

Resveratrolün MCF-7 hücre soyunda apoptotik etkinin araştırılması

Examining the apoptotic effect of resveratrol on MCF-7 cell strain

Gülten Karabekir,¹ Günnur Demircan,² Şule Özdaş²

¹*İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye*

²*İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye*

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada *in vitro* ortamda doğal polifenolik bir bileşik olan resveratrolün MCF-7 meme kanseri hücre soyu üzerindeki sitotoksik etkisi araştırıldı.

Gereç ve yöntemler: Çalışmalarımızda, hücelere verilecek olan resveratrol dozları 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT) analizi ile belirlendi. Resveratrolün MCF-7 hücre soyundaki apoptotik etkisi, APC annexin V antikorunu kullanarak akım sitometri görüntüleme yöntemi ile belirlendi.

Bulgular: 100 µM ve 250 µM resveratrol MCF-7 hücrelerine inkübe edildi ve ölçümler 12, 24. ve 48. saatlerde elde edildi. MTT sonuçlarından, resveratrolün artan konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak hücre yoğunluğunun kontrol grubuna göre azaldığı tespit edildi. On ikinci saatte ölçülen analizlerde sitotoksik doz 250-500 µM arasında, 24. saatteki ölçümlerde 100-250 µM arasında, 48. saatteki ölçümlerde ise 100 µM olarak belirlendi. Annexin V akım sitometri ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde; MCF-7 hücrelerine verilen 100 ve 250 µM resveratrolün kontrol grubuna kıyasla erken apoptozu artırdığı gözlemlendi.

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

Anahtar sözcükler: Annexin V; apoptozis; MCF-7; resveratrol.

ABSTRACT

Objectives: This study aims to examine the cytotoxic effect of resveratrol, as a natural polyphenolic compound *in vitro* environment, in MCF-7 breast cancer cell strain.

Materials and methods: We determined the doses of resveratrol with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) analysis. We detected the apoptotic effect of resveratrol on MCF-7 cell strain by the imaging flow cytometry using the APC annexin V antibody.

Results: 100 µM and 250 µM resveratrol were incubated in MCF-7 cells and measurements were obtained at the 12, 24 and 48 hours. From the MTT results, we found that the cell density decreased with respect to the control group, directly proportional to the increasing concentration of resveratrol. We determined the cytotoxic doses to be between 250-500 µM in the analysis of the 12th hour, between 100-250 µM at the 24 hour measurement and 100 µM at the 48 hour measurement. When the results of Annexin V flow cytometry measurements were evaluated; we observed that 100 and 250 µM resveratrol given to MCF-7 cells increased early apoptosis compared to the control group.

Conclusion: We marked that the apoptotic effect of resveratrol, as one of all its anticancer effects, especially induced early apoptosis in the MCF-7 breast cancer cell strain depending on both dose and time.

Keywords: Annexin V; apoptosis; MCF-7; resveratrol.

Organizmada şifa bulmayan yeni yapılanmalar anlatmak için kanser terimi ilk olarak Hipokrat tarafından (M.Ö 460-377) kullanılmıştır. Kanser, yüzyıllar öncesinde olduğu gibi günümüzde de

aramızdaki varlığını sürdürmektedir. Kanser, hasarlı hücrelerin vücudun herhangi bir yerinde kontrol dışı çoğalıp, o bölgenin de dışına yayılmasından ileri gelen hastalıkların genel adıdır.^[1]

Geliş tarihi: 18 Kasım 2016 **Kabul tarihi:** 20 Aralık 2016

İletişim adresi: Dr. Gülten Karabekir. İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 34394 Esentepe, Şişli, İstanbul, Türkiye.
Tel: 0212 - 213 64 83 e-posta: gunnurbio@yahoo.com

Hasarlı hücreler vücutta kan, lenf ya da vücut boşlukları yoluyla ilk oluştuğu yerler dışındaki yerlere sıçrarlar, bu olaya metastaz adı verilir. Taşındıkları yerlerde de büyümeye devam ederek canlı için risk oluşturmaya başlarlar. Yani hücreler, normal süreçteki fonksiyonlarını yapamaz hale gelir ya da bazı yeni fonksiyonlara sahip olurlar.^[2]

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. Akciğer kanserinden sonra kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır.^[3,4] Dünyada yapılan araştırmalar sonucunda; bazı özelliklere sahip olan kadınlarda meme kanseri görülme riskinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu risk faktörlerinden biri, BRCA1 ve BRCA2 genlerinin taşınmasıdır. Anormal BRCA1 veya BRCA2 geni taşıyan meme kanserli hastaların aile öykülerinde meme kanseri, yumurtalık kanseri veya her ikisi yer alır. Ancak, meme kanserli kadınların çoğunun aile öyküsünde meme kanserinin bulunmadığının da unutulmaması gerekir. Diğer risk faktörleri şunlardır; ailede meme kanseri öyküsünün olması, genetik yatkınlık, önceden meme kanseri geçirmiş olmak, alkol alımı, düşük doz radyasyon, pestisitlere maruz kalmak gibi durumlar vardır. Ayrıca erken menarş, geç menopoz, diyabetes mellitus, ilerleyen yaş, obezite, oral kontraseptiflerin kullanımı, ilk doğumun geç yaşta yapılmış olması veya çocuk doğurmamış olmak gibi durumları da meme kanseri oluşumuna neden olan önemli faktörler arasında sayabiliriz.^[5-7]

MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) hücre soyu, 1970 yılında 69 yaşında bir hastanın metastatik dokusundan elde edilen epitel hücrelerdir. MCF-7 hücreleri adherent özellikler gösterip aynı zamanda transfeksiyonlar içinde uygundur. Bu hücreler östrojen reseptör pozitif özellik gösterdiğinden dolayı meme kanseri araştırmalarında sıklıkla kullanılır. Bu hücrelerin büyümesi *in vitro* olarak TNF alpha ve anti-estrogenler ile inhibe edilebilir.

Resveratrol (RES) (3,4',5-trihidroksi-stilben) birçok bitki tarafından bakteri ve mantar gibi patojenlere, sıcaklık dalgalanmalarına, ultraviyole (UV) ışınlarına ve yaralanmaya karşı doğal olarak üretilen bir fitoaleksindir. Daha sonra 1977 yılında Langcake, resveratrolün asma (*Vitis vinifera*) yapraklarında UV ışınlarına ve mantar enfeksiyonlara karşı sentezlendiğini göstermiştir.^[8,9]

Resveratrol bu güne kadar yapılan çalışmalarda 72 tür, 31 cins ve 12 familyada tespit edilmiştir.^[10] Bununla beraber, öncelikle *Polygonumcuspidatum* (çoban değneği), *Vitisvinifera* (asma), *Vaccinium sp.* (kızılcık), *Veratrumgrandiflorum* (beyaz çöplleme), *Arachishypogea* (yer fıstığı) ve *Morusrubra* (dut) bitkilerinde bulunur.^[11]

Laboratuvar ortamında yapılan başka çalışmalarda da resveratrolün meme kanseri hücre soylarında, medulloblastoma hücre soylarında ve kolon kanseri hücrelerinde apoptozu başlattığı ve tümör büyümesini engellediği gösterilmiştir.^[12]

Resveratrol ve vücutta oluşan metabolitlerinin (trans-resveratrol 3-O-sülfat, transresveratrol4'-O-sülfat, trans-resveratrol 3-O-4'-disülfat, trans-resveratrol 3-O-glukuronit ve trans-resveratrol 4'-O-glukuronit), insan malin MCF-7, MDA-MB-231, ZR-75-1 meme kanseri hücre kültürü üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Sonuçta, resveratrol, hücrelerin yaşam sürelerini anlamlı ölçüde kısaltırken, sülfatlanmış metabolitleri zayıf aktivite göstermiştir.^[13]

Son bilgiler resveratrolün eşsiz bir hücre yok etme sistemine sahip olduğunu ve tümör baskılayıcı gen p53 olsa da olmasa da kanser hücrelerini öldürdüğünü göstermektedir. Ayrıca resveratrolün meme kanseri üzerine etkisi östrojen reseptör pozitif tip ve östrojen reseptör negatif tipin her ikisinde de aynıdır. (www.kilispostasi.com/module, 2008). Meme kanseri riskinde resveratrol tüketimiyle azalma olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir.

Kırmızı şarap ekstralarının insan plasenta mikrozomlarında aromataz enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Aromataz enziminin aşırı miktarda eksprese olduğu, dişi transgenik farelerin üç hafta boyunca gavajla oral olarak 100 µL kırmızı şarap ekstralarıyla beslenmesi sonucu, hiperplazinin ortadan kalktığı, aromatazın aşırı eksprese olmasına bağlı olarak meme dokusunda gerçekleşen neoplastik değişikliklerin azaldığı gösterilmiştir. Meme kanseri hücre dizisi MCF-7 hücrelerinde resveratrolün aromataz enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir.^[14]

Birçok dokuda antikanserojen etkisi gösterilen resveratrolün, etki mekanizmaları gün ışığına çıkarılmayı beklemektedir. Resveratrol, hücre farklılaşmasını inhibe ederek kanserin ilerlemesini kontrol altına alabilmektedir.

