

**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2013-YL-050**

**RESVERATROLÜN HÜCRESEL YAŞLANMANIN
İNDÜKLENMESİ VE SİRTÜİNLERİN
AKTİVASYONUNDA ROLÜNÜN İNSAN
DERMAL FİBROBLASTLARINDA
ARAŞTIRILMASI**

Ayten KILINÇLI

Tez Danışmanları:

Yrd. Doç. Dr. Özkan EREN

Yrd. Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Ayten KILINÇLI tarafından hazırlanan “Resveratrolün hücrel yaşlanmanın indüklenmesi ve sirtüinlerin aktivasyonunda rolünün insan dermal fibroblastlarında araştırılması” başlıklı tez, 27.08.2013 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI	ADÜ
Üye:	Doç. Dr. Serdar KOCA	ADÜ
Üye:	Yrd. Doç. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK	ADÜ
Üye:	Yrd. Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN	ADÜ
Üye:	Yrd. Doç. Dr. Özkan EREN	ADÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN
Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

.././2013

Ayten KILINÇLI

ÖZET

RESVERATROLÜN HÜCRESEL YAŞLANMANIN İNDÜKLENMESİ VE SİRTÜİNLERİN AKTİVASYONUNDA ROLÜNÜN İNSAN DERMAL FİBROBLASTLARINDA ARAŞTIRILMASI

Ayten KILINÇLI

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışmanlar: Yrd. Doç. Dr. Özkan EREN, Yrd. Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN
2013, 90 sayfa

Resveratrolün çeşitli model organizmalarda (NAD)-bağımlı histon deasetilaz ailesi sirtüinlerin üyesi olan Sirt1' i aktive ederek yaşam süresini uzattığı bilinmektedir. Ancak resveratrolün hücresel düzeyde hücre döngüsünü durdurduğu, erken yaşlanmaya ve apoptozise yol açtığı bilindiği için yaşlanmayı engelleyici etkileri tartışılmalı hale gelmiştir. Bu nedenle bu çalışmada, resveratrolün insan normal dermal fibroblastlarında (BJ) yaşlanma üzerine olası etkilerinin ve sirtüinlerle olan ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Resveratrolün 72 saatlik inkübasyon sonrasında 25 µM' dan itibaren BJ hücre proliferasyonunu azalttığı WST-1 ve BrdU testleriyle saptanmış ve Ki-67 immün boyama yöntemiyle de bu sonuç desteklenmiştir. Resveratrolün 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda ise hücresel yaşlanmayı indüklediği Saß-Gal boyaması ile gösterilmiştir. Bunun yanısıra resveratrolün yüksek konsantrasyonlarda (300 µM) hücre ölümüne neden olduğu TUNEL boyamasıyla belirlenmiştir. Sirt1, 2, 3, 6 ve 7' nin ifadelerinin Western Blot yöntemiyle analiz edilmesi sonucunda ise hücresel yaşlanmanın görüldüğü dozlarda Sirt1 ve 2' nin ifadesinde azalma olduğu ancak Sirt3, 6 ve 7' nin ifadelerinde ise değişiklik olmadığı bulunmuştur. Sonuç olarak resveratrolün doza ve zamana bağlı olarak hücresel yaşlanmayı indüklediği ve buna bağlı olarak Sirt1 ve 2' nin ifadelerinin azaldığı bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Resveratrol, sirtüin, hücresel yaşlanma, insan dermal fibroblastları (BJ)

ABSTRACT

**ROLE OF RESVERATROL IN INDUCTION OF CELLULAR
SENESCENCE AND ACTIVATION OF SIRTUINS ON HUMAN DERMAL
FIBROBLASTS**

Ayten KILINÇLI

M.Sc. Thesis, Department of Biology

Supervisors: Yrd. Doç. Dr. Özkan EREN, Yrd. Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN
2013, 90 pages

In model organisms resveratrol extends lifespan via activating Sirt1 which is a member of NAD⁺ dependent histone deacetylase family, sirtuins. On the other hand resveratrol also induces the cell cycle arrest and leads to premature senescence and apoptosis *in vitro* that makes the inhibitory effects of resveratrol on aging controversial. Thus, in this study the potential effects of resveratrol on human normal skin fibroblasts and the relationship between resveratrol and sirtuins were examined. As determined by WST-1 and BrdU tests, starting from 25 µM, resveratrol reduced cell viability. Ki-67 immunostaining results also supported this finding. In addition, utilizing Saß-Gal staining it was found that resveratrol induced cellular senescence at 25, 50 and 100 µM concentrations. Accordingly, resveratrol caused cell death / apoptosis at high concentrations such as 300 µM as determined by TUNEL staining. To answer the question whether resveratrol activates sirtuin expression or not, expression of Sirt1, 2, 3, 6 and 7 were examined. As shown by WB analysis at concentrations where resveratrol induced cellular senescence the expression of Sirt1 and 2 were decreased whereas Sirt3, 6 and 7 did not change. Hence, this study shows that resveratrol induced cellular senescence in a time and dose dependent manner and accordingly reduced the expression of Sirt1 and 2.

Key Words: Resveratrol, sirtuins, cellular senescence, human normal dermal fibroblasts (BJ)

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşıp her türlü yardımı ve desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Özkan EREN (Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aydın) ve Yrd. Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN' e (Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Tıbbi Biyoloji Bölümü, Aydın) teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez savunması sırasında değerli görüş ve önerileriyle tezime katkıda bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI (Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Tıbbi Biyokimya Bölümü, Aydın), Doç. Dr. Serdar KOCA (Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aydın), Yrd. Doç. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK' e (Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aydın) teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman yanımda olan ve beni destekleyen sevgili aileme ve arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi' nde (BİLTEM) yapılmıştır ve Adnan Menderes Üniversitesi Araştırma Projeleri' nce FEF-12036 nolu proje ile desteklenmiştir. Tez çalışmam süresince bursiyer öğrenci olarak çalıştığım TÜBİTAK COST 108S379 nolu yürütücülüğünü değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN' in yaptığı projeden maddi destek sağlanmıştır. Çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan BİLTEM' e ve Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü' ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
1.GİRİŞ	1
1.1.Resveratrol	1
1.1.1.Resveratrol Hakkında Genel Bilgiler	1
1.1.2.Resveratrolün Doğal ve Sentetik Türevleri	3
1.2.Hücreyel Yaşlanma (Senesens)	4
1.2.1.Geri Dönüşümsüz Hücre Siklusunun Durdurulması	6
1.2.2.Yaşlanma Sırasında Kromatin Modifikasyonu	6
1.2.3.Yaşlanmada Moleküler Mekanizmalar	6
1.2.3.1. P53 yolu	6
1.2.3.2. pRB yolu	7
1.2.3.3. Sirtüinler.....	7
2.KAYNAK ÖZETLERİ	11
2.1. Resveratrolün Anti-Oksidan Etkisi	11
2.2.Resveratrolün Anti-İnflamatuar Etkisi	12
2.3. Resveratrolün Anti-Proliferatif ve Sitotoksik Etkisi	13
2.4. Resveratrolün Anti-Kanser ve Apoptotik Etkisi	13
2.5. Resveratrolün Yaşlanma Karşıtı Etkisi ve Sirtüinlerle İlişkisi.....	14

