀ değeri 48 saat için 60 μ M olarak belirlendi. HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde belirlenen, IC₅₀ dozundaki resveratrolün apoptotik hücre ölüm yüzdesi akış sitometrik analizde 24 saatte %34.9; 48 saatte %45.7 ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde apoptotik hücre yüzdesi 24 saatte %27.4 oranında, 48 saatte %40 oranında saptandı. SIRT1 aktivite analizine göre, HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde sirtinol uygulaması ile SIRT1 inhibisyon dozu ve süresi sırasıyla 80 μ M ve 24 saat olarak belirlendi. HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde yapılan hücre canlılık analizinde, 24 saat 60 μ M resveratrol uygulaması ile %40.4 oranında, sirtinol ve resveratrolün ardışık 24'er saat uygulanması ile hücre canlılığında %57.3 oranında azalma belirlendi. Aynı şekilde, HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde 24 saat resveratrol uygulaması ile %43.6 oranında, ardışık uygulama ile canlılıkta %59.6 oranında azalma belirlendi. HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde resveratrol uygulaması ile %27.6, 24'er saat sirtinol ve resveratrolün ardışık uygulanması ile %33.4 oranında apoptotik hücre yüzdesi belirlendi. Aynı şekilde HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde, resveratrol uygulaması ile %17.9, ardışık uygulama ile %18.2 oranında apoptotik hücre yüzdesi saptandı.

Sirtinol ve resveratrolün ardışık olarak uygulandığı HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde SIRT1 protein ekspresyon düzeyinin kontrole göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak azaldığı belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise anlamlı bir fark saptanmadı. Deney gruplarında yapılan gen ekspresyon analizleri sonucunda resveratrolün, kolon kanser hücrelerinin p53 mutasyonu ve SIRT1 aktivite düzeyine bağlı olarak proliferatif ve apoptotik etki gösterebilen birçok gen üzerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim oluşturduğu saptandı.

Sonuç: Yapılan bu araştırma ile resveratrolün (60 μ M) HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} kolon kanser hücrelerinde hücre canlılığını etkilediği ve apoptotik hücre ölümüne yol açtığı saptanmıştır. Bununla birlikte araştırmamızın verileri hücrelerin p53 mutasyonu ve SIRT1 aktivite düzeylerine göre değerlendirildiğinde; resveratrol (60 μ M) uygulamasının hem apoptotik etki hem de gen ekspresyonu düzeyinde farklı değişimlere neden olduğu ilk kez

belirlenmiş oldu. Kolon kanser hücrelerinde resveratrolün p53 ve SIRT1 aktivitesine göre proliferatif ve/veya apoptotik etki gösterebileceğini öngörmekteyiz. Sonuç olarak kolon kanser hastalarında bilinçsiz resveratrol kullanımının farklı etkiler yaratabileceğini öngörmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Kolon kanseri, Resveratrol, SIRT1, p53, Apoptoz, Sinyal ileti yolakları

THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF RESVERATROL AND SIRTUIN1 ON p53(+/+) AND p53(-/-) COLON CARCINOMA CELLS

Güneş ÖZEN, Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences,
Department of Molecular Medicine, 35340, İnciraltı, İzmir

ABSTRACT

Introduction: Cancer is a disease that includes heterogenic and complex molecular changes. Resveratrol is a natural polyphenol synthesized by more than 70 plant species. Nowadays, anti-carcinogenic effects of resveratrol, as well as anti-proliferative and apoptosis inducing effects have been proved in a variety of cancer cells. When recent studies on resveratrol are reviewed, activation of SIRT1, a histone deacetylase enzyme called as sirtuins has been shown. It has been known that SIRT1 has a role on deacetylation of p53. In order to in more than 50% of cancer cases have p53 mutation responses of a cancer cell to therapeutic agents or polyphenols could be very different. On the other hand, increased expression of cytosolic SIRT1 has been reported in colon cancer cells. Considering the effects of resveratrol on SIRT1 expression, the influence of the signal transduction pathways in the presence or absence of p53 of colon cancer cells is gaining importance. However we couldn't find illustrative knowledge in the literature about the effects of resveratrol on signal transduction in the presence or absence of p53 and also interaction with SIRT1.

Aim: In the present study, we aim to investigate the effects of resveratrol on cell viability, apoptotic cell death levels and changes on gene expression of various signal transduction pathways under activated and inhibited SIRT1 conditions in p53(+/+) and p53(-/-) colon carcinoma cells.

Material and Method: IC₅₀ doses of resveratrol and sirtinol, which is a SIRT1 inhibitor, were determined by analysis of WST-1 in HCT116^{p53(+/+)} and HCT116^{p53(-/-)} colon carcinoma cells. The cell death type (apoptotic/necrotic) of resveratrol and sirtinol applications in IC₅₀ dosages was determined by flow cytometric Annexin/PI method for 24 and 48 hours. The activity of SIRT1 enzyme was evaluated by fluorometric activity assay kit. SIRT1 and p53 protein expressions were examined by western blot analyses. Real time PCR analyses were used to evaluate the changes of 29 gene expressions of TGF- β , WNT, p53, NF- κ B and

JAK/STAT signal transduction pathways in all experimental groups. The effects of resveratrol on signal transduction pathways; SIRT1 activation and p53 dependency were evaluated by statistical analyses of obtained data.

Results: IC₅₀ level of resveratrol was found as 60 µM for 48 hour in HCT116^{p53(+/+)} and HCT116^{p53(-/-)} cell lines. Apoptotic cell death ratio was found as 34.9% for 24 hour and 45.7% for 48h and 27.4% for 24h and 40% for 48h in HCT116^{p53(+/+)} and HCT116^{p53(-/-)} cell lines respectively. The inhibition dosage and timing of sirtinol application were determined by SIRT1 enzyme activity assay and found as 80 µM and 24 hour respectively. Decreases of cell viability for HCT116^{p53(+/+)} cell line was found as 40.4% for 24h after resveratrol treatment, and % 57.3 for 24h resveratrol treatment after pre-treatment with sirtinol for 24h. Decreases of cell viability for HCT116^{p53(-/-)} cell line was found as % 43.6 for 24h after resveratrol treatment, and 59.6% for 24h resveratrol treatment after pre-treatment with sirtinol for 24h. Apoptotic cell death ratios were determined as 17.9% for resveratrol treatment and 18.2% for consecutive treatments of sirtinol and resveratrol for 24h. Although in HCT116^{p53(+/+)} cell line SIRT1 protein expression levels were found statistically lower (p<0.05) than the control group in sirtinol pretreated group, statistically significant results have not been found for HCT116^{p53(-/-)} cell line (p>0.05). The results of the gene expression analysis in all experimental groups showed that resveratrol has statistically significant capacity to change on multiple gene expressions which have proliferative or apoptotic capacity, depend on the p53 and SIRT1 activity of the cell lines.

Conclusion: This research has revealed that resveratrol (60µM) causes decrease in cell viability and increase in apoptotic cell death in HCT116^{p53(+/+)} and HCT116^{p53(-/-)} cell lines. However our research for the first time proved that the effects of resveratrol on some of gene expressions and apoptosis ratios could change by the p53 mutation and SIRT1 activity level of HCT116 colon carcinoma cells. We proposed that resveratrol might show proliferative and/or apoptotic effects according to p53 and SIRT1 activity in colon cancer cells. Consequently, we predicted that unconscious usage of resveratrol in colon cancer patient might cause adverse effects.

Key Words: Colon Cancer, Resveratrol, SIRT1, p53, Apoptosis, Signal Transduction Pathways

1. GİRİŞ VE AMAC

Kolon kanseri, Batı ülkelerinde tüm kanserler arasında üçüncü sırada mortaliteye sahip kanser türüdür. Kolon kanserinin tedavisi bu anlamda büyük önem taşımaktadır. Kanser sağaltımında özellikle doğal ürünlerin kullanımı oldukça yaygındır. Resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroksistilben) 70'ten fazla bitki türü tarafından sentezlenen doğal bir polifenoldür. Günümüzde resveratrolün anti-kanserojen etki gösterdiği ve çeşitli kanser hücreleri üzerinde anti-proliferatif ve apoptozu indükleyici etkilerinin olduğu bilinmektedir. Resveratrol ile yapılan son çalışmalar incelendiğinde; resveratrolün sirtuinler olarak adlandırılan histon deasetilaz enzimlerinden SIRT1(Sirtuin1)'i aktive ettiği gösterilmiştir. SIRT1; histon H1, H3 ve H4'ün yanında p53, Foxo, Ku70, P300, Rb, E2F1, NF-κB, p73 ve PGC-1α gibi birçok histon olmayan proteinleri de deasetile etmektedir.

Kanser vakalarının %50'sinden fazlasında p53 mutasyonu olduğu için kanser hücrelerinin tedavi ajanlarına veya flavonoidlere yanıtı çok farklı olabilmektedir. Resveratrolün SIRT1 üzerindeki ekspresyon arttırıcı etkileri düşünüldüğünde, p53 varlığı ve yokluğundaki sinyal ileti yollarına resveratrolün etkisi önem kazanmaktadır.

Bugüne kadar yapmış olduğumuz literatür taramalarına göre resveratrolün SIRT1 aktivitesi üzerindeki etkisi göz önüne alınarak, resveratrolün p53(+/+) ve p53(-/-) kolon kanser hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyen bir araştırma bulunmadığı belirlenmiştir.

Bu bilgi açığına katkıda bulunmak amacıyla bu çalışmada amacımız; p53(+/+) ve p53(-/-) kolon kanser hücrelerinde resveratrolün SIRT1'in aktif ve kısmen inhibe olduğu koşullarda hücrelerdeki hücre canlılığı, apoptotik hücre ölümü ve çeşitli sinyal ileti yolları üzerindeki etkilerini incelemektir.

Bu amaç doğrultusunda çalışmamızın hipotezi: Resveratrol kolon kanser hücrelerinde p53 ve SIRT1 aktivitesine bağımlı etki gösterir.

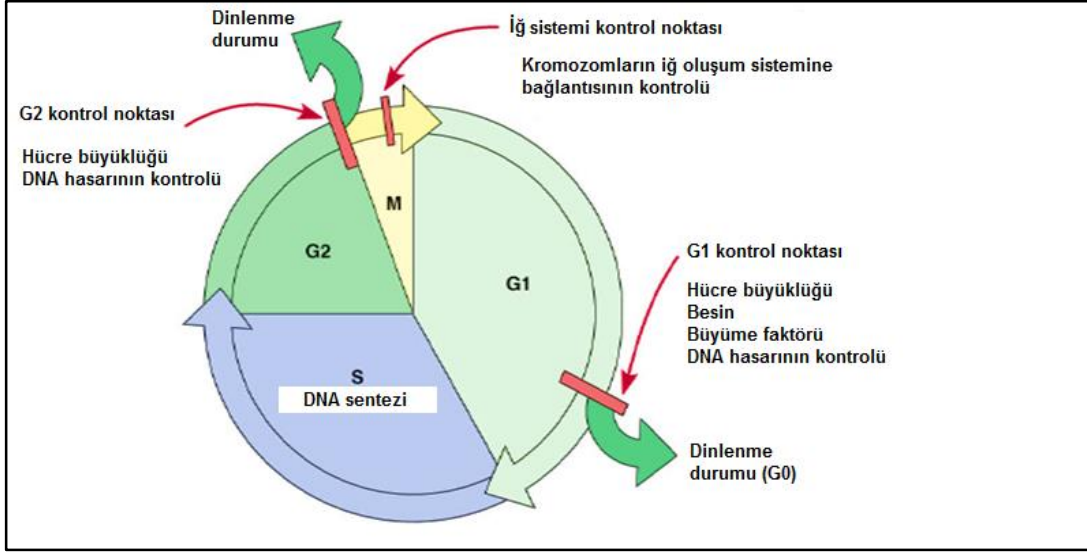
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre Döngüsü ve Kanser Oluşumu ile İlişkisi

2.1.1. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü bir hücrenin bölünmesi sırasında meydana gelen hücresel olaylardan oluşan bir süreçtir. Bu süreçte S evresinde kromozomal DNA kopyalanarak iki katına çıkar ve M evresinde mitozun gerçekleşmesi ile kromozomları, hücresel organelleri ve sitoplazmaları aynı soydan gelen iki yavru hücre oluşur. Boşluk (Gap) evreleri olan G₁ ve G₂; S ve M evrelerini birbirinden ayırmaktadır. Basit bir hücre döngüsü modelinde hücre bölünmesi, Mitoz (M) ve G₁, S, G₂ evrelerinin birleşiminden oluşan bir interfaz (I) sürecinden oluşmaktadır (1). Kültürde çoğaltılan tipik bir insan hücresinde 24 saatlik bir döngünün 23 saatini interfaz, 1 saatini de M evresi oluşturmaktadır. Mitoz evresinde, mikroskopta gözlemlenen basamaklar, DNA'nın kromozomlarda yoğunlaşması, sentrozomların ayrılması ve sentrozomlardan mitotik iğler oluşması, nükleer membran bütünlüğünün bozulması, iğ mikrotübüllerinin kromozomlara bağlanması, kromozomların hücrenin ekvator ekseninde boyunca dizilmesi, kardeş kromatidlerin ayrılması ve iki sentrozom etrafında gruplanarak iki kromozom takımını oluşturması, her bir kromozom takımı etrafında nükleer membran oluşması, kromozomların yoğunluklarını kaybetmeleri ve plazma membranının iki yavru hücreye ayrılmasıdır (sitokinez) (2).

Evreler arasında en yoğun olan süreç M evresi olmasına karşın, hücre bir sonraki evreye geçmeden önce her evrede gerçekleşen biyokimyasal sürecini tamamlamak zorundadır. G₁ evresi ile denge halinde olan ek evre G₀ evresidir ve bu evrede hücre ya durağan durumda ya da yaşlanma halindedir. Hücre döngüsüne katılmayan durağan hücre (*quiescent cell*) hücrenin dış çevresinde oluşan büyüme faktörü konsantrasyon artışı gibi bir mitotik uyarı ile hücre döngüsüne tekrar katılabilir. Buna karşın yaşlanma halinde olan bir hücre (*senescent cell*) mitotik büyüme faktörleri var olsa bile tekrar hücre döngüsüne giremez. G₀ evresinde siklin-bağımlı kinazları da içeren hücre döngüsü için önemli olan proteinler yoktur. Her evre duraksamayı ve ilerlemeyi sağlayan biyokimyasal kontrol noktaları ile sıkı bir kontrol altındadır. Hücre dışı koşullar uygun olduğunda büyüme ve bölünme için sinyaller yeterli olduğunda ise hücre döngüsü, memeli hücrelerinde restriksiyon noktası olarak bilinen ve G₁ fazının sonunda bulunan kontrol noktası aracılığıyla erken G₁ ya da G₀'a ilerler. Bu noktayı geçtikten sonra, hücre dışı sinyaller hücre büyümesi ve bölünmesinin ortadan kaldırılmasını gerektirse bile hücreler DNA replikasyonunu gerçekleştirir (3) (Şekil 1).

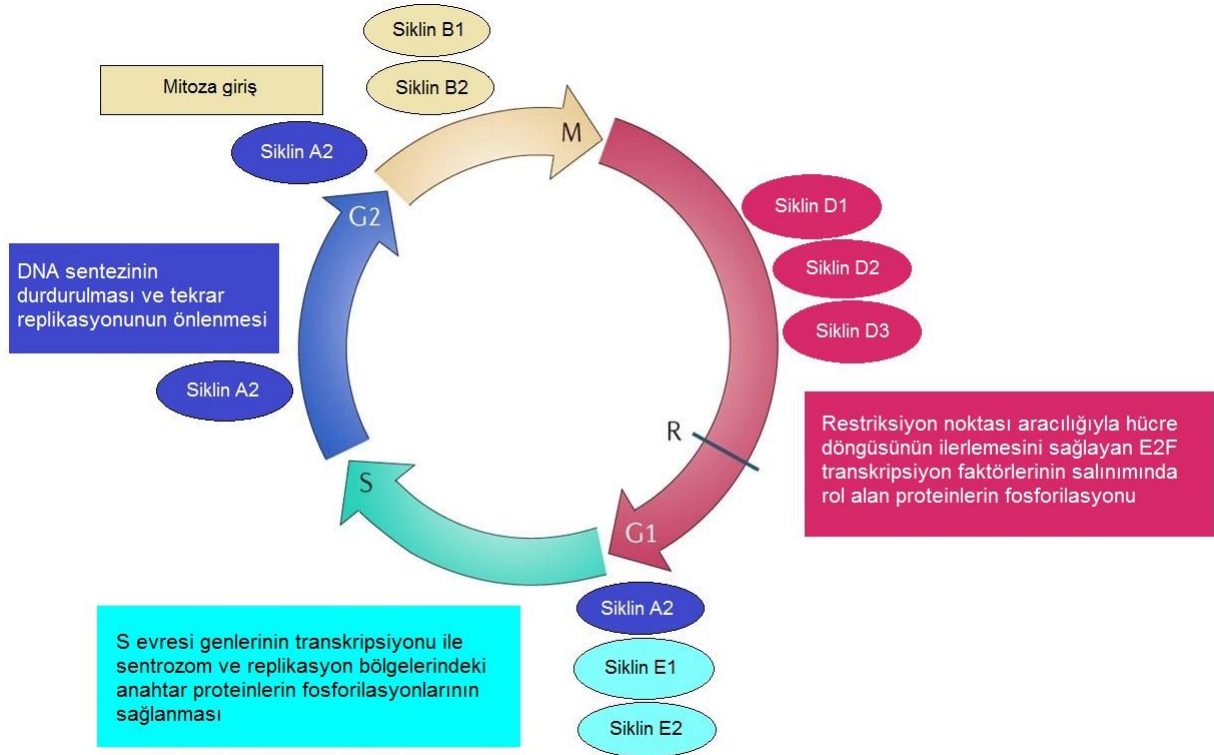


Şekil 1. Hücre döngüsü ve fazları (Kaynak 4'ten uyarlanmıştır)

2.1.2. Hücre döngüsünün düzenlenmesi

Hücre döngüsünün kontrolü, döngüsel olarak aktive edilen protein kinazlara bağlıdır. Hücre döngüsü kontrol sisteminin kalbi, siklin bağımlı kinazlar (*Cycline dependent kinase*, CDK) olarak bilinen bir protein kinaz ailesidir. Döngü boyunca bu kinazların aktiviteleri artarak ya da azalarak hücre döngüsünün ilerlemesi sağlanmaktadır (5). CDK'lerin aktiviteleri, diğer protein kinazlar, fosfatazlar, siklin proteinleri ile birleşmesi ve CDK inhibitör proteinlerinin varlığı veya yokluğu ile sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. CDK düzenleyicilerinin en önemlileri siklin adı verilen proteinlerdir. CDK'ler aktiviteleri için siklinlere bağımlıdır ve bir sikline sıkıca bağlanmazlarsa protein kinaz aktivitesine sahip olamazlar. Siklin düzeylerindeki döngüsel değişimler, siklin-CDK komplekslerinin aktivasyonunu ve bu aktivasyon sırasıyla hücre döngüsü evrelerini tetikler. Hücre döngüsünün her bir evresi için tanımlanmış CDK'lere bağlanan ve ökaryotik hücrelerde fonksiyon gösteren 3 sınıf siklin bulunmaktadır: 1. G1/S siklinleri; G1'in sonunda CDK'lere bağlanırlar ve hücreyi DNA replikasyonuna sevk ederler, 2. S-siklinleri; S evresi boyunca CDK'lere bağlıdır ve DNA replikasyonunun başlaması için gereklidirler; 3. M- siklinleri mitoz olaylarını tetiklerler. Erken G1 evresinde sentezlenen siklin D, CDK4 ve CDK6'ya bağlanır. Geç G1 evresinde sentezlenen siklin E ise CDK2'ye bağlanır. Bu üç kompleks, diğer araçlarla birlikte hücrenin S evresine girmesine ve S evresinde ilerlemesini sağlarlar. Siklin A, CDK2 ve CDK1'e bağlanır ve bu kompleksler, hücrenin S fazını terk edip G2 evresine girmesini sağlar ve Siklin B'nin oluşumunu indüklerler. Siklin B, CDK1'e bağlanır ve bu

kompleks hücrenin G2 evresini terk edip M evresine girmesine izin verir. Siklinler, işlevlerini gerçekleştirdikten sonra, yıkımlandıkları ubiquitin-proteazom yoluna girerler. CDK aktivitesi hem inhibe edici fosforilasyon ve inhibe edici proteinler tarafından baskılanabilir. Hücre döngüsü kontrol sistemi, döngüsel proteolize ve transkripsiyonel regülasyona bağlıdır (Şekil 2) (3, 5, 6).



Nature Reviews | **Cancer**

Şekil 2. Hücre döngüsünün CDK-siklin kompleksleri ile regülasyonu (Kaynak 7’den uyarlanmıştır)

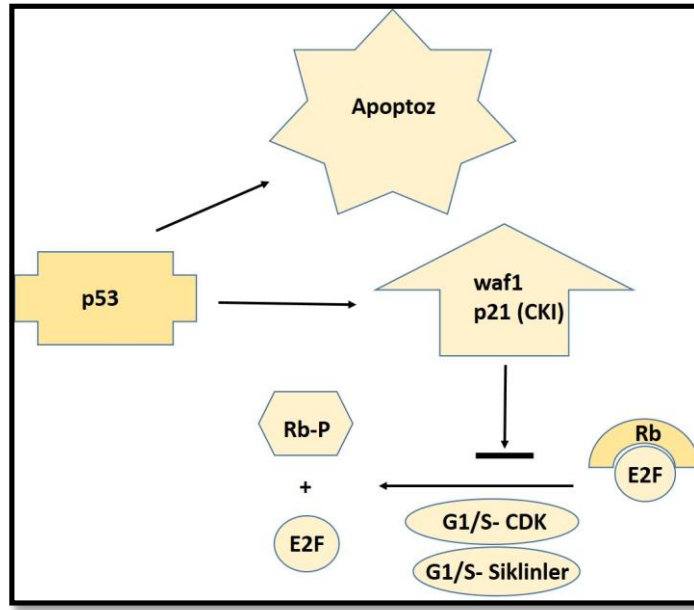
2.1.3 Hücre Döngüsünde Retinoblastoma ve p53’ün Rolü

Hücre döngüsünde G1/S CDK’lerin kritik substratı; ismini eksikliğinde oluşan retinoblastoma kanserlerinden alan Rb proteinidir. Rb proteini G1 ve G0 evrelerinde fosforile halde değildir ve bu yapıda olan Rb proteini E2F transkripsiyon faktörüne bağlanarak transkripsiyon faktörünün serbest kalmasını önlemektedir. G1 ve G1/S-CDK’ler tarafından Rb’nın fosforile olması konformasyonunu değiştirir ve E2F serbestleşir. Serbestleşen E2F; S evresi için gerekli olan DNA polimeraz, dihidrofolat redüktaz, timidin kinaz ve G1/S evresi siklin proteinleri gibi gen ürünlerinin transkripsiyonunu arttırmak için hedef gendeki regülatör elemente bağlanır. G1/S siklin proteinleri G1/S CDK’lerin aktivitesini arttırır. G1/S CDK’ler

tarafından ve E2F transkripsiyon faktörünün serbestleşmesi ile fosforile Rb'nin oluşması G1 evresinden S evresine girişin anahtar gereksinimidir. Rb'nin aktif formu olan fosforile olmamış Rb, E2F'i tutsak ederek inhibe olmasını sağlar. Rb'nin fosforile olması ile E2F'i tutsak etme özelliği kalmadığı için fosforile formu Rb'nin inaktif formudur. G1/S-CDK ve S-CDK aktivitelerindeki artış, onların inaktivasyonuna ya da yıkımına neden olan p27 fosforilasyonunu artırır. Tüm bu etkileşimlerin sonuçları hızlıdır ve S-CDK komplekslerinin tam olarak aktivasyonları S-evresinin başlaması için gereklidir (7, 8, 9).

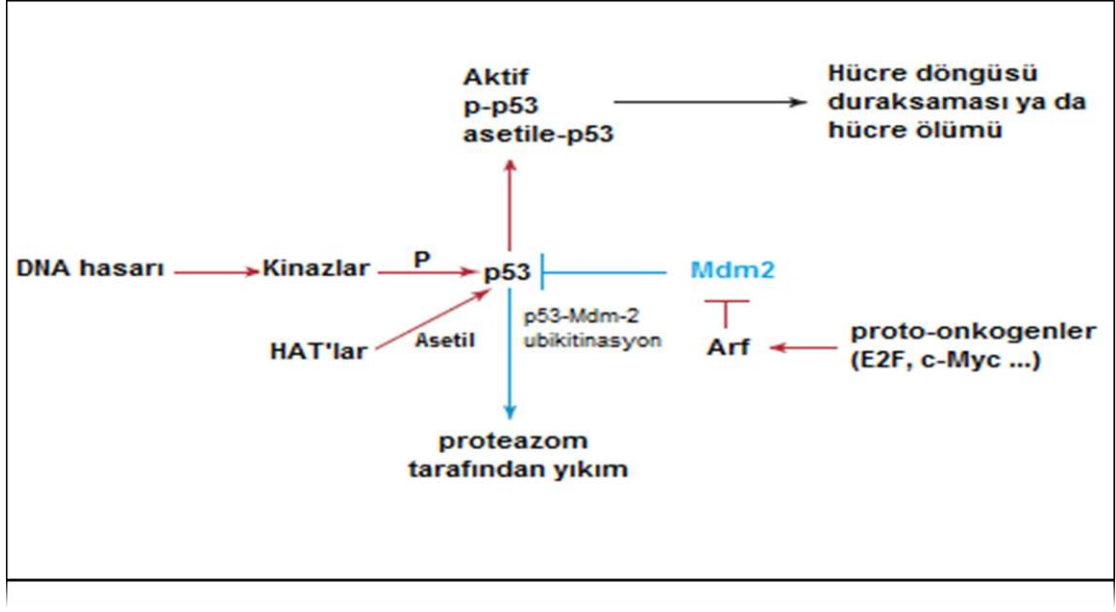
Belirli kimyasallar ya da radyasyona maruziyet sonrası kromozomlar hasar gördüğünde, hücre döngüsü kontrol sistemi kolaylıkla DNA hasarını belirleyerek DNA hasar kontrol noktasında döngüyü durdurur. Çoğu hücre, biri S evresine geçişi engelleyen geç G1'de, biri mitozu girmeyi engelleyen geç G2'de olmak üzere en az iki kontrol noktasına sahiptir. Hücreler G2'de radyasyon hasarına maruz kalırsa, örneğin, hasarlanmış DNA, fosfataz Cdc25'i fosforile ve inaktive eden protein kinaz dizisine bir sinyal gönderir. Bu M-CDK aktivasyonu ve defosforilasyonunu engeller ve böylece mitozu girişi inhibe eder. DNA hasarı tamir edildiğinde, inhibe edici sinyaller sonlandırılır ve hücre döngüsü progresyonu kaldığı yerden devam eder. G1 kontrol noktası G1/S-CDK ve S-CDK komplekslerinin aktivasyonunu inhibe ederek S evresine ilerleyişi engeller (8).

DNA hasarı hücrede çeşitli genlerin transkripsiyonunu uyaran gen düzenleyici protein p53'ün aktivasyonuna neden olur. Bu genlerden biri, G1/S-CDK ve S-CDK'ye bağlanarak onların aktivitelerini inhibe eden ve böylece S evresine girişi engellemede yardımcı olan p21 olarak isimlendirilen bir CKI proteinini kodlar. p53; p21 gen ifadesini tanımlayacak olan waf1 geninin transkripsiyonunu artırarak hücre döngüsünü durdurur. p21 bir CDK inhibitörüdür (CKI) ve Rb'nin fosforilasyonunu baskılamak üzere G1/S evresindeki CDK'lere bağlanır. DNA hasarı dolaylı bir mekanizma ile p53'ü aktive eder. p21 düzeyindeki artış; G₁ ve G₁/S-CDK'leri ve Rb'nin fosforilasyonunu inhibe eder. Fosforile halde olmayan Rb, E2F ile bağlı kalır ve hücre döngüsünün S evresine girişini engeller (Şekil 3). DNA hasarının oluşması ile bu mekanizma (DNA-kinaz: p53-p21-G₁-CDK) hücrel DNA'nın replikasyonu ile S evresine geçmesinden önce DNA tamiri için hücreye zaman tanır. Apoptozun başlaması için gereken p53 düzeyi p21 sentezi için gereken p53 düzeyinden daha yüksektir (8,10).



Şekil 3. p53 ve Rb tarafından G₁/S evresi geçişinin düzenlenmesi (Kaynak 8’den uyarlanmıştır)

Normal koşullar altında p53 düzeyi, p53’ün ubiquitinasyonu ve proteozomlar tarafından yıkılımını sağlayan bir ubiquitin ligaz olarak rol oynayan Mdm2 tarafından düşük tutulur. Kinaz ve Histon Asetil Transferaz (HAT) enzimleri ile uygun rezidülerin fosforilasyonu ve asetilasyonu p53’ün yıkılımını önler ve transkripsiyonel aktivitesini artırır. E2F ve Myc gibi bazı protoonkogen transkripsiyon faktör proteinleri burada tümör baskılayıcı proteinler olarak hareket ederler. Uygun koşullar altında E2F ve Myc hücre bölünmesinde gerekli olan genlerin ekspresyonunu uyarır fakat uygun olmayan koşullar Arf protein ekspresyonunu artırır. Arf, p53 ile etkileşimini önlemek ve dolayısıyla p53 düzeyini arttırmak için Mdm2’ye bağlanır. Arf ile uyarılmış mekanizma, hücre bölünme süreci başladıktan sonra bazı negatif sinyaller ya da koşullar oluştuğunda hücre bölünmesini durdurmak için hücrel bir kontrol mekanizması olabilir. Artan p53 aktivitesi hücre döngüsünde duraksamaya veya apoptoza yol açar (8) (Şekil 4).



Şekil 4. Hücre içi p53 düzeyinin ve aktivitesinin düzenlenmesi (Kaynak 8’den uyarlanmıştır)

DNA hasarının düşük seviyesi her hücrenin normal yaşamında meydana gelir ve eğer hasar kontrol noktaları fonksiyon göstermiyorsa bu hasar hücrenin soyunda birikmektedir. Uzun dönemde hücre kontrol noktalarının eksikliğinde genetik hasarın birikimi kanser-destekleyici mutasyonların frekansında bir artışa neden olur. p53 geninde mutasyonlar insan kanserlerinin tümünün en az yarısında meydana gelir. p53 fonksiyon kaybı kanser hücresinin daha kolay mutasyon biriktirmesine izin verir (11).

p53, p21 ya da p16 gibi tümör baskılayıcı proteinler hücre yaşam döngüsünü duraksatma aktivitesi gösterirken, siklinler ve CDK’ler hücreyi bölünmeye doğru yönlendirdiklerinden onkogen olarak adlandırılırlar. Kanser oluşum mekanizmasında ardışık mutasyonlar sonucu hücre döngüsünün kontrolden çıkması gözlenmektedir. Bu mutasyonlar genellikle DNA onarım enzimlerinde inaktifleşme, proto-onkogenlerde aktifleşme-onkogene dönüşüm ve tümör baskılayıcı genlerde inaktifleşme olarak görülmektedir. Bu süreçte programlanmış hücre ölümü, hasarlı hücreleri ortadan kaldırarak, bir sonraki nesle kalıtım yoluyla geçecek ve kansere sebep olabilecek olası genetik mutasyonların sayısını azaltmaktadır (12).

2.2. Apoptotik Hücre Ölümü

Apoptoz fizyolojik şartlardaki çok hücreli organizmalarda, hem gelişim sırasında hem de gelişimini tamamlamış organizmaların homeostazının sağlanmasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesi için evrimleşmiş karmaşık bir mekanizmadır. Apoptoz veya Tip I hücre ölümü, oldukça sıkı kontrol mekanizması ile hücre sayısını kontrol eden ve hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan mekanizmadır. Bu nedenle tümör hücrelerinin çoğalmasının baskılanmasında çok önemli rol almaktadır. Apoptoz mekanizması potansiyel zararlı hücrelerin yok edilmesi görevini üstlendiğinden pek çok hastalık ile de yakından ilişkilidir. Aşırı apoptoz, fazla hücre kaybı nedeniyle iskemik ve nörodejeneratif hastalıklara sebep olurken, yetersiz apoptoz otoimmün hastalıklara ve kansere neden olmaktadır. Fizyolojik süreçte büyüme faktörlerinin hücreye ulaşamaması veya hücrenin oksidatif stres, hipoksi, iyonize radyasyon, UV ya da ilaç uygulamaları gibi farklı etkenlerin etkisinde kalması sonucunda oluşan hasarlı hücrelerin yok edilebilmesi için apoptotik mekanizma tetiklenmektedir.

Apoptoz mekanizmalarına genel olarak bakıldığında hücre-içi (organeller)/hücre-dışı (plazma membran reseptörleri) olmak üzere iki ana yol bulunmaktadır. Hücre-dışı tetiklenme mekanizmasında plazma membran yüzeyinde bulunan Fas reseptör (FasR) ve TNF reseptör ailesinden olan ölüm reseptörleri (TNFR)1 tarafından tetiklenebilmektedir. Bu reseptörler sisteinden zengin ekstrasellüler bir bölgeye ve apoptotik mekanizmanın proteinlerine bağlanan sitoplazmik bir ölüm bölgesine (death domain) sahiptir. Fas ligandının (FasL) Fas'a veya TNFR1'e bağlanması ile reseptör aktive olmaktadır. Fas'ın aktivasyonu reseptörün Fas-ile ilişkili ölüm reseptörü (FADD, Fas-associating protein with death domain) ile multimerize olmasına; TNFR1'in aktivasyonu ise TNF-ilişkili ölüm bölgesinin aktivasyonuna (TNFR associated death domain) yol açmakta ve sonuçta FADD'ye bağlanması ile sonuçlanmaktadır. Sitoplazmada inaktif olan pro-kaspaz-8 FADD'ye bağlanarak aktif form olan kaspaz-8'e dönüşmekte ve sitoplazmik bir pro-apoptotik protein olan Bid proteinini proteolitik olarak keserek tBid formuna dönüştürmektedir. tBid mitokondriden sitokrom c (Cyt c) ve apoptoz indükleyici faktörün (AIF) salınımına veya direkt olarak kaspaz-3 aktivasyonuna neden olmaktadır. Apoptotik süreç içinde mitokondriden Cyt c'nin salınımı geri dönüşü olmayan hücre ölüm sürecinin başlaması anlamına gelmektedir. Bu aşamadan sonra Cyt c'nin; Apaf-1 (apoptotik proteaz-aktive edici faktör-1) ve ATP ile birleşmesi ile kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktive

olmaktadır. Kaspaz-3 daha sonra pek çok apoptotik substrat ile reaksiyona girerek apoptozu karakterize eden morfolojik sonuçlara yol açmaktadır (13) (Şekil 5).

Şekil 5. Hücre içi ve hücre dışı etkenlerle tetiklenen apoptoz yolakları (13)

p53'ün aktivasyonu hem mitokondriyal (intrinsik) hem de ölüm reseptörü ile uyarılmış (ekstrinsik) apoptotik yolları tetikler. p53 özellikle Bax, Noxa ve PUMA proapoptotik Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) ailesi proteinlerinin ekspresyonlarını uyarır, fakat mitokondri dışı membran geçirgenliğine yol açan sağkalım yanlısı Bcl-2 ekspresyonunu azaltır. Sonrasında sitokrom c mitokondriden salınarak Apaf-1'e bağlanır ve başlatıcı kaspaz-9'un aktivasyonunu uyarır, sonuç olarak sonlandırıcı kaspaz-3, 6 ve 7'nin aktivasyonu gerçekleşir. Diğer taraftan,

aktive olmuş p53 aynı zamanda FAS (CD95/APO-1), DR5 (TRAIL-R2) ve PIDD (*p53-induced protein with death domain*) bazı DR (ölüm reseptörü)lerin ekspresyonlarını artırır. Kaspaz-8 ile birlikte, ölüm tetikleyici sinyal kompleksi oluşur ve sonradan kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozu indükler (13, 17, 18).

2.3. Kolon Kanseri

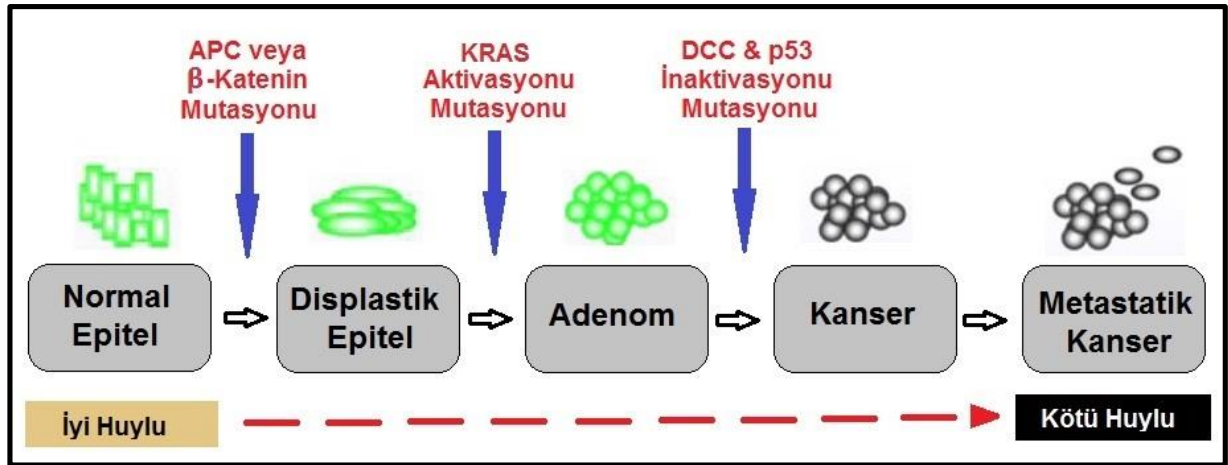
Kanser birden fazla kompleks moleküler değişikliklerden oluşan heterojen bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanser tümörün köken aldığı dokunun tipine göre beş farklı türe ayrılmaktadır: karsinoma, sarkoma, lenfoma ve lösemi, kök hücre tümörleri ve blastoma. Karsinomalar epitelyal hücrelerden türevlenen malign tümörlerdir ve tüm kanser türlerinin %85'ini kapsarlar. En yaygın görülen karsinoma türleri meme, kolon, prostat ve akciğer kanseridir (19). Kalın barsak; çekum, kolon, rektum ve anal kanal bölümlerinden meydana gelmektedir. Kolon ise çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolon adı verilen bölümlerden oluşmaktadır. Kolon; sigmoid kolon üzerinden rektuma, çekum aracılığıyla ise ince barsağın ileumuna bağlanır. Kolon kanseri ya da kolorektal kanser; kolon, rektum ve appendiks bölgelerinde meydana gelen kanser oluşumlarının tamamını kapsamaktadır.

Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 49,700 kanser ölümünün yaklaşık %8'i kolorektal kanser sebeplidir. 2015 yılında yayınlanan verilere göre Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 132,700 yeni kalın bağırsak kanseri teşhis edilmekte ve bunlardan 93,090'nın kolon kanseri, kalanın ise rektal kanser olduğu belirtilmektedir (20). Dünyada en yüksek insidans oranları Avustralya, Yeni Zelanda, Avrupa ve Kuzey Amerika'da, en düşük oranlar Afrika ve Güney-Orta Asyada bulunmuştur (21). Bu coğrafik farklılıkların genetik olarak belirlenmiş duyarlılıklardan köken alan çevresel maruziyetler ve diyetteki değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Düşük sosyo-ekonomik durumun kolorektal kanserin gelişimi için de risk oluşturduğu öngörülmektedir (22). Fiziksel hareketsizlik, sağlıksız beslenme, sigara ve obezite gibi sağlığa zararlı fakat potansiyel olarak değişebilen davranışların, kolorektal kanser riskinin yeniden başlamasında sosyo-ekonomik eşitsizliğin kısmen sorumlu olduğu düşünülmektedir (23). Dünya Sağlık Örgütü GLOBOCAN veritabanına göre kolon kanser oranı erkeklerde kadınlardan yüksektir. Amerika Birleşik Devletleri'nde kolorektal kanser insidans oranları son 15 yıldan fazla bir süredir her yıl yaklaşık %2-3 oranında azaldığı belirtilmektedir. Oranlardaki bu azalma, erken dönemde kolonik poliplerin belirlenebilmesi ve ortadan kaldırılması, erken evrede kolorektal kanserin

tespiti, daha etkili tedavilerin geliştirilmiş olması özellikle de adjuvan (destekleyici) tedavilerle ilişkilendirilmiştir (24).

2.3.1 Kolon Kanseri Oluşumu ve Moleküler Mekanizması

Kolon kanseri, normal kolon epitelinin benign adenoma, ardından adenomatöz polipe ve daha sonra invazif kansere dönüşümünü kapsayan kromozomal ve mikrosatellit instabilitesinin de bulunduğu bir seri genetik ve epigenetik süreçler ile bağlantılıdır.



Şekil 6. İnsan kolorektal karsinogenezinin adenoma-karsinoma modeli (Kaynak 25'ten uyarlanmıştır)

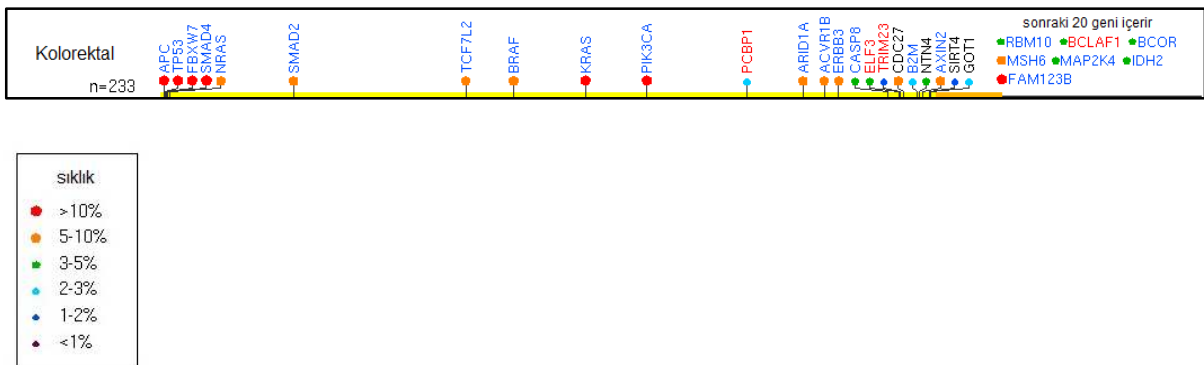
Adenomatöz polipozis (APC) ya da β -katenin mutasyonları neoplastik süreci başlatır. Tümör ilerlemesi diğer genlerdeki mutasyonlar ve genomik instabilitesinden kaynaklanmaktadır. Bu süreç, hiper-proliferasyonun başlaması, küçük ve büyük adenomatöz poliplerin oluşması, displastik epitel yapısının adenomaya ilerlemesi (pre-kanseröz polip), adenokarsinomaya dönüşüm ve kanserin diğer dokulara yayılması ile metastatik kanserin oluşumunu kapsar (Şekil 6) (25, 26).

Kolon karsinogenezinde iki moleküler mekanizma bulunmaktadır: Birincisi olan genomik instabilite, karsinogenez için kritik bir öneme sahiptir. En yaygın görülen genomik instabilite kromozomal instabilitedir. Kromozal instabilitenin moleküler temeli sırasıyla APC, KRAS, DCC ve TP53 delesyon ya da mutasyonları ile karakterize olan kromozal instabilite yolağına dayanmaktadır (27). Bekçi gen olarak APC bu yolda önemli bir düzenleyicidir. Bu yolağ aynı zamanda KRAS mutasyonu ile birlikte displastik anormal kript odaklarının oluşumunda yer almaktadır. Başlangıçta düşük düzeyde olan displastik kript odakları, ileri

derecede adenomatöz poliplere dönüşmekte ve son olarak invaziv kanseri oluşturmaktadır. İkinci mekanizma; genomik instabiliteden sorumlu mikrosatellit instabilite yolağıdır. Bu yolakta yanlış eşleşme tamir genlerinin (MLH1, MSH2, MSH6 ya da PMS2) disfonksiyonu özellikle mikrosatellitler olarak adlandırılan tekrarlı DNA sekansını hedeflemekte ve çok sayıda mutasyon birikimi ile karakterize olan genetik instabilite ile sonuçlanmaktadır (28, 29).

Kolon kanserinin gelişimi, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve onkogenlerin aktivasyonlarını içeren çok faktörlü ve çok adımlı bir süreçtir. p53'ün tümör baskılayıcı bir gen olarak anti-kanser savunmanın en önemli öğelerinden biri olduğu birçok çalışmada doğrulanmıştır (30). TP53 insan kanserlerinde en yaygın olarak mutasyona uğrayan gendir (31). Tümörün patolojik sürecinde adenoma-karsinoma geçişinde TP53 mutasyonlarının kritik bir rolü olduğu düşünülmektedir (32). Kolon kanserinde TP53 mutasyonu proksimal kolon tümörlerinin %34'ünde ve distal kolorektal tümörlerin %45'inde meydana gelmektedir. Bu mutasyonların çoğunluğu, TP53 geninde ekzon 5-8 (DNA bağlanma domaini)de özellikle 175, 245, 248, 273 ve 282 kodonlarda G'den A'ya C'den T'ye geçişlere yer vererek proteinde aminoasit dizisi değişiklikleri ile sonuçlanır. Bunun gibi DNA bağlanma domaininde yer değiştirmelerin yığılması, spesifik DNA bağlanmasının bozulması ve dizisel transaktivasyona neden olur (33, 34). p53 mutant olan kolorektal kanser hastalarında daha fazla kemorezistans ve yabancı tip'e göre daha kötü prognoz görülmektedir (35, 36).

Tumorportal.org 2014 verilerine göre kolorektal kanserlerde görülen gen mutasyonları ve sıklığı aşağıdaki şema ile ifade edilmektedir (Şekil 7) (37).

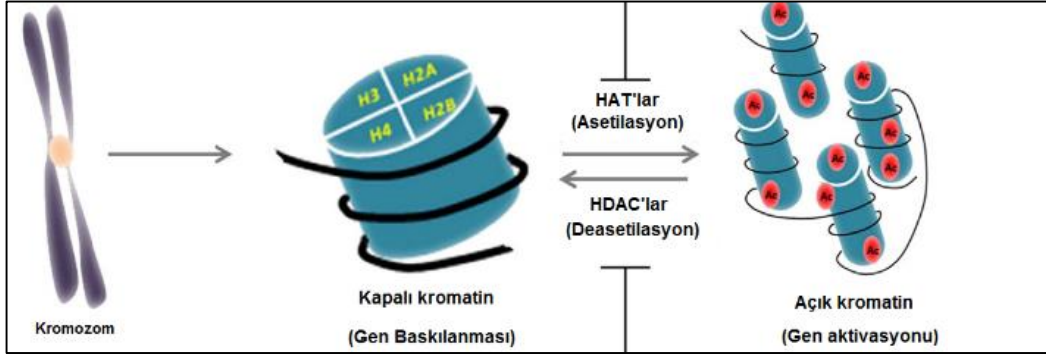


Şekil 7. Kolorektal kanserde görülen mutasyonlar (Kaynak 37'den uyarlanmıştır)

2.4. Kanser Progresyonunda Genel Epigenomik Düzenlenmeler

Laboratuvar hayvanlarının kullanımıyla ve insanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, diyetel girişim denemeleri; yaşam tarzı ve çevresel faktörlerin çok çeşitli neoplazmların gelişiminde kritik bir rol oynadığını gösteren kanıtlar sağlamaktadır. Kimyasal karsinojenler, çevresel kirleticiler, diyetel kontaminantlar ve fiziksel karsinojenleri içeren çevresel faktörler insan kanserlerinin etiyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Ek olarak, alkol tüketimi, sigara kullanımı, güneş ışığına maruziyet, artmış yağ tüketimi gibi yaşam tarzı faktörleri ve kronik stres de kanser oluşumu ve gelişimini desteklemektedir. Bu çalışmalar, kanserin kompleks bir hastalık olduğuna ve hem genetik hem de epigenetik modifikasyonların varlığına kanıt oluşturmıştır. Mikroçevre-aracılı epigenetik bozulmalar neoplastik gelişimde önemli bir rol oynamasına rağmen kanserin başlaması ve ilerlemesi, öncelikle edinilmiş genetik değişimler ile hareket eder (38). “Epigenetik”, gen ekspresyonunun dinamiklerinin düzenlenmesinde yeterli düzeyde etkili ve DNA dizisinde değişiklik oluşturmeyen gen aktivitesinde ve ekspresyonunda meydana gelen kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanır (39,40). Epigenetik modifikasyonlar, potansiyel olarak geri dönüşümlü olduğundan beslenmenin yer aldığı kanser önleyici ve tedavi stratejiler için çekici ve umut verici olarak görülmektedir. Epigenetik düzenlemeden sorumlu anahtar süreçler, DNA metilasyonu, kromatinde modifikasyonlar (çekirdek histonların kovalent modifikasyonu) ve kodlanmayan RNA’lar (mikro-RNA’lar) tarafından post-transkripsiyonel gen regülasyonlarıdır (41, 42).

Kanserin başlangıcı ve progresyonu genel olarak genom ve epigenom deregulasyonları ile ilişkilidir. Tümörögenез sürecinde görülen epigenetik deregulasyonlar (DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve miRNA’ya bağlı düzenleme) giderek daha fazla bildirilmektedir. Farklı kromatin düzenleyici enzimler ve kanser ile ilişkili anomaliler de keşfedilmekte ve sınıflandırılmaktadır. Kromatin enzimlerindeki değişimlerin ve kanserdeki rollerinin daha iyi anlaşılması kanserin önlenmesi ve tedavisinde epigenetik hedeflemenin kullanılabilmesinde önemli bir basamaktır (43). Epigenetik mekanizmalar nükleozomun sıkılığını kontrol ederek gen ifadelerini düzenlerler. Bu mekanizmalar DNA metilasyonu ya da histon modifikasyonları ile sağlanır. Bu süreçte yer alan enzimler: DNA metiltransferazlar (DNMT), Histon metiltransferazlar (HMT), Histon asetiltransferazlar (HAT) ve Histon deasetilazlar (HDAC)’lardır. Bu enzimlerden, HAT ve HDAC enzimleri histon proteinlerinin lizin rezidülerine asetil gruplarının bağlanması ile kromatinlerin konformasyonel yapısını değiştirerek gen regülasyonunda rol oynayabilmektedir (44) (Şekil 8)



Şekil 8. HDAC ve HAT'ların genel fonksiyonları (Kaynak 43'ten uyarlanmıştır.)

2.5. Histon Deasetilazlar

Histon deasetilazlar dört sınıfa ayrılmaktadır. Sınıf I HDAC'lar: (HDAC1, HDAC2, HDAC3 ve HDAC8), *Saccharomyces cerevisiae* Rpd3 homoloğu; Sınıf II (sınıf IIa ve sınıf IIb'ye ayrılır) HDAC'lar (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HDAC10), maya HDAC1 homoloğu Sınıf III HDAC'lar (sirtuinler), maya Sir2 homoloğu enzimler içerir. Sınıf IV'de sadece HDAC11 bulunmaktadır.

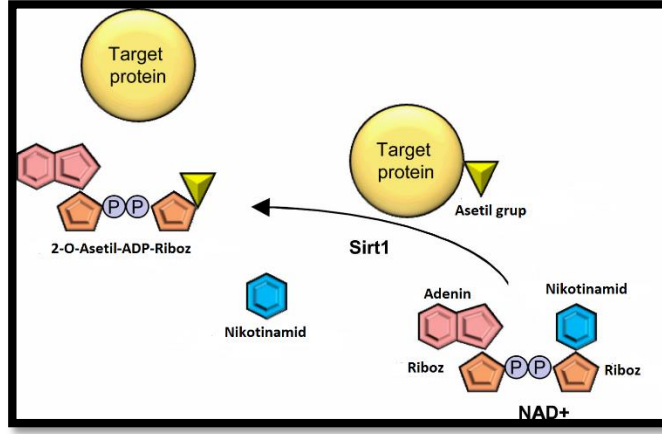
Sınıf III HDAC'lar, Sirtuinler, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)⁺-bağımlı deasetilaz ya da mono-(ADP-ribozil)transferaz aktiviteleri ile birlikte neredeyse tüm türlerde bulunabilen evrimsel olarak korunmuş bir ailenin üyeleridir. *Silencing information regulator 2* (Sir2) *Saccharomyces cerevisiae* mayasında tanımlanmıştır (45). İlk olarak sirtuinlerin eşleşme tipi lokuslarının (mating-type loci) transkripsiyonel susturucusu olarak keşfedilmiş, aynı zamanda çoğu çalışmada genom instabilitesi, hücresel metabolizma, DNA tamiri, kromozomal stabilite, yaşlanma ve kanserdeki çeşitli biyolojik rolleri gösterilmiştir (46). Memeli sirtuinlerinin, başlıca histon deasetilaz aktivitesine sahip (SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT5 ve SIRT7) ya da monoriboziltransferaz aktivitesine sahip (SIRT4 ve SIRT6) yedi izoformu bulunmaktadır (SIRT1-7) (Tablo 1). SIRT1, -6 ve -7 çoğunlukla nükleer, SIRT2 sitoplazmik, SIRT3, -4, -5 mitokondride lokalizasyon göstererek farklı fonksiyonlarda bulunmaktadır. Her bir sirtuin yaklaşık 275 aminoasitlik korunmuş katalitik çekirdek bölgesi ve özgün olarak değişen uzunlukta ilave N-terminal ve/veya C-terminal diziler ile karakterize edilmektedir (47).

Tablo 1. Sirtuin izoformları ve fonksiyonları (47).

Sınıf	Sirtuin	Enzim Aktivitesi	Temel Substratlar	Fonksiyonları
I	SIRT1	Deasetilaz	Histon H1K26, H3K9, H3K18, H4K16, p53, FOXO, Rb, Ku70, p300, NF- κ B, PGC-1 α , PPAR γ , UCP2, Asetil-CoA sentetaz 1, MnSOD, Smad7, MyoD, Per2, SUV39H1	Hücre sağkalımı, yaşam süresinin düzenlenmesi, metabolizmanın düzenlenmesi, inflamasyon, oksidatif stres yanıtı
I	SIRT2	Deasetilaz	α -tübülün, FOXO, Histon H4K16	Hücre döngüsü regülasyonu, sinir sistemi gelişimi
I	SIRT3	Deasetilaz	Histon H3K9, H4K16, Asetil-CoA sentetaz 2, Ku70, FOXO3a, MnSOD	Mitokondriyal metabolizma regülasyonu, yağ asidi oksidasyonu, ATP üretimi
II	SIRT4	ADP-ribozil-transferaz	Glutamat dehidrogenaz	Mitokondriyal metabolizmanın düzenlenmesi, insülin salınımı
III	SIRT5	Deasetilaz/De malonilaz/Desüksinilaz	Karbomoil fosfat sentetaz 1, Sitokrom c	Apoptoz, protein-protein etkileşmesi ve protein kararlılığının düzenlenmesi, üre döngüsü
IV	SIRT6	Deasetilaz/ADP-ribozil-transferaz	Histon H3K9, H3K56, TNF- α , HIF1 α	Genom kararlılığı (baz çıkarma onarımı), DNA tamiri
IV	SIRT7	Deasetilaz	Histon H3K18, p53	rRNA transkripsiyonunun düzenlenmesi, hücre döngüsü düzenleme

2.5.1. SIRT1 ve Kolon Kanserinde Önemi

SIRT1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1), NAD⁺ tüketerek ve nikotinamid (NAM) ve 2'-O-asetil-ADP-riboz oluşturarak farklı proteinlerin deasetilasyonunu katalizler. NAM, nikotinamid fosforiboziltransferaz (NAMPT), Nikotinamid mononükleotid adeniltransferaz (NMNAT) enzimleri ve nikotinamid mononükleotid (NMN) ara molekülü ile bu çevrim devam etmektedir (48) (Şekil 9).



Şekil 9. SIRT1 tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyon (Kaynak 48'den uyarlanmıştır)

SIRT1'in özellikle p53, Foxo, Ku70, P300, Rb, E2F1, NFkB, p73, PGC-1 α ve PPAR γ gibi hücre yaşlanma, hücre döngüsü progresyonu ve apoptoz süreçlerinde yer alan proteinleri deasetile ettiği bildirilmiştir (47).

Kanser hücrelerinde hipermetile olan genlerin epigenetik susturulmasında SIRT1'in önemli bir rolünün olduğu bulgusu kanser biyolojisi açısından büyük bir öneme sahiptir. Birçok etkisi gösterilen SIRT1'in onkojenik olduğu üzerinde durulmaktadır. SIRT1'in onkogen olarak mekanizması multi-faktöriyeldir (49).

Kanser hücrelerinde genellikle yüksek ekspresyon seviyelerine sahiptir. SIRT1'in nukleusta lokalize olarak p53 gibi önemli transkripsiyon faktörlerini deasetile ederek p53'ün potansiyel tümör baskılayıcı özelliğini tehlikeye atabileceği öngörülmektedir. Çeşitli organizmalarda SIRT1'in tek kopya artışları ya da sirtuin aktivatörlerinin uygulanmasıyla hücre yaşlanma süresini arttırdığı gösterilmiştir. Bu durumun yararlı etkisi olabileceği gibi tümör ilerlemesi sürecinde neoplastik hücrelerin oluşumu açısından zararlı bir etkiye sahip olabilir (50-53).

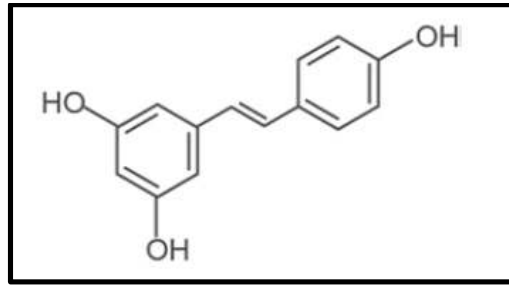
Kolon kanserlerinde prognozu belirleyen molekül olarak p53'ün yanı sıra SIRT1'in de önemli olduğu vurgulanmaktadır. Kabra ve ark.'nın (54) yapmış olduğu çalışmada, HCT116 hücrelerinde SIRT1 overekspresyonunun tümör oluşumunu inhibe ettiği ve SIRT1'in siRNA ile susturumunun ksenograft modelinde tümör oluşumunu arttırıcı etkisinin bulunduğu ancak aynı çalışmada SIRT1 inhibisyonu ile hücrelerin kemoterapi ilaçları tarafından apoptoza duyarlı hale gelebileceği belirtilmektedir. Kolon mukozası, normal mukoza ve benign adenomalarda immünohistokimyasal boyama ile yapılan çalışmalar, yüksek SIRT1 seviyelerinin bulunduğunu, SIRT1 overekspresyonunun evre I/II/III kolorektal adenokarsinomaların yaklaşık %25'inde ve ileri evre IV tümörlerinde de nadir olarak bulunduğunu göstermiştir. Yapılan bu çalışmada karsinomaların %30'unda da normalden düşük SIRT1 ekspresyonu olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda kolon kanserinin önlenmesi ve tedavisinde SIRT1 aktivatörlerinin ve inhibitörlerinin kullanımının önemi olduğu vurgulanmaktadır (54).

Kanser tedavisinde polifenollerin kullanımı ve kanser hücrelerindeki etkileri güncel ve henüz açıklanamamış noktaları bulunan bir araştırma alanıdır. Özellikle SIRT1 aktivatörü olarak etki gösteren polifenoller anti-kanser etkilerinin yanı sıra bu özellikleri ile de öne çıkmaktadırlar. Bununla birlikte sirtuinlerin aktivasyonu ve polifenollerin sirtuinler üzerindeki etkileri henüz net olarak açıklanabilmiş değildir. Resveratrol bir SIRT1 aktivatörü olarak bilinmektedir (55,56)

Howitz ve ark. çeşitli polifenollerin SIRT1 deasetilasyon aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir. Yapılan çalışmada, 15 bitkisel polifenolden resveratrol (13 kata kadar) başta olmak üzere *butein* (8.5 kat), *picaetanol* (7.9 kat), *isoliquiritigenin* (7.6 kat), *fisetin* (6.6 kat) and *quercetin* (4.6 kat) polifenollerinin HeLa kanser hücrelerinde SIRT1'in aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Resveratrolün doğrudan SIRT1'in doğal substratı olan p53'ten türevlendirilmiş fluorojenik asetile peptidin yer aldığı in-vitro deney ile SIRT1'in deasetilaz aktivitesini uyarabildiği gösterilmiştir. Resveratrol ile deasetilasyon aktivitesinin uyarımı, çeşitli SIRT1 aracılı fizyolojik süreçlerin düzenlenmesi ile sonuçlanmıştır (53). Resveratrolün doğrudan transkripsiyonel ya da translasyonel düzeyde SIRT1 ekspresyonunu uyarabildiği ve buna benzer olarak kanser hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücrelerde SIRT1 protein seviyelerini anlamlı olarak arttırabildiği pek çok çalışmada gösterilmiştir (57-59).

2.6. Doğal Polifenollerden Resveratrol

Günümüzde pek çok bitkisel polifenol anti-kanser ajan olarak farklı kanser türlerinde hem tedavi amaçlı hem de koruyucu etkileri çok sayıda hücre kültürü, hayvan modeli ve insan çalışmaları ile belirlenmiştir (60-62). Tahminlere göre 8000'den fazla diyetel polifenol bulunduğu öne sürölmektedir ve kimyasal yapılarına göre on farklı genel sınıfa ayrılmaktadırlar (63). Özellikle bu sınıflardan fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler ve lignanlar aynı zamanda dünya çapındaki toplumların günlük beslenmelerinin bir parçası olan polifenol bakımından zengindir. En çok çalışılan ve kanserden koruyucu özelliğı bulunan polifenollerin en bilinen örnekleri; EGCG (yeşil çay), curcumin (köri) ve resveratroldür.



Şekil 10. Resveratrolün kimyasal yapısı (trans-resveratrol) (64).

Resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroksistilben), fitoaleksine denilen savunma moleküllerinden oluşan, stilben sınıfına ait ve 70'ten fazla bitki türü tarafından sentezlenen doğal bir polifenoldür (Şekil 10). Daha çok üzüm kabuğı, fıstık, çilek, dut gibi çeşitli meyvelerde bulunur (65). Siemann ve ark.'nın (66) şaraplarda resveratrolü tanımlamalarıyla, resveratrolün sağlık üzerine etkisine ilişkin çalışmalar hız kazanmıştır. Özellikle kırmızı şarapta resveratrolün yüksek içeriğinin nedeni şarap fermentasyonu sırasında meyve kabukları ile temas süresinin uzun olmasıdır. Beyaz şarapta resveratrol içeriğinin kırmızı şaraptan düşük olmasının nedeninin, beyaz şarabın fermentasyon işleminin meyve kabuklarının ayrılmasından sonra yapılmasına bağlanmaktadır. Kırmızı üzüm kabuğunun yaş ağırlığında gram başına yaklaşık olarak 50-100 µg resveratrol içeriğı bulunurken, kırmızı şarapta 1,5-3 mg/L olarak bulunmaktadır (67, 68). Resveratrol, ısıya dayanıklı bir özellik taşıması nedeniyle, birçok yiyecek çeşidinde aktif formunu (trans-resveratrol) koruyabilmekte, ağız yoluyla alındıktan hemen sonra sindirilmekte ve hızla kana karışmaktadır (69,70). Yapılan son araştırmalar diyetel polifenollerin kemopreventif potansiyelinin kanser hücrelerinde epigenetik değışiklikleri düzenleme özellikleriyle ilişkili olabileceğini önermektedir. Bu

bağlamda epigenetik modifikasyonların erken ortaya çıkması ve potansiyel olarak tersinir özellik taşıması, klinik bakış açısıyla diyetel polifenollerin önemini ortaya koymaktadır. Ancak flavonoidlerin kanser hücrelerinde çeşitli epigenetik modifikasyonlara etkisi ve bu mekanizmaları nasıl düzenlediği, halen başlangıç aşamasında olan bir konudur. Bununla birlikte diyetel polifenollerin epigenetik etkileri birçok çalışmada rapor edilerek tedavi için umut vaat ettiği bildirilmiştir (71).

Çeşitli kanser hücrelerinde resveratrolün olumlu etkileri ilk olarak Jang ve ark. (65) tarafından 1997 yılından beri yapılan araştırmalar ile ortaya konmaktadır. Resveratrolün anti-kanserojen etki gösterdiği, çeşitli kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği, güçlü antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileri uyardığı ve apoptozu indükleyici etkilerinin olduğu bilinmektedir. Resveratrolün kansere karşı yararlı etkileri, karsinogenezin başlangıç, oluşum ve ilerleme olmak üzere lenfoid and miyeloid kanserlerle birlikte; meme, kolon, pankreas, mide, prostat, baş ve boyun, over, karaciğer, akciğer ve serviks kanserlerinde tüm evreler için gösterilmiştir (72-74).

Yapılan in-vitro çalışmalarda resveratrol uygulanmış hücrelerde en sık görülen ölüm tipinin apoptoz olduğu belirtilmektedir. Resveratrolün antiproliferatif etkisinin; birçok transkripsiyon faktörünün inhibisyonu, p53, kaspazlar ve Bax protein ekspresyonu artışı ile survivin, siklinler ve Bcl-2 protein ekspresyon azalışı ile olduğu belirtilmektedir (72). Basly ve ark. (75), MCF-7 hücrelerinde resveratrolün düşük dozlarının (1 µM) östrojen reseptörü üzerinde bir etkisinin bulunmadığını ve orta seviyedeki konsantrasyonlarının büyümeyi uyarıcı, 50 µM ve üzerindeki dozların sitotoksik ve apoptozu uyarıcı etkilerinin olduğunu göstermişlerdir. MCF-7 hücrelerinde yapılan diğer çalışmalarda resveratrolün kaspaz-3/9, p53 ve bax ekspresyonlarını uyardığı; Akt, STAT3, PI3K, Bcl-2, NF-κB ve aromataz ekspresyonlarını downregüle ettiği ve çoğunlukla S fazında hücre döngüsü duraksamasına neden olduğunu rapor etmişlerdir (76, 77). Resveratrolün LNCaP ve PC-3 hücrelerinde reaktif oksijen türlerini oluşturduğu, kaspaz bağımlı hücre ölümünü tetiklediği ve PI3K-Akt yolağını inhibe ettiği gösterilmiştir (78, 79). Akut miyeloid lösemi hücrelerinde resveratrolün IL-1β aracılı proliferasyonu ve NF-κB'nin downregülasyonunda yer alan temel mekanizmayı inhibe ettiği, proliferasyonu baskıladığı ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir (80). Resveratrolün multiple miyeloma hücrelerinde NF-κB ile düzenlenen antiapoptotik ve hücre sağkalım gen ürünlerinin ve STAT3'ün downregülasyonu ile kemorezistansı ortadan kaldırdığı, apoptozu uyardığı ve proliferasyonu inhibe ettiği belirlenmiştir (81).

Resveratrolün membranda bulunan ölüm reseptör düzeylerini arttırarak ekstresek apoptotik yolağı tetiklediğı ve bu şekilde hücre ölümüne yol açtığı rapor edilmiştir. Delmas ve ark.'nın (82) SW480 kolon kanser hücrelerinde yapmış olduğı çalışmada, resveratrol aracılı apoptozun, Fas-DISC-FADD-prokaspaz-8 kaskadının tetiklenmesi ile ilişkili olduğı saptanmıştır. Bunun yanı sıra, akut lösemi hücrelerinde yapılan çalışmada, resveratrolün Fas bağımsız olarak önce hücre döngüsünün S fazında duraksamaya sonra hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (83). Birçok çalışmada da resveratrolün pro-apoptotik etkilerinin mitokondri fonksiyon değişimleri ile ilişkili olabileceğini öne sürmektedir. Özellikle resveratrolün mitokondri membran depolarizasyonu (84), FoF1-ATPaz inhibisyonu (85) ve Bcl-2 bağımlı yolak modifikasyonlarını uyardığı rapor edilmiştir (86). Zheng ve ark. (85) resveratrolün yarışmalı olmayan bir mekanizma ile FoF1-ATPaz/ATP sentaz enzimatik aktivitesini inhibe ettiğini bulmuşlardır. Bunun yanı sıra resveratrol uygulaması ile pro-apoptotik Bax proteininin ekspresyonunun arttığı ve anti-apoptotik Bcl-2 proteininin ekspresyonunun azaldığını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (87,88).

2.6.1.Kolon Kanserinde Resveratrolün Etkileri

Birçok raporda resveratrolün kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı belirtilmiştir (89). Mohan ve ark. (90) HCT116^{bax(+/+)} ve HCT116^{bax(-/-)} kolon kanser hücrelerinde yaptıkları çalışmada resveratrol aracılı apoptozun kısmen Bax bağımsız olduğı fakat daha çok Bax/Bak inaktivasyonu ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Mikrosatellit kararsızlığı bulunan HCT116^{p53+/+} ve HCT116^{p53-/-} hücre hatlarında resveratrol ve 5-FU ile yapılan çalışmada, apoptozun p53'ten bağımsız olarak gerçekleştiğı belirlenmiştir. Düşük resveratrol konsantrasyonlarında p53'ün apoptoza karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir. Katlanma zamanı yaklaşık 30 saat olan hücrelere 10-100 µM konsantrasyonlarında resveratrol uygulaması ile gerçekleşen hücre ölümünün FasL ile ilişkisinin bulunmadığı belirtilerek mitokondri aracılı bir yolakla ilişkili olduğı saptanmıştır (91). Nutakul ve ark.'nın (92) 50 µM resveratrol ile gerçekleştirdiğı çalışmada resveratrolün kolon kanser hücrelerinde diferansiyasyonu arttırıcı etkisi belirlenmiştir. HCT116 hücrelerinin, bir stilben türevi olan pterostilben ile karşılaştırıldığında resveratrole daha duyarlı olduğı, kesilmiş PARP ve kaspaz-3 proteinleri ile apoptotik yolağın uyarılmasıyla gösterilmiştir.

TGFβ sinyal yolağı, hücre proliferasyonu, farklılaşma, migrasyon ve apoptozu içeren çok sayıda biyolojik süreçlerde yer alan ve insan kanserlerinde çoğunlukla değişim gösteren

hücresel sinyal yollarından biridir. TGF- β sinyalinin bazı alt akım hedefleri, büyüme tutuklamasına neden olan hücre döngüsü kontrol noktası genleri CDKN1A (P21), CDKN1B (p27) ve CDKN2B (p15) ve onların aktivasyonları önemlidir. Buna bağlı olarak, TGF- β normal intestinal epitelde hücre proliferasyonunu inhibe ederek apoptozu uyarak tümör baskılayıcı olarak görev yapar (93, 94). Kolon karsinoma hücre hatlarında yapılan çalışmada, HT29 ve HCT116 hücrelerinde 10 ve 30 μ M dozlarında resveratrolün TGF- β yolağının etkisinde bulunan genlerden biri olan TRAIL'in uyardığı apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (95). TGF- β 'nın siklin bağımlı kinaz inhibitörü p27 düzeylerine eşlik ederek hücre döngüsünün geç G1 evresinde hücre döngüsü duraksamasına aracılık ettiği bilinmektedir (96). resveratrolün HT-29 kolon kanseri hücre hattında TGF- β yolağında proliferasyonu inhibe etme potansiyeline sahip p27 protein ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir (97).

Wnt sinyal yolağı, hücre döngüsünün düzenlenmesinde, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve adezyonunda, tümör oluşumunda, sinaps oluşumu, adipogenez, anjiyogenez gibi önemli biyolojik olaylarda rol almaktadır. Wnt sinyal yolağının sürekli aktivasyonu ve β -katenin birikimi, solid tümörlerde sıklıkla görülmekte ve kontrolsüz hücre büyümesi ve farklılaşmaya neden olmaktadır (98-100). HT-29 kolon kanseri hücrelerinde, resveratrol uygulaması ile insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1)R protein düzeylerinin baskılandığını, Akt ve Wnt sinyal iletim yollarının inhibe edildiğini bildirmişlerdir (97). Wolter ve ark.'nın (101) yapmış olduğu çalışmada, S fazının aktivasyonunu ve G2 fazının bloklanmasını sağlayan, pozitif hücre döngüsü düzenleyici proteinlerinden (cdc2, CDK2, CDK4, CDK6, siklin A, siklin D1 ve siklin E) doz bağımlı olarak siklin E düzeylerinde ve siklin A düzeylerinde 100 μ mol/L konsantrasyona kadar bir artma gösterilmiştir. Resveratrol uygulaması ile siklin D1 seviyeleri ve ilişkili olduğu serin/treonin kinaz CDK4 seviyesini önemli ölçüde azalmıştır. 200 μ M Resveratrol ile 0-24-48 saatte gerçekleştirilen kaspaz-3 aktivitesi zamana bağlı olarak artış göstermiştir (101). Bir Resveratrol analogu olan Piceatannol'un S evresi boyunca ilerlemeyi bozarak büyümeyi baskıladığı gösterilmiştir. Bunu da pozitif hücre döngüsü regülatörleri olan siklin E ve A'nın upregülasyonu ile gerçekleştirdiği ve bu süreçte G0/G1 evre düzenleyici proteinleri olan Siklin D1, CDK4, p27^{kip1} ve G2/M düzenleyicisi siklin B1'in düşük seviyede eksprese edildiği rapor edilmiştir (102). HT-29 ve SW-620 kolorektal karsinoma hücrelerinde yapılan çalışmada 100 μ M resveratrol 48 saat uygulama gerçekleştirilmiş, 5-FU ve resveratrolün kombine uygulaması ile resveratrol hücre büyümesine karşı duyarlılığı arttırmıştır (103).

Farelerde resveratrol (300 ppm) alımı, DSS-aracılı kolit inflamasyonunun belirteçleri olan iNOS, COX2 ve TNF- α düzeylerini azaltmıştır (104). Bu çalışma resveratrolün tümör başlangıcı, büyümesi, hücre ölümü ve metastazda yer alan süreçleri düzenleyen Wnt'leri ve Siklin D1 ve Axin II gibi alt akım efektörlerini etkileyerek kolon kanserinin başlangıç ve metastazında yararlı bir etkiye sahip olabileceğini savunmaktadır (105). Bu çalışmaya paralel olarak kolorektal adenokarsinoma hastalarında resveratrol alımının tümör hücre proliferasyonunu azalttığı da gösterilmiştir (106). İn vitro olarak yapılan çalışmalarda düşük konsantrasyonda (10 μ M–20 μ M) resveratrolün kolon kaynaklı hücrelerin nukleuslarında β -katenin düzeylerini önemli derecede azaltarak Wnt sinyal yolağını inhibe edebildiğini gösterilmiştir (107). Nguyen ve ark. (108) kolorektal kanser hastalarına resveratrol içeren üzüm tozunu vererek yapmış olduğu çalışmada hastaların kolon kanser hücrelerinde Wnt yolağının baskılanmadığı ancak normal kolonik mukozadaki Wnt hedef gen ekspresyonlarının inhibe olduğu gösterilmiştir.

Liu ve ark. (109), PTEN/PI3K/Akt ve Wnt/ β -katenin sinyal yolaklarının düzenlenmesi ile insan kolon kanser hücrelerinde büyüme baskılayıcı etkiler gösterdiğini öne sürmektedirler. Yapılan çalışmada resveratrolün HCT116 hücrelerinde apoptozu uyarak proliferasyonu inhibe ettiği, kolon kanserinin ksenograft tümör büyümesini baskıladığı da gösterilmiştir. Resveratrol PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) ekspresyonlarını arttırmış ve Akt1/2 fosforilasyonunu azaltmıştır. HCT116 hücrelerinde resveratrolün etkisiyle PTEN'in eksojen ekspresyonunun PI3K/Akt sinyalini inhibe etmiş, büyüme baskılayıcı etkileri desteklenmiştir. PTEN'in *knockdown* yapılması ile PI3K/Akt sinyali artması sonucunda resveratrolün büyümeyi inhibe edici fonksiyonu azalmıştır. β -kateninin hem mRNA hem de protein ekspresyonu, Resveratrol ile doz bağımlı olarak azalmıştır.

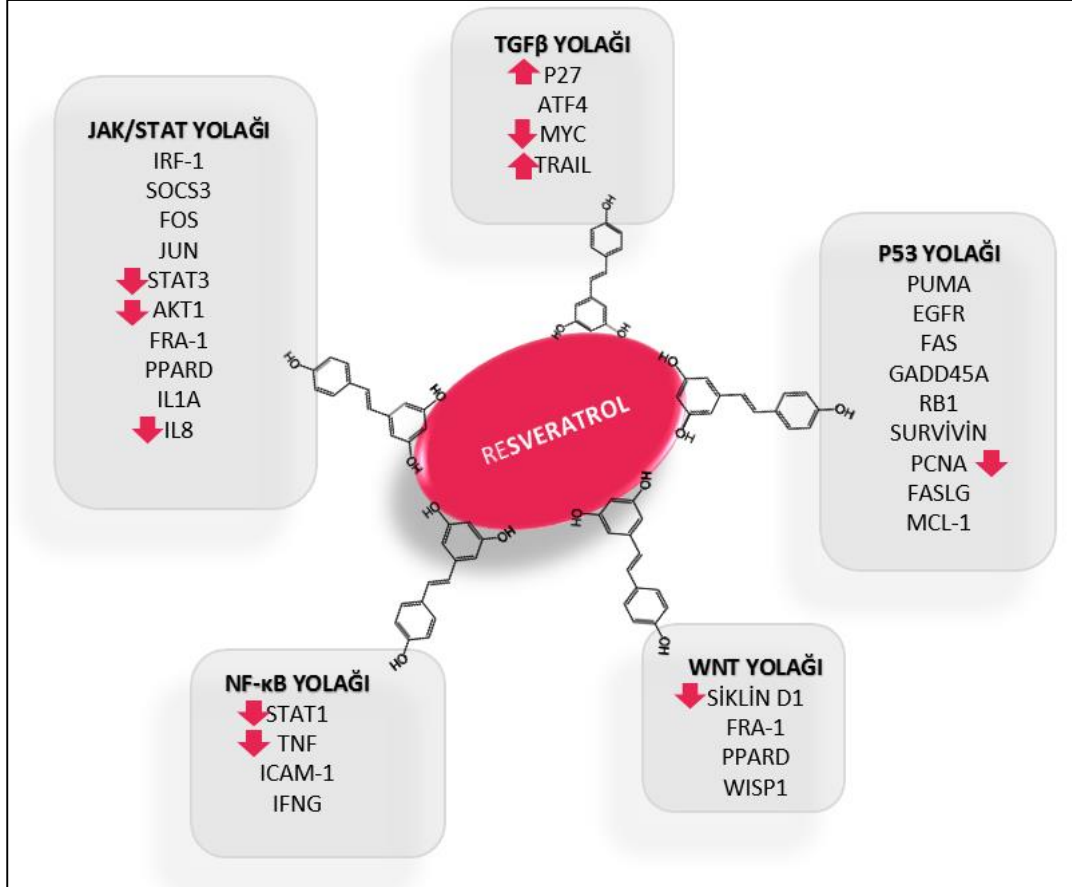
p53'ün hücre içerisinde birçok proteinle ilişkili merkezi bir kavşak niteliğinde olduğu bilinmektedir. p53, hücre döngüsünün G0/G1 evresinde rol alan birçok siklin bağımlı kinazın işlevini engelleyen p21 proteininin ifadesini, p21WAF2/Cip1 geninin transkripsiyonunu uyarak düzenlemekte ve böylece p21 proteini aracılığı ile hücre döngüsünü G1 evresinde durdurmaktadır. C-myc ve c-fos gibi mitoz bölünme için gerekli proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonlarını düzenleyen E2F transkripsiyon faktörü ile etkileşerek hücre döngüsünün G2 evresinde durdurulmasını da sağlamaktadır. p53 aynı zamanda DNA tamiri ve DNA sentez mekanizmasında rol alan PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), GADD45 (*growth arrest and DNA damage inducible 45*) proteinlerini ve programlı hücre ölümünde rol alan

PUMA (*p53 up-regulated modulator of apoptosis*), Noxa (*Latin for “damage”*), Bax (*Bcl-2-associated X protein*) ve Fas gibi birçok hedef proteinin transkripsiyonlarını da düzenlenmektedir (110, 111). Resveratrolün HCT116 ve Caco-2 kolon kanser hücrelerinde 100 µM konsantrasyonunda 24 ve 48 saat uygulanması ile kaspaz-3 ve -8'i aktive edebildiği ve Bax/Bcl-2 oranını arttırabildiği zaman bağımlı olarak gösterilmiştir (112). Resveratrolün HT-29 kolon kanser hücrelerinde 150 µM ve COLO 201 hücrelerinde 75 µM konsantrasyonlarının uygulanması sonrası otofaji ile tetiklenen reaktif oksijen türleri aracılığıyla kaspaz-3 ve kaspaz-8'in kesilmesini uyardığı belirlenmiştir (113). Resveratrolün IGF-1 ile uyarılmış insan kolon kanser hücre proliferasyonunu p53 sinyal yolağını aktive ederek baskıladığı gösterilmiştir (114). Böylece resveratrolün obez bireylerde anti-kolonkarsinogenik etkisinin desteklendiği belirtilmiştir. Aynı zamanda resveratrolün AMPK sinyal yolağını düzenleyerek kemorezistant kanser hücreleri üzerine sinerjistik olarak anti-kanser etki gösterdiği gösterilmiştir (115). Resveratrolün 50 ve 100 µM konsantrasyonlarının 24 saat uygulandığı HCT116 ve Caco-2 hücre hatlarında p53 yolağında yer alan PCNA ve p21'in protein ekspresyonlarını azalttığı rapor edilmiştir (64).