Organizmada hücre canlılığı sürekli bir denge halindedir. Bir taraftan yeni hücreler sentezlenirken, var olan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece organizmadaki canlı ve ölü hücreler arasındaki denge korunmaktadır. Hücre ölümünün başlıca iki tipi vardır, bunlar apoptoz ve nekroz olarak tanımlanır.^[15,16] Hem apoptozda hem de nekrozda düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir.^[17]

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hücre kültürü aşaması

Deneylerde İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Araştırma Laboratuvarından sağlanan MCF-7 meme kanseri hücre soyu kullanıldı. Hücreler, içerisinde inaktive edilmiş %10 fetal sıgır serumu (FCS), 0,2 mM glutamin, 100 µg/mL streptomisin 100 IU/mL penisilin içeren DMEM-F12 Ham medyumunda (Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle Medyum, besleyici karışım F12 Ham medyum) 37 °C'de, %5 CO₂ ve 1 atmosfer basınç altında kültüre edildi. DMEM-F12 Ham medyumunu ticari olarak kullanıma hazır şekilde satın alındı. Hücreler rutin olarak haftada iki kez pasajlandı. Hücreler, yoğunluk olarak flaskın yarı yüzeyini kapladıklarında deneylerde kullanıldı.

25 cm²'lik kültür flaskların resveratrolün uygulanacak her bir dozunu içeren 5 mL DMEM-F12 Ham medyumunu eklendi ve her bir resveratrol dozu için iki adet flask hazırlandı. Kontrol gruplarına etken madde eklenmeden medyum verildi. MCF-7 hücreleri %100 canlı tek hücre süspansiyonundan elde edilerek yaklaşık 2.5x10⁶ hücre olacak şekilde 25 cm²'lik flasklara ekildi. Etken maddenin her konsantrasyonu için iki flask kullanıldı ve 12, 24 ve 48 saatlik deney grupları oluşturuldu.

Resveratrol, dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Bu stok solüsyondan 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM son konsantrasyonları olacak şekilde DMEM-F12 Ham medyumunu ile dilüsyon yapılarak final konsantrasyonlar hazırlandı.

Hücrelerin verilen etken maddenin her konsantrasyonu için tüm sürelerin sonunda invert

mikroskop altında fotoğrafları çekildi ve sitotoksik doz alanları fotoğraflar üzerinde belirtildi.

Sitotoksik dozların değerlendirilmesi

Resveratrolün MCF-7 hücreleri üzerinde yarattığı toksik etki 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT) analizi ile belirlendi. Bu ölçüm için 96 kuyucuklu mikropate kullanıldı. MCF-7 hücrelerinin 24 saat süre ile 96 kuyucuklu mikropatelere tutunması beklendikten sonra üzerlerindeki medyum alınmış ve yerine 100 µL etken madde içeren medyum eklendi. Kontrol gruplarına etken maddesiz medyum eklendi. Test periyodunun sonunda üst medyum kuyucuklardan çekildi ve üzerlerine 100 µL MTT solüsyonu eklendi ve dört saat süre ile 37 °C'de %5 CO₂'de inkübasyona bırakıldı. MTT solüsyonu 5 mg/mL olacak şekilde PBS içinde çözülüp steril filtrasyon ile bir şişeye transfer edilerek hazırlandı. Dört saat inkübasyon sonunda MTT solüsyonu kuyucuklardan çekildi ve kuyucukların üzerine MTT ile oluşan formazon kristallerini çözmek için 200 µL DMSO eklendi, hemen ardından 540 nm dalga boyunda Elisa Reader'da okutuldu. Okunan absorbans değerine göre sitotoksikite düzeyi belirlendi. Sitotoksikite düzeyleri aşağıdaki formül ile hesaplandı.