3.MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. Kimyasal Malzemeler.....	18
3.1.2. Cam ve Plastik Malzemeler	19
3.1.3. Hücre Kültürü Malzemeleri.....	20
3.1.4. Kitler.....	21
3.1.5. Antikorlar	21
3.1.5.1. Primer antikorlar.....	21
3.1.5.2. Sekonder antikorlar.....	21
3.1.6. Markerler	21
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Hücre Kültürü.....	22
3.2.2. Hücrelerin Dondurulması	23
3.2.3. Hücrelerin Çözülmesi.....	23
3.2.4. Hücre Sayımı	23
3.2.5. Resveratrol Stoğunun Hazırlanması	25
3.2.6. Deney Grupları	25
3.2.7. WST-1 Testi	25
3.2.8. BrdU Testi	27
3.2.9. Ki-67 İmmün Boyama Yöntemi.....	29
3.2.10. SA-β-Galaktosidaz Boyama	31
3.2.11. TUNEL Testi	32
3.2.12. Hücre Lizatlarının Hazırlanması	34
3.2.13. Sitolizik ve Nükleer Ekstraksiyon	35
3.2.14. BCA Protein Assay Testi.....	36
3.2.15. Western Blot Analizi	37

3.2.15.1. SDS PAGE jelinin hazırlanması	38
3.2.15.2. Örneklerin hazırlanması	39
3.2.15.3. Elektroforetik yürütme	39
3.2.15.4. Semi-dry transfer.....	40
3.2.15.5. Bloklama	41
3.2.15.6. Birincil ve ikincil antikor ile inkübasyon.....	41
3.2.15.7. ECL ile görüntüleme	41
3.2.16. İstatistiksel Analiz.....	41
4.BULGULAR.....	43
4.1.WST-1 Testi ile Sitotoksik Etki ve Metabolik Aktivitenin Belirlenmesi	43
4.2. Hücre Proliferasyonunun BrdU Testi ile Değerlendirilmesi.....	46
4.3.Hücre Proliferasyonuna Bağlı Olarak Oluşan Ki-67 Ekspresyonunun Belirlenmesi.....	49
4.4. Senesense Bağlı Olarak Artış Gösteren β -galaktozidaz Aktivitesi	53
4.5. TUNEL Testi ile Apoptozisin Değerlendirilmesi	56
4.6. Western Blot Analizi ile Sirtüin Aktivasyonunun Değerlendirilmesi.....	60
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	66
6.KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	83

SİMGELER DİZİNİ

AMPK	AMP-activated protein kinase
ATCC	American type culture collection
BCA	The bicinchoninic acid
BrdU	Bromo-deoksi-üridin
DAPI	4' ,6-diamidino-2-phenylindole
Dk	Dakika
DMEM	Dulbecco' s modified eagle' s medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
G	Guanin
g	Nispi Santrifugal Kuvvet
HEPES	Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic
°C	Derece (Santigrad)
C	Sitozin
CaCl₂	Kalsium klorür
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
KCl	Potasyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
MTT	Hücre proliferasyon kiti
nm	Nanometre
PBS	Phosphate buffered saline
rpm	Revolutions per minute
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Sir2	Silent information regulator 2
NaCl	Sodyum klorür
Na₃VO₄	Tetra etil metilen diamin
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling
Wst-1	Water-soluble tetrazolium salt
UP	Ultra saf su

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Hücre sayımı için kullanılan Neubauer lamı.....	24
Şekil 3.2. WST-1 testi plak planı	26
Şekil 3.3. BrdU testi plak planı	28
Şekil 3.4. Western Blot elektroforetik yürütme düzeneği.....	40
Şekil 3.5. Semi-Dry (Yarı-kuru) transfer düzeneği.....	40
Şekil 4.1. BJ hücrelerinin resveratrol ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen % metabolik aktivite değerlerinin (ortalama±standart sapma) grafiksel olarak değerlendirilmesi	45
Şekil 4.2. BJ hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat resveratrol ile muamelesi sonrasında BrdU testi ile ölçülen % BrdU inkorporasyonunun (ortalama±standart sapma) grafiği.....	47
Şekil 4.3. Kontrol ve DMSO gruplarında Ki-67 ve DAPI boyaması (20x)	50
Şekil 4.4. 25 ve 50 µM resveratrol uygulanan BJ fibroblastlarında Ki-67 ve DAPI boyaması (20x)	51
Şekil 4.5. 100, 200 ve 300 µM resveratrol uygulanan BJ fibroblastlarında Ki-67 ve DAPI boyaması (20x).....	52
Şekil 4.6. 72 saat resveratrol ile muamele edilen BJ hücrelerindeki Ki-67 ekspresyonun % olarak (ortalama±standart sapma) değerlendirilmesi...53	53
Şekil 4.7. Resveratrol ile muamele edilen BJ fibroblastlarında Saß-Gal boyaması (10x).....	55
Şekil 4.8. 25, 50, 100 µM resveratrol ile muamele edilen BJ fibroblastlarında Saß-Gal boyaması (20x).....	56
Şekil 4.9. 72 saat inkübasyon sonrasında Kontrol ve DMSO gruplarında TUNEL ve DAPI boyaması (20x)	57
Şekil 4.10. 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarda resveratrol ile 72 saat muamele sonrasında TUNEL ve DAPI boyaması (20x)	58
Şekil 4.11. 200, 300 µM konsantrasyonlarda resveratrol ile 72 saat muamele sonrasında TUNEL ve DAPI boyaması (20x)	59