NF-κB transkripsiyon faktörü, immün ve stres yanıtları, inflamasyon, apoptoz ve hücre çoğalması regülasyonunu içeren çeşitli hücresel süreçlerde belirlenmiştir. Anormal ve sürekli NF-κB aktivitesi, kanserlerin birçoğunda belirlenmiş ve tümör oluşumunun çeşitli aşamalarında gösterilmiştir. Resveratrolün NF-κB yolağı ilişkili COX-2, 5-LOX, İNOS gibi çeşitli anahtar inflamasyon belirteçleri ve TNF-α, VEGF, IL-1, IL-6 ve IL-8 gibi inflamasyon mediatörlerini down regüle ettiği bildirilmiştir (74). IκB kompleksinin fosforilasyonunun inhibe edilmesi ve nitrik oksit seviyelerinin azalması ve böylece NFκB bağımlı mekanizmaların aktivasyonunun baskılanması yoluyla resveratrolün inflamatuvar yanıtları baskıladığı gösterilmiştir (116).

JAK (*Janus kinase*) ve STAT (*signal transducer and activator of transcription*) yolağının çeşitli sitokinlerin; proliferasyon, büyüme ve immün cevabı içeren çeşitli hücresel fonksiyonları etkileyen büyüme faktörlerinin sinyalizasyonunda önemli bir rol oynadığı ve çeşitli kanserlerde bu yolağın regülasyonunun bozulduğu gösterilmiştir (117). Resveratrolün, STAT3'ü inhibe ettiği ve onun antiproliferatif ve proapoptotik potansiyeline katkıda bulunduğu belirtilmiştir (118). Serra ve ark.'nın yaptığı çalışmada, HT-29 kolon epitelyal hücrelerinin 25 mM resveratrol ve/veya 500 mM 5-aminosalisik asit ile ön uygulaması sonrası hücreler bir sitokin kombinasyonu (IL-1α, TNF-α, IFN-γ) ile muamele edilerek elde edilen

verilerle resveratrolün 5-aminosalisilik asitten 20 kat daha düşük konsantrasyonda sitokin uygulaması ile indüklenen PGE2 ve NO üretimi, iNOS ve COX-2 ekspresyonu, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu anlamlı olarak azalttığı ve resveratrolün nükleusta aktif STAT1 düzeylerini azaltarak JAK-STAT yolagını downregüle ettiği gösterilmiştir (119).



Şekil 11. Resveratrolün kolon kanserinde sinyal ileti yolak genleri üzerine etkisi (Özet).

Bütün bu araştırmalar, resveratrolün hücre tipine göre değişim göstererek, her hücre tipinde farklı bir hücresel mekanizma aracılığı ile etki gösterdiğini ve bu etkilerin birbirleri ile de çapraz reaksiyon gösterme potansiyeli olabileceğini ifade etmektedir. Bu bilgiler ışığında araştırmamızın hipotezini açıklayabilecek bilginin henüz literatürde olmadığı, özellikle p53 mutant olan ve olmayan kolon kanser hücrelerinde bir SIRT1 aktivatörü olan resveratrolün apoptotik hücre ölümü ve TGF-β, WNT, P53, NF-κB ve JAK/STAT sinyal yolaklarında yer alan genlerin mRNA ekspresyonları üzerindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Araştırmanın Tipi:

Çalışma deneysel (*in vitro*) bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları, Araştırma Laboratuvarı (ARLAB) ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda Mayıs 2012-Kasım 2015 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Hücre kültürü çalışmasıdır. Bu nedenle evreni ve örneklemi bulunmamaktadır.

3.4 Çalışma Materyali:

Çalışmamızda HCT116^{p53+/+} ve HCT116^{p53-/-} insan kolon karsinoma hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücre hatları, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Kemal KORKMAZ tarafından Mayıs 2012 tarihinde tarafımıza hediye edilmiş ve laboratuvarımızda kullanılmaya başlanmıştır.

HCT116 hücre hattı, kolorektal karsinom türündeki kanser hastası olan 48 yaşında erkek bir hastanın kolon epitel dokusundan alınan primer tümörden çoğaltılarak elde edilmiş bir hücre hattıdır. Bu hücrelerin Ras mutasyonu taşıdığı bilinmektedir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri:

- Hücre canlılığı, apoptoz analizleri, Sirtuin-1 aktivitesi, mRNA ve protein ekspresyon değişimleri (bağımlı değişken)
- Resveratrol, Sirtinol dozları ile inkübasyon süreleri (bağımsız değişken)

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ve kitler

Resveratrol	Sigma	R5010
Sirtinol	Sigma	S7942
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 1	BD Pharmingen	556547
BCA Protein Assay Kit	ThermoScientific	23225
ECL+Plus Western BlottingSystem	Amersham	RPN 2132
2-Merkaptoetanol	Sigma	M7154
2-Propanol	Fluka	59304
%40'lık 29:1 Akrilamid-bisakrilamid solüsyonu	AppliChem	A0385
Amonyum persülfat	Sigma	A3678
Bromfenol mavisi sodyumtuzu	Sigma	B5525
Dimetilsülfoksit	AppliChem	A7248
Fetal Bovine Serum	Biochrom	S-0115
Gliserol	AppliChem	A2926
L-Glutamine (200mM)	Biochrom	K 0282
McCoy's 5A modified medium	Biochrom	F1015
Metanol	Riedel-de Haen	34860
Nonfat dry milk blotto	SantaCruz	sc-2325
PBS-Dulbecco 1x	Biochrom	L1825
Penisilin/Streptomisin	Biochrom	A 2213
Complete, Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche	11836153001
TEMED	Sigma	T-7024
Triton X-100	Sigma	T-8787
Trizma Baz	Sigma	T-6066
Tripan mavisi	Biochrom	L-6323

Trypsin/EDTA	Biochrom	L 2143
Tween 20	Sigma	P5927
NEPER nuclear and cytoplasmic extraction kit (250 pellet için)	Pierce	78835
Fluor-de-Lys® SIRT1 fluorometric drug discovery assay kit	Enzo Life Sciences	BML-AK555-0001
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2004
Goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2005
Rabbit anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2768
Anti-β-aktin (rabbit) antikor	SigmaAldrich	A2066
Anti-G6PDH (100 µL) antikor	SigmaAldrich	HPA000834
Anti-p53 (DO-1) antikor	Santa Cruz	sc-126
Anti-SIRT1 antikor	Abcam	ab110304
Filtre Kağıdı (15x20cm)	BioRad	1703956
Sequi-Bio PVDF Membrane 0.2µm	BioRad	162-0184
Nitrosellulose transfer membrane	Protran	10 401396
CL-X Posure Film	Thermo	34093
Tris Molecular biology grade1 kg	Sigma	93362
SDS Molecular biology grade500 g	Sigma	L3771
Film banyo solüsyonları	Kodak	-----
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo	26634
Glycine Molecular biology grade 1kg	Sigma	G8898
EDTA	Sigma	ED2SS
Sodyum Klorür	Sigma	S3014
Hard-Shell PCR plate	Biorad	HSL9601
iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-PCR	Biorad	10020178
iScript™ RT-qPCR Sample Preparation Reagent	Biorad	170-8898
Forward-reverse primerler	Biorad	HSTL-1

Tablo 3. Kullanılan Cihazların Marka ve Kod Numaraları

Cihaz Adı	Marka	Model/Kod Numarası
Laminar Akımlı Kabinet	ESCO	LP2-4S1
CO ₂ İnkübatörü	Thermo Scientific	311
Hücre Sayım Cihazı	İnnovatis	CEDEX XS
Salınımlı Santrifüj	Eppendorf	5810R
Ters-Faz Işık Mikroskobu	Olympus	CKX40
Plak Okuyucu	BioTek	ELX800
Plak Okuyucu (fluorometre)	BioTek	FLX800
Gerçek Zamanlı PZR cihazı	Biorad	CFX Coonect™ Real Time System /1855201
Vertikal Elektroforez Sistemi	Biorad	1658001EDU
Güç Kaynağı	Biorad	Power Pac™ Universal
Yarı Kuru Transfer Sistemi	Biorad	Trans-Blot® Turbo
Islak Transfer Sistemi	Biorad	1703811
Termal Isıtıcı Blok	Stuart	SBH130D
Hassas terazi	Precisa	XB 220A
Çalkalayıcı	Stuart	SSL3
pH metre	J.P Selecta	4120500
Etüv	Thermo Scientific	Heraeus
Otoklav	Hirayama	HICLAVE HV-50
Spinner	Labnet	C1301B-230V
Vorteks	Aldrich	IKA® MS1 shaker Z404047
Derin Dondurucu -20 °C	Vestel	FT 145
Derin Dondurucu -80 °C	Thermo Scientific	Forma Model 705
Buzdolabı	Vestel	RT 455

3.6.2.Yöntemler

3.6.2.1. Deney Modelinin Planlanması:

Resveratrolün HCT116^{p53(+/-)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde SIRT1 bağımlı/bağımsız etkilerinin incelenmesi için aşağıdaki şekilde yapılan uygulamalar ile deney grupları oluşturuldu:

Kontrol (K): % 0.01 DMSO, %1 FBS, % 1 Penisilin/Streptomisin, %1 L-glutamin içeren McCoy's 5A ortamı.

Sirtinol (S): SIRT1 aktivitesini inhibe eden dozda sirtinollü ortam ile uygulama (%1 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin, %1 L-glutamin içeren McCoy's 5A ortamı)

Resveratrol (R) : IC₅₀ dozunda resveratrol içeren ortam ile uygulama (% 1 FBS % 1 Penisilin/Streptomisin, %1 L-glutamin içeren McCoy's 5A ortamı)

Sirtinol + Resveratrol (S+R): SIRT1 aktivitesini inhibe eden dozdaki sirtinol ile 24 saat ön uygulamanın ardından IC₅₀ dozunda resveratrol ile 24 saat inkübasyon.

3.6.2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

Azot tankında dondurulmuş halde bulunan HCT116^{p53(+/-)} ve HCT116^{p53(-/-)} kolon kanser hücre hatları kullanıldı. ATCC'de yer alan CCL-247TM kodlu hücre hatlarının katalogta önerilen büyüme ortamları kullanılarak kültüre edildi. Tüm çalışmalar aseptik koşullar altında, Sınıf II Laminar Flow kabin içerisinde gerçekleştirildi. Azot tankında dondurulmuş halde bulunan HCT116 kolon karsinoma hücre hatları, uygun ortamda çözülerek deneylerde kullanılmak üzere çoğaltıldı (120).

Yöntem: Sıvı azot tankında saklanan HCT116 insan kolon karsinoma hücreleri McCoy's5A ortamında %10 fetal bovine serum (FBS), %1 L-glutamin, %1 Penisilin/Streptomisin ilave edilmesi ile hazırlanan ortam ile 25 cm²'lik hücre kültür kaplarında kültüre edildi. Kültür kapları 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Hücre sayımı için 1X Tripsin-EDTA çözeltisi flasklara eklenerek tüm hücreler süspansiyon haline gelinceye dek 37°C'de inkübe edildi. Kültür kabının içeriği toplandı ve 1300 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldıktan sonra pelletteki hücreler 1 ml ortam ile süspanse edilerek hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı %0,4'lük Tripan mavisi/PBS çözeltisi kullanılarak *Neubauer-Improved* lamında mikroskopik olarak yapıldı. Tüm deneyler için gereken hücre miktarı 6 ve 96 kuyulu, 25 cm², 75 cm² lik kültür kaplarına istenen sayılarda ekildi.

3.6.2.2.1. Hücrelerin Çözülmesi

Sıvı azot tankında veya -80°C'deki dondurucuda saklanan ve kriyo tüplerde bulunan hücreler çıkarılarak 37°C'deki su banyosunda hızla çözüldükten sonra elde edilen hücre süspansiyonu 5 ml büyüme ortamı içeren bir tüpe aktarıldı. Hücreler 1300 rpm'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti PBS ile yıkanarak tekrar santrifüj edildi. PBS uzaklaştırıldıktan sonra uygun büyüme ortamında süspanse edildi. Hücre sayımı yapıldıktan ve hücre canlılığı kontrol edildikten sonra hücre süspansiyonu 25 cm²'lik flaska ekildi. *Inverted* mikroskopta incelenen hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı.

3.6.2.2.2 Hücrelerin Pasajlanması

Flaskların içinde bulunan ortam atılarak flaska tutunan hücrelerin yüzeyi, hem FBS'yi hem de ölü hücreleri uzaklaştırmak amacıyla 1X PBS ile yıkandı. Flaska yeterli miktarda Tripsin/EDTA konuldu ve hücreler kalkıncaya kadar (1-3 dakika), 37°C'deki inkübatörde inkübe edildi. Mikroskopla incelenen hücrelerin flask yüzeyinden ayrılmasının ardından Tripsin/EDTA'yı inhibe etmek amacıyla, 1:1 oranında uygun büyüme ortamı eklendi ve hücreler steril bir falkon tüpe aktarıldı. Flaskın yüzeyi 1X PBS ile yıkanarak kaldırılan hücreler aynı falkonda toplandı. Hücreler 1300 rpm'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti uygun büyüme ortamında süspanse edildi. Hücre sayımı yapıldıktan ve hücre canlılığı kontrol edildikten sonra hücre süspansiyonu uygun kültür kabına ekildi. *Inverted* mikroskopta incelenen hücreler uygun ortamdaki inkübatöre kaldırıldı.

3.6.2.2.3 Hücre Sayımı ve Canlılık Kontrolü

Hücreler tripsinle kaldırıldıktan sonra PBS yardımıyla yıkama ve kültür ortamı ilavesi ile hücre süspansiyonu elde edildi. Elde edilen hücre süspansiyonundan 50 µL alındı ve 1:1 oranında % 0,4 tripan mavisini (50 µL) ile bir endorf içinde karıştırıldı. Uygun miktarda steril 1X PBS ile seyreltmeler yapıldı. Hazırlanan hücre/boya karışımından 10 µL Neubauer lamına alınarak, lamının 16 küçük kareye bölünmüş olan ve sayım alanının köşelerinde bulunan 4 büyük karedeki canlı (tripan negatif - renksiz) ve ölü (tripan pozitif - mavi renk) hücrelerin tümü *inverted* mikroskopta sayılarak, hücre sayımlarının ortalaması alındı. Hücre

süspansiyonunun mililitresindeki canlı ya da ölü hücre sayısını (hücre sayısı/mL) ve % hücre canlılığını belirlemek için aşağıdaki hesaplardan yararlanıldı:

Hücre sayısı (hücre sayısı/mL): Ortalama hücre sayısı x seyreltme faktörü x 10^4

% Hücre canlılığı: (canlı hücre sayısı) / (ölü+canlı hücre sayısı) x 100

3.6.2.2.4. Hücrelerin Dondurulması

Hücre sayımı işlemi sonrası hücreler 1 mL hacimde $1,5 \times 10^6$ hücre /mL olacak şekilde ve 1 mL taze dondurma ortamı (%80 FBS+%20 DMSO) ile toplam 2 mL hacimde kriyovial tüplerine konuldu. Dondurulacak hücrelerin bulunduğu tüpler, kriyo kutuya konularak -80°C 'de 1 gün bekletildikten sonra sıvı azot içerisinde ihtiyaç duyulan saklama zamanına göre saklandı.

3.6.2.3. Hücrelerin Katlanma Zamanlarının Belirlenmesi

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücre hatlarının laboratuvar şartlarımızda ikiye katlanma zamanlarının belirlenmesi amacıyla 6 kuyucuklu plakların her bir kuyusuna 3×10^5 hücre ekilerek 24-48-72 sa. 37°C 'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Ekim yapıldıktan sonra 24-48-72. saatlerde HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinin Tripan Mavisi ile mikroskopta ve 'CEDEX XS Analyzer' cihazında sayılarak katlanma zamanları belirlendi.

Hücrelerin katlanma zamanları www.doubling-time.com/compute.php internet sitesindeki hesaplama programından yararlanılarak belirlendi.

3.6.2.4. Resveratrol ve Sirtinol Çözeltilerinin Hazırlanması

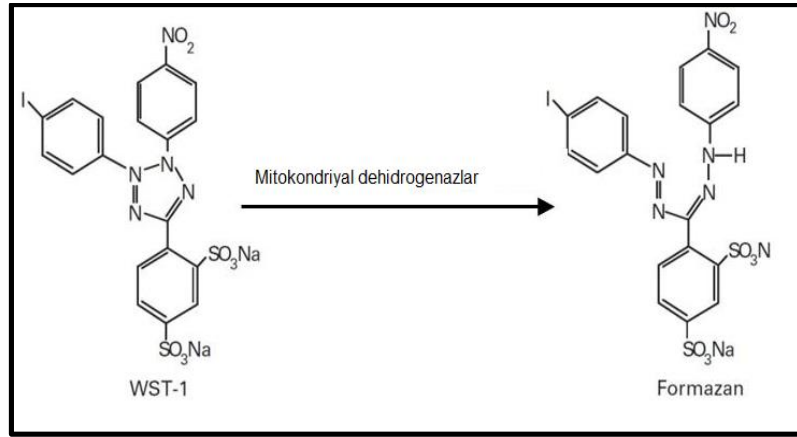
Resveratrol DMSO içerisinde 100 mM stok çözelti olarak hazırlandı. %1 FBS içeren kültür ortamında 1mM ara stok çözeltisi olarak hazırlandıktan sonra istenilen konsantrasyonlardaki seyreltmeler aynı şekilde kültür ortamıyla gerçekleştirildi.

Bir SIRT1 inhibitörü olan Sirtinol 0-100 μM konsantrasyon aralığında çalışmada kullanılmıştır (121). Sirtinol, DMSO içerisinde 100 mM ana stok çözeltisi hazırlandıktan sonra %1 FBS içeren kültür ortamı ile 20 mM ara stok çözeltisine seyreltilti. Çözeltideki DMSO yüzdesi (≤ 0.01) dikkate alınarak istenilen konsantrasyonlardaki seyreltmeler kültür ortamı ile gerçekleştirildi.

3.6.2.5. Hücre Canlılık Analizi

WST-1 testi

Yöntem prensibi: Hücresel enzimler tetrazolyum tuzlarını formazana dönüştürürler. WST-1 (4-(3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyum-1,3-benzen disülfonat), suda çözünür formazan boyalarını içermektedir. Oluşan formazanlar farklı absorpsiyon yapma yeteneğindedir. Canlı hücre sayısındaki bir artış örnekteki mitokondriyal dehidrogenazların aktivitesindeki artışla sonuçlanır. Bu da formazan oluşumunu arttırır (Şekil 12). Artış metabolik olarak aktif hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Oluşan renkli çözelti spektrofotometrik olarak 450 nm – referans 630 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda ölçülür (122,123). WST-1, daha etkili sinyal vermesi ve hücrelerde daha az toksik etki yaratması ve ortam içerisinde doğrudan ölçülebilme özellikleri nedeniyle diğer canlılık testlerine göre avantajlıdır.



Şekil 12. WST-1 reaktifinin formazan yapısına dönüşümü (124)

Yöntem:

Resveratrol ve sirtinolün hücrelerin canlılığına etkilerini zamana göre izlemek amacıyla 24, 48, 72 saatlerde WST-1 canlılık analizi gerçekleştirildi. Hücreler 5000, 6000, 8000 hücre/100 µL olacak şekilde 96 kuyulu plaklara ekildi. Hücrelerin yapışması için 24 saat beklendi. Kuyuların üzerindeki eski ortam uzaklaştırılarak deney planına uygun besi ortamında hazırlanmış ilaç çözeltileri (100 µL) eklendi. Hücreler istenilen sürelerde 37°C'deki % 5 CO₂ bulunan inkübatörde inkübasyona bırakıldı. WST-1 reaktifinden her bir kuyucuğa 10 µl (1/10 dilüsyon) eklendi. Hücreler 37 °C'de 0,5-3 saat inkübasyona bırakıldı. 1 dakika karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra ELISA plak okuyucu ile 450 nm – referans 630 nm'de ölçüm alındı (125).

Uygulama: Hücreler 96 kuyulu plaklara 5000, 6000, 8000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Hücre adezyonu ve hücre sayısı duplikasyonu için 24 saat beklendikten sonra ortam içerikleri istenen konsantrasyonlarda Resveratrol ve Sirtinol içeren ortamlar ile değiştirildi. İnkübatörde istenen sürelerde (24, 48, 72 sa.) inkübasyon gerçekleştirildikten sonra üreticinin talimatlarına göre WST-1 canlılık analizi gerçekleştirildi. Elde edilen verilere göre %50 hücre canlılığını inhibe edebilen Resveratrol ve Sirtinol dozları belirlendi.

IC₅₀ değerleri, konsantrasyon değerlerinin logaritmasına karşılık % canlılık inhibisyon değerleri ile oluşturulan lineer grafikten elde edilen $y = a \cdot x + b$ denkleminde, x değeri hesaplandı. % 50 canlılık inhibisyonunu ifade eden 0.5 değeri y yerine yazıldı. $\log x = IC_{50} = (0.5 - b) / a$ denklemine göre elde edilen değer anti-logaritması, IC₅₀ değeri olarak hesaplandı.

3.6.2.6. Hücrelerden Nükleer ve Sitoplazmik Fraksiyon Eldesi

SIRT1 protein ekspresyonu ve enzim aktivitesinin saptanması için SIRT1'in yoğun olarak bulunduğu hücrelerden nükleer fraksiyon izole edildi.

NE-PER© kit, nükleer ve sitoplazmik ekstraksiyon reaktifleri kültüre edilmiş hücreler ya da dokulardan sitoplazmik ve nükleer ekstraktların aşamalı olarak ayrılmasını sağlar. Çalışmadaki tüm işlemler kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi:

Deney gruplarına göre gerçekleştirilen uygulamalar sonrasında hücreler, tripsin-EDTA ile toplandı ve daha sonra 5 dakika 500 g'de santrifüj edildi. Hücre pelleti PBS ile süspanse edilerek yıkandı. Yaklaşık $1-10 \times 10^6$ hücre, 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi, 500 g'de 2-3 dakika için santrifüj edilerek pellet oluşturuldu. Süpernatant dikkatlice kaldırılarak atıldı ve pelletin olabildiğince kuru bırakılmasına dikkat edildi. Hücre pelletine buz soğukluğunda CER I reaktifi eklendi. Hücre pelleti miktarına uygun reaktif hacimleri kullanılarak sitoplazmik ve nükleer protein ekstraksiyonuna geçildi. Kullanılan hacimler sırasıyla, 200:11:100 uL CER I: CER II: CER reaktiflerin hacim oranlarına göre devam ettirildi. Hücre pelletini tam olarak süspanse etmek için 15 saniye süre ile en hızlı ayarda kuvvetlice vortekslendi. Tüp 10 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi. Tüpe buz soğukluğunda CER II ilave edildi. Tüp en yüksek ayarda 5 saniye vortekslendi. 1 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Yüksek ayarda 5 saniye vortekslendi. Mikrosantrifüjün en yüksek hızında +4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi (~16,000g) Süpernatant hemen önceden soğutulmuş temiz bir tüpe aktarıldı. Kullanılana kadar tüpler buz üzerine yerleştirildi veya

depolandı (Depolama -80 °C). Nukleusu içeren süpernatantı alındıktan sonra kalan çözünmeyen (pelet) fraksiyonu buz soğukluğunda NER’de süspanse edildi. 15 saniye boyunca en yüksek ayarda vorteks yapıldı. Örnek buz üzerine yerleştirildi ve toplamda 40 dakika içerisinde, 15 saniye boyunca her 10 dakikada bir vorteks işlemine devam edildi. Tüp 10 dakika boyunca mikrosantrifüjde +4 °C’de maksimum hızda (~ 16,000g) santrifüj edildi. Süpernatant hemen önceden soğutulmuş temiz bir tüpe aktarıldı. Tüp buz üzerine yerleştirildi. Sitoplazmik ve nükleer fraksiyonlar kullanılıncaya kadar -80 °C’de depolandı (126).

3.6.2.7. BCA Protein Tayini

Yöntem prensibi: Nükleer ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılan hücrelerin total protein konsantrasyonlarının belirlenmesi için BCA (Bikinkoninik asit) protein tayin kiti (*Thermo-Pierce BCA kit*) kullanıldı. Yöntemin temeli, alkali koşullarda proteinlerde bulunan tirozin aminoasit kalıntıları tarafından Cu^{+2} iyonunun Cu^{+1} iyonuna indirgenmesi sırasında BCA reaktifinin renk değiştirmesine dayanmaktadır. Oluşan renk şiddeti 562 nm dalga boyunda ölçülür (127, 128).

Uygulama: Yapılan enzim aktivitesi ve western blot analizlerinde protein değerlerinin eşitlenebilmesi için tüm örneklerde protein miktarı BCA yöntemi ile belirlendi.

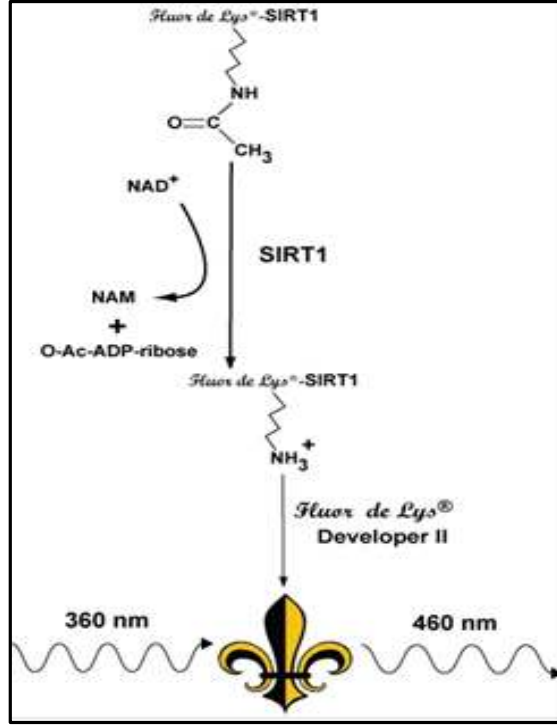
Örnekler ve 0,025-2,0 mg/ml arası değişen konsantrasyonda BSA standartları aynı plağa 25 µl olacak şekilde pipetlendi ve her bir örnek 200 µl BCA reaktifi ile karıştırılarak plak 37°C’de 30 dk. bekletildi. Süre sonunda plak okuyucuda kolorimetrik olarak 562 nm’de okuma gerçekleştirildi. Elde edilen absorbans verilerine karşılık gelen BSA standart konsantrasyonları ile standart grafiği çizildi. Standart grafiğinden elde edilen $y=ax+b$ denklemi kullanılarak örneklerin total protein konsantrasyonları hesaplandı.

3.6.2.8. SIRT1 Aktivite Analizi

Yöntem prensibi: SIRT1 enzim aktivitesi fluorometrik olarak ölçülmektedir. Fluorometride, madde konsantrasyonu, floresans ışımanın ölçümü ile tayin edilmektedir.

Bu yöntemle, insan rekombinant ve örnek içerisinde bulunan SIRT1 enzimi tarafından, substratın NAD bağımlı deasetilasyonu sonrasında bir fluorofofor oluşumu sağlanarak *Developer II* reaktifine duyarlı hale getirilmektedir. Oluşan fluorofofor, 360 nm’de yayılan ışık ve 460 nm’de emilen ışık bir fluorometre cihazı ile ölçülmektedir. Reaksiyon sırasında NAD,

Nikotinamid (NAM) ve O-asetil-ADP-riboz oluşturabilmek için tüketilmektedir (*Fluor-de-Lys® SIRT1 fluorometric drug discovery assay kit* ©) (Şekil 13) (129).



Şekil 13. Floresans temelli SIRT1 enzim aktivite reaksiyonunun şematik gösterimi (129).

Yöntem:

Resveratrol, sirtinol, sirtinol ve resveratrolün birlikte uygulanması sonrası değişen SIRT1 enzim aktivite değerleri fluorometrik analiz ile belirlendi. SIRT1 Fluorometrik Aktivite kiti © protokolüne göre uygun enzim-substrat konsantrasyonları seçilerek floresans temelli SIRT1 enzim aktivite reaksiyonunun gerçekleştirilmesi sağlandı (129).

Standart grafiğinin oluşturulması: 0,0-0,30 U/μL aralığında rekombinant SIRT1 enzimi analiz tamponu yardımıyla seyreltilerek beş farklı konsantrasyonda SIRT1 aktivitesi için standart grafiği oluşturuldu.

Uygulama: Enzimatik reaksiyon için 125 μM SIRT1 deasetilaz substratı ve 2500 μM SIRT1 NAD substratı ara stok olarak analiz tamponuyla hazırlandı. Her bir kuyucuğa SIRT1 deasetilaz substrat ara stok çözeltisinden 10'ar μL ve SIRT1 substratı NAD ara stok çözeltisinden 10'ar μL konuldu. Hücrelerden izole edilen nükleer fraksiyonlar her bir

kuyucuğa 10'ar µL ilave edildi. Örnekler, protein konsantrasyonuna göre hesaplanarak uygun seyreltmelerle standart grafikteki değer aralığına girecek şekilde kullanıldı. Her kuyucuğa 25 µL analiz tamponu konuldu. Kontrol olarak örnek hacmi yerine analiz tamponu kullanıldı. Sirtinol inhibisyon kontrolü olarak Sodyum Suramin (pozitif kontrol) ile 37 °C'de 10 dakika inkübasyon yapıldı. Bu sırada, *Developer II/2* mM Nikotinamid, plağa konulmadan 30 dk önce hazırlanma koşuluna dikkat edildi. 45 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Eksitasyon 360 nm, Emisyon 460 nm'de fluorometrik olarak ölçüm alındı (130).

3.6.2.9. Akış Sitometrik Apoptoz Analizi

Yöntem Prensibi: Resveratrol, sirtinol, sirtinol ve resveratrolün birlikte uygulanmasının yol açtığı apoptotik hücre ölümünü saptamak amacıyla *Annexin-V/PI* analizi yapıldı. Yöntem apoptoz sırasında *Annexin-V* ve membran bütünlüğü bozulmuş hücre içine giren *Propidium iodide (PI)* floresan boyalarının moleküllere bağlanması ile apoptotik/nekrotik hücrelerin belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Normalde hücre membranının iç yüzeyinde bulunan bir membran fosfolipidi olan fosfatidilserinin apoptotik hücre ölümü sırasında aminofosfolipid transferaz enzimiyle hücre membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine dönen moleküllerinin Ca^{+2} iyonu varlığında floresan boya *Annexin-V* ile bağlanması sonucu apoptotik hücre ölüm yüzdesi belirlenmektedir. Sağlıklı hücrelerde hücre içine giremeyen ve DNA'ya bağlanamayan *PI* boyası ise hücre membran bütünlüğünün bozulması ile hücre içine geçerek DNA'ya bağlanarak nekrotik hücre ölüm yüzdesini belirtmektedir (131, 132).

Uygulama: 6-kuyulu kültür kaplarının kuyucuklarına 5×10^5 hücre/kuyucuk ekim yapıldı. % 1 FBS içeren ortamda inkübasyonları gerçekleştirildi (Starvasyon aşaması). 24 saat beklendikten sonra kuyucukların ortamları belirlenen konsantrasyonlarda kontrol (% 0,01 DMSO), resveratrol, sirtinol ile uygulama örneklerinde 24 saat süre ile 6-kuyulu kültür kaplarının içerdiği besi ortamları ayrı tüplere aktarıldı. Hücreler tripsinize edilerek kaldırıldı ve kendi tüplerine aktarıldı. Kuyucuklar son olarak PBS yıkanarak tüplere aktarıldı. Hücre süspansiyonu 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve her bir pellet *FITC Annexin-V Apoptosis Detection Kit 1*® içeriğinde olan 1 ml 1X Bağlanma Tamponu ile süspanse edildi. Her bir tüpten 100'er µl ayrı bir tüpe aktarıldı ve üzerine *PI Boyama Solüsyonu* ve *FITC-Annexin V Boyama Solüsyonundan* 5'er µl eklendi ve tüpler karanlıkta 15

dakika inkübe edildi. Her bir tüpe 400'er µl 1X Bağlanma Tamponu ilave edildi ve akış sitometre cihazında 1 saat içerisinde ölçüm gerçekleştirildi.

3.6.2.10. Western Blot Analizi

SIRT1 ve p53 protein ekspresyonlarının saptanması için western blot analizi gerçekleştirildi.

Yöntem Prensipleri: Blotlama tekniği; proteinlerin bir jel matrisinde ayrılması, katı faza aktarılması ve spesifik bir prob kullanılarak belirlenmesini sağlayan bir süreçtir. Blotlama tekniği temel olarak 1. Elektroforez, 2. Proteinlerin membrana transferi, 3. Bloklama, 4. Antikor uygulama, 5. Belirleme ve 6. Sonuçların analizi olmak üzere 6 basamaktan oluşmaktadır. Western Blotlama, bir proteinin varlığının ve ekspresyon düzeyinin semikantitatif olarak belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir.

3.6.2.10.1. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Bir protein karışımında proteinleri sadece büyüklüklerine göre ayırmak üzere kullanılan SDS-PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) elektroforezidir. Bu tekniğin temeli yüklü moleküllerin elektrik alanında yüklerinin zıt yönüne doğru göç etmesine dayanır. SDS varlığında negatif yükle yüklenen proteinlerin aynı zamanda denatüre olarak primer yapıda kalmaları sağlanmaktadır. Poliakrilamid jel de, farklı büyüklükteki proteinlerin elektriksel alanda farklı hızlarda göç ederek birbirlerinden ayrılmasını sağlamaktadır (133, 134).

Uygulama:

▪ Camların Temizlenmesi:

Daha önce deterjanla yıkanmış olan camlar (1mm'lik) sırayla, sıcak su, distile su ile yıkanarak etil alkol ile toz bırakmayan bir bez yardımıyla dikkatlice silindi.

▪ Ayırıcı ve Paketleyici Jellerinin Hazırlanması:

1. Ayırıcı jel 15 mL'lik falkon tüpü içine TEMED ve APS en son olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı. APS polimerizasyon katalizörü olduğu için jel dökülmeden hemen önce ilave edildi.

2. İlk önce, ayırıcı jel (%40 29:1 Akrilamid-bisakrilamid, 1.5M Tris/Hcl pH 8.8, %10 SDS, %10 APS, TEMED ve distile su) hazırlandı. Proteinin molekül ağırlığına uygun olarak istenilen yüzdede jel (%12) seçildi.
3. APS ilave edilir edilmez iki cam arasına dolduruldu. Jelin oksijen ile temasını kesmek için jelin üzerine 1'er ml n-propanol döküldü.
4. Jelin polimerize olması için 20-30 dakika beklendi.
5. Jel üzerindeki isopropanol filtre kağıdı ile emdirilerek veya jel kaseti hafifçe eğilerek atıldı.
6. Paketleyici jel de %5'lik hazırlanarak (%40 akrilamid, 0.5M Tris/Hcl pH 6.8, %10 SDS, %10 APS, TEMED, distile su) ayırıcı jelin üzerine döküldü ve hızlıca tarak yerleştirildi.
7. Polimerizasyonun olması için 20-30 dakika beklendi

▪ **Protein Örneklerinin Western Blotlama için Hazırlanması:**

Kuyucuk başına yaklaşık 15 µL hacimde örnek yükleneceği için: 15-30 µg proteine eşdeğer örnek hacmi, liziz tamponuyla (1x proteaz inhibitör kokteyli içeren) 12 µL'ye tamamlandı. Laemmli örnek tamponu (60 mM Tris-Cl pH:6.8, %2 SDS, %10 gliserol, %5 β-merkaptoetanol, % 0,01 bromfenol mavisi (5x)) 1x olacak şekilde her örnek için 3µL olarak hesaplandı.

Örnekler hazırlanarak, 95 °C'de 5 dk süre ile denatüre edildi ve hemen buz içine alındı.

▪ **Proteinlerin Jelde Yürütülmesi:**

1. Jel kasetleri elektroforez tankına yerleştirildi.
2. İki kaset arası 1X yürütme tamponu (25 mM Tris-baz, % 0.1 SDS, 192 mM Glisin) ile dolduruldu.
3. Hazırlanan örnekler yükleme için kullanıldı.
5. İlk kuyucuğa 3 µL Moleküler Marker (10-250 kDa) yüklendi.
6. Jel kuyucuklarına örnek tamponu ve liziz tamponuyla seyreltilmiş 15-30 µg protein içeren örnekler yüklendi.
7. Tank hizasına kadar 1X yürütme tamponu ile dolduruldu.
8. Güç kaynağı 80/100V'a ayarlanarak 2,5-3 saat yürütüldü.

▪ **Jelde Bulunan Proteinlerin Membrana Transferi:**

Yöntem, jel yüzeyine dik bir elektrik akımı uygulanarak eksi yüklü proteinlerin jelden çıkarak hemen üzerinde bulunan pozitif yüklü membrana adsorbe olmalarını sağlayan elektroforetik transfer ilkesine dayanmaktadır.