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

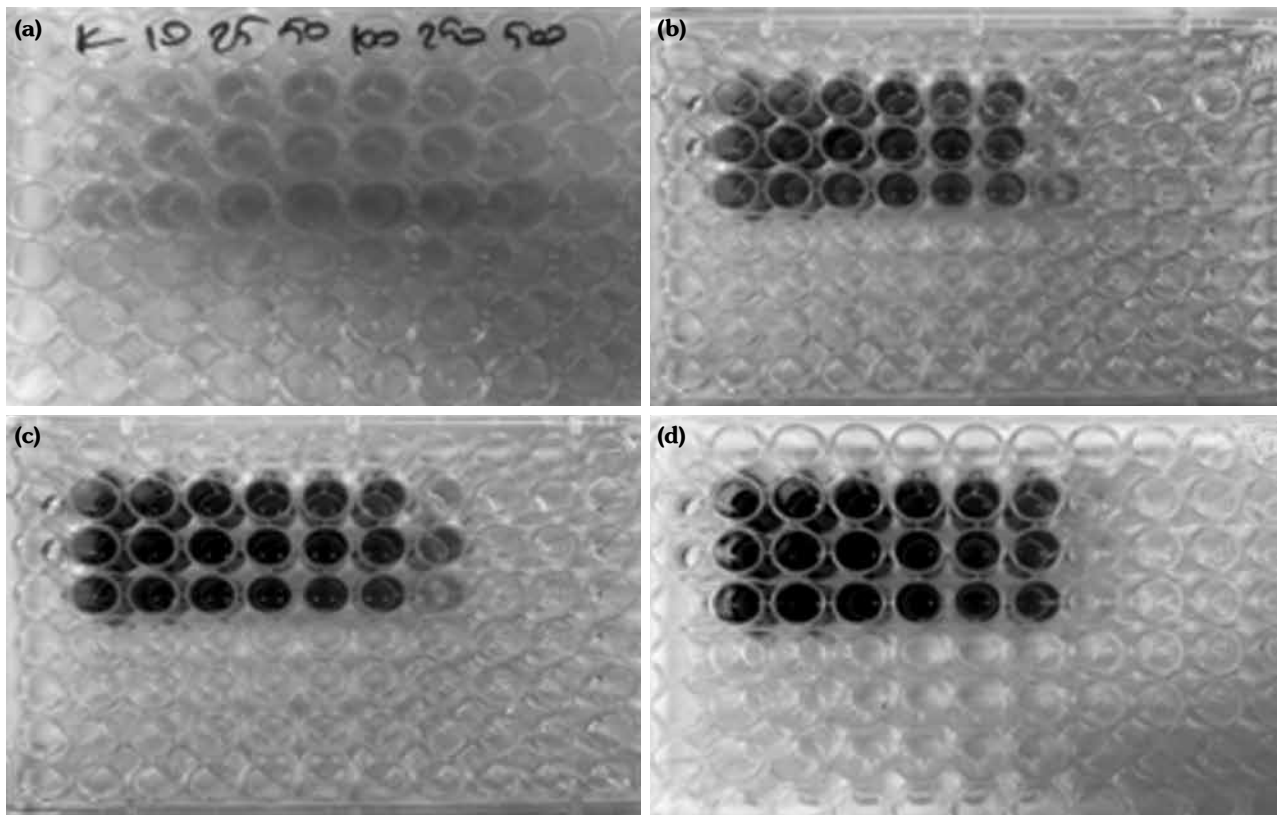
Kontrole göre %50 oranında sitotoksik etki gösteren konsantrasyon sitotoksik doz olarak kabul edildi.

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

B,C,D-2 kontrol grubu, B,C,D-3 10 µM resveratrol, B,C,D-4 25 µM resveratrol, B,C,D-5 50 µM resveratrol, B,C,D-6 100 µM resveratrol, B,C,D-7 250 µM resveratrol, B,C,D-8 500 µM resveratrol konsantrasyonları olacak şekilde MCF-7 hücreleri 96 kuyucuklu mikropatelere ekildi (Şekil 1).

Akım sitometri ölçümü ile ApcAnneksin V tayini

Tripsin-EDTA ile flasktan kaldırılan hücre süspansiyonu steril falkon tüplere alındı. Falkona alınan hücreler iyice süspanse edilerek sayım için 10 µL çekildi ependorf tüplere alındı ve 10 µL trypan blue ile karıştırılıp Thoma Lamı ile sayıldı



Şekil 1. MTT testi sürecinde 0, 12, 24. ve 48. saatlerde MCF-7 hücrelerine resveratrol uygulamasından sonra 96 kuyucuklu mikropelatelerin görüntüsü A: 0. saat, B: 12. saat, C: 24. saat, D: 48. saat. MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid testi

ve toplam hücre sayıları hesaplandı. Her hücre hattı için toplam 3×10^5 hücre alınarak santrifüj edildi ve üst sıvı vakumla atıldı. Hücre pelleti 1 mL PBS ile sulandırılıp santrifüj edilerek yıkandı. Üst sıvı vakumla atıldıktan sonra hücre pelleti 100 μ L Annexin Binding Buffer ile sulandırılarak endorff tüplere alındı. Her bir örneğe 5 μ L Annexin-V-APC boyası eklenerek kısaca vortexlendi ve 30 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 300 μ L

soğuk Annexin-binding buffer ilave edildi, örnekler buz üzerine alındı. 2 μ g/mL Propidium iodide (PI) eklendi ve 10 dakika bekletildi. Örnekler 40 μ m'lik filtrelerden geçirilerek BD Accuri C6 akım sitometri (BD Biosciences, CA, USA) cihazı ile analiz edildi. Apoptoz analizlerinde; Annexin-V ve hücre canlılık belirteci olan PI boyası ile ikili boyama yapılarak erken/geç apoptotik hücre ayrımı mümkün olmaktadır.

Tablo 1. 10, 25, 50, 100, 250, 500 μ M resveratrol verilmiş ve resveratrol verilmemiş (kontrol) MCF-7 hücre soyununun 12, 24. ve 48. saatlerindeki MTT absorbans değerleri

Resveratrol	12. saat absorbans değeri	24. saat absorbans değeri	48. saat absorbans değeri
Kontrol	1.1458	1.0827	2.2779
10 μ M	1.0322	1.1143	2.2813
25 μ M	1.0132	0.9724	1.9517
50 μ M	1.0287	0.8812	1.644
100 μ M	0.9663	0.614	1.1569
250 μ M	0.8221	0.4412	0.7646
500 μ M	0.4276	0.2552	0.1812

BULGULAR

Çalışmamızda MTT ölçümü için 96 kuyucuklu mikropalakalar kullanıldı. Resveratrolün uygulanacak tüm dozlarının her biri için üç kuyucuğa ekim yapıldı. Kontrol grubuna resveratrol verilmedi. 12, 24 ve 48 saat zaman aralıklarında deney tekrarlandı. Anneksin V akım sitometri ölçümü için MCF-7 hücre soyuna 100 ve 250 μM resveratrol verilerek 12, 24 ve 48. saatler için ayrı ayrı 25 cm^2 'lik flaklara ekim yapıldı. Kontrol grubuna resveratrol verilmedi.