Şekil 4.12. Resveratrol ile 72 saat muamele edilen BJ fibroblastlarında WB analizi ile Sirt1 ifade düzeyi	60
Şekil 4.13. Sirt1 ifadesinin % olarak değerlendirilmesi	61
Şekil 4.14. Resveratrol ile 72 saat muamele edilen BJ fibroblastlarında WB analizi ile Sirt2 ifade düzeyi	62
Şekil 4.15. Sirt2 ifadesinin % olarak değerlendirilmesi	62
Şekil 4.16. Resveratrol ile 72 saat muamele edilen BJ fibroblastlarında WB analizi ile Sirt3 ifade düzeyi	63
Şekil 4.17. Sirt3 ifadesinin % olarak değerlendirilmesi	63
Şekil 4.18. Resveratrol ile 72 saat muamele edilen BJ fibroblastlarında WB analizi ile Sirt6 ifade düzeyi	64
Şekil 4.19. Sirt6 ifadesinin % olarak değerlendirilmesi	64
Şekil 4.20. Resveratrol ile 72 saat muamele edilen BJ fibroblastlarında WB analizi ile Sirt7 ifade düzeyi	65
Şekil 4.21. Sirt7 ifadesinin % olarak değerlendirilmesi	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Resveratrolün üzüm ve şaraplarda bulunma miktarı	3
Çizelge 1.2. Sirtüinlerin bulunduğu yer ve fonksiyonları	8
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan hücre tipi ve hücrenin özellikleri.....	22
Çizelge 3.2. Çalışmada uygulanan resveratrol konsantrasyonları.....	25
Çizelge 3.3. Yüzelere göre ayırıcı ve paketleyici jel içerikleri	39
Çizelge 4.1. WST-1 testine göre DMSO ve 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 µM konsantrasyonların kontrolle karşılaştırılması ve p değerleri	44
Çizelge 4.2. WST-1 testine göre 25, 50, 100, 200 ve 300 µM konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat için kontrole göre metabolik aktivitedeki % azalma değerleri.....	45
Çizelge 4.3. WST-1 testine göre DMSO ve 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 µM konsantrasyonların kontrolle karşılaştırılması ve p değerleri	48
Çizelge 4.4. BrdU testine göre 25, 50, 100, 200 ve 300 µM konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat için kontrole göre metabolik aktivitedeki % azalma değerleri.....	48

1. GİRİŞ

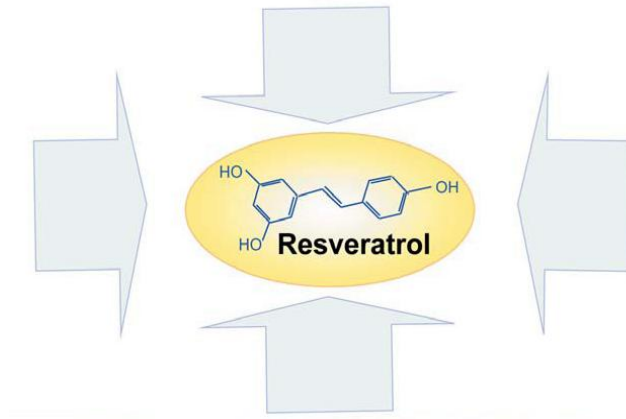
1.1. Resveratrol

1.1.1. Resveratrol Hakkında Genel Bilgiler

Resveratrol, ilk olarak 1940 yılında *Melanthiaceae* (Dokuztepeligiller) familyasında yer alan ve bilim dünyasına *Veratrum album* L. var. *grandiflora* Maxim. ex Miq. olarak tanımlandığı için beyaz çöpleme olarak da bilinen bitkinin köklerinden izole edilmiştir. Bu bitkinin günümüzde geçerli adı *Veratrum grandiflorum* (Maxim. ex Miq.) O. Loes' dir (Şekil 1.a). Şekil 1. b' de moleküler yapısı verilen resveratrolün o zamandan beri çok sayıda cinsde ait 70' den fazla bitki türünden ekstraktları yapılmıştır. *Festuca* spp. (Yumak), *Picea* spp. (Ladin), *Arachis hypogaea* L. (Yerfıstığı), *Cassia* spp. (Sinameki) *Gnetum montanum* Markgr., *Vaccinium myrtillus* L. (Yaban Mersini) başta olmak üzere tüm *Vaccinium* cinsine ait türler, *Nothofagus* spp. (Güney Kayını), *Artocarpus* spp., *Bulbophyllum triste* Rechb. f., *Morus* spp. (Dut), *Rheum rhaponticum* L., *Pinus sylvestris* L. (Sarıçam), *Scilla nervosa* Jessop, *Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decr. (= *Polygonum cuspidatum* Siebold & Zucc.), *Vitis vinifera* L. (Üzüm) resveratrolün özütlendiği bitki taksonlarından bazılarıdır (Aggarwal vd., 2004; Gupta vd., 2011). Resveratrolün en bol bulunduğu bitkiler şarap yapımında kullanılan *Vitis vinifera*, *V. labrusca* ve *V. rotundifolia* türleridir (Fremont, 2000). Resveratrol asmanın kökünde, tohumunda ve saplarda bulunsa da 1 gram kabukta 50-100 µg olmak üzere en fazla meyve kabuğunda bulunmaktadır (Jang vd., 1997; Sato vd., 1997). Üzüm ve şarapta bulunan resveratrol miktarları Çizelge 1.1' de verilmiştir.



Şekil 1.a. *Veratrum grandiflorum* (Maxim. ex Miq.) O. Loes (Sichuan ve Shan, 2004)



Şekil 1.b. Resveratrolün moleküler yapısı (Aggarwal vd., 2004)

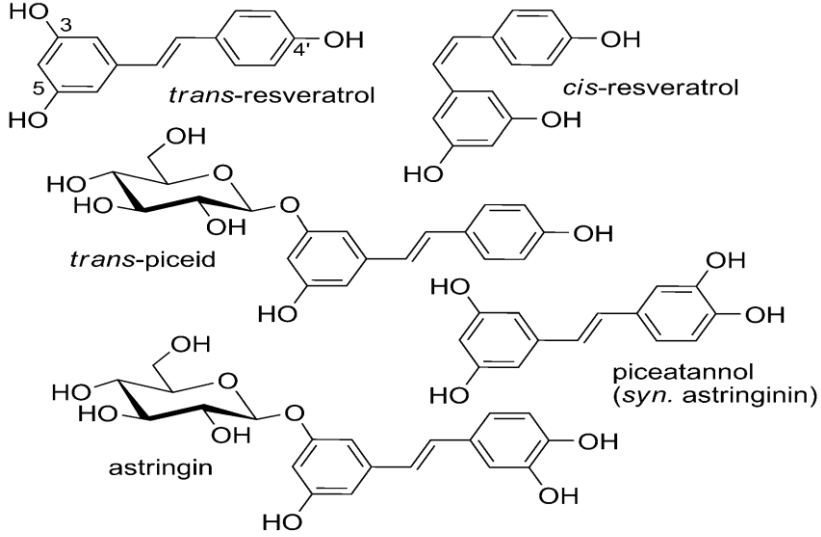
Çizelge 1.1. Resveratrolün üzüm ve şaraplarda bulunma miktarı (Giovinazzo vd., 2012)