▪ **Yarı-kuru transfer:**

1. Çalışma öncesi Nitrosellüloz transfer membranı (her jel için 1 adet) ve Whatman filtre kağıtları (her jel için 2 adet) 8,3 x 5,8 cm boyutunda kesilip hazırlandı.
2. PVDF membranın, transfer öncesi 1 dakika metanolde ıslatılarak aktive edilmesi sağlandı. Distile suda çalkalandıktan sonra transfer tamponunda nötralize edildi. Whatmann kağıtları 1 X transfer tamponunda (25 mM Tris-baz, 192 mM Glisin, % 20 metanol) ıslatıldı.
3. Jeller kasetlerden çıkarıldı. Jelin yırtılmaması için iki cam arasına bir miktar yürütme tamponu dökülerek işlem kolaylaştırıldı.
4. Jellerin tarak kısımları kesildi. Jelin markerin sağ tarafı olan sağ uç kısmına bir çentik atıldı.
5. Jeller transfer için en alta Whatman – Membran – Jel –Whatman şeklinde yarı kuru transfer aparatına yerleştirildi.
6. Jeller yerleştirildikten sonra ruler ile hava kabarcıkları giderildi.
7. Turbo Blot transfer cihazında Standart SD programı seçilerek jelin membrana transferi yapıldı.
8. 30 dakika sonunda jelde bulunan proteinlerin membrana geçmesi sağlandı.

▪ **Islak Transfer:**

1. Elektroforez sonrası sistemden çıkarılan jel, 1X transfer tamponuna alındıktan ve PVDF membran aktifleştirildikten sonra, transfer kasetlerinin içerisine sırasıyla keçe, Whatman kağıdı, membran, jel, tekrar whatman ve tekrar keçe konularak kasetler kapatıldı.
2. Islak transfer kasetleri ve buz blok transfer tankına yerleştirildi ve tank 1X Transfer Tamponu ile dolduruldu.
3. Tankın içerisine manyetik bar yerleştirilerek karıştırıcı ile tamponun içerisindeki iyonların sürekli olarak hareketi sağlandı.
4. Cihaz 140 mA 18 saate ayarlanarak +4 °C’de transfer işlemi gerçekleştirildi.

▪ **Transfer Sonrası İşlemler:**

1. Membran Ponceau-S ile yıkanarak proteinlerin membrana geçip geçmediği kontrol edildi.
2. Jeldeki protein kalıntılarını belirlemek amacıyla, Coomassie boyasında oda sıcaklığında 4 saat ya da gece boyu çalkalayıcıda bekletildi. Yıkama için %67.5 distile su, %7.5 asetik asit kullanıldı.

▪ **Bloklama**

1. Membran % 5 süt tozu/1X TBST (Bloklama tamponu) ile oda sıcaklığında 60 dk. karıştırıcıya konuldu.
2. Bloklama sonrası membran 1X TBST (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, % 1 Tween-20 pH:7.4) ile 2 kere çalkalandı.

▪ **Primer Antikorla Muamele:**

Primer antikorlar, %0.1 -%5 yağsız süt tozu 1XTBST içerisinde istenilen konsantrasyonda hazırlandı.

1. 4 °C’de gece boyu primer antikorla çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
2. Membran primerden sonra 1X TBST ile 2 kere çalkalandı.
3. Membran 1X TBST ile 1x15dakika, 3x5 dakika yıkandı.

▪ **Sekonder Antikorla Muamele:**

Sekonder antikorlar, %0,1 - %5 yağsız süt tozu 1X TBST içinde (tercihen %5) hazırlandı.

1. Kullanılan sekonder antikor için önerilen sürelerde ve konsantrasyonlarda antikor muamelesi yapıldı. Oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda inkübasyon gerçekleştirildi.
2. Süre sonunda, membran 1X TBST ile 2 kere çalkalandı.
3. Membran 1X TBST ile 1x15dakika, 3x5 dakika yıkandı.

▪ **Bantların Görüntülenmesi ve Analizi:**

1. Film banyo cihazı 15 dk önce açılarak cihazın ısınması sağlandı.
2. Karanlık odada membran başına 1 ml ECL-Plus reaktifi: (A:B 40:1, 1000ul A + 25 µl B) hazırlandı.
3. Membranlar 1 ml ECL plus reaktifi ile 5 dk muamele edildi.
4. Karanlıkta film kasetinin içine asetatlar yerleştirildi ve arasına membranlar yerleştirildi. Asetatlar ıslaklık kalmaması için mendille temizlendi.

5. Film bir kenarından kesilerek veya işaretlenerek kasete yerleştirildi. Kemilüminesans ışımının şiddetine göre 10 s'den itibaren 1-5-10-30 dakika bekletildi.
6. Film banyo cihazına verildi.
7. Protein bant görüntülerinin dansitometrik analizi *Image J* programı ile gerçekleştirildi.

3.6.2.11 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Yöntem Prensipleri: Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresan sinyal veren boyalar (örn, SYBR Green) ya da özel probalar kullanılarak amplifikasyona bağlı DNA artışı ile oluşan floresan sinyalinin kantitasyonunu yapan bir PZR tekniğidir. Bu teknik; tekrarlanan üç termal döngü temeline dayanmaktadır: 1) Denatürasyon: Kalıp DNA 90-95 °C'de denatüre edilerek çift sarmal yapıdaki DNA zincirlerinin fiziksel olarak birbirinden ayrılması sağlanır. Elde edilen iki DNA zinciri, Taq polimeraz (DNA polimeraz) için bir kalıp görevi görür. 2) Primer Bağlanması (*Annealing*): Bu basamakta sıcaklık 55-65 °C'ye düşürülerek hedef bölgeye komplementer olan primerlerin DNA zincirlerine bağlanması sağlanır. 3) Zincir uzaması (*Extension*): Bu basamak, Taq polimerazın aktivitesinin en yüksek olduğu 70-75 °C arasında gerçekleştirilir ve aktifleşen Taq polimeraz seçici olarak hedef bölgeyi çoğaltır. Bu üç adım bir PZR döngüsünü oluşturur ve yaklaşık 25-30 döngü sonrası hedef bölgenin milyarlarca kopyası (*amplikon*) elde edilir (135).

Aynı cihaz içerisinde hedef bölgenin hem çoğaltma işlemi, hem de çoğaltılan ürünleri saptama işlemi yapılabilmektedir. Ayrıca tüpler açılmadan test tamamlandığı için kontaminasyon riski de oldukça sınırlıdır. Gerçek zamanlı PZR'de amplifikasyon sonrasında elde edilen ürün varlığının saptanması çeşitli şekillerde yapılabilir. Bunlardan birincisi özgül olmayan bir yöntem olan çift zincirli DNA boyalarının kullanılmasıdır. Bu amaçla en sık kullanılan boya SYBR Green I'dir. Primerlerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen polimerizasyon aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan boya miktarı artar ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenir. Elde edilen floresansın istenen hedef bölgenin amplifikasyonu ile mi gerçekleştiği, yoksa non-spesifik bir ürün mü olduğunu anlayabilmek için "melting curve" (erime eğrisi) analizi yapılır (136, 137).

Uygulama:

▪ RNA izolasyonu:

- ✓ Hücreler inkübasyon süresi dolduğunda tripsinize edilerek toplandı ve 1×10^6 hücre/ ml konsantrasyonunda olacak şekilde PBS ile resüspanse edildi.
- ✓ Maksimum 1×10^5 hücre olacak şekilde ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne ayrıldı. Hücreler 2000 rcf (*relative centrifugal force*) $+4^{\circ}\text{C}$ de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelletine zarar vermeksizin $5 \mu\text{L}$ 'den fazla PBS kalıntısı bırakılmamasına özen gösterildi.
- ✓ Bu aşamadan sonra her bir örnek için (pelet) RNA stabilizasyonuna ve genomik DNA'nın uzaklaştırılmasını sağlayan ve örneklerden RNA saflaştırma aşamasını ortadan kaldıran iScript™ RT-qPCR örnek hazırlama reaktifi ile örnekler RT-qPCR analizine hazır hale getirildi.
- ✓ Bu amaçla iScript™ RT-qPCR örnek hazırlama reaktifi her bir pellet üzerine $100 \mu\text{L}$ olarak eklendi ve örnekler orta ayarda (6-10) 30 saniye vortekslendi.
- ✓ Elde edilen RNA izolasyonu sağlanmış ve genomik DNA'sı uzaklaştırılmış örnekler 15,000 rcf de 2 dakikada santrifüj edildi ve süpernatantlar pellete bulaştırılmadan dikkatlice toplandı.
- ✓ Süpernatant buz üzerine alınarak *Reverse* transkripsiyon reaksiyonuna devam edildi.

▪ cDNA sentezi

RT-PCR için reverse transkripsiyon süper karışımı (*BIORAD iScript™*) kullanılarak elde edilen RNA örnekleri üreticinin talimatlarına göre cDNA sentez işlemi gerçekleştirildi. Tablo 4'te bulunan reaktifler kullanılarak cDNA sentez reaksiyonu oluşturuldu. cDNA sentezinin kontrolü, β -aktin housekeeping geni ile gerçek zamanlı PZR ile gerçekleştirildi.

Tablo 4. cDNA sentezi için kullanılan reaktifler ve hacimleri.

Bileşen	Hacim/reaksiyon
5x iScript reverse transcription supermix	4 µL
RNA template (1 µg-1 pg total RNA)	5 µL
DNaz/RNaz içermeyen dH ₂ O	11 µL
Total hacim	20 µL

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1. *Forward* ve *Reverse* Primerlerin hazırlanışı:

Liyofilize olarak elimize ulaşan HSTL-1 gen seti primerleri üreticinin talimatlarına göre 40 µL nükleaz içermeyen su ile çözündürüldüğünde 10 µM stok elde edildi. 10 µL primer + 90 µL nükleaz bulunmayan su kullanılarak 1 µM konsantrasyonda bir plate olarak hazırlandı. Günlük kullanımda +4 °C’de sonrası için -20 °C’de saklandı.

2. Reaksiyon Karışımı Hazırlığı ve Termal Döngü Protokolü

Tablo 5. PZR reaksiyon karışımı hazırlığı.

Reaksiyon Hazırlığı		
Bileşen	10 µL Reaksiyondaki hacim	Son konsantrasyon
SYBR®Green supermix (2x)	5 µL	1x
Forward ve reverse primerler	1 µL	250-500 nm
Template (cDNA)	Değişebilir	cDNA: 100 ng-100 fg genomik DNA: 50 ng-5 pg
Nükleaz içermeyen H ₂ O	Değişebilir	-
Total reaksiyon karışımı hacmi	10 µL	-

Termal Döngü Programı:

- Polimeraz aktivasyonu ve DNA denatürasyonu için 95 °C’de 3 dk,
- Amplifikasyon aşamasında ön denatürasyon işlemi için 95 °C’de 10 s,
- Annealing/Uzama+Plak Okunması için 58 °C’de 45 s

Döngü sayısı 45 olarak belirlendi. Erime Eğrisi analizi için de 65 °C- 95 °C aralığında 0,5 °C’lik sıcaklık değişim bilgileri cihazda kayıtlı programa yüklenerek işlemler gerçekleştirildi.

3. Sonuçların Analizi

Her bir örneğe ait hedef genin gen ekspresyonu, eşlenik housekeeping (GAPDH) gen ekspresyonuna oranlanarak normalize edildi ve $2^{-\Delta\Delta Cq}$ yöntemi ile de“Rölatif Kantitasyon” işlemi gerçekleştirildi. Hesaplamalar aşağıdaki eşitliğe göre yapıldı.

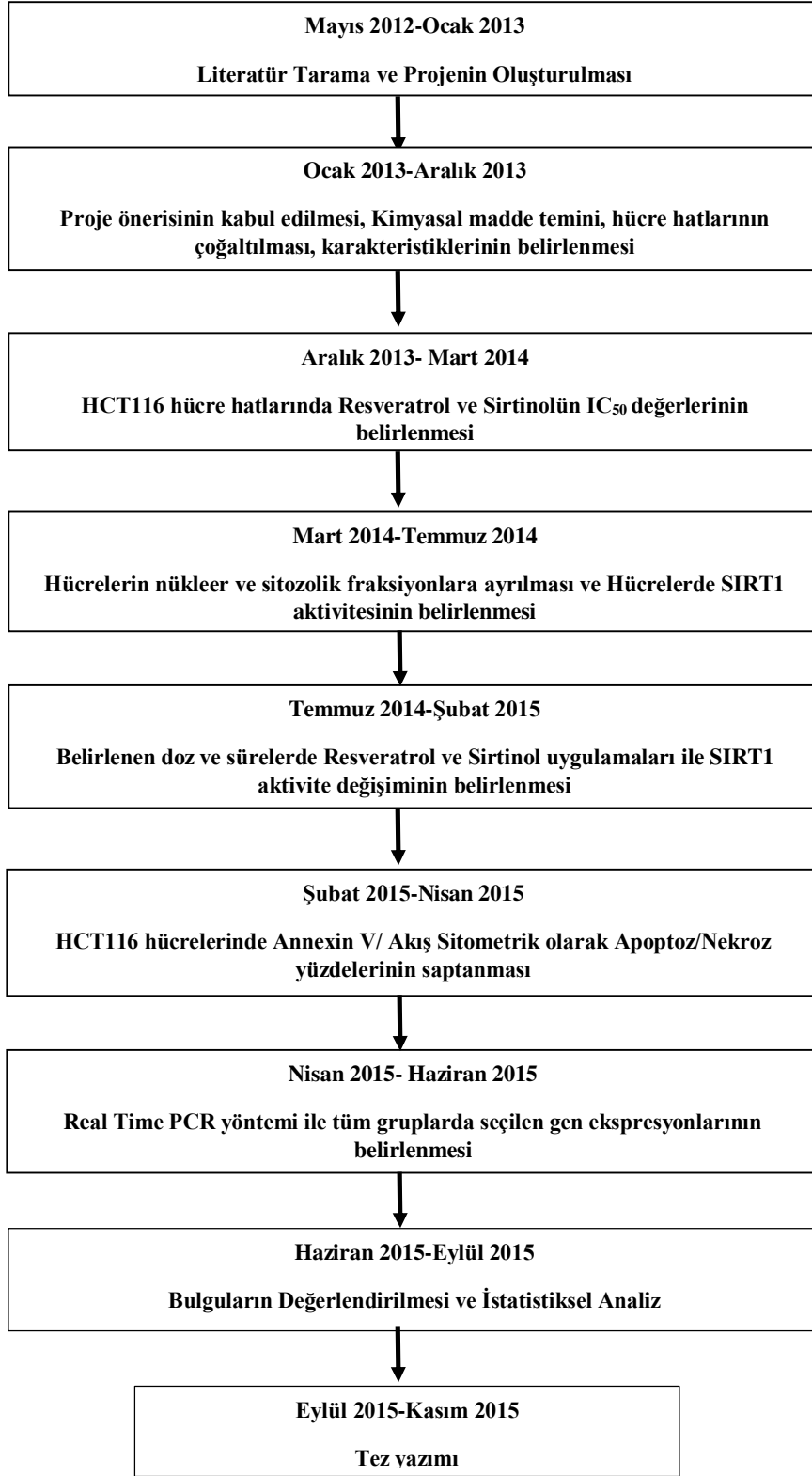
$\Delta Cq \text{ kontrol} = \text{kontrolde ait hedef genin } Cq \text{ değeri} - \text{kontrolde ait referans genin } Cq \text{ değeri}$

$\Delta Cq \text{ örnek} = \text{örneğe ait hedef genin } Cq \text{ değeri} - \text{örneğe ait referans genin } Cq \text{ değeri}$

Rölatif hedef gen ekspresyonu: $2^{-(\Delta Cq \text{ örnek} - \Delta Cq \text{ kontrol})} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Araştırmanın planı ve takvimine ait akış grafiği Şekil 14’te gösterilmiştir.



Şekil 14. Araştırma planı ve takvimi akış grafiği.

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda iki grup arasındaki karşılaştırmalar için, Graphpad Prism 5.04 programı kullanılarak istatistiksel analizler Student's t-testi ile gerçekleştirildi ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler Ortalama $\pm$ Standart Hata şeklinde verildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışma in vitro bir çalışmadır. Çalışmamızın kısıtlılıkları:

- SIRT1 aktivitesinin inhibisyonunda kullanılan sirtinolün kontrolü olarak siRNA yöntemiyle SIRT1'in susturumunun sağlanması ile ikinci bir inhibisyon koşulunun sağlanamaması.
- mRNA düzeyinde ekspresyonları belirlenen genlerin protein yansımaları gösterilerek hücresel etkilerine ilişkin daha doğru çıkarımlarda bulunulamaması.
- Çalışmanın in-vivo çalışma ile desteklenememesi.

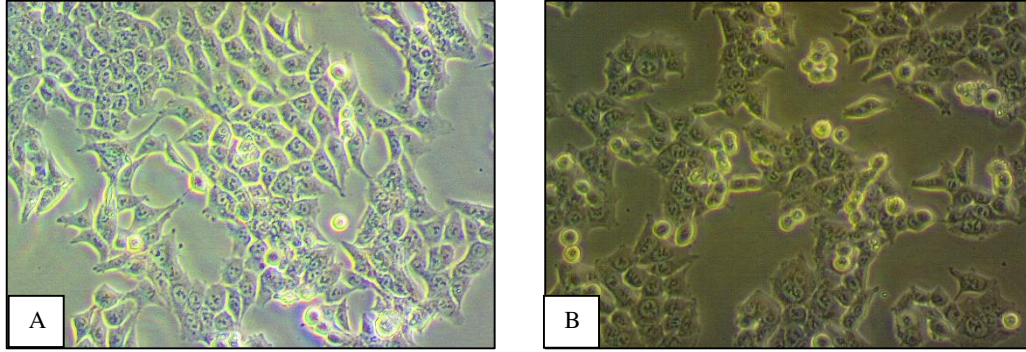
3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu, 14/02/2013 tarih ve 2012/11-02 karar numarası ile 871-GOA protokol numaralı çalışmamızın etik açısından sakıncalı olmadığına karar vermiştir (EK-1).

4.BULGULAR

4.1. Hücre Karakteristiklerinin Belirlenmesi

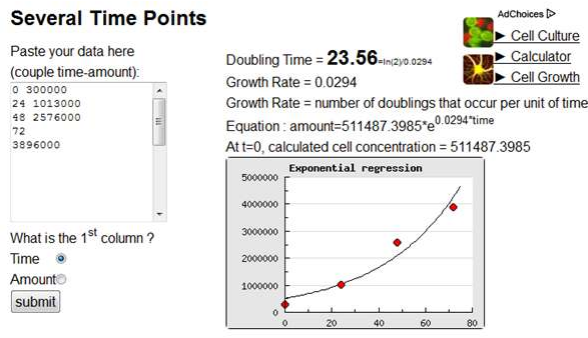
4.1.1. $HCT116^{p53(+/+)}$ ve $HCT116^{p53(-/-)}$ Hücrelerinin Morfolojik Görünümü



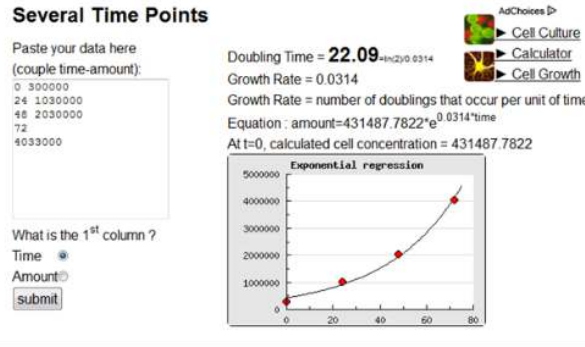
Şekil 15. $HCT116^{p53(+/+)}$ ve $HCT116^{p53(-/-)}$ hücrelerinin mikroskop görüntüleri A. $HCT116^{p53(+/+)}$ hücreleri, B. $HCT116^{p53(-/-)}$ hücreleri.

4.1.2. $HCT116^{p53(+/+)}$ ve $HCT116^{p53(-/-)}$ Hücrelerinin Katlanma Zamanlarının Belirlenmesi

Çalışmamızda kullandığımız HCT116 kolon kanser hücrelerinin ikiye katlanma zamanları www.doubling-time/compute.php internet sitesine 24, 48, 72 sa. hücre sayım sonuçlarının girilerek sitedeki hesaplama programından elde edilen veriler doğrultusunda $HCT116^{p53(+/+)}$ hücrelerinde 23.56 sa. (Şekil 16); $HCT116^{p53(-/-)}$ hücrelerinde 22.09 sa. (Şekil 17) olarak belirlendi.



Şekil 16. $HCT116^{p53(+/+)}$ hücrelerinin katlanma zamanı.

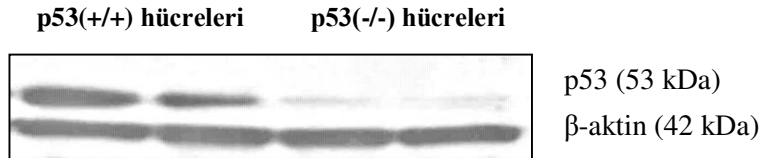


Şekil 17. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinin katlanma zamanı.

Sonuç olarak, iki hücre hattı ile paralel çalışmalar yapılacağından hücrelerin katlanma zamanları 23 sa. olarak kabul edildi. Çalışmamızdaki deney koşulları hücrelerin katlanma zamanları dikkate alınarak oluşturuldu.

4.1.3. HCT116 Kolon Karsinoma Hücre Hatlarında p53 Protein Ekspresyonunun Western Blotlama Yöntemi İle Doğrulanması

HCT116 kolon karsinoma hücre hatlarında p53 protein ekspresyonunun varlığını ve yokluğunu doğrulamak amacıyla Western blotlama yöntemiyle p53 protein ekspresyon seviyeleri belirlendi.



Şekil 18. HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücre hatlarında nükleer lizatlarda p53 protein ekspresyonu.

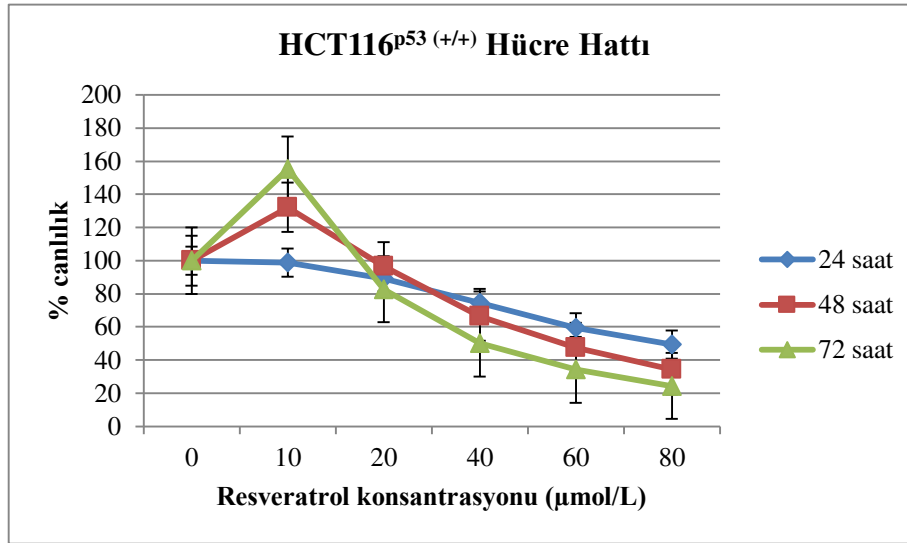
HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde p53 protein bantlarının varlığı, HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde p53 protein bantlarının yokluğu ile hücrelerin p53 ekspresyon durumu belirlendi (Şekil 18).

4.2. HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} Hücre Hatlarında Hücre Canlılık Analizi

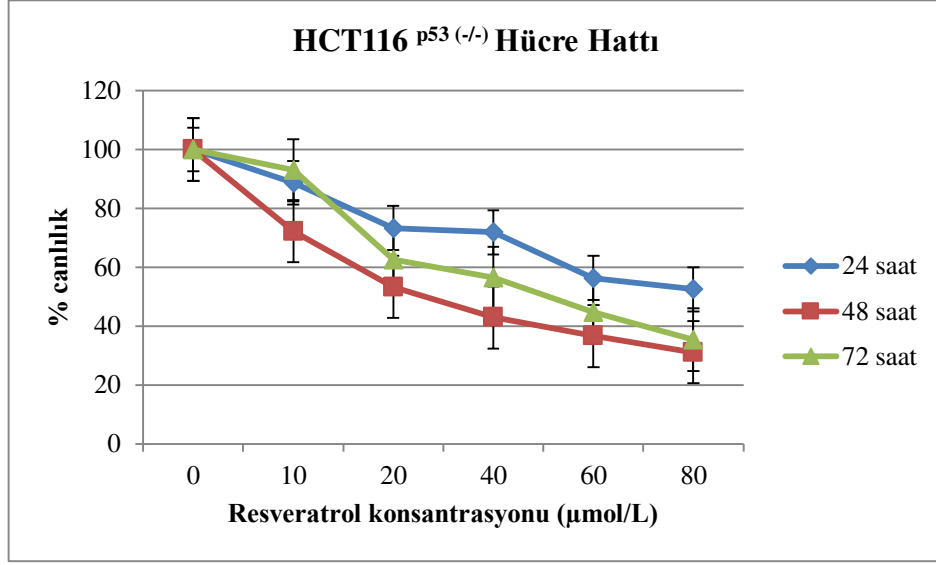
4.2.1. Resveratrolün Hücre Canlılığına Etkisi

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde 24-72 sa. 0-80 μ M konsantrasyonlarında Resveratrol uygulaması ile WST-1 canlılık analizi gerçekleştirildi. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde; HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücreleri için resveratrolün uygun doz ve süresine karar verildi.

A



Şekil 19. HCT116^{p53(+/+)} hücre hattında 0-80 μ M Resveratrol konsantrasyonlarının 24-72 sa. inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi (Ortalama $\pm$ Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

B

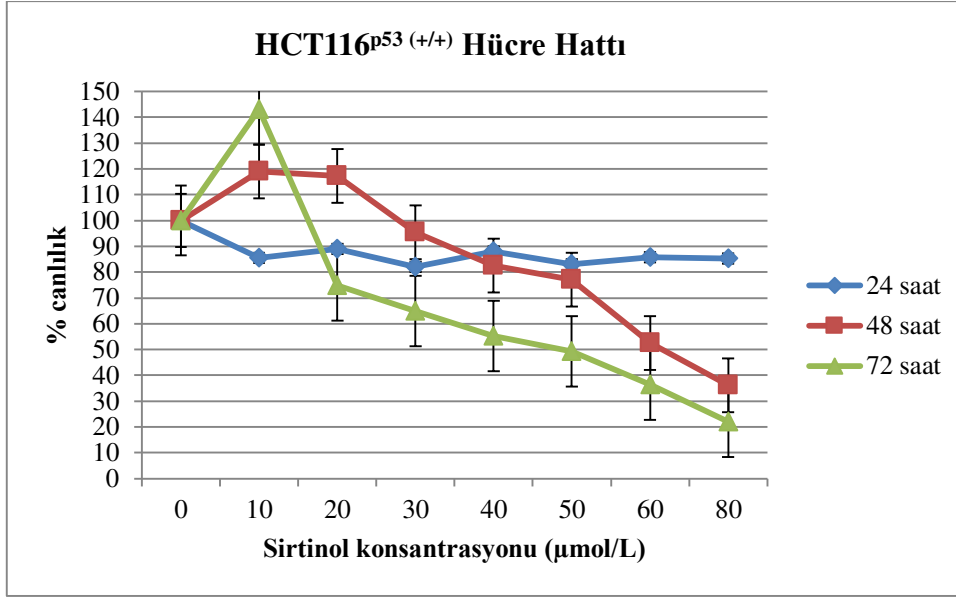
Şekil 20. HCT116^{p53(-/-)} hücre hattında 0-80 µM Resveratrol konsantrasyonlarının 24-72 sa. inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

Sonuç: HCT116^{p53(+/-)} hücrelerinde resveratrolün IC₅₀ değerleri 48 saat uygulama ile 54 µM ve HCT116^{p53(-/-)} hücreleri için de 31 µM olarak belirlendi. Bu verilere göre, HCT116^{p53(+/-)} hücrelerden elde edilen değerler referans olarak alındı ve her iki hücre hattında uygulanmasına karar verildi. Hücre canlılığının 72 saatte çok azalması göz önüne alındığından 48. saatteki IC₅₀ değerinin 48 saat ve 60 µM olarak tüm deneyler için kullanılmasına karar verildi (Şekil 19, 20).

4.2.2. Sirtinol'un hücre canlılığına etkisi

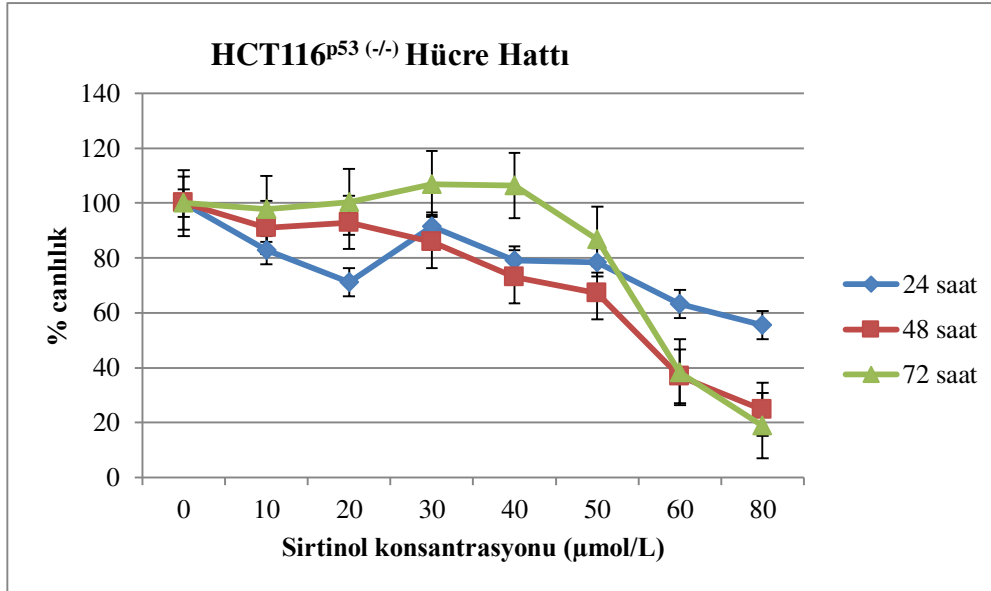
HCT116^{p53(+/-)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde 24-72 sa. 0-80 µM konsantrasyonlarında Sirtinol uygulaması ile WST-1 canlılık analizi gerçekleştirildi. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde; HCT116^{p53(+/-)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücreleri için Sirtinol'un uygun doz ve süresine karar verildi (Şekil 21,22).

A



Şekil 21. HCT116^{p53(+/+)} hücre hattında 0-80 µM Sirtinol konsantrasyonlarının 24-72 sa. inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

B



Şekil 22. HCT116^{p53(-/-)} hücre hattında 0-80 µM Sirtinol konsantrasyonlarının 24-72 sa. inkübasyonu ile % canlılık değerlerinin değişimi (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

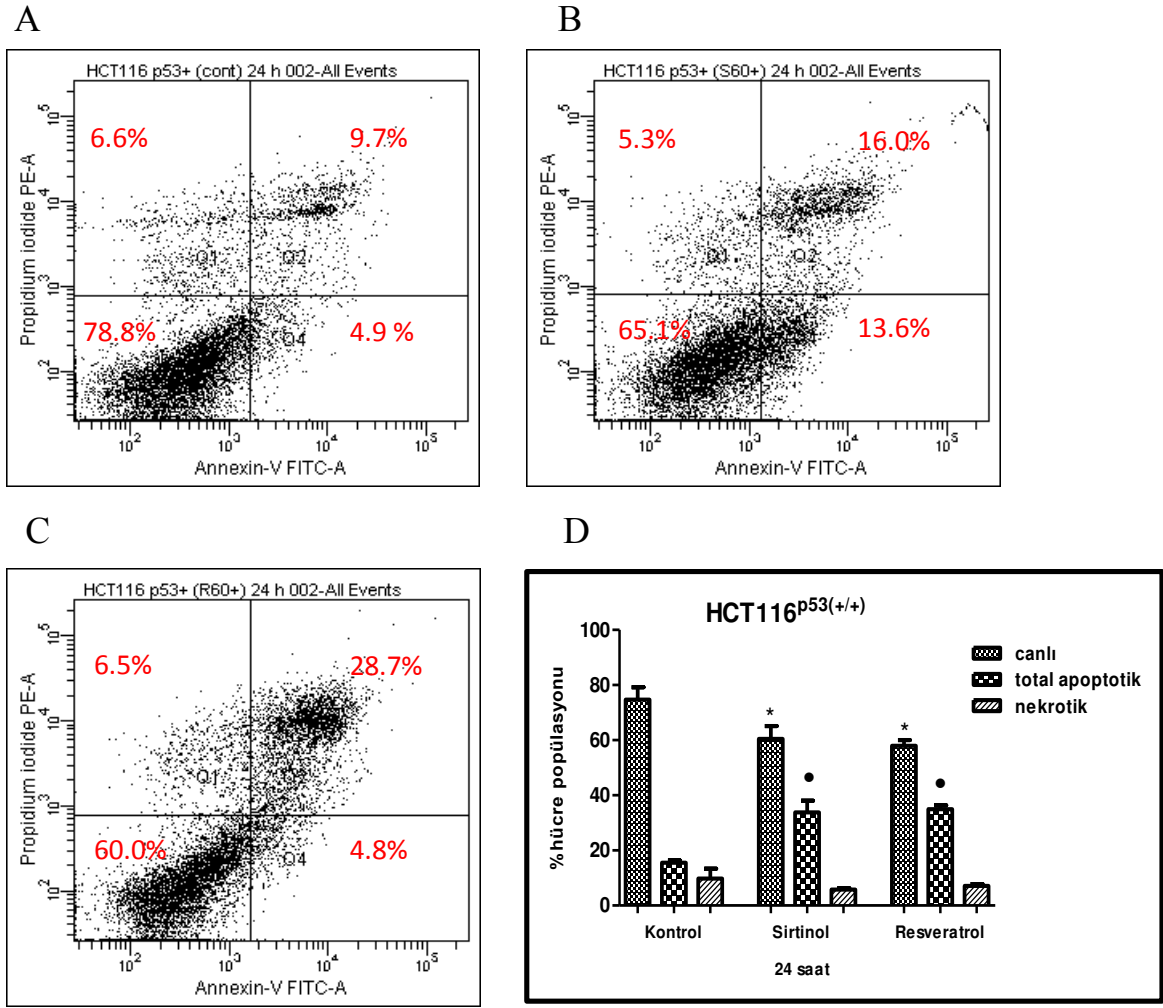
Sonuç: Hücre canlılık analiz sonuçlarına göre, sirtinolün SIRT1 aktivitesini maksimum düzeyde baskılayabileceği ve en fazla % 50 oranında hücre canlılığını azaltan doz olan 48. saatteki dozu seçildi. Her iki hücre hattı için de sirtinol doz ve süresi 60 μ M ve 48 saat olarak belirlendi.

4.3. IC₅₀ dozunda Resveratrolün Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde, WST-1 analizine göre belirlenmiş doz ve sürede, 60 μ M Resveratrol ve 60 μ M Sirtinol ile 24 ve 48 sa. inkübasyon süresinde gerçekleşen hücre ölüm tipi (apoptotik/nekrotik) akış sitometrik *Annexin-V/ PI* yöntemi ile değerlendirildi.

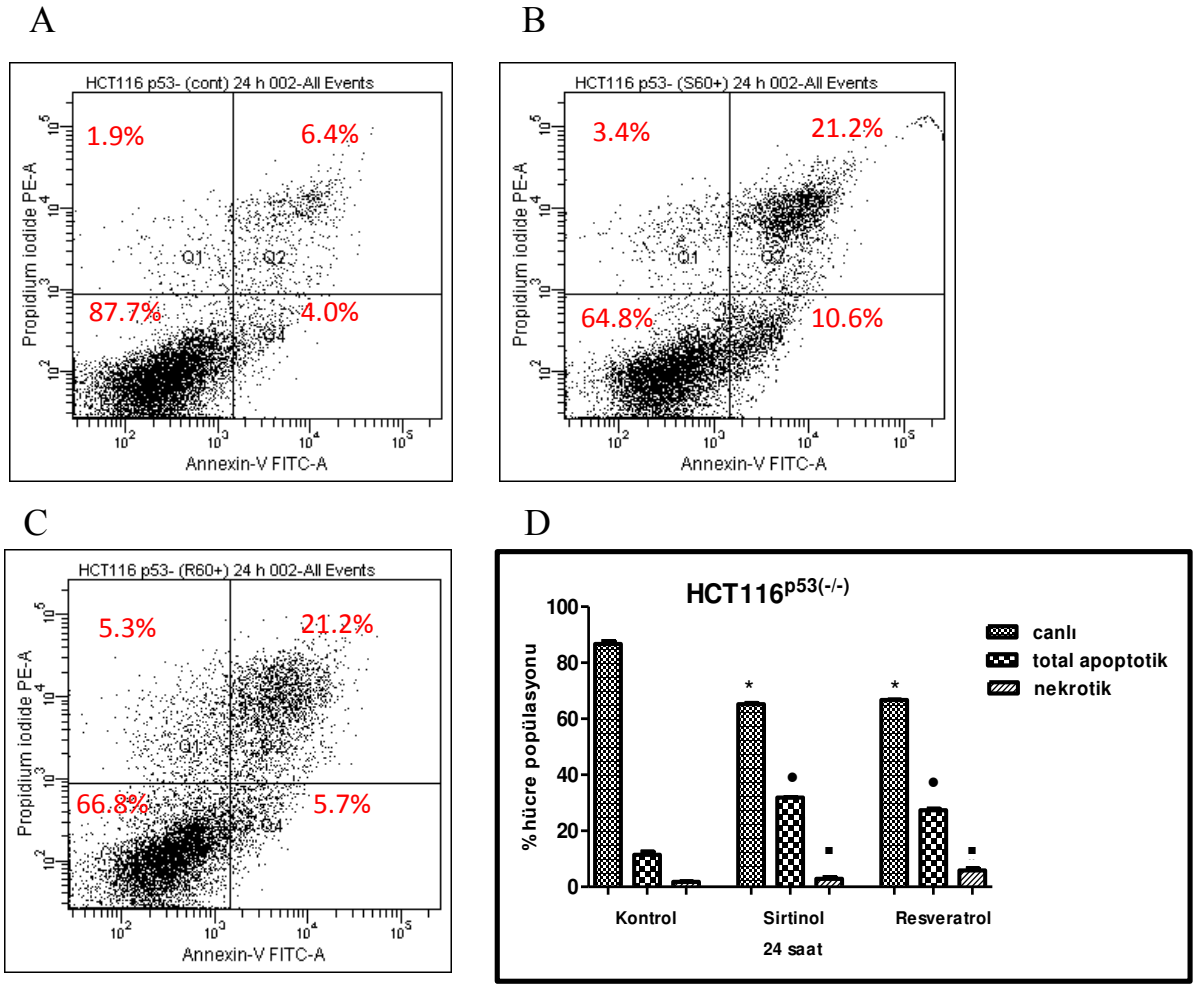
4.3.1. HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} Hücrelerinde 24 saat Uygulanan Resveratrolün Apoptotik Etkileri

60 μ M resveratrol ve sirtinol ile 24 saat inkübe edilen hücrelerde apoptoz indüksiyonu doğrulandı. HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde gerçekleştirilen çalışmada, kontrol grubunda %15.5, sirtinol uygulaması ile %33.8 ve resveratrol uygulaması ile %34.9 oranında apoptotik hücre yüzdesi belirlendi. Kontrol grubuna göre sirtinol uygulaması ile $p=0.0188$ ve resveratrol uygulaması ile $p=0.0042$ düzeyinde anlamlı olarak canlı hücre yüzdesini azalttığı ve iki uygulamanın da $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı olarak apoptotik hücre ölümünü arttırdığı belirlendi. Aynı zamanda iki uygulama ile nekrotik hücre ölümünde kontrole göre anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$) (Şekil 23).