TARTIŞMA

İlaçların yarattığı güçlü yan etkiler düşünüldüğünde ve kanserli hastaların tedavi sürecinde yaşadığı olumsuzluklar, antioksidan ve anti-kanserojen etkisi olan yeni ilaçların geliştirilmesi ve kullanılması önem arz etmektedir. Jang ve Pezzuto^[18] tarafından yayınlanan ilk makaleden sonra resveratrolün anti-kanser potansiyeli kanser araştırmacıları tarafından büyük ilgi görmüştür.

Yan etkisi olmayan, ilaç direnci geliştirmeyen, antioksidan ve anti-kanserojenik etkileri bilinen resveratrolün MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini *in vitro* ortamda göstermeyi çalışmamızda amaçladık.

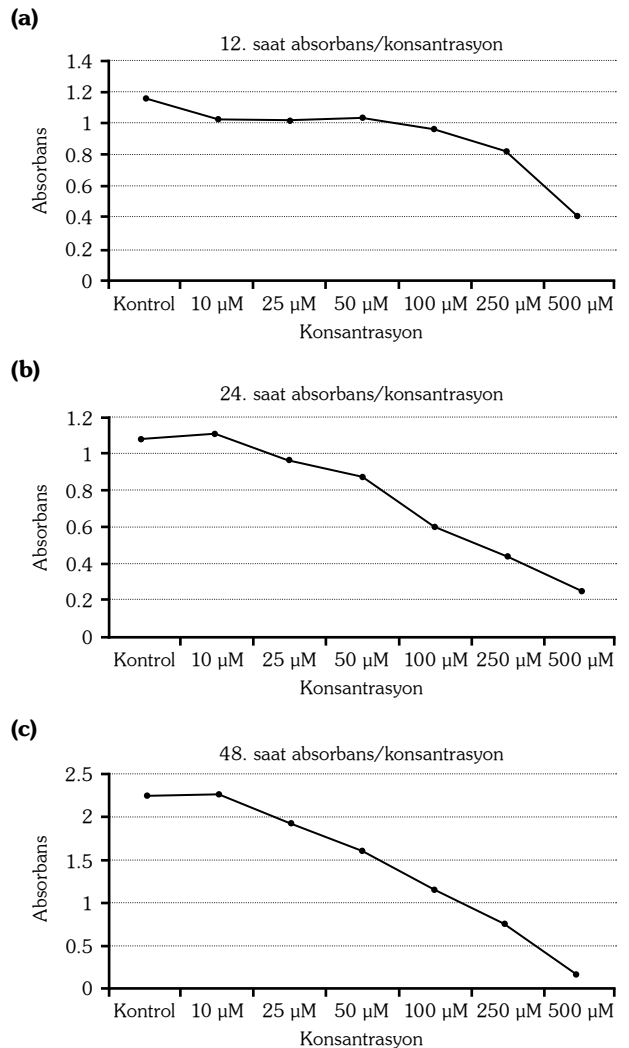
Bu çalışmada, APC ile işaretli Annexin-V anti-korunun apoptoz sürecinde hücre membranında bulunan fosfolipidlerden biri olan fosfatidilserin bağlanabilme özelliğinden yola çıkılarak, MCF-7 meme kanseri hücrelerine farklı dozlarda resveratrol verilerek, resveratrolün apoptoz üzerine etkilerinin zamana bağlı olarak oluşturduğu değişiklikler ve dozlar arasındaki farklılıkları araştırıldı.

MTT analizlerinde, sitotoksik doz, kontrol grubuna göre %50 absorbands azalmasına yol açan resveratrol dozu olarak tespit edilmiştir. On ikinci saatte yapılan ölçümlerde sitotoksik doz 250-500 μM arasında, 24. saatteki ölçümlerde 100-250 μM arasında, 48. saatteki ölçümlerde ise 100 μM olarak belirlenmiştir. Bu sayede MTT analizi ile hücre sayısı da değerlendirilmiştir. Biz de çalışmamızda, hücre yoğunluğunun kontrol grubuna göre azaldığını, 12, 24 ve 48 saat süreyle resveratrol ile inkübe ettiğimiz MCF-7 hücrelerine uyguladığımız MTT analizi sonuçlarından tespit ettik (Tablo 1, Şekil 2).

Akım sitometrik ölçümler için MCF-7 meme kanseri hücrelerini MTT sonuçlarına göre hem

100 hem de 250 μM resveratrol ile 12, 24 ve 48 saat süre ile inkübe ettik. Sonuçları kontrol grubuna göre karşılaştırdık.