	Kırmızı Üzüm	Kırmızı Üzüm Suyu	Beyaz Şarap	Kırmızı Şarap
Resveratrol	1.5 –7.8	1.14-8.69	0.05-1.8	1.98-7.13
	µg/g	mg/L	mg/L	mg/L

Resveratrol (3,5,4' –trihidroksistilben) enfeksiyon önleyici, anti-oksidan, anti-inflamatuvar, anti-proliferatif, antitümöral etkilerle birlikte çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik etkilere sahip doğal bir polifenoldür (Shakibaei vd., 2009; Yu vd., 2012). Polifenoller, antioksidan olarak insan vücudundaki çeşitli nedenlerle oluşmuş serbest radikalleri temizleme kabiliyetine sahiptirler. Ayrıca oksidatif stresi azaltmalarından dolayı kardiyovasküler hastalık ve kanser riskini de azalttıkları bilinmektedir (Abdulla vd., 2013). Doğal bir polifenol olan resveratrolün de kardiyovasküler hastalıklar, kanser, tip 2 diyabet ve nörolojik hastalıklar gibi yaş ile ilgili hastalıklarda yararlı etkilere sahip olduğunun yapılan çalışmalarla gösterilmesi büyük ilgi görmüştür (Yu vd., 2012). Ayrıca resveratrol bitkiler tarafından mikrobik, fungal, fiziksel uyarılara karşı üretilen antimikrobiyal ve antifungal etkili bir birleşiktir yani fitoaleksindir (Yu vd., 2012).

1.1.2. Resveratrolün Doğal ve Sentetik Türevleri

Resveratrol, bitki polifenollerinin polihidroksistilben alt sınıfına aittir. Stilben' ler bitkilerde bulunan biyoaktif birleşiklerin bir grubudur. Stilbenlerin yalnızca birkaçına (trans resveratrol ve onun doğal glikoziti trans-piceid) insan diyetinde rastlanmıştır. Bunların yapısı, bir çift bağ ile ayrılmış, kompakt bir halka yapısı oluşturacak bir izopropilen grubu yoluyla bağlanmış iki benzen halkası ile karakterize edilir (Kasiotis vd., 2013). Resveratrolün diğer formları ise cis formu ve resveratrolün diğer türevlerinden olan piseatannol ve astringindir. Bu formlar doğal olarak meydana gelmiştir. Resveratrolün biyolojik aktivitelerinin çoğu ise Şekil 1.2' de gösterilen trans formuna atfedilmiştir (Quideau vd., 2012).



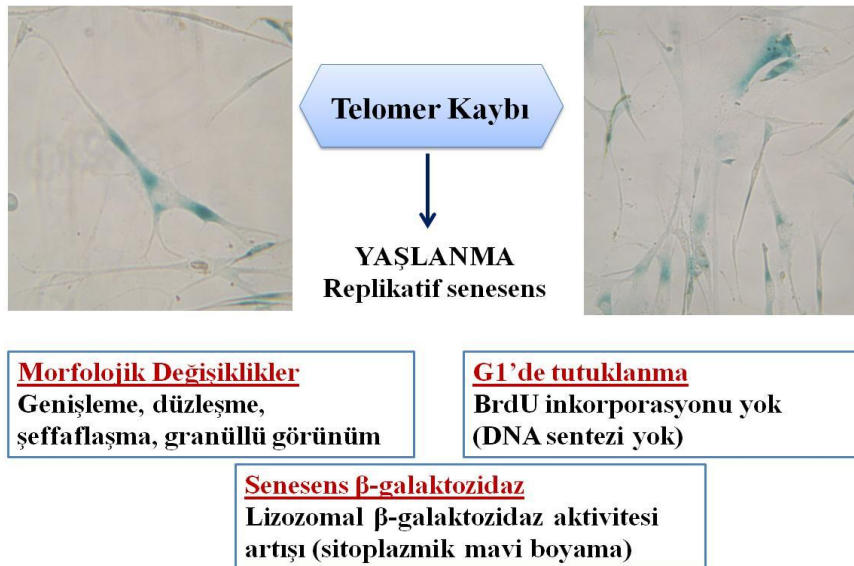
Şekil 1.2. Resveratrol ve resveratrol ile ilişkili polihidroksisitolbenler (Quideau vd., 2012)

1.2. Hüresel Yaşlanma (Senesens)

Yaşlanma, hücrelerden organlara kadar tüm yapılarda fonksiyonların giderek azaldığı oldukça karmaşık bir süreçtir. Canlı organizmanın büyüme ve gelişmesinde zamanla meydana gelen hasarların toplamı ve fonksiyonel açıdan yeteneklerinin azalmasıdır.

Hüresel senesens ise, ilk olarak *in vitro* koşullarda kültive edilen diploid fibroblastlarda replikasyon tükenmişliği sonucunda ortaya çıkan, hücre bölünmesinin durdurulması durumu olarak tanımlanmış ve *in vitro* bir fenomen olduğu düşünülmüştür. Sonraları bunun memeli hücrelerinde her bölünmede telomerin erozyona uğraması sonucu, DNA' da oluşan çift sarmal hasarıyla indüklenen, hücre siklusunun G1 fazında geri dönüşümsüz durdurulması durumu olduğu ortaya çıkarılmış ve literatürde replikatif senesens olarak yerini almıştır. Replikatif senesens memeli hücrelerinde ve organizmada dokuların dengesinin korunmasında, hüresel yaşlanma ve kanserde önemli rol oynar (Kılıc Eren, 2012). Yaşlanan hücreler replikasyon yeteneklerini kaybetmiş olsalar da canlı ve metabolik olarak aktif hücrelerdir. Uzun süre hayatta kalırlar ve apoptozise direnirler (Blagosklonny, 2012). Bu hücrelerde aynı zamanda yaşlanma ile ilişkili beta galaktozidaz enzim aktivitesinin arttığı görülür. Yaşlanan hücreler β -

galaktozidaz aktivitesi için pozitifdir ve morfolojik olarak basık, genişlemiş, daha granüler bir yapı gösteren hücelere dönüşmektedir (Lou ve Chen, 2006). Şekil 1.3' de yapılan Sa β -Gal boyaması sonucu elde edilen görüntülerle senesens karakteristikleri gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Senesensin karakteristikleri