Şekil 23. HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde 24 sa. Annexin-V/PI analizi. A. Kontrol, B. 60 µM sirtinol uygulaması C. 60 µM resveratrol uygulaması örnek gösterimleri D. Akış sitometrik Annexin-V/PI analizinin grafiksel ifadesi (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs deney grupları canlı * p<0.05) (Kontrol vs deney grupları total apoptotik • p<0.05) (Kontrol vs deney grupları nekrotik ▪p<0.05 istatistiksel anlamlı fark).

Aynı şekilde HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde, 24 saatte kontrol grubunda %11.5, sirtinol uygulaması ile %31.9 ve resveratrol uygulaması ile %27.4 oranında total apoptotik hücre yüzdesi belirlendi. Bu hücrelerde de resveratrol ve sirtinol uygulamalarının kontrol grubuna göre canlı hücre yüzdesini p<0.0001 düzeyinde anlamlı olarak azalttığı ve yine bu düzeyde apoptotik hücre ölüm yüzdesini arttırdığı belirlendi. Sirtinol uygulaması ile p=0.0299 ve resveratrol uygulaması ile p=0.0003 düzeyinde nekrotik hücre yüzdesinin anlamlı olarak arttığı belirlendi (Şekil 24).

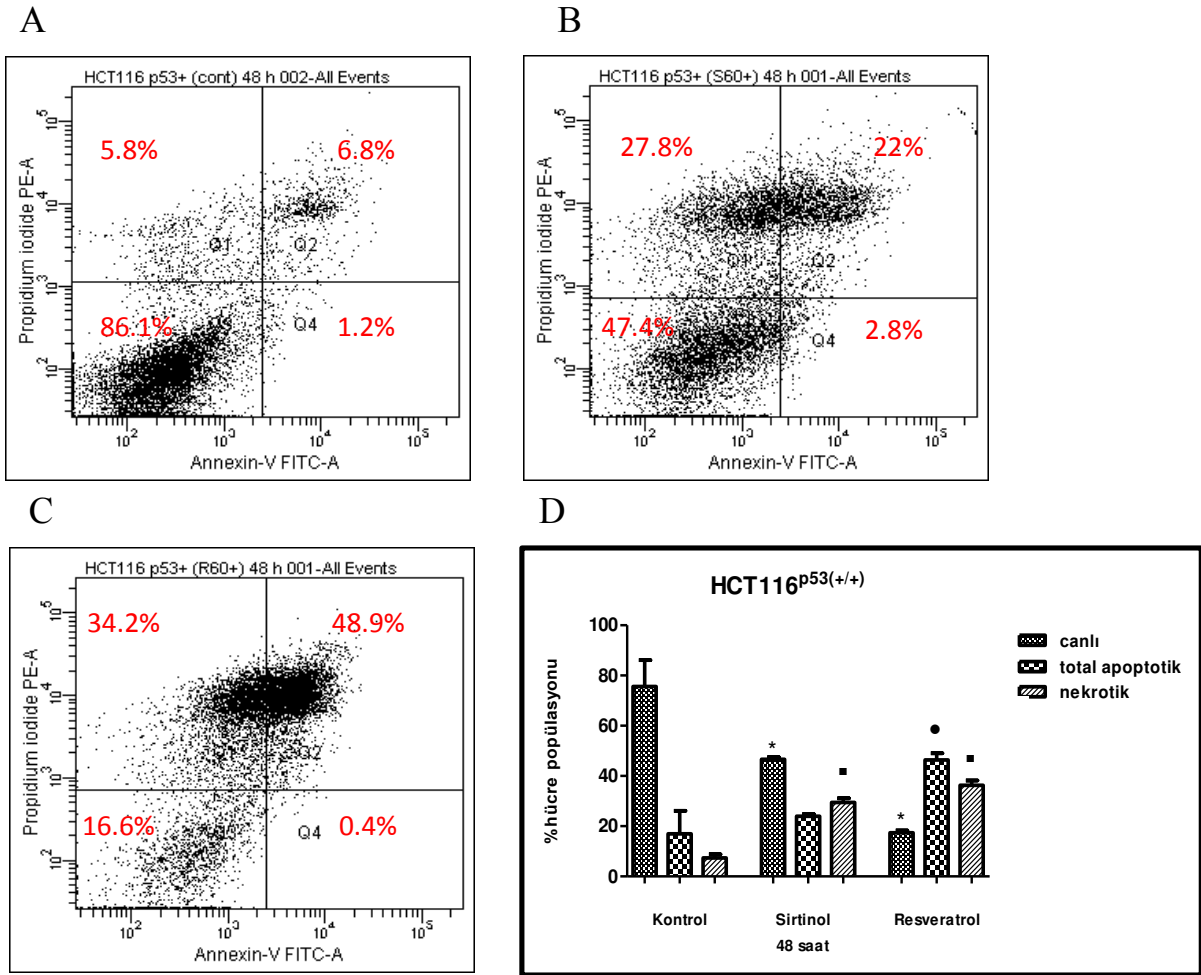


Şekil 24. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde 24 sa. Annexin-V/PI analizi. A. Kontrol, B. 60 µM Sirtinol Uygulaması C. 60 µM Resveratrol Uygulaması örnek gösterimleri D. Akış sitometrik Annexin-V/PI analizinin grafiksel ifadesi (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs deney grupları canlı * $p<0.05$), kontrol vs deney grupları total apoptotik • $p<0.05$), kontrol vs deney grupları nekrotik ▪ $p<0.05$ istatistiksel anlamlı fark).

Sonuç: HCT116^{p53(+/-)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde 24 saat resveratrol uygulamaları karşılaştırıldığında $p=0.0009$ düzeyinde anlamlı fark gözlemlendi. HCT116^{p53(+/-)} hücrelerinde resveratrol uygulaması ile gerçekleşen apoptotik hücre ölümü, anlamlı olarak yüksek bulundu.

4.3.2. *HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} Hücrelerinde 48 saat Uygulanan Resveratrolün Apoptotik Etkileri*

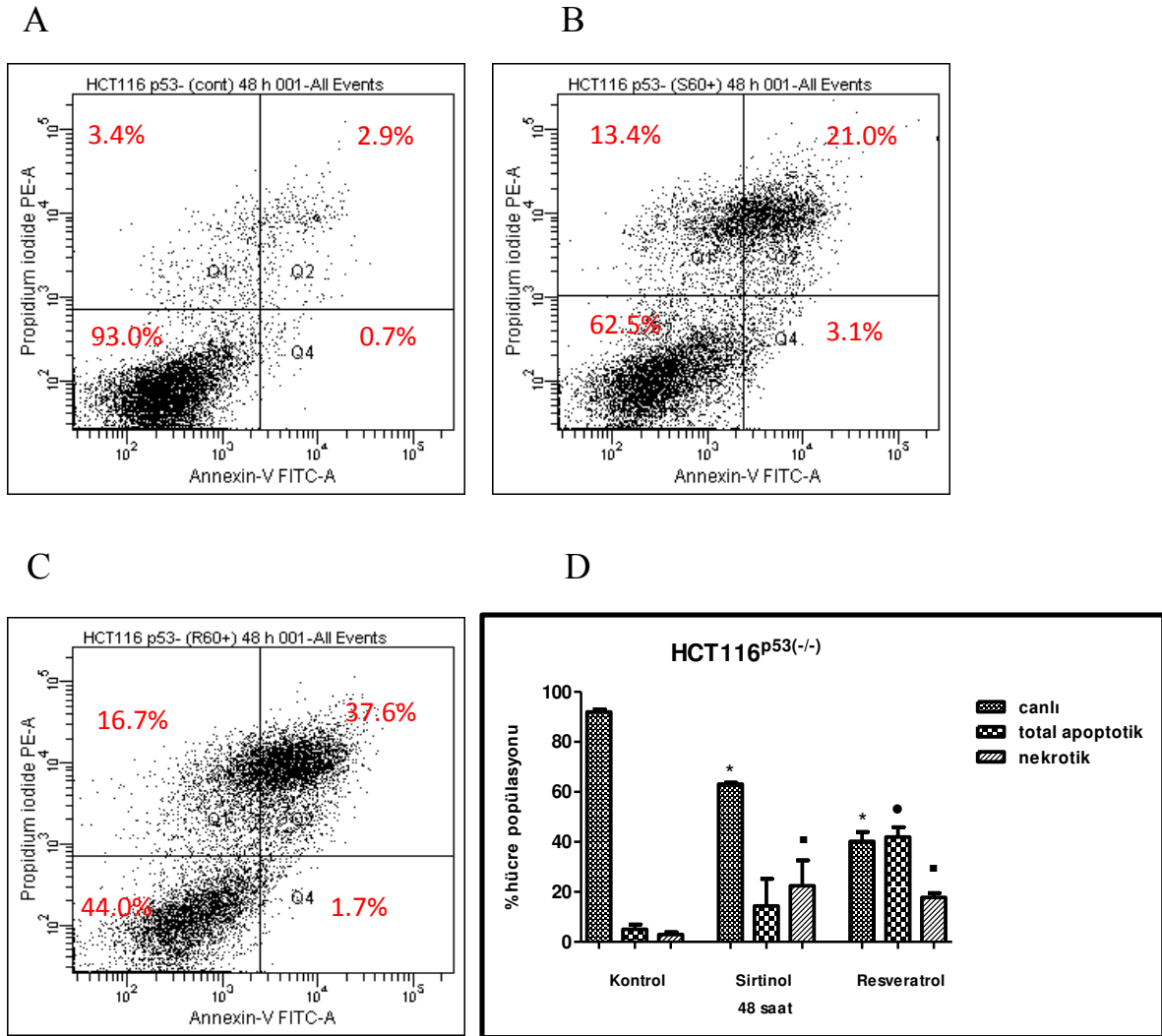
48 saat inkübe edilen HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde, kontrol grubunda %16.4, resveratrol uygulaması ile %45.7 ve sirtinol uygulaması ile %24 oranında apoptotik hücre yüzdesi saptandı. Kontrol grubuna göre sirtinol uygulaması ile $p=0.0087$, resveratrol uygulaması ile $p=0.0007$ düzeyinde canlı hücre yüzdesini anlamlı olarak azalttığı saptandı. Resveratrol uygulamasının kontrole göre apoptotik hücre ölümünü $p=0.0059$ düzeyinde anlamlı olarak arttırdığı, sirtinol uygulaması ile $p=0.2581$ düzeyinde anlamlı bir değişim göstermediği belirlendi. Her iki uygulama ile de nekrotik hücre yüzdesinin $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı olarak arttığı saptandı (Şekil 25).



Şekil 25. HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde 48 sa. Annexin-V/PI analizi. A. Kontrol, B. 60 μ M Sirtinol Uygulaması, C. 60 μ M Resveratrol Uygulaması örnek gösterimleri. D. Akış sitometrik Annexin-V/PI analizinin grafiksel ifadesi (Ortalama $\pm$ Standart Hata, her koşul 3 kez

tekrarlanmıştır) (Kontrol vs deney grupları canlı * $p<0.05$), kontrol vs deney grupları total apoptotik • $p<0.05$), kontrol vs deney grupları nekrotik ▪ $p<0.05$ istatistiksel anlamlı fark).

Aynı şekilde HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde, kontrol grubunda %4.4, resveratrol uygulaması ile %40 ve sirtinol uygulaması ile %16.3 oranında apoptotik hücre yüzdesi belirlendi. Kontrol grubuna göre her iki uygulama ile $p<0.0001$ düzeyinde hücre canlılığında azalma belirlendi. Kontrole göre resveratrol uygulamasının $p=0.0001$ düzeyinde anlamlı olarak apoptotik hücre ölümünü arttırdığı belirlenirken, sirtinol uygulaması ile apoptotik hücre ölümünde $p=0.2136$ düzeyinde anlamlı bir değişim saptanmadı. Nekrotik hücre yüzdesinin de resveratrol uygulaması ile $p=0.0002$ düzeyinde ve sirtinol uygulaması ile $p=0.0294$ düzeyinde kontrole göre anlamlı olarak artış gösterdiği belirlendi (Şekil 26).

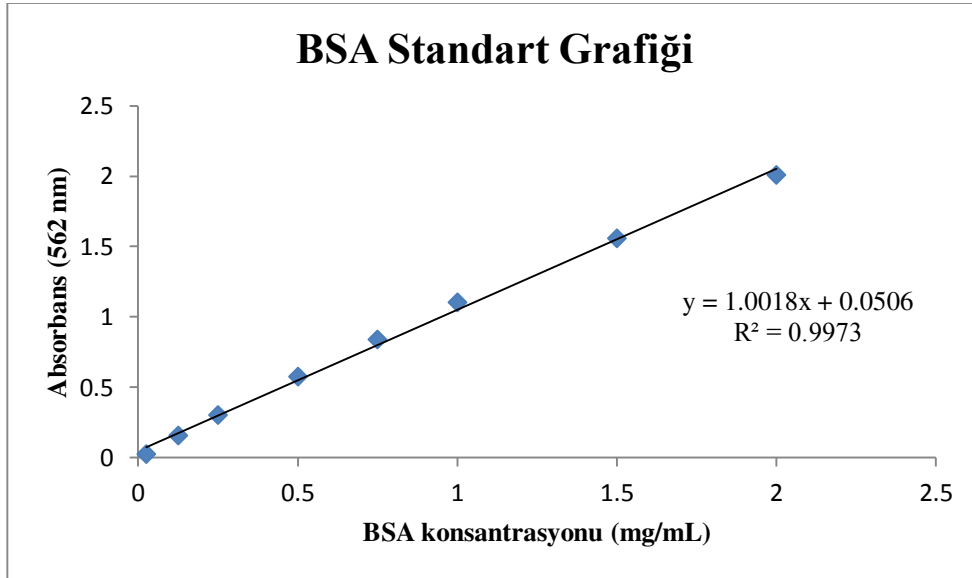


Şekil 26. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde 48 sa. Annexin-V/PI analizi. A. Kontrol, B. 60 µM Sirtinol Uygulaması C. 60 µM Resveratrol Uygulaması. D. Akış sitometrik Annexin-V/PI analizinin grafiksel ifadesi (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs deney grupları canlı * p<0.05), kontrol vs deney grupları total apoptotik • p<0.05), kontrol vs deney grupları nekrotik ▪ p<0.05 istatistiksel anlamlı fark).

Sonuç: HCT116^{p53(+/-)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde 48 saat resveratrol uygulamaları karşılaştırıldığında p=0.1835 düzeyinde anlamlı bir değişim gözlenmedi.

4.4. BSA Standart Grafiği

Standart grafiği BCA kit protokolüne göre oluşturuldu (Şekil 27).



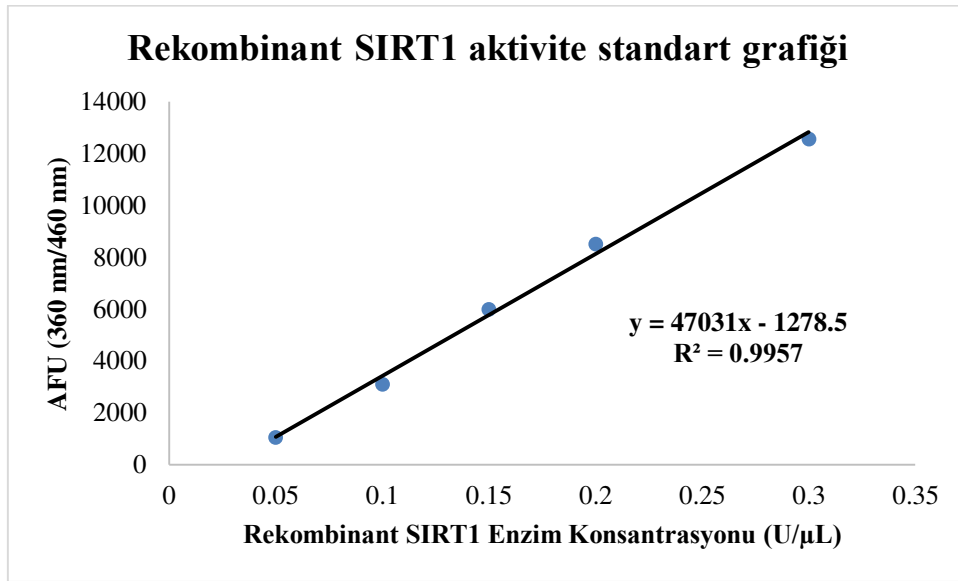
Şekil 27. BSA protein standart grafiği

4.5. SIRT1 Aktivitesinin Değerlendirilmesi

SIRT1 aktivitesini baskılayan sirtinol dozunun belirlenmesi için HCT116^{p53(+/-)} hücrelerinde farklı sirtinol konsantrasyonlarındaki inhibisyon incelendi. Belirlenen sirtinol dozu HCT116^{p53(-/-)} hücrelerine de uygulandı.

4.5.1. SIRT1 aktivite standart grafiği

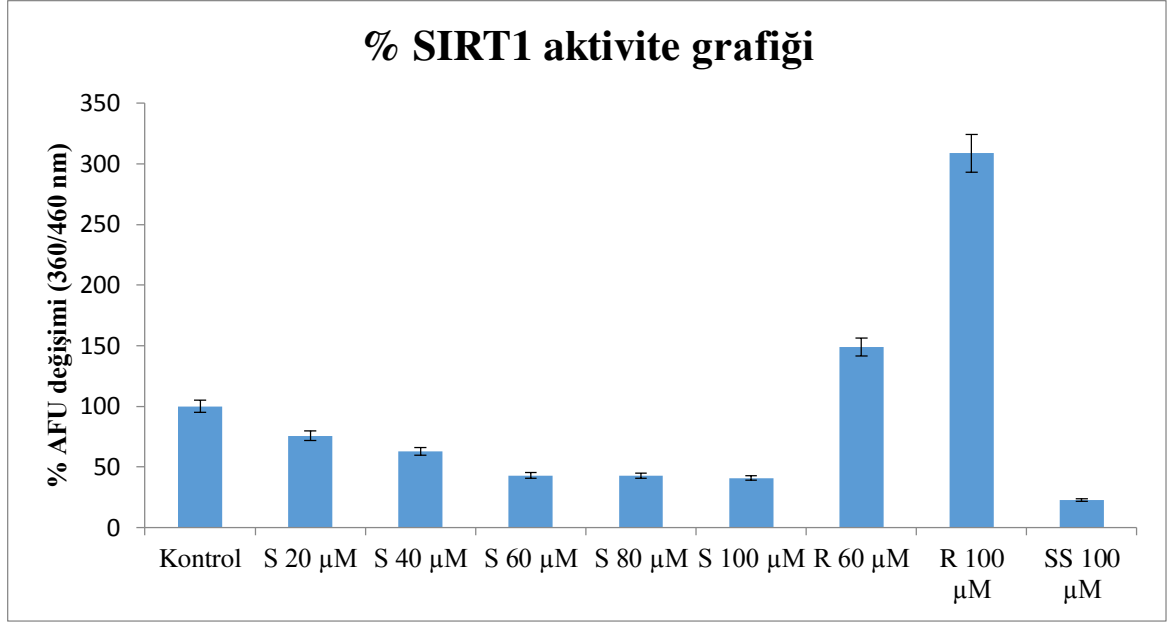
SIRT1 Fluorometrik Aktivite kiti © iđeriđinde bulunan Rekombinant SIRT1 Enzimi (U) nin seyreltmeleri ile yönteme uygun olarak AFU (*Arbitrary Fluorescence Units*) değerleri ve enzim konsantrasyonu arasında standart grafiği oluşturuldu (şekil 28).



şekil 28. Rekombinant SIRT1 enzim aktivite standart grafiği.

4.5.2. Hücrelerde SIRT1 inhibisyon düzeyleri

24 saat 20-100 μM Sirtinol ve 60-100 μM resveratrol uygulaması yapılan HCT116^{p53(+/-)} hücrelerinden elde edilen nükleer fraksiyonlarda SIRT1 aktivite analizi gerçekleştirildi. SIRT1 aktivite analiz kitinde bulunan SIRT1 inhibitörü sodyum suramin (SS) 100 μM konsantrasyonda sirtinolün pozitif kontrolü olarak kullanıldı.



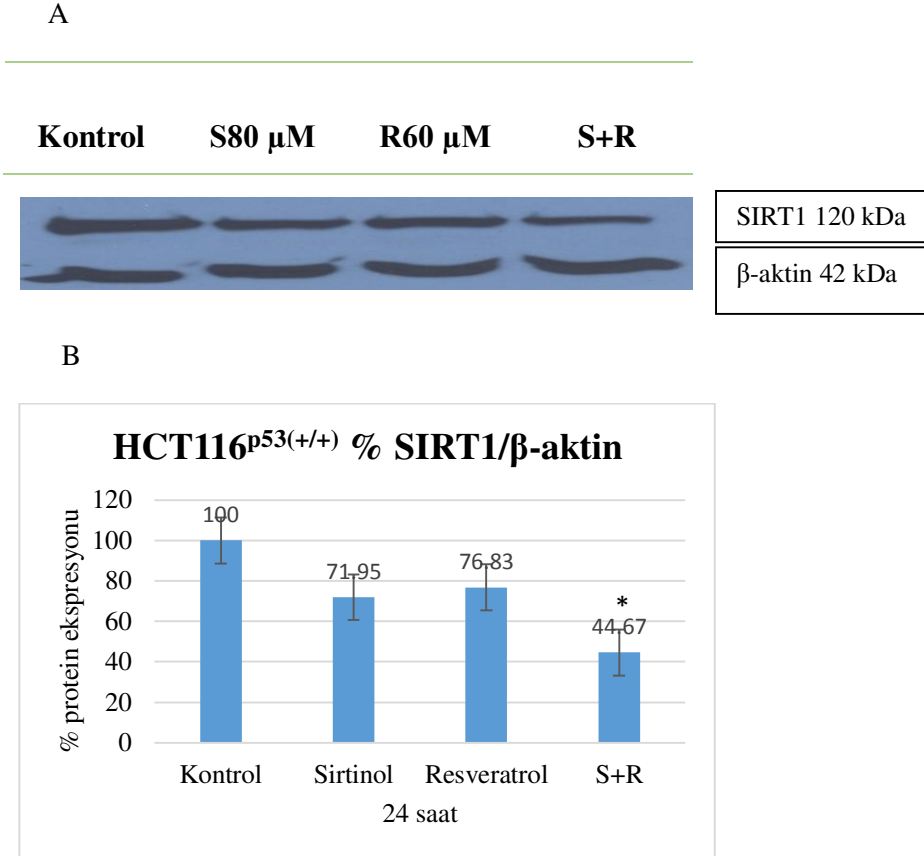
şekil 29. HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde SIRT1 enzim aktivite analizi (Ortalama± Standart Hata, her koşul 3 kez tekrar edilmiştir)

Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde SIRT1 aktivite inhibisyonunu % 58 oranında sağlayan 80 μM sirtinol dozu seçildi. Aynı zamanda kullanılan resveratrol dozlarının SIRT1 aktivitesini arttırdığı gösterildi (şekil 29).

4.6. SIRT1 Protein Ekspresyon Değişimi

4.6.1. *HCT116^{p53(+/+)} Hücrelerinde SIRT1 Protein Ekspresyon Değişimi*

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde SIRT1 protein ekspresyon düzeyi K (Kontrol), S (Sirtinol 80 μ M, 24 sa.), R (Resveratrol 60 μ M, 24 sa.), S+R (Sirtinol 80 μ M, 24 sa. + Resveratrol 60 μ M, 24 sa.) gruplarında Western Blot analizi ile semi-kantitatif olarak incelendi.



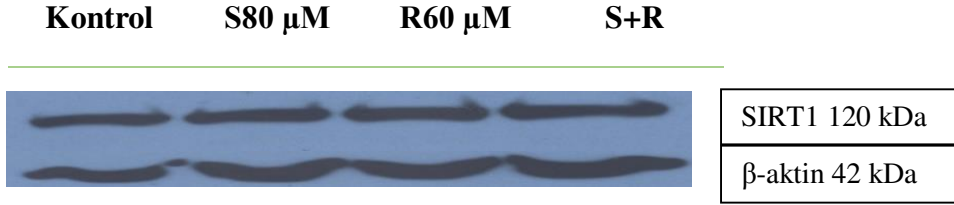
Şekil 30. HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde SIRT1 proteininin western blot analizi. A. X-Ray filmi örnek görüntüsü, B. Dansitometrik analiz ile SIRT1/ β -Aktin oranının grafiksel ifadesi (* $p < 0.05$ düzeyinde kontrole göre anlamlı)

Sonuç: Sirtinol ve resveratrolün ardışık olarak uygulandığı HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde SIRT1 protein ekspresyon düzeyinin kontrole göre $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Şekil 30A, B)

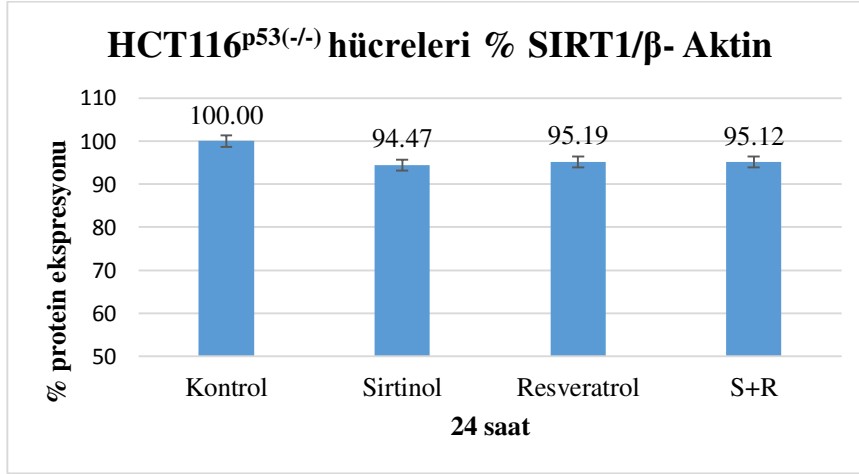
4.6.2. HCT116^{p53(-/-)} Hücrelerinde SIRT1 Protein Ekspresyon Değişimi

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde de, aynı gruplarda SIRT1 protein ekspresyonu Western Blot analizi ile değerlendirildi.

A



B



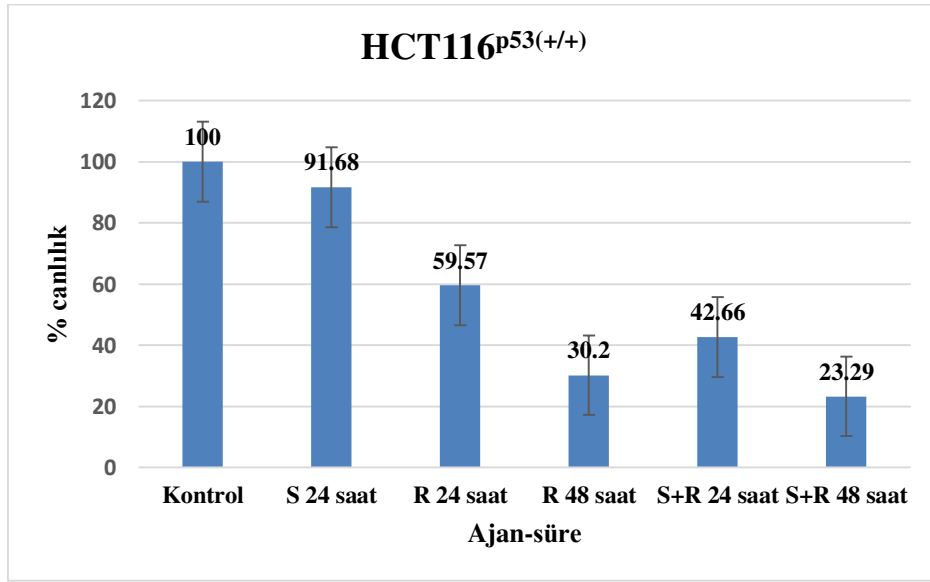
Şekil 31. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde SIRT1 proteininin western blot analizi. A. X-Ray filmi örnek görüntüsü, B. Dansitometrik analiz ile SIRT1/β-Aktin oranının grafiksel ifadesi (*p<0.05 düzeyinde kontrole göre anlamlı)

Sonuç: Sirtinol ve resveratrolün ardışık olarak uygulaması ile HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde SIRT1 protein ekspresyon düzeyinin kontrole göre anlamlı bir fark göstermediği belirlendi (Şekil 31A, B).

4.7. Sirtinol ve Resveratrol Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

4.7.1. *HCT116^{p53(+/+)} Hücre Hattında Sirtinol ve Resveratrol Uygulamalarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi*

Belirlenen sirtinol ve resveratrol doz ve sürelerinde, hücrelere uygulanması sonucunda hücre canlılığının değişimi incelendi. Kontrol (%0.01 DMSO), 80 μ M sirtinol 24 sa., 60 μ M resveratrol 24 sa., 60 μ M resveratrol 48 sa., 80 μ M sirtinol 24 sa. ön uygulama sonrası 24 sa. 60 μ M resveratrol uygulaması ve 80 μ M sirtinol 24 sa. ön uygulama sonrası 48 sa. 60 μ M resveratrol uygulaması olmak üzere altı grupta hücre canlılık değişimi belirlendi.

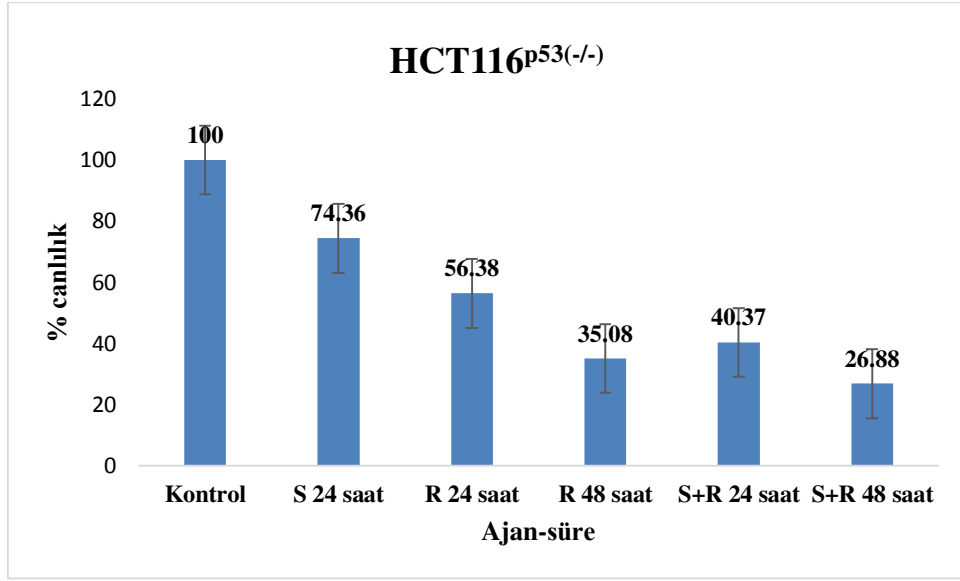


Şekil 32. HCT116^{p53(+/-)} hücrelerinde Sirtinol ve Resveratrol uygulamaları ile % canlılık değerlerinin değişimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

HCT116^{p53(+/-)} hücrelerinde kontrole göre sirtinolün 24 saat uygulaması ile canlılıkta %8.3 oranında, resveratrolün 24 sa. uygulaması ile % 40.4 oranında azalma belirlendi. resveratrolün 48 sa. uygulaması ile %70 oranında canlılıkta azalma tespit edildi. Sirtinolün 24 sa. ve resveratrolün ardışık olarak 24 sa. uygulanması ile canlılıkta % 57.3 oranında ve sirtinol sonrası resveratrolün ardışık olarak 48 sa. uygulaması ile canlılıkta % 76.7 oranında azalma olduğu saptandı (Şekil 32).

4.7.2. *HCT116^{p53(-/-)} Hücre Hattında Sirtinol ve Resveratrol Uygulamalarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi*

HCT116^{p53(+/+)} hücre hattında olduğu gibi HCT116^{p53(-/-)} hücre hattında da, kontrol (%0.01 DMSO), 80 µM sirtinol 24 sa., 60 µM resveratrol 24 sa., 60 µM resveratrol 48 sa., 80 µM sirtinol 24 sa. ön uygulaması sonrasında 24 sa. 60 µM resveratrol uygulaması ve 80 µM sirtinol 24 sa. ön uygulaması sonrasında 48 sa. 60 µM resveratrol uygulaması olmak üzere altı grupta hücre canlılık değişimi belirlendi.



Şekil 33. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde sirtinol ve resveratrol uygulamaları ile % canlılık değerlerinin değişimi (Ortalama±Standart Hata, her koşul 9 kez tekrarlanmıştır).

Sonuç: HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde kontrole göre sirtinolün 24 sa. uygulaması ile canlılıkta % 25.6 oranında, resveratrolün 24 sa. uygulaması ile % 43.6 oranında azalma belirlendi. resveratrolün 48 sa. uygulaması ile canlılıkta % 64.9 oranında azalma tespit edildi. Sirtinolün 24 sa. ve resveratrolün ardışık olarak 24 sa. uygulaması ile canlılıkta % 59.6 oranında ve sirtinol sonrası resveratrolün ardışık olarak 48 sa. uygulaması ile canlılıkta % 73.1 oranında azalma olduğu saptandı (Şekil 33).

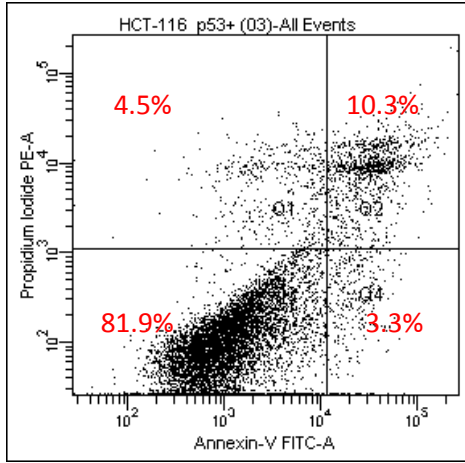
Sonuç olarak, sirtinol ve resveratrolün ayrı ayrı hücrelere uygulanmasında IC₅₀ değeri için 48 sa. gerekli iken, sirtinol ön uygulaması sonrası resveratrol uygulandığında IC₅₀ değerine 24 saatte ulaşıldığı saptandı. Bu verilere dayanarak sirtinol ve resveratrol hücrelere 24'er saat uygulandı.

4.8. Sirtinol ve Resveratrol Ardışık Uygulamasının Apoptotik Etkisi

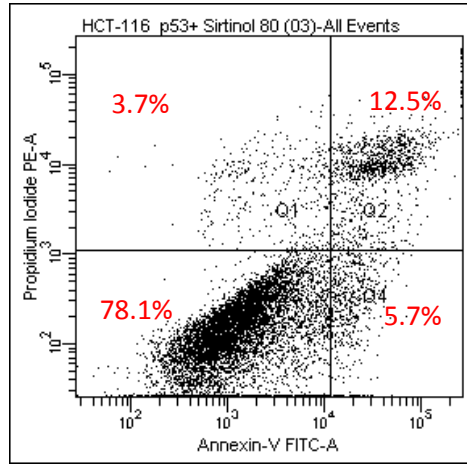
4.8.1. *HCT116^{p53(+/+)} Hücre Hattında Sirtinol ve Resveratrol Uygulamalarının Apoptotik Etkisi*

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde, kontrol (K), 80 μ M sirtinol 24 saat (S), 60 μ M resveratrol 24 saat (R) ve 80 μ M sirtinol 24 saat sonrası 24 saat 60 μ M resveratrol uygulamaları (S+R) ile gerçekleşen hücre ölüm tipi (apoptotik/ nekrotik) akış sitometrik Annexin-V/ PI yöntemi ile *FITC-Annexin-V Apoptosis Detection Kit 1* kullanılarak saptandı.

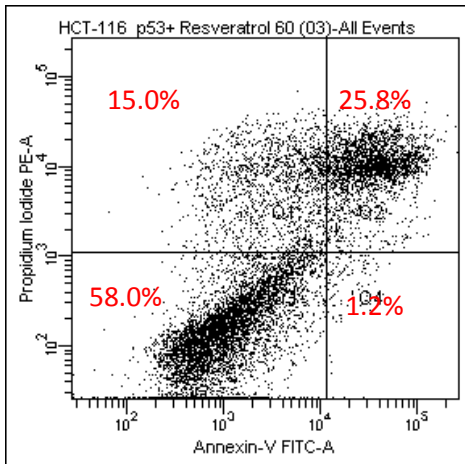
A



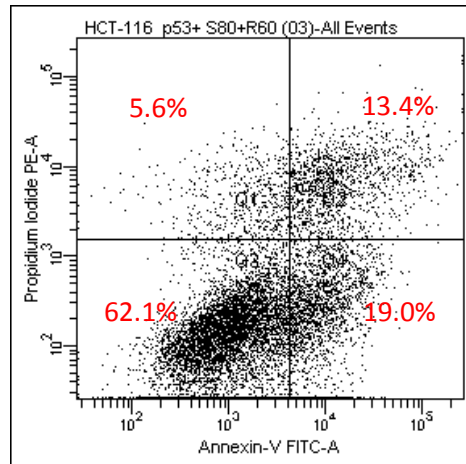
B



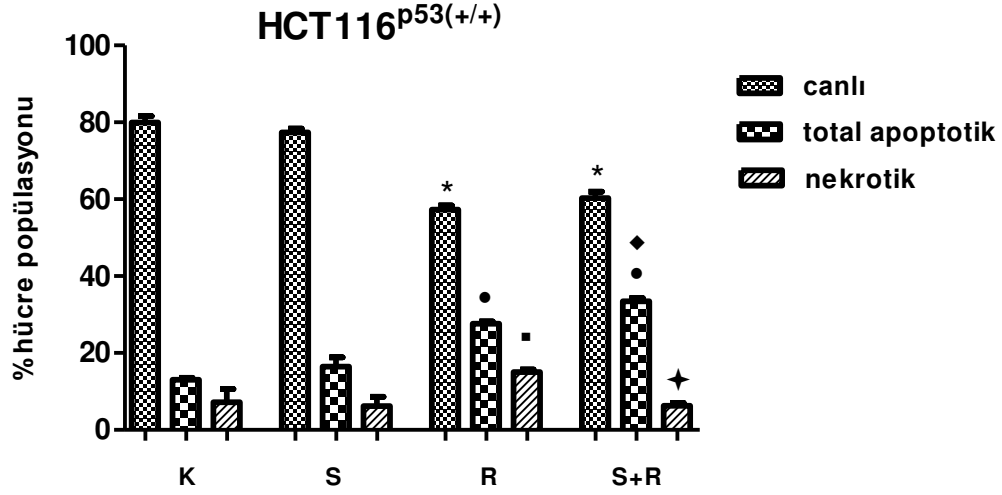
C



D



E



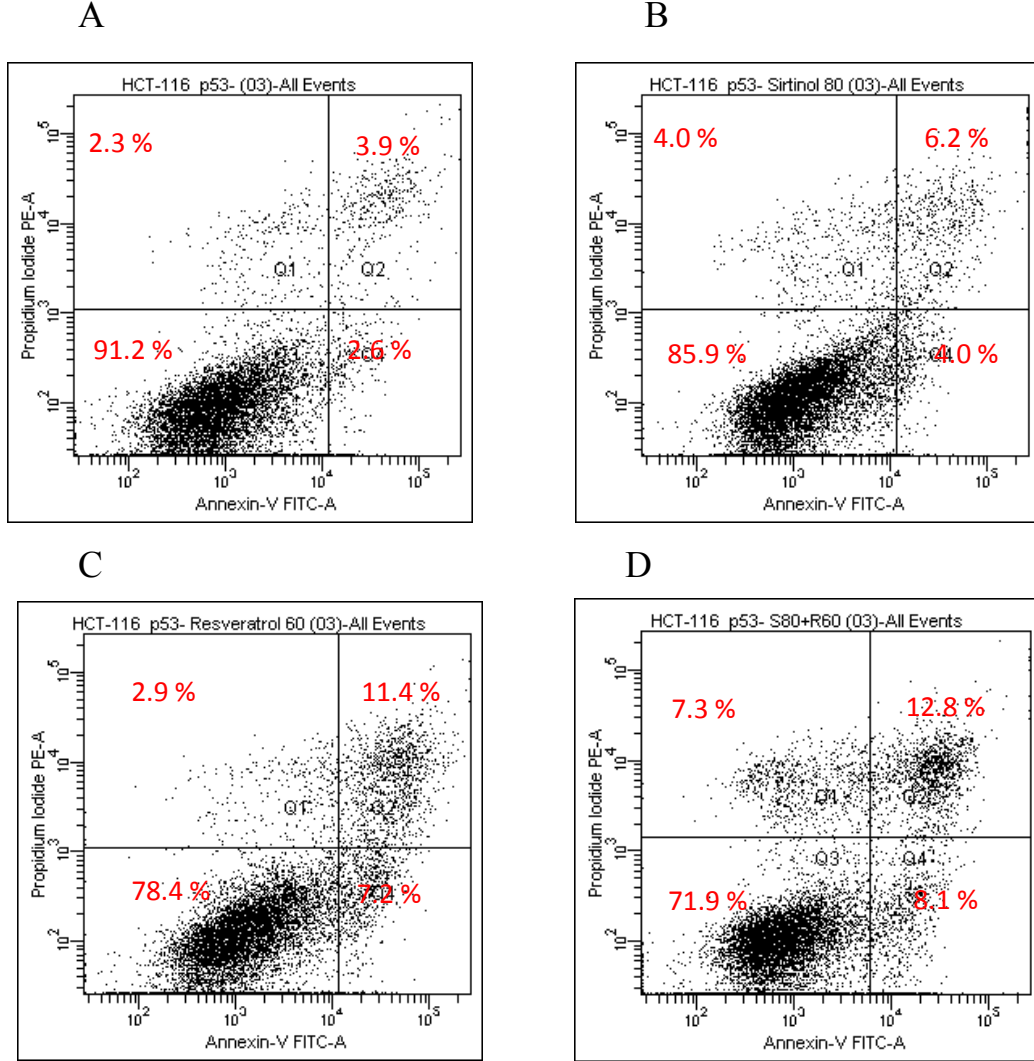
Şekil 34. HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde Sirtinol ve Resveratrol uygulamaları ile akış sitometrik analiz. A. Kontrol (K), B. Sirtinol 24 saat (S), C. Resveratrol 24 saat (R) ve D. Sirtinol + Resveratrol 24 saat (S+R) E. HCT116^{p53(+/+)} Akış Sitometrik analiz sonuçlarının grafiksel ifadesi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs deney grupları canlı *p<0.05) (Kontrol vs deney grupları total apoptotik •p<0.05) (Kontrol vs deney grupları nekrotik ▪p<0.05) (R vs S+R total apoptotik ♦p<0.05) (R vs S+R nekrotik ✦p<0.05, istatistiksel anlamlı fark).