MCF-7 hücrelerine verilen 100 ve 250 μM resveratrolün kontrol grubuna göre erken apoptozu artırdığı çalışmalarımızdan elde edilen Anneksin V akım sitometri ölçüm sonuçlarında gözlemlendi. Özellikle 48. saat sonunda erken apoptoz yüzdesinin kontrol grubuna kıyasla fazla oranda arttığı görüldü. Canlı hücre yüzdeleri değerlendirildiğinde, MCF-7 hücrelerine verilen 100 ve 250 μM resveratrolün kontrol grubuna



Şekil 2. MCF-7 hücre soyunda resveratrolün kontrol grubu, 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM konsantrasyonlarında absorbands/konsantrasyon grafiği. (a) 12. saat absorbands/konsantrasyon grafiği, (b) 24. saat absorbands/konsantrasyon grafiği, (c) 48. saat absorbands/konsantrasyon grafiği.

Tablo 2. Kontrol grubu 24. ve 48. saat MCF-7 hücre soyu ve 100 ve 250 μM resveratrol verilmiş MCF-7 hücre soyunda 12, 24. ve 48. saatlerdeki canlı hücre [Annexin V (-) PI (-)], erken apoptotik hücre [Annexin V (+) PI (-)], nekrotik hücre [Annexin V (-) PI (+)] ve geç apoptotik ve nekrotik hücre [Annexin V (+) PI (+)] yüzde değerleri

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

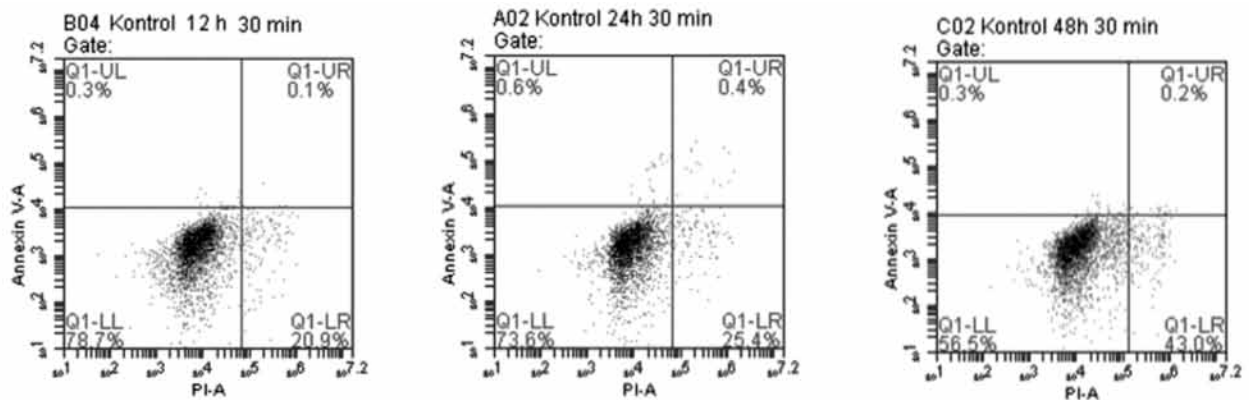
PI: PropidiumIodide; MCF-7: Michigan Cancer Foundation-7.

göre 12. ve 24. saatlerdeki canlı hücre sayısı ile 48. saatteki canlı hücre sayısı arasında oldukça fazla fark olduğu saptandı (Tablo 2, Şekil 3-5).

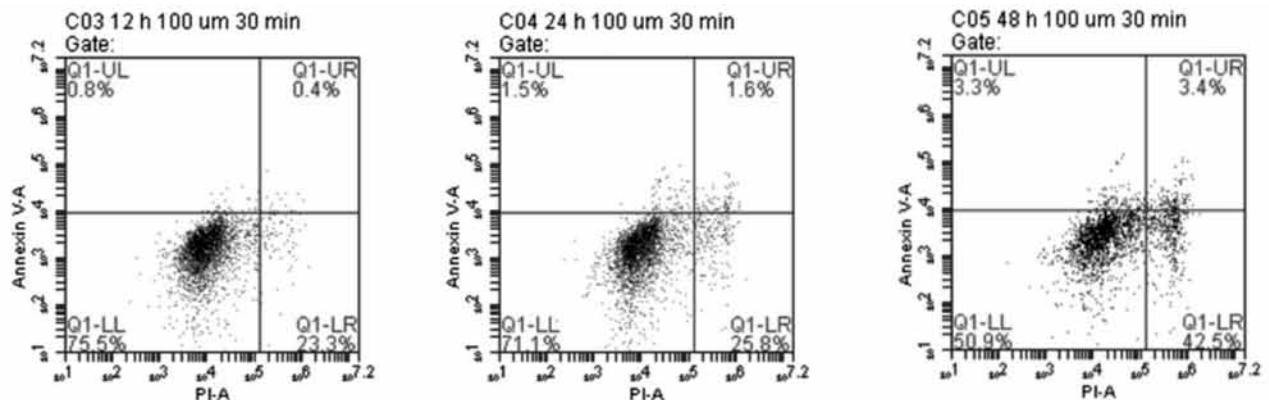
Geç apoptotik hücre yüzdele-ri değerlendirildiğinde; 12, 24. ve 48. saatler sonunda hem kontrol grubunda hem de 100 ve

250 μM resveratrol verilen hücre gruplarında zamana bağlı olarak geç apoptozun arttığı gözlemlendi.