Günümüzde ise senesensin hücrede telomer dışında, oksidatif hasar, DNA hasarı, anormal onkogen aktivasyonu veya tümör supresör gen inaktivasyonu ya da mitojenik stimülasyona karşı koruyucu bir cevap ve bir tümör supresör mekanizma olarak da genç hücrelerde prematüre olarak aktive olduğu bilinmektedir (Kilic ve Schmittca, 2008). Prematüre senesens ise genç hücrelerde hücrelerin bölünme yeteneğini çeşitli stres koşullarında (DNA hasarı yaratan ajanlar, oksidatif stres, belirli onkogenlerin aktivasyonu tümör supresör gen inaktivasyonu, mitojenik stimülasyon, gibi) kaybetmesi ile meydana gelen hücre yaşlanması sürecidir.

Hüresel yaşlanma, yaşlanma sürecinin altında yatan mekanizmaların anlaşılması için birçok çalışmada hüresel model olarak kullanılmıştır (Chen vd., 2007).

1.2.1. Geri Dönüşümsüz Hücre Siklusunun Durdurulması

Yaşlanmakta olan hücrelerin büyümelerinin durdurulması çoğunlukla G1 fazında meydana gelir. Hücre siklusu inhibitörlerinin artmış ifadesi ile siklinler ve

transkripsiyon faktörleri gibi hücre siklusunun ilerlemesi için gerekli olan hücre siklusu regülatörlerinin azalmış ifadesi bu duruma eşlik eder. Sikline bağımlı kinaz inhibitörleri p21 ve p16, yaşlanma ve yaşlanma ile bağlantılı hastalıklar konusunda oldukça önemli rol oynarlar. Retinoblastoma proteini (pRB) G1' deki hücre siklusu ilerleyişinde blok oluşturmak üzere hipofosforillenmiş aktif safhasında koruyan sikline bağımlı kinazları inaktive etmek üzere fonksiyon gösterir (Martinsson vd., 2005; Park vd., 2012).

1.2.2. Yaşlanma Sırasında Kromatin Modifikasyonu

Kromatin yaşla bağlantılı olarak yeniden modellenir. Metilasyonda genom boyunca azalma olsa da genomun spesifik bölgelerindeki metilasyonda aynı zamanda bir artış vardır. Bu durum, genlerin öncü bölgelerinden oluşan DNA üzerindeki CG' de meydana gelir. Histonlar da yaş ile birlikte deasetilasyon yoluyla modifiye olurlar. Kromatinde yaşlılıkla ilişkili heterokromatin odağı adı verilen özel bölgeler yaratırlar. Genellikle bu tür modifikasyon, proliferasyonun, yaşlanan hücrelerde tetiklendiği ve proliferasyonu destekleyen genlerle bağlantı bölgelerinin sessizleşmesine neden olan ve yaşlanmaya bağlı proliferasyonun durdurulmasına katkıda bulunduğu durumlar da görülür (Di Bernardo vd., 2012).

1.2.3. Yaşlanmada Moleküler Mekanizmalar

Farklı uyaranlar yaşlanma tepkisini indükleyebilseler de hemen hepsi yaşlanma tepkisini meydana getiren ve koruyan bir ya da farklı iki yola doğru yönelmektedirler. Bunlar p53 ve pRB adı verilen tümör baskılayıcı proteinler tarafından yürütülmektedir.

1.2.3.1. P53 yolu

P53' ün DNA hasarına karşı oluşan hücresel yanıtta önemli bir rol oynadığı çok iyi bilinmektedir. Telomerlerin yıpranması p53 artışını tetiklediğinden, aynı zamanda yaşlanma tepkisinde de önemli bir aracı olduğu da ortaya çıkarılmıştır (Tasaki vd., 2012; Senturk ve Manfredi, 2013). Normal hücreler içindeki onkogenlerin uygun olmayan biçimlerde aktivasyonu, p53 aktivasyonu yoluyla erken yaşlanmayı hücresel koruyucu tümör baskılayıcı cevap olarak indükler (Walerych vd., 2012).

1.2.3.2. pRB yolu

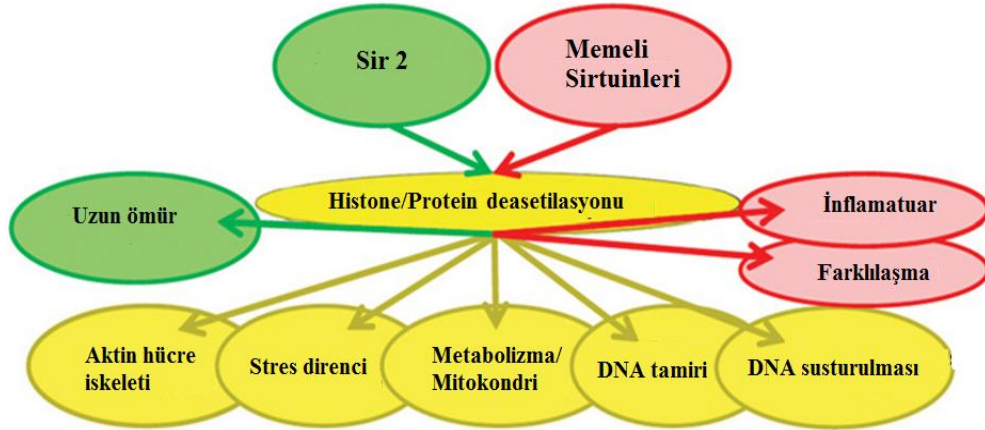
Bazı hücrelerde tek başına p53 aktivasyonunun, yaşlanma fenotipini geri döndürmede yetersiz olduğu görülmektedir. Farkı yaratan nokta p16 ifadesinin varlığı ya da yokluğudur. Stres p16 ifadesini arttırırken sonuç olarak ortaya çıkan pRB artışının kromatinin yeniden organize olmasına yardım ettiği ve bu durumun hücre siklusu regülatörlerini kodlayan genin yaşlanma ile bağlantılı replikatif inhibisyonu ile sonuçlandığı bilinmektedir (Mackenzie Ross vd., 2012; Mijovic vd., 2013).