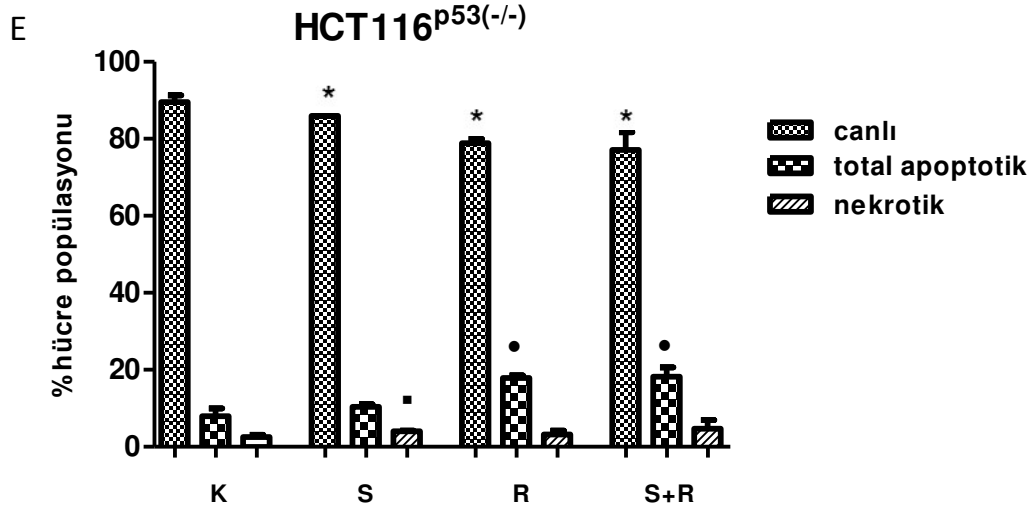
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde gerçekleştirilen çalışmada, kontrol grubunda %13.8, sirtinol uygulaması ile %16.4 ve resveratrol uygulaması ile %27.6, sirtinol ve resveratrolün ardışık uygulanması ile %33.4 oranında apoptotik hücre yüzdesi belirlendi. Kontrol grubunun apoptotik hücre yüzdesi ile yapılan istatistiksel karşılaştırmada sirtinol uygulaması ile elde edilen apoptotik hücre yüzdesinin p=0.0802 değeri ile anlamlı bir fark göstermediği, resveratrol uygulamasının yanı sıra sirtinol ve resveratrolün ardışık uygulaması ile p<0.0001 düzeyinde anlamlı olarak apoptotik hücre yüzdelерinde artış belirlendi. Aynı zamanda resveratrol ve ardışık uygulamalarının apoptotik hücre yüzdeleri arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada ardışık uygulamada p=0.0007 değeriinde anlamlı olarak apoptotik hücre yüzdesi artışı belirlendi (Şekil 34).

Sonuç olarak, HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde resveratrolün SIRT1'in inhibe edildiği koşulda apoptotik hücre yüzdesini anlamlı olarak arttırdığı saptandı.

4.8.2. HCT116^{p53(-/-)} Hücre Hattında Sirtinol ve Resveratrol Uygulamalarının Apoptotik Etkisi

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde de oluşturulan aynı gruplarda gerçekleşen hücre ölüm tipi (apoptotik/nekrotik) akış sitometrik Annexin-V/ PI yöntemi ile *FITC-Annexin-V Apoptosis Detection Kit 1* kullanılarak saptandı.





Şekil 35. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde Sirtinol ve Resveratrol uygulamaları ile akış sitometrik analiz. A. Kontrol (K), B. Sirtinol 24 saat (S), C. Resveratrol 24 saat (R) ve D. Sirtinol+Resveratrol 24 saat (S+R) E. HCT116^{p53(-/-)} Akış Sitometrik analiz sonuçlarının grafiksel ifadesi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs deney grupları canlı *p< 0.05) (Kontrol vs deney grupları total apoptotik •p<0.05) (Kontrol vs deney grupları nekrotik ♦p< 0.05) (R vs S+R total apoptotik ♦p<0.05) (R vs S+R nekrotik ♦p<0.05, istatistiksel anlamlı fark).

Sonuç: HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde, kontrol grubunda % 7.1, sirtinol uygulaması ile %10.4 ve resveratrol uygulaması ile % 17.9, sirtinol ve resveratrolün ardışık uygulanması ile % 18.2 oranında apoptotik hücre yüzdesi belirlendi. Kontrol grubuna göre canlı hücre popülasyonunda sirtinol grubunda p=0.0238, resveratrol grubunda p=0.0008, ardışık uygulama grubunda p=0.0116 düzeyinde anlamlı fark saptandı. Kontrol grubunun apoptotik hücre yüzdesi ile yapılan istatistiksel karşılaştırmada sirtinol uygulaması ile elde edilen apoptotik hücre yüzdesinin p=0.1094 düzeyinde anlamlı bir fark göstermediği, resveratrol uygulaması ile p=0.0011 düzeyinde anlamlı, sirtinol ve resveratrolün ardışık uygulaması ile de p=0.0047 düzeyinde anlamlı olarak apoptotik hücre yüzdelерinde artış belirlendi. Kontrol grubuna göre nekrotik hücrelerin karşılaştırılmasında, sirtinol uygulaması ile p=0.0127 düzeyinde anlamlı fark belirlenirken, resveratrol uygulaması ile p=0.4058 ve ardışık uygulama ile p=0.1833 düzeylerinde anlamlı fark saptanmadı. Aynı zamanda resveratrol ve ardışık uygulamalarının apoptotik hücre yüzdeleri arasında yapılan istatistiksel

karşılaştırmada $p=0.8442$ düzeyinde, nekrotik hücre yüzdeleri arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada $p=0.3450$ düzeyinde anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 35).

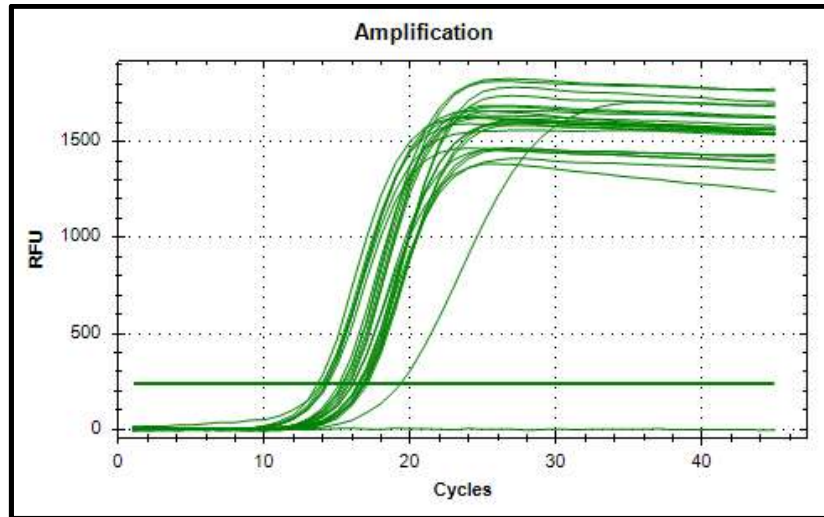
HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde resveratrol uygulaması ve ardışık uygulama karşılaştırılması ile apoptotik hücre ölüm yüzdesinin anlamlı fark oluşturmaması, bize resveratrol ile gerçekleşen apoptotik hücre ölümünün SIRT1-bağımsız olabileceğini göstermektedir.

Akış sitometrik analiz sonuçlarına göre HCT116^{p53(+/-)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücreleri arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada resveratrol uygulaması ile apoptotik hücre yüzdesinin $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı, ardışık uygulama ile apoptotik hücre yüzdesinin $p=0.0005$ düzeyinde anlamlı fark saptandı. HCT116^{p53(+/-)} hücrelerinde apoptotik hücre yüzdelерinin daha yüksek olduğu belirlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda verilerimiz, gerçekleşen apoptotik hücre ölümünün p53 bağımlı olabileceğini göstermektedir.

4.9. Gerçek Zamanlı PZR analizleri

4.9.1. cDNA sentezinin Kontrolü

β -Aktin genine ait primer setinin kullanılması sonucu örneklerimizin cDNA sentezinin yeterli oranda gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi. Döngü sayısı 25'in altında belirlendiğinden örnek genleri ile housekeeping genler arasında karşılaştırma yapılabilecek düzeyde cDNA elde edildiği saptandı (Şekil 36).



Şekil 36. Gen amplifikasyon eğrisi örnek gösterimi (β -Aktin).

4.9.2. Sinyal İleti Yolak Genlerinin mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} kolon kanser hücrelerinde K (Kontrol), S (Sirtinol 80 µM, 24 sa.), R (Resveratrol 60 µM, 24 sa.), S+R (Sirtinol 80 µM, 24 sa. + Resveratrol 60 µM, 24 sa.) koşullarında mRNA ekspresyon seviyeleri incelendi.

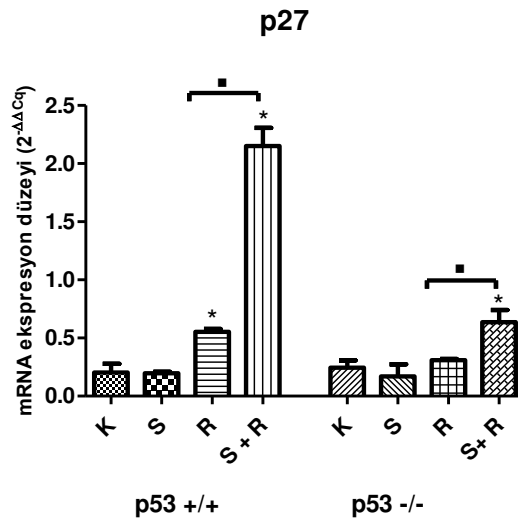
4.9.2.1. TGF-β Yolak Genleri

4.9.2.1.1 P27 mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında Resveratrol (R) ile p=0.0016 düzeyinde anlamlı ve Sirtinol + Resveratrol (S+R) grubunda p<0.0001 düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da p<0.0001 düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında, R uygulaması ile gen ekspresyon düzeyinde p=0.1484 düzeyinde anlamlı bir fark görülmezken, S+R uygulaması ile p=0.0052 düzeyinde anlamlı artış saptandı. R ve S+R grupları arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada, p=0.0059 düzeyinde anlamlı artış gözlemlendi.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerindeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında p<0.0001, S+R grupları arasında ise p=0.0002 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (Şekil 37).



Şekil 37. P27 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * p< 0.05 istatistiksel olarak anlamlı) (R vs S+R ■ p< 0.05 istatistiksel olarak anlamlı).

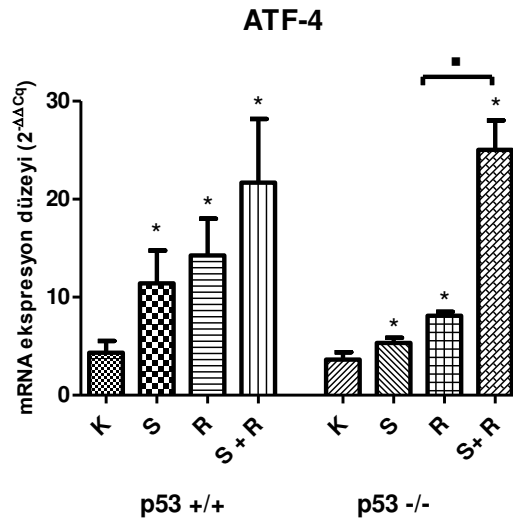
Sonuç: P27 gen ekspresyonunun HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde daha etkin bir şekilde arttığı belirlendi. Belirlenen artış p53 ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı olarak değerlendirildi. (Tablo 6).

4.9.2.1.2. ATF-4 mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında R ile p=0.0119 düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda p=0.0105 düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da p=0.1621 düzeyinde anlamlı fark gözlenmedi.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile p=0.0008 düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda p=0.0003 düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da p=0.0006 düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerindeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında p=0.0475 düzeyinde anlamlı fark saptanırken, S+R grupları arasında ise p=0.4636 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Şekil 38).



Şekil 38. ATF4 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * p< 0.05 istatistiksel olarak anlamlı) (R vs S+R ■ p< 0.05 istatistiksel olarak anlamlı).

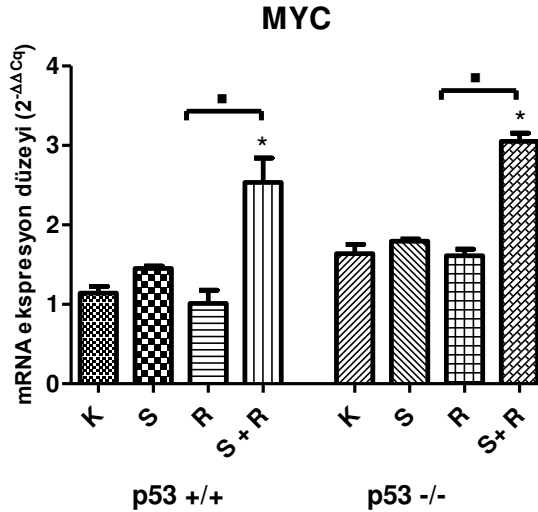
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde resveratrol uygulaması ATF4 gen ekspresyonunu daha etkin bir şekilde artırırken, HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde, SIRT1 inhibisyonu ile ATF4 gen ekspresyonunu daha etkin bir şekilde arttırdı. Resveratrolün ATF4 gen ekspresyonunu p53 ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı olarak arttırdığı saptandı (Tablo 6).

4.9.2.1.3. MYC mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R grubu ile p=0.2885 düzeyinde anlamlı fark saptanmazken, S+R grubunda p=0.0016 düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da p=0.0017 düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile p=0.7674 düzeyinde anlamlı fark saptanmazken ve S+R grubunda p<0.0001 düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da p<0.0001 düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında p=0.005 düzeyinde anlamlı fark saptanırken, S+R grupları arasında ise p=0.0507 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Şekil 39).



Şekil 39. MYC mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır). (Kontrol vs S, R, S+R * p< 0.05 istatistiksel olarak anlamlı) (R vs S+R ■ p< 0.05 istatistiksel olarak anlamlı).

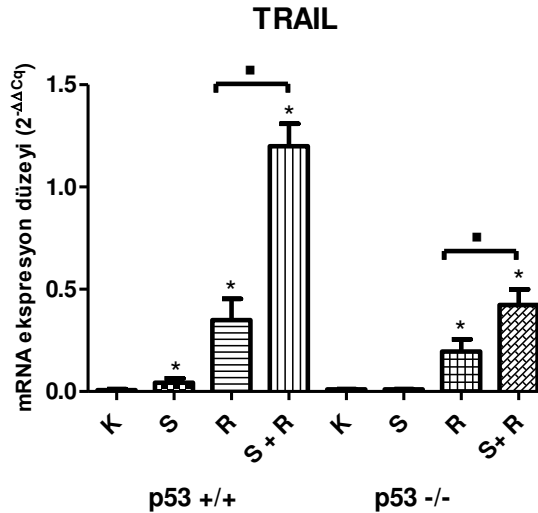
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde resveratrol uygulaması ile anlamlı bir değişim gözlenmemesine rağmen SIRT1'in inhibisyon durumunda MYC gen ekspresyonu anlamlı olarak artış göstermiştir. Resveratrolün p53 bağımsız ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı olarak MYC gen ekspresyonunda değişim gösterdiği belirlendi (Tablo 6).

4.9.2.1.4. TRAIL mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R grubu ile $p=0.0047$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0006$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0062$ düzeyinde anlamlı artış ve S+R grubunda $p=0.0007$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0149$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.0903$ düzeyinde anlamlı bir fark saptanmazken, S+R grupları arasında ise $p=0.0005$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 40).



Şekil 40. TRAIL mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır)(Kontrol vs S, R, S+R * $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

Sonuç: Resveratrolün ve SIRT1 inhibisyonunun iki hücre hattında da anlamlı olarak TRAIL gen ekspresyonunu arttırdığı ve buna bağlı olarak p53 bağımsız ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı olarak etki gösterdiği saptandı (Tablo 6).

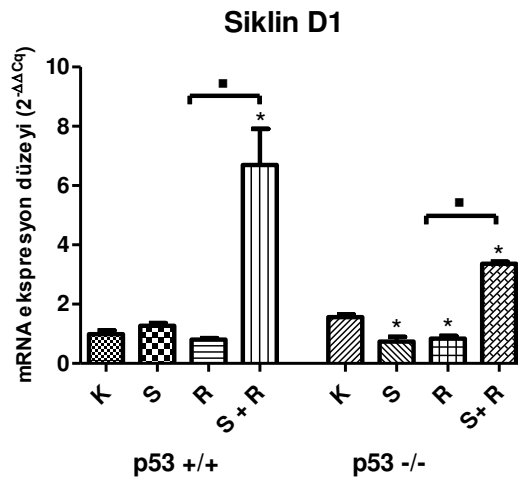
4.9.2.2. WNT yolak genleri

4.9.2.2.1. Siklin D1 mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile p=0.0709 düzeyinde anlamlı fark saptanmazken ve S+R grubunda p=0.0013 düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da p=0.0011 düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile p=0.0007 düzeyinde anlamlı azalma ve S+R grubunda p<0.0001 düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da p<0.0001 düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/-)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında p=0.6289 düzeyinde anlamlı fark saptanmazken, S+R grupları arasında ise p=0.0090 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 41).



Şekil 41. Siklin D1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * p< 0.05 istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ p< 0.05 istatistiksel olarak anlamlı).

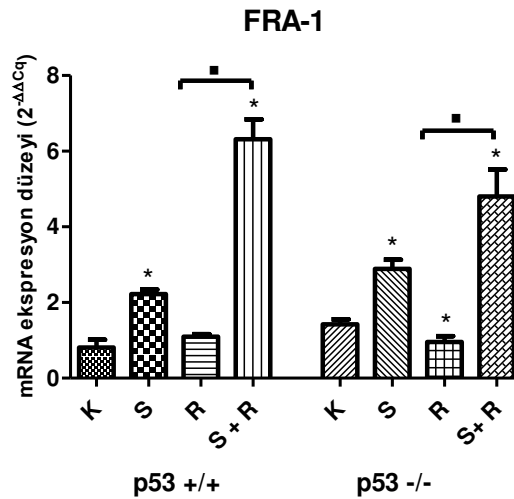
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde Siklin D1 gen ekspresyonunu resveratrol uygulaması ile anlamlı olarak değiştirmedeği ancak SIRT1 inhibisyonu ile arttırdığı belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise, resveratrol uygulaması ile Siklin D1 gen ekspresyonu azalmış, SIRT1 inhibisyonuyla artış göstermiştir. Bu şekilde, resveratrolün p53 bağımsız ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.2.2. *FRA-1 mRNA Ekspresyonu*

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0900$ düzeyinde anlamlı fark saptanmazken ve S+R grubunda $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0157$ düzeyinde anlamlı azalma ve (S+R) grubunda $p=0.0013$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0008$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerindeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.2256$ düzeyinde anlamlı fark saptanmazken, S+R grupları arasında ise $p=0.0411$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 42).



Şekil 42. FRA-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır)(Kontrol vs S, R, S+R * $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

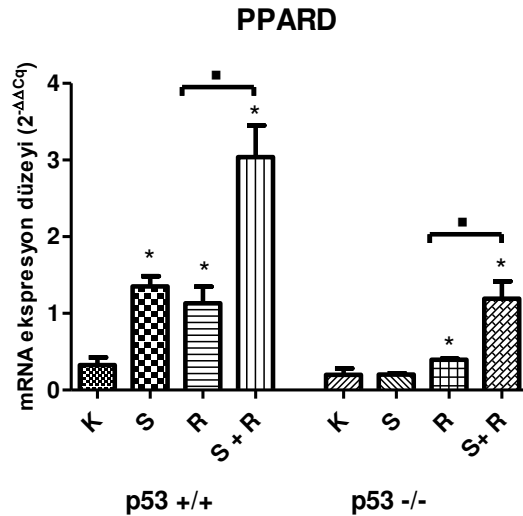
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde FRA-1 gen ekspresyonunu resveratrol uygulaması ile anlamlı olarak değiştirmedeği ancak SIRT1 inhibisyonu ile arttırdığı belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise, resveratrol uygulaması ile FRA-1 gen ekspresyonu azalmış, SIRT1 inhibisyonuyla artış göstermiştir. Bu şekilde, resveratrolün p53 bağımsız ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.2.3. PPARD mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0044$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0004$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0021$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0158$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0020$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0036$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerindeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.0043$ düzeyinde anlamlı, S+R grupları arasında ise $p=0.0025$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 43).



Şekil 43. PPAR δ mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama $\pm$ Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır)(Kontrol vs S, R, S+R * $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R $\cdot p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

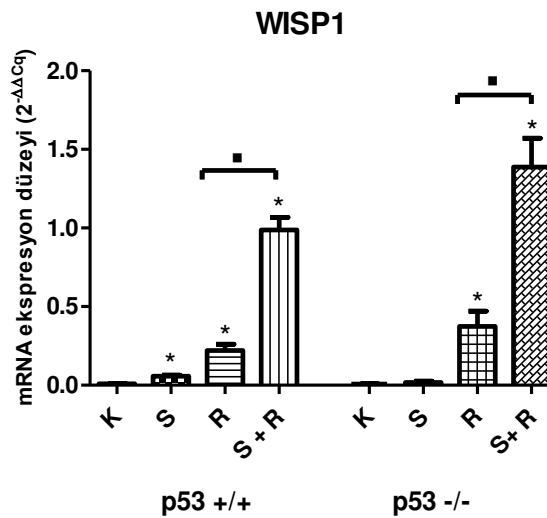
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde PPAR δ gen ekspresyonunu resveratrol uygulaması ile anlamlı olarak arttırdığı aynı zamanda SIRT1 inhibisyonu ile de arttırdığı belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde de gen ekspresyonundaki artış benzer olmakla birlikte HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde SIRT1 inhibisyonu ile daha fazla artış gözlemlendi. Bu şekilde, resveratrolün p53 bağımlı ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.2.4. WISP1 mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0008$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0001$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0029$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0002$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0011$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.0661$ düzeyinde anlamlı fark saptanmazken, S+R grupları arasında ise $p=0.0257$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 44).



Şekil 44. WISP1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ▪ $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde WISP1 gen ekspresyonunu resveratrol uygulaması ile anlamlı olarak arttırdığı aynı zamanda SIRT1 inhibisyonu ile de arttırdığı belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde de gen ekspresyonundaki artış benzer olmakla birlikte bu hücrelerde resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile daha fazla artış gözlemlendi. Bu şekilde, resveratrolün p53 bağımlı ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etki gösterdiği saptandı (Tablo 6).

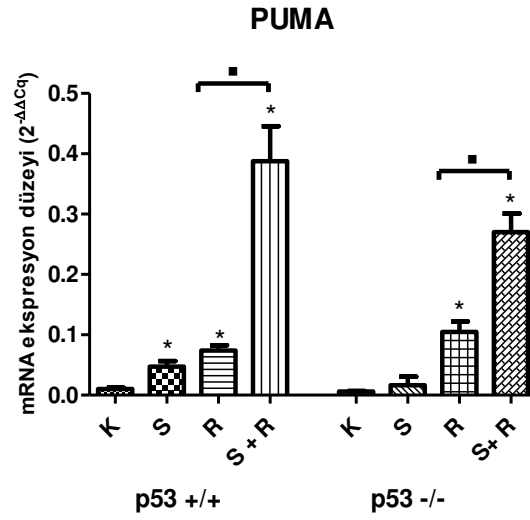
4.9.2.3. P53 Yolak Genleri

4.9.2.3.1. PUMA mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0002$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $P=0.0004$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0007$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0006$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0013$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.0530$ düzeyinde anlamlı fark saptanmazken, S+R grupları arasında ise $p=0.0361$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (Şekil 45).



Şekil 45. PUMA mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır)(Kontrol vs S, R, S+R * $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

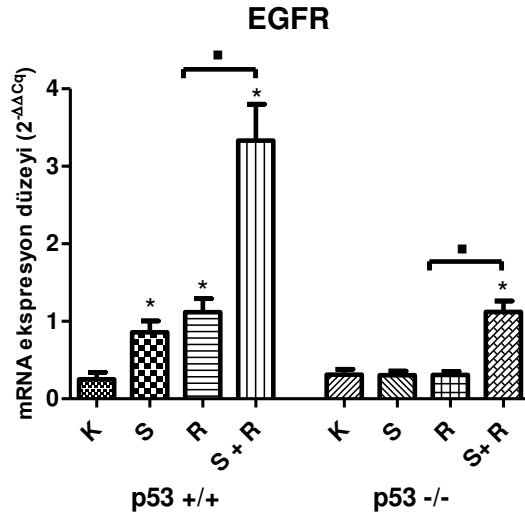
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde resveratrolün PUMA gen ekspresyonunu anlamlı olarak arttırdığı aynı zamanda SIRT1 inhibisyonu ile de arttırdığı belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde de gen ekspresyonundaki artışın benzer olduğu gözlemlendi. Bu şekilde, resveratrolün p53 bağımsız ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı(Tablo 6).

4.9.2.3.2. EGFR mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0016$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0004$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0016$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.9691$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0009$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0007$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.0015$ düzeyinde anlamlı, S+R grupları arasında ise $p=0.0015$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 46).



Şekil 46. EGFR mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır)(Kontrol vs S, R, S+R * $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

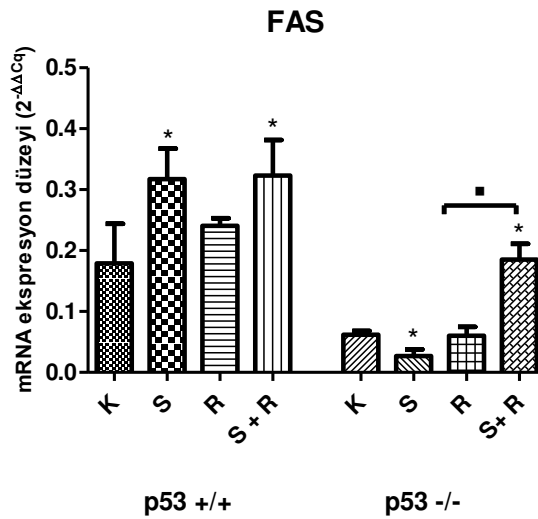
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde EGFR gen ekspresyonunu resveratrol uygulaması ile anlamlı olarak arttırdığı aynı zamanda SIRT1 inhibisyonu ile de arttırdığı belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde resveratrol uygulaması ile anlamlı bir değişim gözlenmezken SIRT1 inhibisyonu ile gen ekspresyonu artışı belirlendi. HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde SIRT1 inhibisyonu ile daha fazla artış gözlemlendi. Bu şekilde, resveratrolün p53 bağımlı ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.3.3. FAS mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.1825$ düzeyinde anlamlı fark saptanmazken ve S+R grubunda $p=0.0464$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada $p=0.0758$ düzeyinde anlamlı bir fark görülmedi.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.8638$ düzeyinde anlamlı bir fark saptanmazken, S+R grubunda $p=0.0013$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0006$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı fark ve S+R grupları arasında ise $p=0.0202$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 47).



Şekil 47. FAS mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır)(Kontrol vs S, R, S+R * $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde FAS gen ekspresyonunun resveratrol uygulaması ile anlamlı bir değişim göstermediği SIRT1 inhibisyonu ile arttığı belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde de gen ekspresyonundaki artış benzer şekilde gözlenmesine rağmen, gen

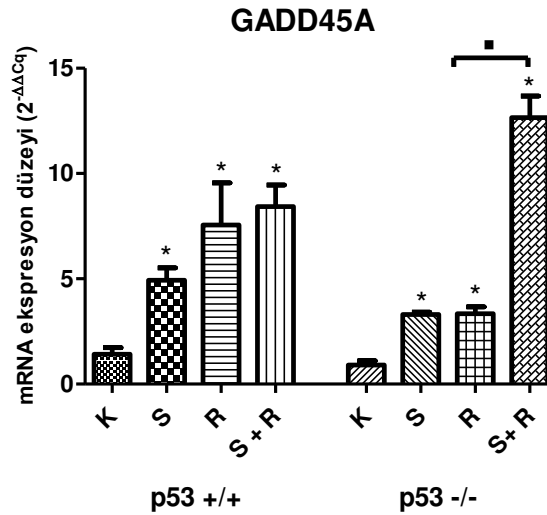
ekspresyon seviyeleri HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde daha yüksek olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 bağımlı ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.3.4. GADD45A mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0064$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0004$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.5374$ düzeyinde anlamlı fark saptanmadı.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0004$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0001$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.0232$ düzeyinde anlamlı fark, S+R grupları arasında ise $p=0.0074$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 48).



Şekil 48. GADD45A mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi.(Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

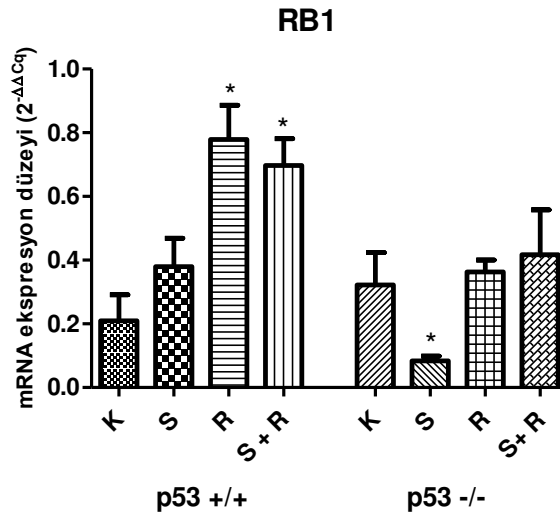
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde GADD45A gen ekspresyonunun resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu anlamlı artış gösterdiği belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde de gen ekspresyonundaki artış benzer şekilde gözlemlendi. Bu hücrelerde resveratrolün SIRT1 inhibisyonu ile daha belirgin bir artışa sebep olduğu saptandı. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 bağımlı ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.3.5. RB1 mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0018$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0020$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.3561$ düzeyinde anlamlı bir fark saptanmadı.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.5470$ düzeyinde ve S+R grubunda $p=0.3944$ düzeyinde anlamlı bir fark gözlenmedi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.5521$ düzeyinde anlamlı bir fark saptanmadı.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerindeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.0031$ düzeyinde anlamlı fark, S+R grupları arasında ise $p=0.0417$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 49).



Şekil 49. RB1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R * $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

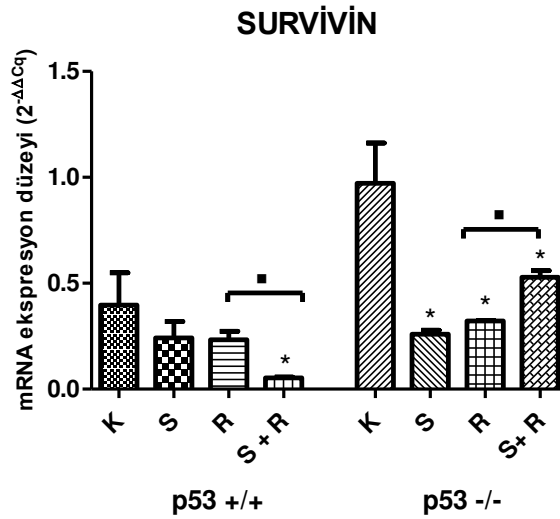
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde RB1 gen ekspresyonunun resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde gen ekspresyonunda anlamlı bir değişim gözlenmedi. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 bağımlı ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.3.6. *SURVIVIN mRNA Ekspresyonu*

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.1448$ düzeyinde anlamlı fark saptanmazken S+R grubunda $p=0.0173$ düzeyinde anlamlı olarak azalma belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0014$ düzeyinde anlamlı azalma görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0041$ düzeyinde anlamlı azalma ve S+R grubunda $p=0.0163$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0003$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerindeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.0172$ düzeyinde anlamlı fark, S+R grupları arasında ise $p<0.0001$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 50).



Şekil 50. Survivin mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır)(Kontrol vs S, R, S+R * $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde resveratrolün ve SIRT1 inhibisyonu ile uygulamasının survivin gen ekspresyonunu anlamlı olarak azalttığı belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde de resveratrol uygulaması ile gen ekspresyonunda azalma görülmesine karşın, resveratrolün SIRT1 inhibisyonu ile uygulaması sonrası ekspresyon artışı saptandı. Bu sonuçlara göre,

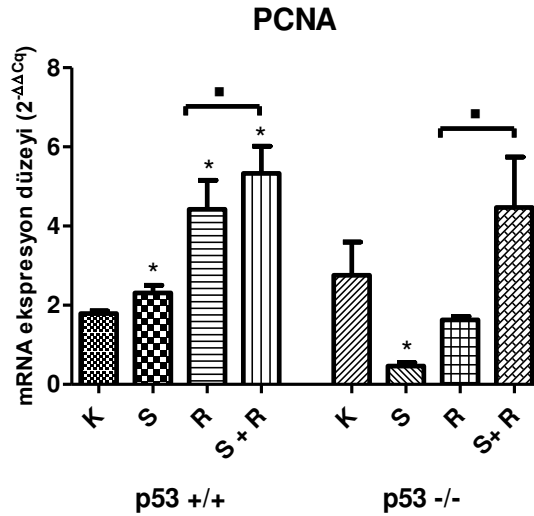
resveratrolün survivin gen ekspresyonu üzerindeki etkisinin p53 bağımsız ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.3.7. PCNA mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile p=0.0034 düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda p=0.0009 düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da p=0.1947 düzeyinde anlamlı fark görülmedi.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile p=0.0812 düzeyinde ve S+R grubunda p=0.1239 düzeyinde anlamlı fark saptanmadı. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada p=0.0184 düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında p=0.0028 düzeyinde anlamlı fark saptanırken, S+R grupları arasında ise p=0.3641 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Şekil 51).



Şekil 51. PCNA mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * p< 0.05 istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ p< 0.05 istatistiksel olarak anlamlı).

Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde PCNA gen ekspresyonunun resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile gen ekspresyonunda anlamlı bir değişim gözlenmemesine rağmen resveratrolün tek ve SIRT1 inhibisyonu ile uygulamaları

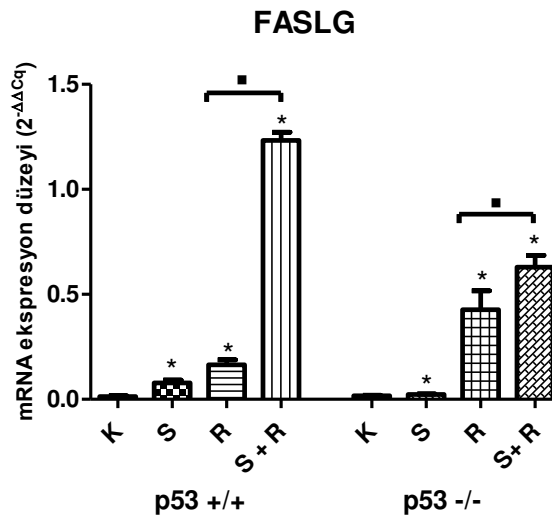
karşılaştırıldığında anlamlı olarak gen ekspresyonu artışı saptandı. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 bağımlı ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.3.8. FASLG mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile p=0.0004 düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda p<0.0001 düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da p<0.0001 düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile p=0.0014 düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda p<0.0001 düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da p=0.0304 düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında p=0.0080 düzeyinde anlamlı fark, S+R grupları arasında ise p=0.0001 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 52)



Şekil 52. FASLG mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * p< 0.05 istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ p< 0.05 istatistiksel olarak anlamlı).

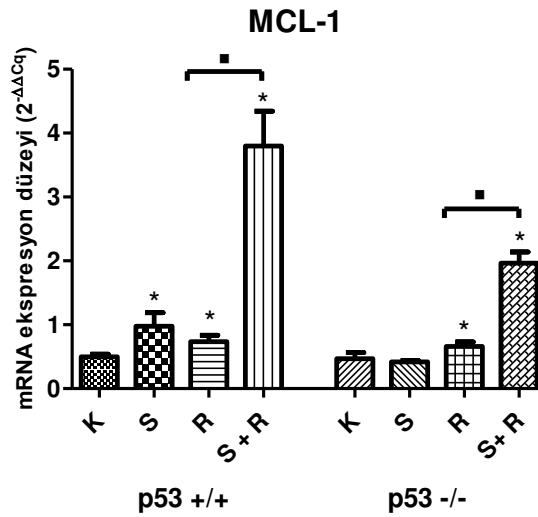
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde FASLG gen ekspresyonunun resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde de gen ekspresyonunda anlamlı artış gözlemlendi. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 bağımsız ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.3.9. MCL-1 mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0176$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0005$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0007$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0497$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0002$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0003$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.3374$ düzeyinde anlamlı fark saptanmazken, S+R grupları arasında ise $p=0.0052$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 53).