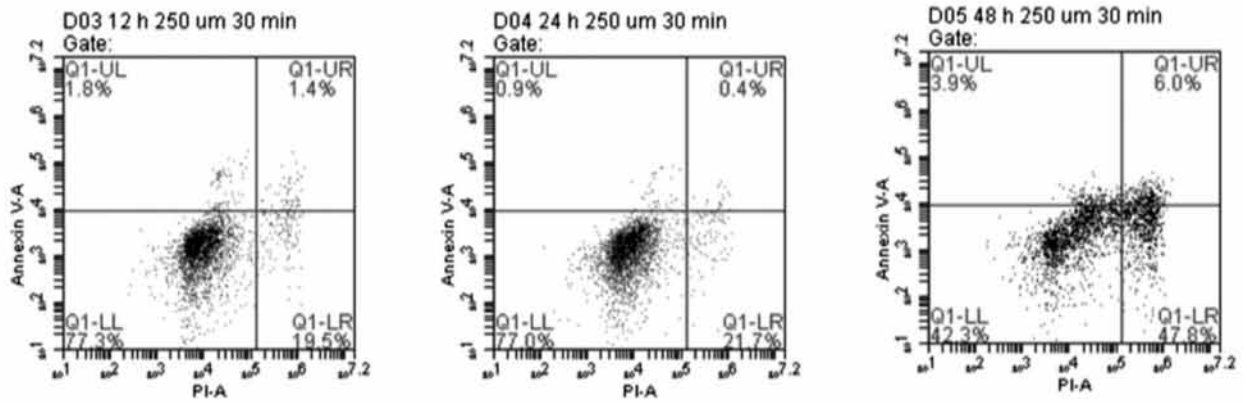
Nekrotik hücre gruplarında ise, 100 μM verilen MCF-7 hücrelerinde zamana bağlı olarak bir artış gözlemlenirken, kontrol ve 250 μM resveratrol



Şekil 3. 12, 24. ve 48. saatlerdeki resveratrol verilmemiş kontrol gruplarının akım sitometrik ölçüm grafikleri.



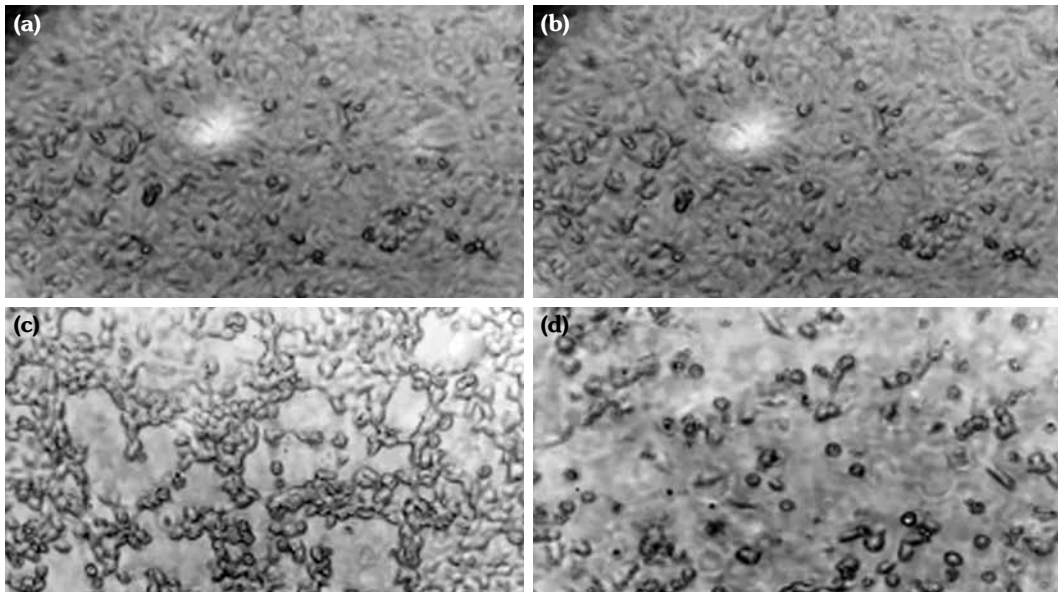
Şekil 4. 100 μM resveratrol verilmiş MCF-7 hücre soyunda 12, 24. ve 48. saatlerdeki akım sitometrik ölçüm grafikleri.