1.2.3.3. Sirtüinler

Hücreyi yaşlanma bağlantılı fonksiyon azalmasından korumada önemli rol oynayan bir protein sınıfı da sirtüinlerdir. Sirtüinlerin NAD⁺-bağlı deasetilaz ve ADP-riboziltransferaz aktivitesine sahip olan bir protein sınıfı olduğu bilinmektedir. Memelilerde, hücre içinde farklı yerlerde lokalize olan 7 tane sirtüin bulunmaktadır (Haigis ve Sinclair, 2010).

Sirt1, Sirt2, Sirt3 ve Sirt5 NAD-bağlı deasetilaz, Sirt4 ve Sirt6 ADP-ribozil transferaz aktivitesine sahiptir. Sirt7 için henüz hiçbir enzimatik aktivite tanımlanmamıştır (Yu vd., 2009). Sirtüinin aracılık ettiği deasetilasyon reaksiyonu, lizin deasetilasyonunu NAD hidrolizi ile birleştirir. Bu hidroliz sirtüin aktivitesi inhibitörü olan nikotinamid ürününü meydana getirir.

Yapılan çalışmalarda Sir2 geninin, genom instabilitesini bastırarak yaşam süresini uzattığı bildirilmiştir (Kaeberlein vd., 1999). Sir2, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Caenorhabditis elegans* gibi birçok türde organizmanın yaşam döngüsünü düzenlediği bilinen NAD-bağlı histon deasetilazdır (Michishita vd., 2005). *Saccharomyces cerevisiae*, Sir2 geninin ilk olarak tanımlandığı ökaryot modelidir (Horio vd., 2011). Memelilerde sirtüin olarak bilinen Sir2 benzeri genler bakteriler, bitkiler ve hayvanlar gibi birçok organizmada bulunmaktadır. Sir2 ve memeli sirtüinleri memeli ve maya hücrelerinde ortak olan birçok fizyolojik fonksiyonu etkilemektedir (Horio vd., 2011). Sir2 ve memeli sirtüinlerinin ortak fonksiyonları Şekil 1.4' te gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Sir2 ve memeli sirtüinlerinin ortak fonksiyonları (Horio vd., 2011)

Memeli sirtüinleri arasında Sir2 proteinine en yakın homolog olarak gösterilen Sirt 1' dir (Yu vd., 2009). Sirt1 nükleus, Sirt2 sitoplazmada, Sirt3, Sirt4 ve Sirt5 mitokondride, Sirt3 ise hem nükleus hem mitokondride bulunur. Sirt6 ve Sirt7 ise nükleer sirtüinlerdir (Yamamoto vd., 2007). Sirtüinler, buldukları yerler ve biyolojik fonksiyonları Çizelge 1.2' de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Sirtüinlerin bulunduğu yer ve fonksiyonları (Haigis ve Sinclair, 2010)

Sirtüin	Bulunduğu Yer	Fonksiyonları
Sirt1	Nükleus	Metabolizma, Stres
Sirt2	Sitoplazma	Hücre Döngüsü
Sirt3	Mitokondri	Termogenezis, ATP Üretimi
Sirt4	Mitokondri	İnsülin Sekresyonu
Sirt5	Mitokondri	Üre Döngüsü
Sirt6	Nükleus	DNA Onarımı, Metabolizma
Sirt7	Nükleolus	rRNA Transkripsiyonu

Memeli sirtüinlerinin DNA onarımı, metabolik regülasyon, yaşlanma ile ilgili hastalıklar ve diğer birçok konuda rolü olduğu bilinmektedir (Finkel vd., 2009).

Çizelge 1.2' de görüldüğü gibi Sirt2 sitoplazmik bir proteindir. Hücre kültürü çalışmalarında Sirt2' nin memeli hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol aldığı gösterilmiştir. Sirt2 proteinin seviyesi hücre döngüsünün mitotik fazı boyunca artış göstermiş ve ifadesinde görülen aşırı artışın mitozun gecikmesine neden olduğu bildirilmiştir (Haigis ve Guarente, 2009).

Sirt3, memeli hücrelerinin mitokondrisinde lokalize olduğu gösterilen ilk sirtüindir. Mitokondriyal matrikste bulunmaktadır. Sirt3, tübülün ve histon peptidleri gibi birçok subsuratın deasetilasyonundan sorumludur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla Sirt3' ün biyolojik fonksiyonu aydınlatılmaya çalışılmaktadır (Bause ve Haigis, 2012; Brown vd., 2013). Sirt3' ün mitokondriyal fonksiyonları regüle ettiği de bildirilmiştir (Haigis ve Guarente, 2009).

Sirt6 ise nükleer bir protein olup, çoğunlukla fare dokularında ifade edilmektedir. Sirt6, DNA onarımında görev almaktadır (Jia vd., 2012).

Sirt7' nin insan hücrelerinde nükleolusta yer aldığı ve rRNA transkripsiyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Dalak, karaciğer ve testislerde bol miktarda bulunmaktadır (Li ve Bhatia, 2013). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Sirt7' nin hücre büyüme ve metabolizmayı regüle ettiği ve Sirt7' deki aşırı artışın rRNA transkripsiyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Tsai vd., 2012).

Resveratrolün Sir2 ailesi deasetilaz aktivitesini aktive etme yeteneği son zamanlarda büyük ilgi uyandırmıştır. Yapılan çalışmalarda resveratrolün Sirt1, Sirt3 ve Sirt7' yi aktive ettiği gösterilmiştir (Yu vd., 2009). Resveratrolün, özellikle çeşitli model organizmalarda Sirt1' i aktive ederek yaşam süresini uzattığı bilinmektedir. Ancak resveratrolün hücre düzeyinde hücre döngüsünü durdurduğu, erken yaşlanmaya ve apoptozise yol açtığı bilindiği için yaşlanmayı engelleyici etkileri tartışmalı hale gelmiştir. Bu çalışmada resveratrolün insan normal dermal fibroblastlarında (BJ) yaşlanma üzerine olası etkilerinin ve sirtüinlerle olan ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yapılan bu çalışmada;

- 1) Resveratrolün hücre yaşlanmanın indüklenmesi ve sirtüinlerle olan ilişkisinin ortaya çıkarılması amacıyla *in vitro* hücre kültürü yöntemi ve insan normal dermal fibroblastları (BJ) kullanılmıştır.