Şekil 53. MCL-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

Sonuç: Her iki hücre hattında da MCL-1 gen ekspresyonunun resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği belirlendi. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 bağımsız ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

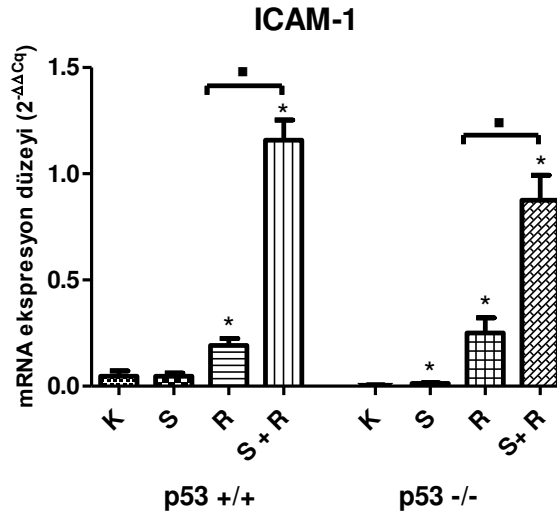
4.9.2.4. NF- κ B Yolak Genleri

4.9.2.4.1. ICAM-1 mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0036$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0039$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0002$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0014$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.2614$ düzeyinde anlamlı fark saptanmazken, S+R grupları arasında ise $p=0.0318$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 54).



Şekil 54. ICAM-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

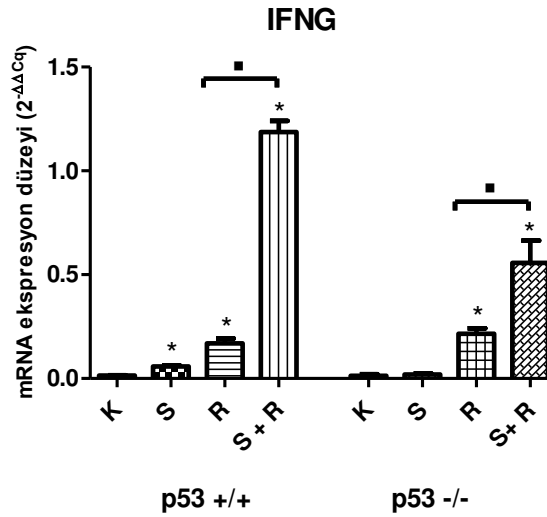
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde ICAM1 gen ekspresyonunun resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde de aynı şekilde anlamlı artış gözlemlendi. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 bağımsız ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.4.2. IFNG mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0003$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0002$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0009$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0059$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.0848$ düzeyinde anlamlı fark saptanmazken, S+R grupları arasında ise $p=0.0008$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 55).



Şekil 55. IFNG mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

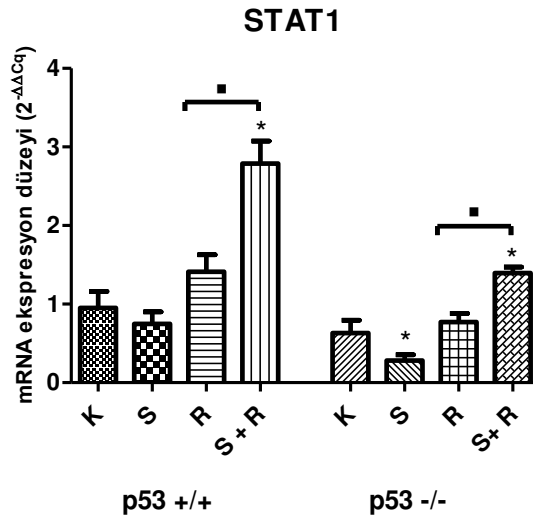
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde IFNG gen ekspresyonunun resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde de resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile gen ekspresyonunda anlamlı artış belirlendi. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 bağımsız ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.4.3. STAT1 mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0567$ düzeyinde anlamlı fark saptanmazken, S+R grubunda $p=0.0009$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0027$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.2813$ düzeyinde anlamlı fark saptanmazken, S+R grubunda $p=0.0019$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0013$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.0100$ düzeyinde anlamlı fark, S+R grupları arasında ise $p=0.0013$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 56).



Şekil 56. STAT1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

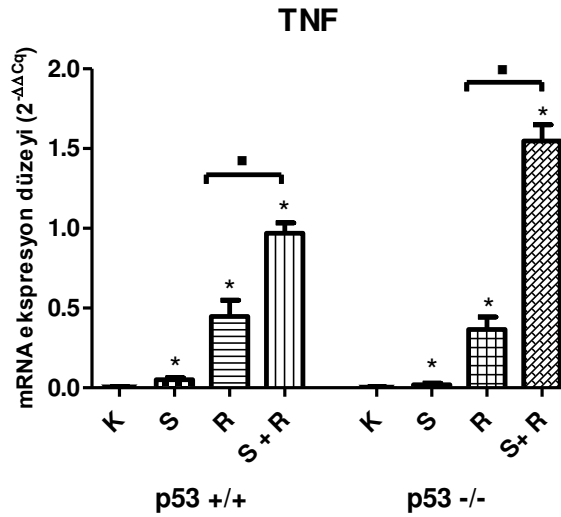
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde STAT1 gen ekspresyonunun resveratrol uygulaması ile anlamlı bir değişim göstermediği, SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde de aynı şekilde gen ekspresyon değişimi gözlemlendi. HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde resveratrolün SIRT1 inhibisyonu ile gen ekspresyon seviyesini daha fazla arttırdığı belirlendi. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.4.4. TNF mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0016$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0017$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0013$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerindeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.3315$ düzeyinde anlamlı fark saptanmazken, S+R grupları arasında ise $p=0.0011$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 57).



Şekil 57. TNF mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde TNF gen ekspresyonunun resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde de aynı şekilde gen ekspresyon değişimi gözlemlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde resveratrolün SIRT1 inhibisyonu ile gen ekspresyon seviyesini daha fazla arttırdığı belirlendi. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 bağımsız ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

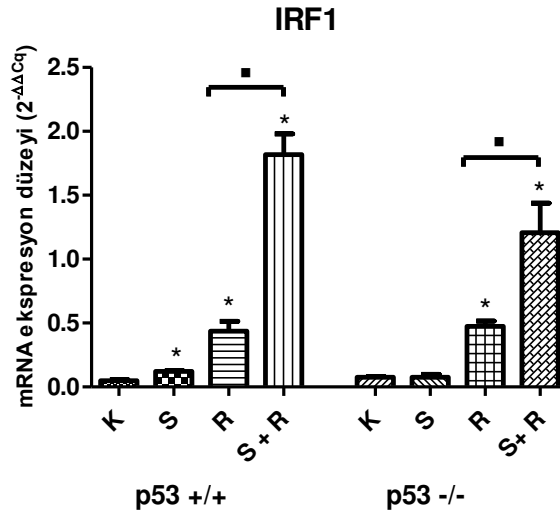
4.9.2.5. JAK/STAT Yolak Genleri:

4.9.2.5.1. IRF1 mRNA Ekspresyonu:

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0016$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0002$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0010$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0055$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.4845$ düzeyinde anlamlı fark saptanmazken, S+R grupları arasında ise $p=0.0196$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 58).



Şekil 58. IRF1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

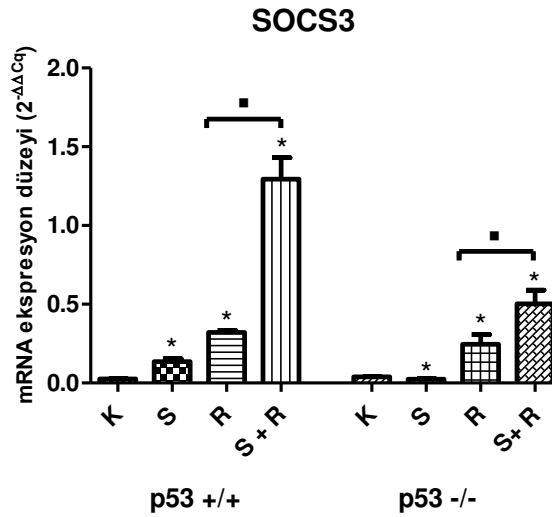
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde IRF1 gen ekspresyonunun resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde de aynı şekilde gen ekspresyon değişimi gözlemlendi. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 bağımsız ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.5.2. SOCS3 mRNA ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0003$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0044$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0007$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0136$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerindeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.1073$ düzeyinde anlamlı bir fark saptanmazken, S+R grupları arasında $p=0.0011$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 59).



Şekil 59. SOCS3 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

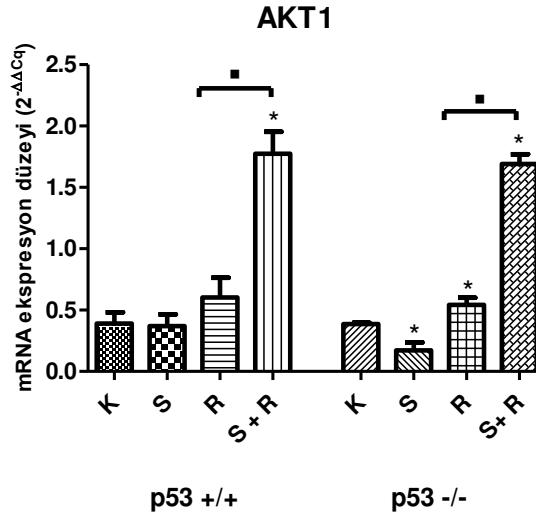
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde SOCS3 gen ekspresyonunun resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde de aynı şekilde gen ekspresyon değişimi gözlemlendi. HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde resveratrolün SIRT1 inhibisyonu ile gen ekspresyon seviyesini daha fazla arttırdığı belirlendi. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 bağımsız ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.5.3. AKT1 mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.1164$ düzeyinde anlamlı fark gözlenmezken, S+R grubunda $p=0.0003$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0011$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0095$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerindeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.5705$ düzeyinde ve S+R grupları arasında $p=0.4939$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Şekil 60).



Şekil 60. AKT1 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

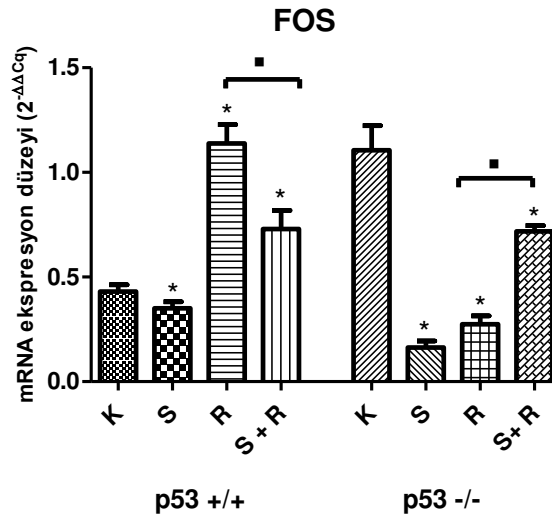
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde AKT1 gen ekspresyonunun Resveratrol uygulaması ile anlamlı bir değişim göstermediği, SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde Resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği saptandı. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 bağımsız ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.5.4. FOS mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0002$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0055$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0048$ düzeyinde anlamlı azalma görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0003$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0052$ düzeyinde anlamlı azalma belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.0001$ düzeyinde anlamlı fark saptanırken, S+R grupları arasında ise $p=0.8476$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Şekil 61).



Şekil 61. FOS mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

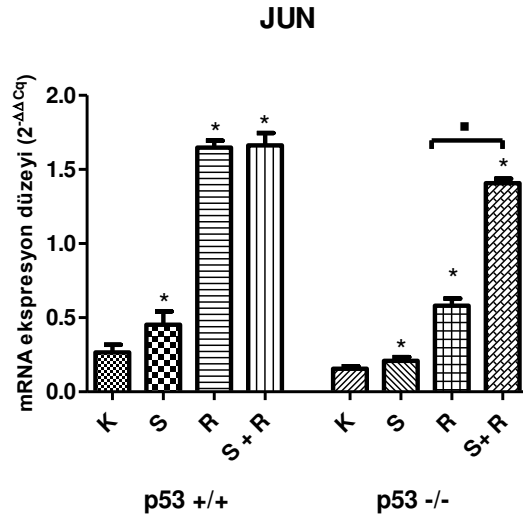
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde FOS gen ekspresyonunun resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı olarak azalma gösterdiği ancak gen ekspresyon düzeyinin resveratrolün SIRT1 inhibisyonu ile arttığı saptandı. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 bağımlı ve SIRT1 inhibisyonu bağımsız etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.5.5. JUN mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.8118$ düzeyinde anlamlı fark saptanmadı.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0001$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerindeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı, S+R grupları arasında ise $p=0.0076$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 62).



Şekil 62. JUN mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı), (R vs S+R ■ $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı).

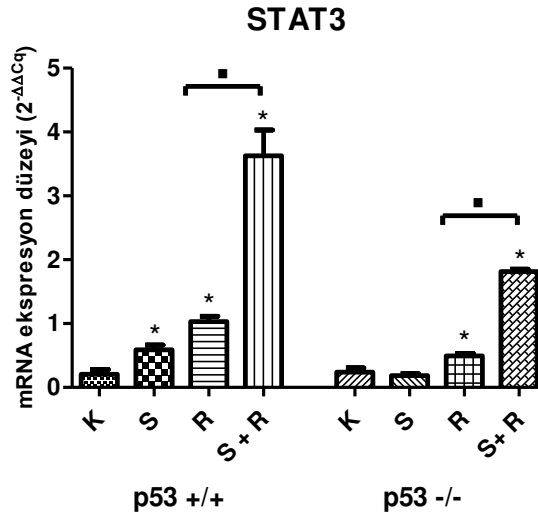
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde JUN gen ekspresyonunun resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği ancak bu artışın SIRT1 inhibisyonuna bağımlı olmadığı belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği saptandı. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.5.6. STAT3 mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0002$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0004$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0056$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.0006$ düzeyinde anlamlı, S+R grupları arasında ise $p=0.0015$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi (Şekil 63).



Şekil 63. STAT3 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±SD, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) Kontrol vs S, R, S+R * $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı R vs S+R ■ $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı.

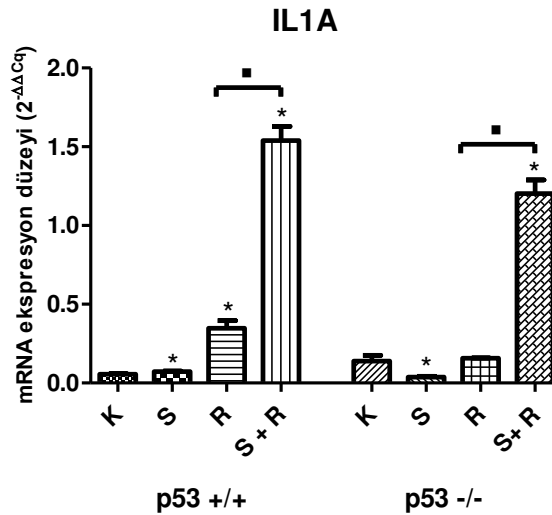
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde STAT3 gen ekspresyonunun resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde de resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği ancak HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde resveratrolün SIRT1 inhibisyonu ile gen ekspresyonunda daha fazla artışa neden olduğu saptandı. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.5.7. IL1A mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0005$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.4472$ düzeyinde anlamlı fark saptanmazken, S+R grubunda $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p<0.0001$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.0024$ düzeyinde anlamlı, S+R grupları arasında ise $p=0.0092$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (Şekil 64).



Şekil 64. IL-1A mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±SD, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) Kontrol vs S, R, S+R * $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı R vs S+R ■ $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı.

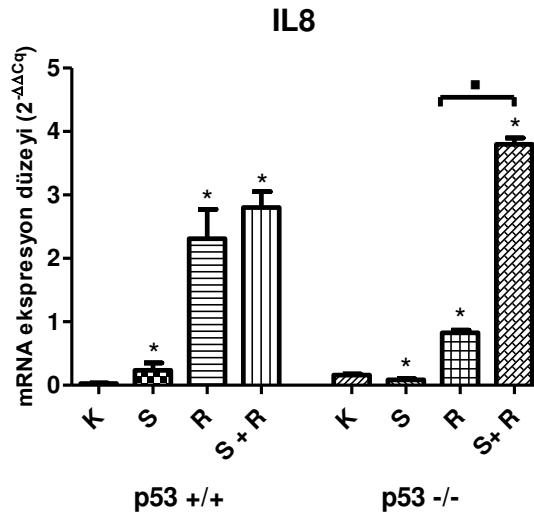
Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde IL1A gen ekspresyonunun resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise, resveratrol uygulaması ile anlamlı değişim gözlenmezken, SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği ancak HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde resveratrolün SIRT1 inhibisyonu ile gen ekspresyonunda daha fazla artışa neden olduğu saptandı. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

4.9.2.5.8. IL8 mRNA Ekspresyonu

HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0119$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0105$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada $p=0.1621$ düzeyinde anlamlı bir fark saptanmadı.

HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde ise; kontrol ile kıyaslandığında R ile $p=0.0008$ düzeyinde anlamlı ve S+R grubunda $p=0.0003$ düzeyinde anlamlı artış belirlendi. R grubu ile S+R grubu arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada da $p=0.0006$ düzeyinde anlamlı artış görüldü.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerdeki tüm grupların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması sonucunda R grupları arasında $p=0.0475$ düzeyinde anlamlı fark saptanırken, S+R grupları arasında ise $p=0.4636$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Şekil 65).



Şekil 65. IL-8 mRNA ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi. (Ortalama±Standart Hata, her koşul 3 kez tekrarlanmıştır) (Kontrol vs S, R, S+R * $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı)(R vs S+R ■ $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı)

Sonuç: HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde IL-8 gen ekspresyonunun Resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği belirlendi. HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde de Resveratrol uygulaması ve SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı artış gösterdiği saptandı. Ancak HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde resveratrolün SIRT1 inhibisyonu ile gen ekspresyonunda daha fazla artışa neden olduğu saptandı. Bu sonuçlara göre, resveratrolün p53 ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı etkisi saptandı (Tablo 6).

Tablo 6. mRNA kat değişimleri

Sinyal İleti Yolakları	P53 +/+ hücreleri (kontrolle göre kat değişim)			P53 -/- hücreleri (kontrolle göre kat değişim)			
TGFβ Yolağı	Kontrol p53 +/+	P53+/ SIRT1+	P53+/ SIRT1-	Kontrol p53 -/-	P53-/ SIRT1+	P53- / SIRT1-	Resveratrolün P53 ve SIRT1 bağımlılığı
P27	0.2	(0.5)↑	(2.1)↑	0.25	(0.3)↔	(0.64)↑	P53 bağımlı artış SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
ATF4	4.35	(14.3)↑	(21.2)↑	3.64	(8.1)↑	(25.0)↑	P53 bağımlı artış SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
MYC	1.14	(1.01)↔	(2.5)↑	1.64	(1.61)↔	(3.0)↑	P53 bağımsız artış SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
TRAIL	0.01	(0.3)↑	(1.2)↑	0.01	(0.2)↑	(0.42)↑	P53 bağımsız SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
WNT Yolağı	Kontrol p53 +/+	P53+/ SIRT1+	P53+/ SIRT1-	Kontrol p53 -/-	P53-/ SIRT1+	P53- / SIRT1-	Resveratrolün P53 ve SIRT1 bağımlılığı
SİKLİN D1	0.99	(0.81)↔	(6.7)↑	1.56	(0.84)↓	(3.36)↑	P53 bağımsız SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
FRA-1	0.81	(1.09)↔	(6.3)↑	1.42	(0.96)↓	(4.80)↑	P53 bağımsız SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
PPARD	0.33	(1.1)↑	(3.0)↑	0.2	(0.39)↑	(1.2)↑	P53 bağımlı artış SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
WISP	0.01	(0.2)↑	(1.0)↑	0.01	(0.4)↑	(1.4)↑	P53 bağımlı artış SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
P53 Yolağı	Kontrol p53 +/+	P53+/ SIRT1+	P53+/ SIRT1-	Kontrol p53 -/-	P53-/ SIRT1+	P53- / SIRT1-	Resveratrolün P53 ve SIRT1 bağımlılığı
PUMA	0.01	(0.1)↑	(0.4)↑	0.01	(0.1)↑	(0.3)↑	P53 bağımsız SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
EGFR	0.25	(1.1)↑	(3.3)↑	0.31	(0.31)↔	(1.1)↑	P53 bağımlı artış SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
FAS	0.18	(0.24)↔	(0.3)↑	0.06	(0.06)↔	(0.2)↑	P53 bağımlı artış SIRT1 inhibisyonu

							bağımlı artış
GADD45A	1.41	(7.5)↑	(8.4)↑	0.91	(3.3)↑	(12.6)↑	P53 bağımlı artış SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış.
RB1	0.21	(0.8)↑	(0.7)↑	0.32	(0.36)↔	(0.42)↔	P53 bağımlı artış SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
SURVİVİN	0.4	(0.23)↔	(0.05)↓	0.97	(0.3)↓	(0.5)↓	P53 bağımsız SIRT1 inhibisyonu bağımlı azalış
PCNA	1.79	(4.4)↑	(5.3)↑	2.76	(1.6)↓	(4.5)↑	P53 bağımlı artış SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
FASLG	0.01	(0.2)↑	(1.2)↑	0.02	(0.4)↑	(0.6)↑	P53 bağımsız SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
MCL-1	0.5	(0.7)↑	(3.8)↑	0.47	(0.7)↑	(2.0)↑	P53 bağımsız SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
NFκB Yolağı	Kontrol p53 +/-	P53+/ SIRT1+	P53+/ SIRT1-	Kontrol p53 -/-	P53-/ SIRT1+	P53- / SIRT1-	Resveratrolün P53 ve SIRT1 bağımlılığı
ICAM-1	0.05	(0.2)↑	(1.2)↑	0.01	(0.2)↑	(0.9)↑	P53 bağımsız SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
IFNG	0.01	(0.2)↑	(1.2)↑	0.01	(0.2)↑	(0.6)↑	P53 bağımsız SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
STAT1	0.95	(1.41)↑	(2.8)↑	0.63	(0.77)↔	(1.4)↑	P53 bağımlı artış SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
TNF	0.01	(0.4)↑	(1.0)↑	0.01	(0.4)↑	(1.5)↑	P53 bağımsız SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
JAK/STAT Yolağı	Kontrol p53 +/-	P53+/ SIRT1+	P53+/ SIRT1-	Kontrol p53 -/-	P53-/ SIRT1+	P53- / SIRT1-	Resveratrolün P53 ve SIRT1 bağımlılığı
IRF-1	0.05	(0.4)↑	(1.8)↑	0.08	(0.5)↑	(1.21)↑	P53 bağımsız SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış

SOCS3	0.03	(0.3)↑	(1.29)↑	0.04	(0.2)↑	(0.5)↑	P53 bağımsız SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
AKT1	0.39	(0.6)↔	(1.8)↑	0.39	(0.5)↔	(1.7)↑	P53 bağımsız SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
FOS	0.43	(1.1)↑	(0.7)↑	1.11	(0.3)↓	(0.7)↓	P53 bağımlı artış SIRT1 inhibisyonu bağımsız
JUN	0.27	(1.6)↑	(1.7)↑	0.16	(0.6)↑	(1.4)↑	P53 bağımlı artış SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
STAT3	0.21	(1.0)↑	(3.6)↑	0.24	(0.5)↑	(1.8)↑	P53 bağımlı artış SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
IL1A	0.06	(0.3)↑	(1.5)↑	0.14	(0.16)↔	(1.2)↑	P53 bağımlı SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış
IL8	0.03	(2.3)↑	(2.8)↑	0.16	(0.8)↑	(3.8)↑	P53 bağımlı artış SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış

5. TARTIŞMA

p53; hücrenin DNA hasarında hücre döngüsünü durduran ve hücreye DNA tamiri için süre tanıyan bir molekül olarak tanımlanmaktadır. DNA hasarı tamir edilemez düzeyde ise p53 hücreyi apoptotik ölüme yönlendirerek hasarlı hücrelerin çoğalmasını engelleyen bir protein olarak fonksiyon görmektedir. p53'ün fonksiyonunu kaybetmesi, hasarlı DNA ve kanser hücresi özelliğini taşıyan hücrenin bölünmesi ile sonuçlanır. p53 mutasyonlarının farklı tipleri, invazif derinlik, metastatik bölge ve aynı zamanda hastaların prognozu gibi kolorektal kanserin biyolojik davranışının belirlenmesinde büyük bir önem taşımaktadır. p53 mutasyonları proksimal kolon kanserlerinde lenfatik invazyonla ilişkilidir ve distal kolorektal kanserde hem lenfatik hem de vasküler invazyonla anlamlı korelasyon göstermektedir (33). Mutant p53 taşıyan kolorektal kanser hastalarının yabanıl-tip p53 taşıyanlara göre daha kötü prognoz ve kemoterapiye daha dirençli olduğu bildirilmiştir (34). Kolon kanserlerinde prognozu belirleyen molekül olarak p53'ün yanı sıra, SIRT1'in de önemli olduğu vurgulanmaktadır. Stunkel ve ark. (138) SIRT1'in incelenen diğer kanser hücre hatlarına göre en yüksek mRNA ekspresyon seviyesini HCT116 ve SW620 kolon kanser hücre hatlarında belirlemişlerdir.

Kabra ve ark.'nın (54) yapmış olduğu çalışmada, SIRT1'in HCT116 hücrelerinde overekspresye olduğu durumda tümör oluşumunu inhibe ettiği, siRNA ile susturumunda ise tümör oluşum potansiyelini arttırıcı etkisinin bulunduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda SIRT1 inhibisyonu ile hücrelerin kemoterapi ilaçları tarafından apoptoza duyarlı hale getirildiği belirtilmektedir. Kolon mukozasında yapılan çalışmalar; normal mukozada ve benign adenomalarda immünohistokimyasal boyama ile yüksek SIRT1 seviyelerinin bulunduğunu, SIRT1 overekspresyonun evre I/II/III kolorektal adenokarsinomaların yaklaşık %25'inde ve ileri evre IV tümörlerinde de nadir olarak bulunduğunu, karsinomaların %30'unda da normalden düşük SIRT1 ekspresyonu olduğunu göstermiştir (54). Bu araştırmada SIRT1'in farklı etkileri olabileceği vurgulanmaktadır. Bu sonuçlar ışığında kolon kanserinin önlenmesi ve tedavisinde SIRT1 aktivatörleri ve inhibitörlerinin kullanımının önemi ortaya konmuş ancak SIRT1'in fonksiyonu açısından belirsizlik bulunduğu da gündeme gelmiştir (139,140). SIRT1 fonksiyonunu belirlemek amacıyla, SIRT1'in HCT116^{p53(+/-)} hücrelerinde siRNA ile susturulması sonucunda apoptotik hücre ölümünde artış saptanmış ve SIRT1'in p53, Bax ve kaspaz-2 ile birlikte Bcl-2 bağımsız olarak apoptotik yolağı düzenlediği bildirilmiştir (141).

SIRT1'in rolünü açıklayabilecek bir diğer yol olarak SIRT1'e spesifik inhibitörlerin kullanılması önerilmektedir. SIRT1 inhibitörlerinden sirtinol, MCF-7 meme kanseri ve H1299 akciğer kanseri hücre hatlarında senesens'e benzer şekilde büyümeyi durdurduğu saptanmıştır (142). SIRT1'in aşırı ifade edildiği PC3 prostat kanser hücre hattında sirtinol kullanımıyla, hücre büyümesi inhibe edilmiş ve Kamptotesin ve Cisplatin anti-kanser ilaçlarına olan duyarlılık artmıştır (143). Kolon kanserinde p53 ve SIRT1'in önemini vurgulayan bu araştırmalar ışığında araştırmamızda HCT116^{p53(+/-)} ve HCT116^{p53(-/-)} kolon karsinoma hücre hatlarının SIRT1 aktif ve aktivite inhibisyonu yapılmış formlarının etkisini incelemek amacıyla sirtinol inhibitörünün kullanılmasına karar verilmiştir.

Anti-kanser potansiyeli olan polifenoller arasında en çok çalışılan ve kanserden koruyucu özelliği bulunan polifenollerin en bilinen örneklerinden biri resveratrol'dür (72). Yapılan son araştırmalar, diyetel polifenollerin kemopreventif potansiyelinin kanser hücrelerinde epigenetik değişiklikleri düzenleme özellikleriyle ilişkili olabileceğini önermektedir (40). Ancak flavonoidlerin kanser hücrelerinde çeşitli epigenetik modifikasyonlara etkisi ve bu mekanizmaları nasıl düzenlediği, halen başlangıç aşamasında olan bir konudur. Çeşitli kanser hücrelerinde resveratrolün olumlu etkileri ilk olarak Jang ve ark. (65) tarafından 1997 yılından beri yapılan araştırmalar ile ortaya konmaktadır. Resveratrolün anti-kanserojen etki gösterdiği, çeşitli kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği, güçlü antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileri uyardığı ve apoptozu indükleyici etkilerinin olduğu bilinmektedir. Birçok raporda resveratrolün kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı belirtilmiştir (82, 89, 90). Mikrosatellit instabilitesi bulunan HCT116^{p53(+/-)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücre hatlarında resveratrol ve 5-FU ile yapılan çalışmada (91), apoptozun p53'ten bağımsız olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. Resveratrolün kolon kanser hücrelerinde hücre ölümüne yol açan dozu ile ilgili veriler de literatürde değişkenlik göstermesine karşın, genellikle 10-200 µM arasındaki konsantrasyonlar ile karşılaşılmaktadır. HT-29 kolorektal karsinoma hücrelerinde resveratrolün anti-proliferatif etki gösterdiği doz 78.9 ± 5.4 µM olarak bulunmuştur (144).

Yapmış olduğumuz araştırmada; resveratrolün HCT116 kolon karsinoma hücrelerine 60 µM IC₅₀ dozunda, 24 saat uygulanması sonucunda meydana gelen apoptotik ölümün HCT116^{p53(+/-)} hücrelerde HCT116^{p53(-/-)} hücrelere göre anlamlı olarak daha yüksek düzeyde olduğu saptanmış, 48 saatte ise iki hücre hattı arasında anlamlı bir değişim saptanmamıştır. Bu da bize resveratrolün apoptotik etkisinde p53'ün rolünün bulunduğunu gösterebilmektedir.

Resveratrolün kolon kanser hücrelerinde apoptotik etkisinin de kolon kanser hücre tipi, süre ve doza bağlı olarak değişebileceği belirtilmektedir. Bununla birlikte HCT116 hücrelerinde, 24 saat 10-150 μ M aralığında resveratrol uygulaması ile 50 μ M dozunda gerçekleştirilen akış sitometrik analiz ile apoptotik hücre ölüm yüzde oranları %29.3 olarak bulunmuştur (64). Çalışmamızda seçmiş olduğumuz 60 μ M resveratrol dozunun 24 saatte HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde %34.9 oranında apoptotik hücre ölümü oluşturması; resveratrolün apoptotik etkisinin aynı tip hücrelerde benzer olduğunu ancak farklı hücre tiplerine göre değişkenlik gösterebildiğini desteklemektedir.

HCT116^{p53(+/+)} hücreleri ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde hücre canlılık analizi verilerine göre resveratrolü SIRT1 inhibisyonu ile birlikte değerlendirdiğimizde; canlılıktaki azalmanın SIRT1 inhibisyonu ile anlamlı olarak arttığı ancak bu azalmanın p53'e bağımlı olmadığı belirlendi.

HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde yapılan akış sitometrik analizde, sonuçlar değerlendirildiğinde, HCT116^{p53(+/+)} hücrelerinde resveratrolün apoptotik hücre ölümünü anlamlı olarak SIRT1 inhibisyonuna bağımlı bir şekilde arttırdığı gözlenirken, HCT116^{p53(-/-)} hücrelerinde SIRT1 inhibisyonuna bağımlı anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Böylece akış sitometrik analiz sonuçlarımıza göre, SIRT1 inhibisyonunun p53'e bağımlı olarak resveratrolün apoptotik etkisini arttırdığı ortaya konmaktadır.

Bütün bu sonuçlar, resveratrolün hücre tipine göre değişim göstererek, her hücre tipinde farklı bir hücresel mekanizma aracılığı ile farklı etki gösterebileceğini ve bu etkilerin birbirleri ile de çapraz reaksiyon gösterme potansiyeli olabileceğini ifade etmektedir.

Kanser hücrelerinde yüksek ekspresyon seviyelerine sahip olan SIRT1'in onkogen olarak mekanizmasının multi-faktöriyel olduğu öne sürülmektedir (140). SIRT1'in p53 gibi önemli transkripsiyon faktörlerini deasetile etmesi p53'ün potansiyel tümör baskılayıcı özelliği konusunda şüphe oluşturmaktadır. Çeşitli organizmalarda SIRT1'in tek kopya artışları ya da sirtuin aktivatörlerinin uygulanmasıyla hücresel yaşam süresinin arttırdığı gösterilmiştir (55). Bu durum farklı hücrelerde yararlı etkilere sahip olmakla birlikte, tümör ilerlemesi sürecinde, neoplastik hücrelerin seçilmesi açısından zararlı bir etkiye sahip olabilir.

Pek çok kanser hücresinde olduğu gibi, kolon kanser hücrelerinde de bir SIRT1 aktivatörü olan resveratrolün SIRT1'in aktivite ve ekspresyon seviyelerini arttırdığına dair çalışmalar mevcuttur (55,57-59). Resveratrolün SIRT1 aktivitesi üzerine etkisini açıklamak üzere Caco-2 hücrelerinde 24 saat, 50-200 µmol/L resveratrol uygulaması ile yaptıkları çalışmada SIRT1 protein ekspresyonunun 50 µM konsantrasyondan itibaren arttığı gösterilmiştir (118). SIRT1'in, p53, Foxo, Ku70, P300, Rb, E2F1, NFκB, p73, PGC-1α ve PPARγ gibi hücrel yaşlanma, hücre döngüsü ve apoptoz süreçlerinde yer alan proteinleri deasetile ettiği bildirilmiştir (47). Kanser terapisinde SIRT1'in aktivasyonu ve inhibisyonu ile ilişkili sinyal yolları ve hücreler üzerinde apoptotik veya proliferatif etkisi olup olmayacağı konusunda bilgiler oldukça karmaşıktır (47,145). Bu bağlamda bir SIRT1 aktivatörü olduğu belirtilen resveratrolün p53 mutasyonu olan ve olmayan kolon kanser hücrelerindeki davranışı ve sinyal ileti yolları üzerindeki etkisi henüz açıklığa kavuşmamış bir alandır. Araştırmamız bu alandaki boşluğa ışık tutmak amacı ile kurgulanmıştır. Bu bilgiler göz önüne alındığında bir SIRT1 aktivatörü olan resveratrolün p53(+/+) veya p53(-/-) hücrelerde kullanımının sonuçlarının oldukça farklı olabileceği tarafımızdan öngörülmüş ve hücre proliferasyon ve ölümünde etkin olan gen ekspresyonlarının p53 ve SIRT1 bağımlılığını ortaya koymak amacı ile tüm uygulama gruplarında gen ekspresyonları incelenmiştir.

Bu amaçla TGF-β yolağında bulunan p27, ATF4, MYC ve TRAIL genlerinin deney gruplarında ekspresyonlarının incelenmesi sonucunda; p27 gen ekspresyonunun yapılan diğer çalışmalara benzer olarak resveratrol uygulanan ve Sirtinol+Resveratrol uygulanan gruplarda anlamlı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızdan elde edilen bu veriler Wolter ve ark.'nın (91) resveratrol uygulaması ile Caco-2 kolon kanser hücrelerinde bulmuş oldukları p27 ekspresyon düzeyi ile uyum göstermekte ancak bu verilere SIRT1 aktivitesinin inhibisyonuna bağlı olarak değişebileceği bilgisini ilave ederek literatüre katkı sağlamaktadır.

Endoplazmik Retikulum (ER) stresi aktive edici ATF4'ün apoptoz sinyal-regüle edici kinaz 1 (ASK1) ve kaspaz-12 tarafından apoptozu başlattığı ve ER stresinde ATF4'ün pro-apoptotik rolü gösterilmiştir (146). Bununla birlikte insan hepatosit Chang hücre hattında 10 µM resveratrolün SIRT1 bağımlı olarak ER stresi ile artış gösteren ATF4 protein ekspresyonunu baskılayarak apoptozu azalttığı gösterilmiştir (147). Çalışmamızda ise; 60 µM resveratrolün ATF4 gen ekspresyon artışını hem p53, hem de SIRT1 inhibisyonuna bağımlı olarak gerçekleştirdiği saptanmıştır. Hücre apoptozu ve senesens'i ile DNA hasar yanıtlarında yer alan c-Myc overekspresyonu, DNA hasar yanıtının tümör progresyonunda tümör

baskılanması ve tümör gelişimini içeren ikili rolü gösterilmiştir (148) Fouad ve ark. (112) ise 100 μ M resveratrolün HCT116 hücrelerinde c-myc protein ekspresyonunu 48 saatte anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda HCT116^{p53(+/+)} ve HCT116^{p53(-/-)} hücre hatlarında 60 μ M resveratrolün 24 saat uygulaması ile mRNA ekspresyon düzeyinde kontrole göre anlamlı bir fark görülmemiştir. SIRT1 inhibisyonu ile hem HCT116^{p53(+/+)} hem HCT116^{p53(-/-)} hücrelerde artan c-Myc gen ekspresyon sonuçlarımız, resveratrolün SIRT1 bağımlı olarak c-myc ekspresyonunda rol aldığını doğrulamaktadır. Gastrik kanser hücrelerinde 100 μ M resveratrol ile c-myc mRNA ekspresyonunun anlamlı olarak azalmasına karşın, bir SIRT1 inhibitörü olan Nikotinamid uygulaması ile c-myc mRNA ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gösterilerek elde edilen sonuçlar bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir (149).

Ekstresek hücre ölüm yolağı ile hücreleri apoptotik ölüme sürükleyen TRAIL aynı zamanda intrinsek yolağı da TRAIL-kaspaz-8-tBid-Bax kaskadı ile aktive ederek apoptotik hücre ölüm mekanizmasında yer almaktadır (13). Hepatoselüler karsinoma hücre hattı HepG2 hücrelerinde yapılan çalışmada 50 μ M resveratrol ile sinerjistik olarak 10 ng/mL TRAIL uygulaması ile resveratrolün TRAIL uyarımlı apoptozu arttırdığı belirlenmiştir (150). Çalışmamızda ise resveratrolün ve SIRT1 inhibisyonu etkisinin göz önüne alındığında resveratrolün TRAIL gen ekspresyonunu p53 bağımsız ancak SIRT1 inhibisyonu bağımlı olarak arttırdığı saptanmıştır. TGF- β yolağındaki tüm genler dikkate alındığında; resveratrol uygulaması ile P27, ATF4 ve MYC gen ekspresyonlarının p53 bağımlı olarak artış gösterdiği, TRAIL gen ekspresyonunun ise p53 bağımsız olduğu saptanmıştır. Bu veriler; resveratrolün SIRT1 aktivitesinin inhibisyonuna bağımlı olarak özellikle p27 ve TRAIL gen ekspresyonu azalmış olan kanser hücrelerinde olumlu etkisi olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte resveratrolün bu etkisinin HCT116^{p53(+/+)} kolon kanser hücrelerinde daha etkin olduğu görülmektedir.