Şekil 5. 250 µM resveratrol verilmiş MCF-7 hücre soyunda 12, 24. ve 48. saatlerdeki akım sitometri ölçüm grafikleri.

verilen MCF-7 hücrelerinde ise zamana bağlı olarak düzenli bir yüzde artışı gözlemlendi. Özellikle hem 100 hem de 250 µM resveratrol verilen MCF-7 hücrelerinde erken ve geç apoptozun zamana bağlı olarak artması resveratrolün MCF-7 hücrelerinde apoptozu tetiklediğini açıklayabilir. Yine 48. saatin sonunda resveratrolün apoptozu 12. ve 24. saatlere göre daha çok tetiklediği görülmektedir. Bu da zaman içinde resveratrolün MCF-7 hücrelerinde apoptozu daha da hızlandırdığını bize göstermektedir (Tablo 2, Şekil 3-5).

Kontrol grubu, 100 ve 250 µM resveratrol uygulanan gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında 100 ve 250 µM resveratrol uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre apoptozun daha da tetiklendiği ayrıca 250 µM resveratrol uygulanan hücrelerde 100 µM resveratrol uygulanan hücelere göre apoptozun daha da arttığı görüldü. Resveratrolün hücelere verilen doz miktarı arttıkça MCF-7 hücrelerinde erken apoptoz daha da tetiklenmektedir (Tablo 2, Şekil 3-5).



Şekil 6. MCF-7 hücre soyunun 10*40 mikroskop görüntüsü. (a) MCF-7 hücre soyu kontrol grubu, (b) 250 µM resveratrol verilmiş MCF-7 hücre soyunun 12. saat mikroskop görüntüsü, (c) 250 µM resveratrol verilmiş MCF-7 hücre soyunun 24. saat mikroskop görüntüsü, (d) 250 µM resveratrol verilmiş MCF-7 hücre soyunun 48. saat mikroskop görüntüsü.

Sonuç olarak, resveratrolün hem 100 hem de 250 µM'lık dozlarının hem doz artımıyla hem de zamana bağlı olarak da apoptozu indüklediği görülmektedir (Şekil 6).

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

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

Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansman

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

- Gürel DK. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Erişkin Onkoloji, Hematoloji Kliniklerinde kemoterapi uygulanan hastaların yaşam kalitesi ve bunu etkileyen faktörlerin incelenmesi. [Yüksek Lisans Tezi], Adana: Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hemşirelik Anabilim Dalı; 2007.
- Kutluk T, Kars A. Kanser konusunda genel bilgiler. Erişim linki: <http://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/kanser.pdf>. [11 Temmuz 2013]
- Somunoğlu S. Meme kanseri: Belirtileri ve erken tanıda kullanılan tarama yöntemleri. Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi 2009;4:103-22.
- Saip P, Keskin S, Özkan M, Kaplan MA, Aydoğan F, Demirağ GG, ve ark. Türkiye'de meme kanserli hastaların tanı ve tedavi yöntemlerine ulaşım hızı; çok merkezli gözlemsel çalışma. The Journal of Breast Health 2011;7:109-17.
- Karaman A. Mide kanserinde p53 tümör supresör geninin rolü. Türkiye Klinikleri. Tıp Bilimleri Dergisi 2003;23:67-73.
- Kosova F, Arı Z. Adipositokinler ve Meme Kanseri, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2008;22:377-84.
- Somunoğlu S. Meme kanserinde risk faktörleri. Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi 2007;2:3-11.
- Cichewicz RH, Kouzi SA. Resveratrol oligomers: Structure, chemistry, and biological activity. Studies in Natural Products Chemistry 2002;26:507-79.
- Langcake P, Pryce RJ. A new class of phytoalexins from grapevines. Experientia 1977;33:151-2.
- Alkan R. Natural plant antibiotics: resveratrol. Gıda 2007;32:259-62.
- Shishir S, Bharat B, Aggarwal. Resveratrol: A Polyphenol for All Seasons. In: Aggarwal BB, Shishir S, editors. Resveratrol in Health and Disease. London: Taylor & Francis; 2006. p. 65.
- Schneider Y, Vincent F, Durantion B, Badolo L, Gossé F, Bergmann C, et al. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. Cancer Lett 2000;158:85-91.
- Demirezer LÖ, editör. Fed Monografları, Tedavide Kullanılan Bitkiler. Ankara: MN Medikal & Nobel Yayıncılık; 2011.
- Eng ET, Williams D, Mandava U, Kirma N, Tekmal RR, Chen S. Suppression of aromatase (estrogen synthetase) by red wine phytochemicals. Breast Cancer Res Treat 2001;67:133-46.
- Ameisen JC. The origin of programmed cell death. Science 1996;272:1278-9.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995;267:1456-62.
- Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. Eur J Endocrinol 1998;138:482-91.
- Jang M, Pezzuto JM. Assessment of cytooxygenase inhibitors using in vitro assay systems. Meth Cell Sci 1997;19:25-31.