- 2) Resveratrolün BJ fibroblastlarında hücre canlılığı ve metabolik aktivite üzerine etkisi WST-1 testi kullanılarak, proliferasyon üzerine etkisi BrdU testi ve Ki-67 immün boyama yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.
- 3) Resveratrolün insan normal dermal fibroblastlarında yaşlanma üzerindeki etkilerini test etmek amacıyla Saß-Gal boyama yöntemi, ayrıca hücrelerde apoptozisin indüklenmesine neden olup olmadığının belirlenmesi amacıyla ise TUNEL boyama yöntemi kullanılmıştır.
- 4) Resveratrolün insan normal dermal fibroblastlarında yaşlanma üzerinde olası etkilerinin sirtüinlerle ilişkisinin ortaya çıkarılması amacıyla Sirt1, 2, 3, 6 ve 7 proteinlerinin ifadeleri Western Blot yöntemiyle analiz edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Resveratrolün Anti-Oksidan Etkisi

Resveratrolün anti-oksidan aktivitesini aydınlatmak amacıyla Jang ve Surh (2001) tarafından gerçekleştirilen çalışmada rat, PC12 hücrelerinde hidrojen peroksit indüklü oksidatif stres ve apoptotik hücre ölümü araştırılmıştır. Hücreler resveratrol ile muamale edilmeden önce ve edildikten sonra hidrojen peroksit indüklü sitotoksiste, DNA fragmantasyonu, ROS' un hücre içindeki birikimi ölçülmüştür. Sonuçta resveratrolün reaktif oksijen parçalarının hücre içinde birikmesinin ve hidrojen peroksit indüklü sitotoksitenin azaltılması aracılığıyla oksidatif stresi engellediği bildirilmiştir. PC12 hücrelerinde resveratrolün oksidatif stres ile hücrelerde oluşan apoptozisi azalttığı izlenmiştir (Jang ve Surh, 2001). Resveratrolün hücre içi ve hücre dışı ROS üretimini inhibe ettiği de gösterilmiştir. (Jang ve Surh, 2001; He vd., 2010). Resveratrolün ayrıca lipidleri peroksit degradasyonundan koruduğu bildirilmiştir (Bhavnani vd., 2001; Franco vd., 2010). Resveratrolün lipit peroksidasyonunu önlemede vitamin E ve vitamin C ile karşılaştırıldığında % 95 oranında daha etkili olduğu ve hücre içerisindeki molekülleri hedef alarak hücre canlılığını sürdürdüğü ve oksidasyonu inhibe ettiği bildirilmiştir (Stojanovic vd., 2001).

Ryan vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada resveratrolün yaşa ve egzersize bağlı oksidatif hasarı ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu azalttığı gösterilmiştir. Bahse konu çalışmada, 3 aylık ve 27 aylık fareler 10 gün boyunca % 0.05 trans-resveratrol içeren diyetle alınmışlardır. 7 gün sonunda farelerin bacaklarından elektriksel akım verilerek kaslara egzersiz yaptırılmıştır. Çalışma sonunda yaşlı farelerin egzersiz yaptırılan kaslarında resveratrolün lipit oksidasyonundaki artışı engellediği, katalaz aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir (Ryan vd., 2010). Yau vd. (2010) tarafından gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise ülseratif kolite sahip farelerde sodyum sülfat indüklü oksidatif hasara karşı resveratrolün rolü araştırılmıştır. Farelere 7 gün boyunca oral yolla sodyum sülfat verilmiştir. Resveratrol ile muamele edilen grupların inhibitör etkileri ve histolojik değişiklikler günlük olarak hastalık aktivite indeksi ölçülerek belirlenmiştir. Kolon dokusunda MDA, MPO, SOD and GSH-PX aktivite değerleri kimyasal kolorimetre ile belirlenmiştir. Resveratrol verilen grupta sodyum sülfatın etkisinin inhibe olduğu bildirilmiştir. Ayrıca resveratrol ile muamele edilen kolon dokusunda MDA ve MPO değerlerinde azalma gözlenmiştir. SOD ve GSH-Px

ifadelerinde artış, TNF- α , IL-8, IFN- γ , p22phox ve gp91phox ifadelerinde azalma saptandığı bildirilmiştir. Sonuç olarak resveratrolün sodyum sülfat indüklü oksidatif hasarın önlenmesinde önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (Yao vd., 2010).

2.2. Resveratrolün Anti-İnflamatuar Etkisi

Resveratrolün inflamasyon karşıtı etkisinin doku hasarı ve hücrel proliferasyonu baskıladığı ve cilt yapısının korunmasında önemli bir faktör olduğu bilinmektedir (De La Lastra ve Villegas, 2005). Ayrıca yapılan birçok çalışmada resveratrolün anti-inflamatuar özellik gösterdiği ve bu etkiyi nötrofil, monosit ve makrofajlarda ROS' un inhibisyonuna neden olarak yaptığı bildirilmiştir (Martinez ve Moreno, 2000). Makrofajlardan ve lenfositlerden çeşitli sitokinlerin salınımının resveratrol tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (Feng vd., 2002).

RAW264.7 hücreleri ile yapılan bir çalışmada resveratrolün makrofajlarda LPS indüklü TNF- α ve IL-6 üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir. Yani resveratrolün inflamasyon karşıtı bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Kang vd., 2010).

Resveratrolün, son zamanlarda tümörlerde ve inflamatuvar hastalıklarda önemli bir rolü olduğu gösterilen COX-2' nin (Malhotra vd., 2011) enzim aktivitesini inhibe ederek PGE2 sentezini durdurduğu bildirilmiştir (Subbaramaiah vd., 1998; Cianciulli vd., 2012). Resveratrolün TNF α , IL-6, IL-8, COX-2' nin ifadesini hücre içi Ca⁺²' nin seviyesindeki ve hücre dışı ERK ½ seviyesindeki azalma aracılığıyla baskılamakta olduğu bildirilmiştir. AP-1 ise hücre farklılaşması ve proliferasyonunu da içeren bazı genlerin ifadesini düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Resveratrolün hücre farklılaşması ve proliferasyonunu da içeren bazı genlerin ifadesini düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olan AP-1' in de TNF indüklü aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Manna vd., 2000; Kim vd., 2006). 3T3 hücreleri ile yapılan diğer bir çalışmada resveratrol ile aktive edilen Sirt1' in TNF-a indüklü inflamasyonu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Zhu vd., 2011). Resveratrol ile mumale edilen ratlarda anti-inflamatuar etkilere bakılan diğer bir çalışmada ise MPO, TNF-a, IL-6 and ICAM-1 gibi inflamatuvar parametrelerinde azalma olduğu, IL-10 anti-inflamatuar parametrelerinde ise artış olduğu bildirilmiştir (Orsu vd., 2013).