WNT sinyal yolağında bulunan Siklin D1, uygun CDK molekülü ile birleştiğinde Rb tümör baskılayıcı proteinini fosforilleyerek E2F transkripsiyon faktörünün Rb proteininden ayrılıp salınmasına ve DNA sentezi için gerekli olan proteinlerin aktifleştirilmesine neden olmaktadır (151). FRA-1, DNA'ya bağlanan bir transkripsiyon faktörüdür ve Siklin D1 önemli bir hücre döngüsü düzenleyicisidir. İkisi de transkripsiyonel olarak β -katenin tarafından düzenlenen onkogenler olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca FRA-1 ve Siklin D1'in kolonik tümörlerde upregüle olduğu ve kanser progresyonunda yer aldığı belirtilmiştir (152,

153) FRA-1'in birçok kanserde matriks metalloproteinaz (MMP) ailesi üyesinin ekspresyonunu da düzenlediği bilinmektedir (154). HCT116 ve RKO kolon kanser hücrelerinde FRA-1 knockdown edildiğinde migrasyon ve invazyonu azalttığı ve paralel olarak MMP-1 ve MMP-9'u azalttığı gösterilmiştir (155). PPARD geninin farklılaşmayı uyardığı ve hücre proliferasyonunu arttırdığı belirtilmektedir (156). PPARD'nin intestinal tümör büyümesinin regülasyonunda yer aldığı rapor edilmiştir (157). WISP-1 geni ise Wnt-1-katenin sinyal ileti yolağında Wnt-1'in indüklenmesiyle salınan anahtar bir protein olarak karsinogenezde yer almaktadır (158). WISP-1'in anti-apoptotik Akt/PKB sinyal ileti yolağını aktive edebileceği, p53 uyarımlı apoptoz gibi hücreSEL apoptozu inhibe etmek için Bcl-XL ekspresyonunu arttırabileceği sitokrom C salınımını baskılayabileceği bilinmektedir (159). WISP-1 overekspresyonu ile apoptoz inhibe edilerek tümör oluşum süreci hızlanabilmektedir (160).

Belirtilen genler WNT yolağında bulunan ve kolon kanser hücrelerinde proliferasyon yönünde artış gösteren genler olarak tanımlanmaktadır. Verilerimiz değerlendirildiğinde; resveratrolün Siklin D1 ve FRA-1 genlerinde p53 bağımsız, PPARD ve WISP genlerinde ise p53 bağımlı artış gösterdiği belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, resveratrolün HCT116^{p53(+/-)} kolon kanser hücrelerinde daha etkin olmak üzere SIRT1 aktivitesinin inhibisyonu ile özellikle Siklin D1, FRA-1 ve PPARD gen ekspresyonları başta olmak üzere artış sağladığı ve bu nedenle SIRT1 aktivitesi düşük olan hücrelerde tümörojenik aktiviteyi arttırabilme olasılığı olduğunu ifade etmektedir. Buradan yola çıkarak resveratrol kullanımında kolon kanser hücrelerinde özellikle Wnt yolağı genlerine etkisi belirlenerek kullanılmasının uygun olacağı görüşündeyiz.

p53 sinyal yolağında bulunan genler incelendiğinde; ekspresyonu p53 tarafından düzenlenen apoptotik PUMA geni, anti-apoptotik Survivin geni ve MCL1 geni ve apoptotik FASLG gen ekspresyonunun resveratrol uygulaması ile p53 bağımsız değişim gösterdiği ancak SIRT1 inhibisyonu bağımlı olarak gen ekspresyonlarının arttığı saptanmıştır. Buna karşın proliferatif özellikte olan EGFR ve PCNA gen ekspresyonlarının ve anti-proliferatif özellikte olan FAS, GADD45A, RB1 gen ekspresyonlarının resveratrol uygulaması ile p53 ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı artış gösterdiği saptanmıştır. HCT116^{p53(+/-)} hücrelerinde PUMA, FAS, GADD45A ekspresyon artışı ve Survivin azalışı ile resveratrol SIRT1 inhibisyonu sonucunda p53 varlığında daha etkin olarak proapoptotik etki gösterebilir.

NFκB sinyal yolağında bulunan hücre adezyon ve metastazından sorumlu ICAM-1 geni, hücre proliferasyonunu inhibe etmesi ve bazı durumlarda apoptozu uyarmasıyla negatif büyüme faktörleri olarak bilinen IFNG geni, neoplastik dokularda tümör hücre apoptozunu uyarmasına karşın kolon karsinoma hücrelerinde bu özelliğini kaybeden ve erken evrelerde tümör oluşumunu uyaran TNF geni p53 bağımsız; JAK/STAT yolağıyla ilişkili olarak çeşitli hormon, büyüme faktörleri sitokinler tarafından uyarılan transkripsiyon faktörlerinden proliferasyon lehine etki gösteren STAT1 geninin p53 bağımlı olarak resveratrol uygulaması ile artış gösterdiği ve SIRT1 inhibisyonu bağımlı olarak tüm genlerin artış gösterdiği saptanmıştır (161-166). Bu veriler resveratrolün p53 bağımsız olarak NFκB yolağını etkilediği ancak hücrelerin SIRT1 aktivite düzeyine bağımlı olarak gen ekspresyonunu değiştirebileceğini göstermektedir.

Resveratrol uygulaması ile kolon kanser hücrelerinde, JAK/STAT sinyal yolağında bulunan IRF-1, SOCS3, AKT-1 genlerinin p53 bağımsız ancak FOS, JUN, STAT3, IL1A, IL8 ise p53 bağımlı olarak artış gösterdiği bununla birlikte FOS geni dışında tüm genlerin SIRT1 inhibisyonu bağımlı olarak arttığı saptandı. IRF-1, hücre döngüsü regülasyonu, apoptoz, DNA tamiri ve kromatin yeniden düzenlemesinin regülasyonunu uyarak tümör baskılamasını tetikleyebilen bir hedef gen setini aktive etmektedir (167). Resveratrol ve SIRT1 inhibisyonu ile IRF-1 gen ekspresyonundaki artış apoptotik süreçle ilişkili bulunduğundan hücrelerde apoptozun artışı söz konusu olabilmekte ve bu etkinin çalışmamızda yer alan kolon kanser hücrelerinde p53 bağımsız bir mekanizmayla gerçekleştiği öngörülmektedir. STAT yolağının Bim, Bax, Bak pro-apoptotik proteinlerle etkileşerek ve onların aktivitelerini baskılayarak apoptozu baskılayabildiği bilinmektedir. Bir STAT3 inhibitörü olan SOCS3 proteininin gen ekspresyonunun artışı kolorektal kanser hücreleri için proliferatif olan STAT3'ün baskılanacağı öngörüsünü oluştursa da çeşitli çalışmalarda belirtildiği gibi SOCS3'ün her kanser türüne göre proliferatif veya apoptotik davranışlarda bulunabileceği ve davranış yönüne uygun olan protein ekspresyonları ile korele olabileceği belirtilmektedir (168). Gen ekspresyonu düzeyinde inceleme yaptığımız araştırmamızda, MCL-1, STAT-1, Siklin D1, Myc gibi JAK/STAT yolağında bulunan proteinlere ait gen ekspresyonlarının artışı SIRT1 inhibisyonu ile Resveratrol uygulamasının kolorektal karsinomada proliferatif etkisi olabileceği şüphesini doğurmaktadır. STAT1 ve STAT3'ün tümör oluşum sürecinde farklı

etki gösterebilmektedirler. STAT1'in çoğunlukla apoptotik etki gösterdiği, STAT3'ün ise hücre içi birçok etkileşimde bulunarak proliferasyonu uyardığı bilinmektedir (169-171).

STAT3 aktivasyonunun inhibisyonu hücreyi apoptoza götürebilmektedir. Corvinus ve ark.'nın (172) yaptığı çalışmada STAT3'ün proliferasyonu arttırıcı yönde etki gösterdiği aynı zamanda STAT3'ün aktivitesinin baskılanmasıyla kolon karsinoma ksenograft tümörlerde tümör büyümesini azalttığı gösterilmiştir. Kolon kanserinde en fazla upregüle olan IL-8'in, tümör büyümesi, invazyon ve metastaza katkı sağladığı, hücre proliferasyonu ve migrasyonunu uyardığı bilinmektedir. Çalışmamızda; resveratrolün IL-8 gen ekspresyonunu arttırdığı ve bu etkinin SIRT1 inhibisyonu ile p53'e bağımlı olarak daha da arttırdığı böylece hücre proliferasyonu yönünde etki gösterebileceği belirlenen IL-8 gen ekspresyon değişimi ile gösterilmiştir. Çalışmamızın verileri, resveratrolün SIRT1 inhibisyonu sonrası proliferasyon yönünde etki gösterebileceğini ifade etmektedir.

Sonuç olarak; yapmış olduğumuz bu araştırma ile HCT116^{p53(+/-)} ve HCT116^{p53(-/-)} kolon kanser hücrelerinde, 60 µM resveratrol uygulamasının hücrelerin p53 mutasyonu ve SIRT1 aktivite düzeylerine göre hem apoptotik etki hem de gen ekspresyonu düzeyinde farklı değişimlere neden olduğu ilk kez detaylı olarak incelenmiştir.

Çalışmamızda, resveratrolün kolon kanser hücrelerinde p53 mutasyonu taşıyıp taşımadığı, SIRT1 aktivite düzeylerinin düşük veya yüksek olma durumuna göre birçok gen ekspresyonunu değiştirebildiği özellikle de kanserleşmede önemi vurgulanan TGFβ, WNT, p53, NF-κB ve JAK/STAT yolaklarında yer alan genlerin ekspresyonlarını değiştirebildiği gösterilmiş oldu. Bu genlerde meydana gelen değişimlerin kanserin prognozunda önemli etkiler yaratabileceği öngörülmektedir.

Tüm verilerin değerlendirilmesi ile varılan sonuç; kolon kanser hücrelerinde resveratrolün p53 ve SIRT1 aktivitesine göre proliferatif ve/veya apoptotik etki gösterebileceğidir. Bu bağlamda günümüzde oldukça popüler olan ve kanser hastalarının bilinçsiz kullanımında olan polifenollerin anti-kanser etkisi olabileceği gibi kanser hücrelerinin değişken gen ekspresyonu bağlı olarak proliferatif etki gösterebileceği ve prognozu kötüleştirebilme potansiyeli olacağı öngörüsündeyiz.

6. **SONUÇ VE ÖNERİLER**

Çalışmamız çerçevesinde HCT116 kolon kanser hücrelerinde Resveratrol-p53-SIRT1-sinyal ileti yolları gen ekspresyonları ilk kez in-vitro koşullarda araştırılmıştır. Çalışmamızda apoptotik incelemelerle de resveratrolün SIRT1 aktivitesi ve p53 bağımlı etkileri belirlenmiştir. Bununla birlikte; sirtinol ile sağlanan SIRT1 aktivite inhibisyonunun, siRNA yöntemi ile susturum sonrası değişimler ile karşılaştırılamaması, gen ekspresyon analizlerinin protein ekspresyon analizleri yapılarak doğrulanamaması ve elde edilen in-vitro sonuçların deney hayvanlarında gerçekleştirilecek in-vivo veriler ile karşılaştırılamaması, araştırmamızın kısıtlılıklarını ve gelecek çalışmalarımızın temelini oluşturmaktadır.

7. **KAYNAKLAR**

1. Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 2000; 100: 71–78.
2. Smith JA, Martin L. Do cells cycle? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973; 70: 1263-7.
3. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003; 36: 131-49.
4. <https://oncogenesandcancer.wordpress.com/cell-cycle-checkpoints-and-effect-of-oncogenes2/>
5. Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 2004; 116: 221–234.
6. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 153–66.
7. http://www.nature.com/nrc/journal/v13/n3/fig_tab/nrc3468_F1.html
8. Devlin T M. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. 7th Edition, Wiley-VCH 2010; 1003-1027.
9. Stevaux O, Dyson NJ. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 684-91.
10. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 979-87.
11. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-74.
12. Zhang H. Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. *J Cell Physiol* 2007; 210: 567-74.
13. Koçtürk S. Apoptoz Üzerine Etki Eden Faktörler. İçinde: Meme Kanserine Moleküler ve Genetik Yaklaşım Kitabı, Haydaroğlu A, Editör. ISBN: 978-975-483-928-9 Ege Üniversitesi Basımevi, 2011. p. 19-35.
14. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358, 15–16.
15. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, et al. Database of p53 gene somatic mutations in human tumours and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 3551-55.
16. Kruse JP, Gu W. Modes of p53 regulation. *Cell* 2009;137: 609-22.

17. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 2003; 10: 431-42.
18. Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331: 851-8.
19. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y. Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58/2: 71-96
20. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 5-29.
21. Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM, et al. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer* 2012; 118: 3636-44.
22. Willett WC. Diet and cancer: an evolving picture. *JAMA* 2005; 293: 233-4.
23. Doubeni CA, Major JM, Laiyemo AO, et al. Contribution of behavioral risk factors and obesity to socioeconomic differences in colorectal cancer incidence. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104: 1353-62.
24. Jemal A, Simard EP, Dorell C, Noone AM, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus(HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105: 175-201.
25. Smith G1, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 9433-8.
26. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3784 –3791.
27. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759–767.
28. Iacopetta B, Grieco F, Amanuel B. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol* 2010; 6: 260–269.
29. Matsubara N. Epigenetic regulation and colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2012; 55: 96-104.

30. Cottu PH, Muzeau F, Estreicher A, Fléjou JF, et al. Inverse correlation between RER+ status and p53 mutation in colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 1996; 13: 2727-2730.
31. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 2013; 502: 333-339.
32. López I, P Oliveira L, Tucci P, Alvarez-Valín F, et al. Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer. *Gene* 2012; 499: 81-87.
33. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, et al. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7518-7528.
34. Zandi R, Selivanova G, Christensen CL, Gerds TA, et al. PRIMA-1Met/APR-246 induces apoptosis and tumor growth delay in small cell lung cancer expressing mutant p53. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 2830-2841.
35. Iacopetta B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat* 2003; 21: 271-276.
36. Muller P, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* 2014; 25: 304-17.
37. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 2014; 505: 495-501.
38. Cho HS, Park JH, Kim YJ. Epigenomics: Novel aspect of genomic regulation. *Biochem Mol Biol* 2007; 40: 151-155.
39. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 2007; 128: 635-638.
40. Stefanska B, Karlic H, Varga F, Fabianowska-Majewska K, et al. Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components--the implications in cancer prevention. *Br J Pharmacol* 2012; 167: 279-97.
41. Dehan P, Kustermans G, Guenin S, Horion J, et al. DNA methylation and cancer diagnosis: new methods and applications. *Expert Rev Mol Diagn* 2009; 9: 651-7.
42. Lim U, Song MA. Dietary and lifestyle factors of DNA methylation. *Methods Mol Biol* 2012; 863: 359-376.

43. Shankar S, Kumar D, Srivastava RK. Epigenetic modifications by dietary phytochemicals: implications for personalized nutrition. *Pharmacol Ther* 2013; 138: 1-17.
44. Yang XJ, Seto E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 2007; 26: 5310-8.
45. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003; 425: 191–196.
46. Brooks CL, Gu W. How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? *Nat Rev Cancer* 2009; 9:123-8.
47. Kozako T, Suzuki T, Yoshimitsu M, Arima N, et al. Anticancer agents targeted to sirtuins. *Molecules* 2014; 19: 20295-313.
48. Oka S, Hsu CP, Sadoshima J. Regulation of cell survival and death by pyridine nucleotides. *Circ Res* 2012; 111: 611-27.
49. Deng CX. SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? *Int J Biol Sci* 2009; 5: 147-52.
50. Kleszcz R, Paluszczak J, Baer-Dubowska W. Targeting aberrant cancer metabolism - The role of sirtuins. *Pharmacol Rep* 2015; 67: 1068-80.
51. Smith J. Human Sir2 and the ‘silencing’ of p53 activity. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 404–6.
52. Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 2004; 430: 686–689.
53. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003; 425: 191-6.
54. Kabra N, Li Z, Chen L, Li B, et al. SirT1 is an inhibitor of proliferation and tumor formation in colon cancer. *J Biol Chem* 2009; 284: 18210-7.
55. de Boer VC, de Goffau MC, Arts IC, Hollman PC, et al. SIRT1 stimulation by polyphenols is affected by their stability and metabolism. *Mech Ageing Dev* 2006; 127: 618-27.
56. Alcaín FJ, Villalba JM. Sirtuin activators. *Expert Opin. Ther. Patents* 2009; 19: 403-414.

57. Wang GL, Fu YC, Xu WC, Feng YQ, et al. Resveratrol inhibits the expression of SREBP1 in cell model of steatosis via Sirt1-FOXO1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380: 644-9.
58. Lin JN, Lin VC, Rau KM, Shieh PC, et al. Resveratrol modulates tumor cell proliferation and protein translation via SIRT1-dependent AMPK activation. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 1584-92.
59. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 2004; 23: 2369-80.
60. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* 2001; 21: 381–406.
61. Singh UP, Singh N, Singh B, Hofseth LJ, et al. Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) induces silent mating type information regulation-1 and down-regulates nuclear transcription factor-kappa B activation to abrogate dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 332: 829–839.
62. Cui X, Jin Y, Hofseth AB, Pena E., et al. Resveratrol suppresses colitis and colon cancer associated with colitis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3: 549–559.
63. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998; 56: 317–333.
64. Liu B, Zhou Z, Zhou W, Liu J, et al. Resveratrol inhibits proliferation in human colorectal carcinoma cells by inducing G1/S-phase cell cycle arrest and apoptosis through caspase/cyclin-CDK pathways. *Mol Med Rep* 2014; 10: 1697-702.
65. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997; 275: 218-20.
66. Siemann EH, Creasy LL. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic* 1992; 43: 49-52.
67. Dong Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutat Res* 2003; 523-524: 145-50.
68. Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, et al. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 224: 274-83.

69. Kuhnle G, Spencer PE, Chowrimootoo G, Schroeter H. Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochemical and Biophysical Communications* 2000; 272: 212-217.
70. Bavaresco L, Vezzulli S. Stilben phytoalexin physiology in grapevine (*Vitis* spp.) as affected by viticultural factors. In: *Recent Progress in Medicinal plants*. Vol: 11. Drug Development from New Molecules; 2006. p. 389-410.
71. Smoliga JM, Baur JA, Hausenblas H. Resveratrol and health – a comprehensive review of human clinical trials. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55: 1129-1141.
72. Cucciolla V, Borriello A, Oliva A, Galletti P, et al. Resveratrol: from basic science to the clinic. *Cell Cycle* 2007; 6: 2495-510.
73. Kulkarni SS, Cantó C. The molecular targets of resveratrol. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852: 1114-23.
74. Athar M, Back JH, Kopelovich L, Bickers DR, et al. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 2009; 486: 95–102.
75. Basly JP, Marre Fournier F, Le Bail JC, Habrioux G, et al. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. *Life Sci* 2000; 66: 769-77.
76. Pozo Guisado E, Merino JM, Mulero Navarro S, Lorenzo Benayas MJ, et al. Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NFkappaB. *Int J Cancer* 2005; 115: 74-84.
77. Kim YA, Choi BT, Lee YT, Park DI, et al. Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells. *Oncol Rep* 2004; 11: 441-6.
78. Aziz MH, Nihal M, Fu VX, Jarrard DF, et al. Resveratrol-caused apoptosis of human prostate carcinoma LNCaP cells is mediated via modulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1335-41.
79. Benitez DA, Pozo Guisado E, Clementi M, Castellon E, et al. Nongenomic action of resveratrol on androgen and oestrogen receptors in prostate cancer: modulation of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Br J Cancer* 2007; 96: 1595-604.
80. Estrov Z, Shishodia S, Faderl S, Harris D, et al. Resveratrol blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NFkappaB, inhibits proliferation,

- causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2003; 102: 987-95.
81. Bhardwaj A, Sethi G, Vadhan Raj S, Bueso Ramos C, et al. Resveratrol inhibits proliferation, induces apoptosis, and overcomes chemoresistance through downregulation of STAT3 and nuclear factor-kappaB-regulated antiapoptotic and cell survival gene products in human multiple myeloma cells. *Blood* 2007; 109: 2293-302.
 82. Delmas D, Rebe C, Lacour S, Filomenko R, et al. Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 41482-90.
 83. Bernhard D, Tinhofer I, Tonko M, Hubl H, et al. Resveratrol causes arrest in the S-phase prior to Fas-independent apoptosis in CEM-C7H2 acute leukemia cells. *Cell Death Differ* 2000; 7: 834-42.
 84. Dorrie J, Gerauer H, Wachter Y, Zunino SJ. Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res* 2001; 61: 4731-9.
 85. Zheng J, Ramirez VD. Piceatannol, a stilbene phytochemical, inhibits mitochondrial F₀F₁-ATPase activity by targeting the F₁ complex. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 499-503.
 86. Tinhofer I, Bernhard D, Senfter M, Anether G, et al. Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2. *Faseb J* 2001; 15: 1613-5.
 87. Ahmad KA, Iskandar KB, Hirpara JL, Clement MV, et al. Hydrogen peroxide-mediated cytosolic acidification is a signal for mitochondrial translocation of Bax during drug-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Res* 2004; 64: 7867-78.
 88. Park JW, Choi YJ, Suh SI, Back WK, et al. Bcl-2 overexpression attenuates resveratrol-induced apoptosis in U937 cells by inhibition of caspase-3 activity. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1633-939.
 89. Mahyar-Roemer M, Katsen A, Mestres P, Roemer K. Resveratrol induces colon tumor cell apoptosis independently of p53 and precede by epithelial differentiation,

- mitochondrial proliferation and membrane potential collapse. *Int J Cancer* 2001; 94: 615-622.
90. Mohan J, Gandhi AA, Bhavya BC, Rashmi R, et al. Caspase-2 triggers bax-bak-dependent and -independent cell death in colon cancer cells treated with resveratrol. *J Biol Chem* 2006; 281: 17599-611.
 91. Wolter F, Stein J. Resveratrol enhances the differentiation induced by butyrate in caco-2 colon cancer cells. *J Nutr* 2002; 132: 2082-2086.
 92. Nutakul W, Sobers HS, Qiu P, Dong P, et al. Inhibitory effects of resveratrol and pterostilbene on human colon cancer cells: a side-by-side comparison. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 10964-70.
 93. Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000; 103: 295–309.
 94. Akhurst RJ. TGF beta signaling in health and disease. *Nat Genet* 2004; 36: 790–2.
 95. Delmas D, Rébé C, Micheau O, Athias A, et al. Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene* 2004; 23: 8979-86.
 96. Lecanda J, Ganapathy V, D'Aquino-Ardalan C, Evans B, et al. TGFbeta prevents proteasomal degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 for cell cycle arrest. *Cell Cycle* 2009; 8: 742–756.
 97. Vanamala J, Reddivari L, Radhakrishnan S, Tarver C. Resveratrol suppresses IGF-1 induced human colon cancer cell proliferation and elevates apoptosis via suppression of IGF-1R/Wnt and activation of p53 signaling pathways. *BMC Cancer* 2010; 10: 238.
 98. Akiyama T. Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11: 273-82.
 99. Mulholland DJ, Dedhar S, Coetzee GA, Nelson CC. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr Rev* 2005; 26: 898-915.
 100. Chesire DR, Isaacs WB. Beta-catenin signaling in prostate cancer: an early perspective. *Endocr Relat Cancer* 2003; 10: 537-60.
 101. Wolter F, Akoglu B, Clausnitzer A, Stein J. Downregulation of the cyclin D1/Cdk4 complex occurs during resveratrol-induced cell cycle arrest in colon cancer cell lines. *J Nutr* 2001; 131: 2197-2203.

102. Wolter F, Clausnitzer A, Akoglu B, Stein J. Piceatannol, a natural analog of resveratrol, inhibits progression through the S phase of the cell cycle in colorectal cancer cell lines. *J Nutr* 2002; 132: 298-302.
103. Santandreu FM, Valle A, Oliver J, Roca P. Resveratrol potentiates the cytotoxic oxidative stress induced by chemotherapy in human colon cancer cells. *Cell Physiol Biochem* 2011; 28: 219-28.
104. Cui X, Jin Y, Hofseth AB, Pena E. et al. Resveratrol suppresses colitis and colon cancer associated with colitis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3: 549-559.
105. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2013; 13: 11-26.
106. Patel KR, Brown A, Jones DJL, Britton RG, et al. Clinical pharmacology of Resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 2010; 70: 7392-7399.
107. Hope C, Planutis K, Planoutiene M, Moyer MP. Low concentrations of resveratrol inhibit Wnt signal throughput in colon-derived cells: Implications for colon cancer prevention. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52: S52–S61.
108. Nguyen AV, Martinez M, Stamos MJ, Moyer MP, et al. Results of a phase I pilot clinical trial examining the effect of plant-derived resveratrol and grape powder on Wnt pathway target gene expression in colonic mucosa and colon cancer. *Cancer Manag Res* 2009; 1: 25-37.
109. Liu YZ, Wu K, Huang J, Liu Y et al. The PTEN/PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin signaling pathways are involved in the inhibitory effect of resveratrol on human colon cancer cell proliferation. *Int J Oncol* 2014; 45: 104-112.
110. Gabriel JA. *The Biology of Cancer*. Second Edition. John Wiley and Sons Ltd, West Sussex, England, 2007; 37-40.
111. Haris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Nat Can Inst* 1996; 88: 1442-55.

- 112.Fouad MA, Agha AM, Merzabani MM, Shouman SA. Resveratrol inhibits proliferation, angiogenesis and induces apoptosis in colon cancer cells: calorie restriction is the force to the cytotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 2013; 32: 1067-1080.
- 113.Miki H, Uehara N, Kimura A, Sasaki T, et al. Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells. *Int J Oncol* 2012; 40: 1020-1028.
- 114.LeRoith D, Roberts CT. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 2003; 195: 127-137.
- 115.Vanamala J, Radhakrishnan S, Reddivari L, Bhat VB, et al. Resveratrol suppresses human colon cancer cell proliferation and induces apoptosis via targeting the pentose phosphate and the talin-FAK signaling pathways-A proteomic approach. *Proteome Sci* 2011; 9: 49.
- 116.Panaro MA, Carofiglio V, Acquafredda A, Cavallo P, et al. Anti-inflammatory effects of resveratrol occur via inhibition of lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation in Caco-2 and SW480 human colon cancer cells. *Br J Nutr* 2012; 108: 1623-1632.
- 117.Subramaniam D, Ramalingam S, Houchen CW, Anant S. Cancer stem cells: a novel paradigm for cancer prevention and treatment. *Mini Rev Med Chem* 2010; 10: 359-71.
- 118.Ulrich S, Loitsch SM, Rau O, von Knethen A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a molecular target of resveratrol-induced modulation of polyamine metabolism. *Cancer Res* 2006; 66: 7348-54.
- 119.Serra D, Rufino AT, Mendes AF, Almeida LM et al. Resveratrol modulates cytokine-induced Jak/STAT activation more efficiently than 5-aminosalicylic acid: an in vitro approach. *PLoS One* 2014; 9: e109048.
120. www.atcc.org
- 121.Grozinger CM, Chao ED, Blackwell HE, Moazed D, et al. Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J. Biol. Chem* 2001; 276: 38837–38843.
- 122.Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 2005; 11: 127-52.

123. Cook JA, Mitchell JB. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem* 1989; 179: 1-7.
124. <http://www.biovision.com/ready-to-use-cell-proliferation-reagent-wst-1-5637.html>
125. Li Z, Sturm S, Svejda B, Höger H, et al. Anticancer activity of novel extracts from *Cautleya gracilis* (Smith) Dandy: apoptosis in human medullary thyroid carcinoma cells. *Anticancer Res* 2008; 28: 2705-13.
126. Smirnova IV, Bittel DC, Ravindra R, Jiang H, et al. Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1. *J Biol Chem* 2000; 275: 9377-84.
127. Huang T, Long M, Huo B. Competitive Binding to Cuprous Ions of Protein and BCA in the Bicinchoninic Acid Protein Assay. *Open Biomed Eng J* 2010; 4: 271-8.
128. Noble JE, Bailey MJ. Quantitation of protein. *Methods Enzymol* 2009; 463: 73-95.
129. <http://www.enzolifesciences.com/BML-AK555/fluor-de-lys-sirt1-fluorometric-drug-discovery-assay-kit/>.
130. Kokkola T, Suuronen T, Molnár F, Määttä J, et al. AROS has a context-dependent effect on SIRT1. *FEBS Lett* 2014; 588: 1523-8.
131. Vermes I, Hanen C, Steffens Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184, 39-51.
132. Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. *Exp Oncol* 2012; 34: 255-62.
133. Koçtürk S. “İmmunoblotlama”. In: Koçtürk S, Vatansever HS, Editörler, III. *Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri Teorik Kursu Kitabı*, Celal Bayar Üniversitesi Basımevi, 2014, 89-97.
134. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* Bd 1979; 76: 4350–4354.

135. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE. Current Protocols in Molecular Biology. December 09, 2011.
136. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990; 262: 56-61, 64-5.
137. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 95-125.
138. Stünkel W, Peh BK, Tan YC, Nayagam VM, et al. Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer. *Biotechnol J* 2007; 2: 1360-1368.
139. Stünkel W, Campbell RM. Sirtuin 1 (SIRT1): the misunderstood HDAC. *J Biomol Screen* 2011; 16: 1153-69.
140. Bosch-Presegué L, Vaquero A. The dual role of sirtuins in cancer. *Genes Cancer* 2011; 2: 648-62.
141. Ford J, Jiang M, Milner J. Cancer-specific functions of SIRT1 enable human epithelial cancer cell growth and survival. *Cancer Res* 2005; 65: 10457-63.
142. Ota H, Tokunaga E, Chang K, Hikasa M, et al. Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest with attenuated Ras-MAPK signaling in human cancer cells. *Oncogene* 2006; 25: 176-85.
143. Kojima K, Ohhashi R, Fujita Y, Hamada N, et al. A role for SIRT1 in cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 and DU145 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373: 423-8.
144. Juan ME, Wenzel U, Daniel H, Planas JM. Resveratrol induces apoptosis through ROS-dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 4813-8.
145. Van Leeuwen I, Lain S. Sirtuins and p53. *Adv Cancer Res* 2009; 102: 171-95.
146. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006; 7: 880-5.

- 147.Liu LQ, Fan ZQ, Tang YF, Ke ZJ. The resveratrol attenuates ethanol-induced hepatocyte apoptosis via inhibiting ER-related caspase-12 activation and PDE activity in vitro. *Alcohol Clin Exp Res* 2014; 38: 683-93.
- 148.Chen BJ, Wu YL, Tanaka Y, Zhang W. Small Molecules Targeting c-Myc Oncogene: Promising Anti-Cancer Therapeutics. *Int J Biol Sci* 2014; 10: 1084-96.
- 149.Lu J, Zhang L, Chen X, Lu Q, et al. SIRT1 counteracted the activation of STAT3 and NF- κ B to repress the gastric cancer growth. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7: 5050-8.
- 150.Tameda M, Sugimoto K, Shiraki K, Inagaki Y, et al. Resveratrol sensitizes HepG2 cells to TRAIL-induced apoptosis. *Anticancer Drugs* 2014; 25: 1028-34.
- 151.Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, et al. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004; 145: 5439-47.
- 152.Wang HL, Wang J, Xiao SY, Haydon R, et al. Elevated protein expression of cyclin D1 and Fra-1 but decreased expression of c-Myc in human colorectal adenocarcinomas overexpressing beta-catenin. *Int J Cancer* 2002; 101: 301-310.
- 153.Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. The PRAD-1/cyclin D1 oncogene product accumulates aberrantly in a subset of colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 1994; 58: 568-573.
- 154.Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 2008; 40: 1362-1378.
- 155.Wu J, Wu G, Lv L, Ren YF, et al. MicroRNA-34a inhibits migration and invasion of colon cancer cells via targeting to Fra-1. *Carcinogenesis* 2012; 33: 519-28.
- 156.He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 1999; 99: 335-45.
- 157.Gupta RA, Wang D, Katkuri S, Wang H, et al. Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor-delta accelerates intestinal adenoma growth. *Nature medicine* 2004; 10: 245-247.

158. Wang J, Zhang GY, Li XH. Effect of indomethacin on Bfl-1, WISP-1 and proliferating cell nuclear antigen in colon cancer cell line HCT116 cells. *Chin J Dig Dis* 2006; 7: 219-24.
159. Su F, Overholtzer M, Besser D, Levine AJ. WISP-1 attenuates p53-mediated apoptosis in response to DNA damage through activation of the Akt kinase. *Genes Dev* 2002; 16: 46–57.
160. Khor TO, Gul YA, Ithnin H, Seow HF. A comparative study of the expression of Wnt-1, WISP-1, surviving and cyclin-D1 in colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 291–300.
161. Porta C, Riboldi E, Sica A. Mechanisms linking pathogens-associated inflammation and cancer. *Cancer Lett* 2011; 305: 250-62.
162. Gough DJ, Levy DE, Johnstone RW, Clarke CJ. IFN γ signaling-does it mean JAK-STAT? *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19: 383-94.
163. Lejeune FJ, Ruegg C, Lienard D. Clinical applications of TNF- α in cancer. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 573–80.
164. Petak I, Danam RP, Tillman DM, Vernes R, et al. Hypermethylation of the gene promoter and enhancer region can regulate Fas expression and sensitivity in colon carcinoma. *Cell Death Differ* 2003; 10: 211–7.
165. Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 135–41.
166. Madan E, Prasad S, Roy P, George J, et al. Regulation of apoptosis by resveratrol through JAK/STAT and mitochondria mediated pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377: 1232-7.
167. Kröger A, Köster M, Schroeder K, Hauser H, et al. Activities of IRF-1. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 5-14.
168. Rigby RJ, Simmons JG, Greenhalgh CJ, Alexander WS, et al. Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) limits damage-induced crypt hyper-proliferation and inflammation-associated tumorigenesis in the colon. *Oncogene* 2007; 26: 4833-41.

- 169.Avalle L, Pensa S, Regis G, Novelli F, et al. STAT1 and STAT3 in tumorigenesis: A matter of balance. *Jak-Stat* 2012; 1: 65–72
- 170.Klampfer L. The role of signal transducers and activators of transcription in colon cancer. *Front Biosci* 2008; 13: 2888–99.
- 171.Gordziel C, Bratsch J, Moriggl R, Knosel T, et al. Both STAT1 and STAT3 are favourable prognostic determinants in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 2013; 109: 138–46.
- 172.Corvinus FM, Orth C, Moriggl R, Tsareva SA, et al. Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. *Neoplasia* 2005; 7: 545-55.
- 173.Jin WJ, Xu JM, Xu WL, Gu DH, et al. Diagnostic value of interleukin-8 in colorectal cancer: a case-control study and meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 16334-42.

8. **EKLER**

EK-1 ETİK KURUL ONAYI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.- 107

14.02.2013

Sayın Prof.Dr.A.Semra KOÇTÜRK

Kurulumuz tarafından 14.02.2013 tarih ve 871-GOA protokol numaralı 2013/05-21 karar numarası ile görüşülen "**Resveratrol ve Sirtuin1'in p53(+/+) ve p53 (-/-) Kolon Kanseri Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi**" konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

ASLIYDİR

Yunus KARSE
D.E.Ü. Tıp Fakültesi
Fakülte Sekreteri

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2013/05-21	Tarih: 14.02.2013
	Prof.Dr.A.Semra KOÇTÜRK'ün sorumlusu Güneş ÖZEN'in yürüttüğü olduğu "Resveratrol ve Sirtuin1'in p53(+/+) ve p53 (-/-) Kolon Kanseri Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr..Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Kemal Kürşad GENÇ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Işıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

Yunus KARSILI
D.E.Ü. Tıp Fakültesi
Fakülte Sekreteri
ASLİ GİBİDİR

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	871-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Resveratrol ve Sirtuin1'in p53(+/+) ve p53 (-/-) Kolon Kanser Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.A.Semra KOÇTÜRK Güneş ÖZEN
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

ASLİ KOPYADIR
Yunus KARSLI
D.E.Ü. Tıp Fakültesi
Fakülte Sekreteri

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: GÜNEŞ ÖZEN

TC Kimlik No / Pasaport No:	67399122942
Doğum Yılı:	1988
Yazışma Adresi :	Fahrettin Altay Mah. 65/8 Sk Akdeniz Apt. No:14 D:4 Karabağlar/İZMİR
Telefon :	05542779171
Faks :	-
e-posta :	gozen.88@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Moleküler Tıp	Yüksek Lisans	2011-
Türkiye	Anadolu Üniversitesi	İşletme Fakültesi	İşletme	Lisans	2009-2014
Türkiye	Ege Üniversitesi	Eğitim Fakültesi	Pedagojik Formasyon	Lisans-sertifika programı	2011-2012
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyokimya	Lisans	2011

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
DEÜ Tıp Fakültesi	Türkiye	İzmir	Merkez Laboratuvarı	Stajyer	Haziran-Temmuz 2010
TÜBİTAK-MAM	Türkiye	Kocaeli	Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü	Stajyer	Ağustos- Eylül 2010

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlarla Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			
Hücre Ölümü Araştırma Derneği üyeliği			
Türk Biyokimya Derneği üyeliği			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐			

YAYINLARI**SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler**

Gürgeç SG, Yücel AT, Karakuş AÇ, Çeçen D, Özen G, Koçtürk S. Usage of whey protein may cause liver damage via inflammatory and apoptotic responses. Hum Exp Toxicol, 2015; 34(7): 769-79.

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Özen G, Ateş H, Koçtürk S. The Importance of p53 and SIRT-1 in Apoptotic Effects of Resveratrol in HCT116 Colon Carcinoma Cell Line. V. International Congress Of Molecular Medicine Abstract Book:89, PP-041, May 20-22, 2015, Dokuz Eylül University, Izmir/Turkey.

Özen G, Ateş H, Koçtürk S. Resveratrol ve Sirtinolün P53^(+/+) ve P53^(-/-) Kolon Kanseri Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi. 2. İlaç Kimyası (Üretimi, Teknolojisi, Standardizasyonu) Kongresi Özet Kitabı: p319, Mart 21-23, 2014, Belek, Antalya/Turkey.

Özen G, Ateş H, Koçtürk S. Investigation of Apoptotic Effects of Resveratrol and Sirtinol on P53^(+/+) and P53^(-/-) Colon Carcinoma Cell Lines. 1st Cell Death Research Congress with International Participation Abstract Book, ISBN: 978-605-63544-0-3, pp:110, P-20 (poster presentation) 30th October - 3rd November 2013, Cesme - Izmir / Turkey.

Çataler Karakuş A, Ateş H, Mutlu Altundağ E, **Özen G**, Akgül B, Koçtürk S. Examination of Caspase-8 And Caspase-9 Gene Silencing Effects On Level Of Apoptosis Triggered By EGCG in Colon Carcinoma Cell Line. 1st Cell Death Research Congress with International Participation Abstract Book, ISBN: 978-605-63544-0-3, pp:70, S-7 (oral presentation), 30th October - 3rd November 2013, Cesme, Izmir / Turkey.

Çataler Karakuş A, Ateş H, **Özen G**, Koçtürk S. Investigation of Relationship of EGCG with Proapoptotic Bax Protein and Caspase Expression in Colon Carcinoma Cell Line. 1st Cell Death Research Congress with International Participation Abstract Book, ISBN: 978-605-63544-0-3, pp:108, P-19 (poster presentation), 30th October - 3rd November 2013, Cesme, Izmir / Turkey.

"Negative Effect of Long and Short Time Application Whey Protein on Rat Liver; An Histologic and Biochemical Study" 8. Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi, 14-18 Kasım 2012, Antalya, Türkiye.

Çataler A, **Özen G**, Gürgeç G. Tuğ A, Koçtürk S. Uzun dönem whey protein kullanımı karaciğer hasarı yaratabilir!, XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi, Cilt: 37, Özel Sayı, P163, 25-28 Eylül 2012, Konya, Türkiye.