2.3. Resveratrolün Anti-Proliferatif ve Sitotoksik Etkisi

Schneider vd. (2000) tarafından yapılan çalışmada kolon kanseri hücrelerinde 25 μ M resveratrolün proliferasyonda % 70 oranında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca resveratrolün herhangi bir sitotoksik ve apoptotik etkiye sahip olmadığı rapor edilmiştir (Schneider vd., 2000). İnsan servikal tümör kanser hücre dizilerinde yapılan başka bir çalışmada hücreler 24 saat 25 μ M resveratrol ile muamele edildikten sonra BrdU testi yapılarak proliferasyonda azalma meydana geldiği rapor edilmiştir (Zoberi vd., 2002). Rahman vd. (2012) tarafından Rat nöroblastoma hücreleri kullanılarak yapılan çalışmada resveratrolün bu hücrelerde doza ve zamana bağlı olarak hücre içerisindeki sitotoksisiteyi arttırdığı bildirilmiştir. Çalışmada 20 μ M resveratrol ile hücreler 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ayrıca hücrelerin resveratrol ile muamelesi hücre döngüsünün S fazında durmasına ve BrdU pozitif hücre sayısında azalmaya neden olmuştur (Rahman vd., 2012). Fang vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada 0-50 μ M resveratrolün prostat kanser hücrelerinde (PC-3) 24 saat sonunda proliferasyonda azalmaya neden olduğu Quick Cell Proliferation Assay Kit kullanılarak belirlenmiştir (Fang vd., 2012).

2.4. Resveratrolün Anti-Kanser ve Apoptotik Etkisi

Jang vd. (1997) tarafından resveratrolün anti-kanser potansiyeli hakkında yayınlanan ilk makaleden beri bu molekül kanser araştırmacıları tarafından büyük ilgi görmüştür (Jang vd., 1997). Resveratrolün anti-kanser aktivitesi tümör hücrelerinin hücre döngüsü süreci, proliferasyonu, apoptozisi, metastazi, anjiyogenezi ve invazyonunu düzenleyen çeşitli hücre sinyal moleküllerinin modülasyonu aracılığı ile olmaktadır. Resveratrolün kemoterapiye direnç mekanizmalarının üstesinden gelerek kemoterapötik ajanlara karşı dirençli hücreleri duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Gupta vd., 2011). Bazı tümör hücrelerinde ise resveratrolün kansere karşı koruyucu olarak görev yaptığı bilinmektedir. Birçok anti-tümör terapisi için apoptozisin indüklenmesi anahtar bir mekanizmadır. Resveratrol, kültüre edilmiş kanser hücre dizilerinde antiproliferatif özelliğe sahiptir ve hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozisin indüklenmesinde önemli rol oynamaktadır. Fakat apoptozis-indüklü etkileri farklı tümör hücrelerinde farklılık göstermektedir (Bai vd., 2010). Ayrıca resveratrolün prostat kanseri ve kolon kanserinde p53-bağımlı apoptozise aracı olduğu bildirilmiştir (Gatouillat vd., 2010). Liao vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada

Huh-7 karsinom hücrelerinde 25 μ M resveratrol hücre döngüsünün durdurulmasına ve apoptozise neden olduğu bildirilmiştir (Liao vd., 2010). K562 hücrelerinde resveratrol ile aktive olan PKC ve ERK1/2 p53 fosforilasyonu ve apoptozise neden olduğu rapor edilmiştir (Chakraborty vd., 2008; Can vd., 2012). Resveratrolün anti-apoptotik ve anti-kanser etkisini görmek amacıyla yapılan başka bir çalışmada pankreatik kanser hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerde yüksek dozda resveratrol radyasyonla kombine edilince Annexin V ile ölçülen apoptoziste ve ROS' da artış olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada resveratrolün tek başına ROS aktivitesinde değişikliğe neden olmadığı da rapor edilmiştir (Sun vd., 2008).

0-50 μ M resveratrolün akciğer kanser hücrelerinde doza bağlı olarak proliferasyonda azalma olduğu ve 100-200 μ M resveratrolün akciğer kanser hücrelerinde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Aynı zamanda 20, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarda p21 ifadesinde artış olduğu bu konsantrasyonlarda senesensin indüklendiği belirlenmiştir (Luo vd., 2013). Yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar resveratrolün anti-kanser etkilerinin prematüre senesensin indüksiyonu yoluyla olabileceğini düşündürmektedir.

2.5. Resveratrolün Yaşlanma Karşıtı Etkisi ve Sirtüinlerle İlişkisi

Resveratrolün yaşlanma karşıtı etkisinin insülin hassasiyetini, sirtüin genlerinin enzimatik aktivitesini, mitokondri sayısını arttırıcı etkisi ve anti-oksidan etkisi ile gerçekleştirdiği bilinmektedir. Bu zamana kadar birçok araştırmacı tarafından resveratrolün yaşam süresinin uzamasına etki ettiği rapor edilmiştir (Van Der Horst ve Burgering, 2007; Agarwal ve Baur, 2011; Hector vd., 2012; Quideau vd., 2012). Resveratrolün *Saccharomyces cerevisiae*' de yaşam süresini maksimum seviyede arttırdığı bildirilmiştir (Howitz vd., 2003). Daha sonra bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*, meyve sineği *Drosophila melanogaster* ve bal arısı *Apis mellifera* da aynı bulguya rastlanmıştır (Bauer vd., 2004). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise kalori kısıtlaması ve resveratrolün yaşlanma karşıtı etkileri üzerinde yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmalarda kalori kısıtlamasının pek çok türde yararlı etkilere sahip olduğu, bu etkilerden en önemlisinin ortalama yaşam süresini ve ömür uzunluğunu arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca resveratrolün Sirt1' i aktive etme yeteneği yaşlanma karşıtı etkisiyle bağdaştırılmıştır (Guo, 2011)

Resveratrolün NAD⁺ bağımlı histon deasetilaz olan sirtuinleri aktive etme yeteneği ile ilgili bu zamana kadar birçok çalışma yapılmıştır (Borra vd., 2005; Kao vd., 2010; Vetterli ve Maechler, 2011; Lakshminarasimhan vd., 2013). Hu vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada resveratrolün Sirt1' i aktive etmesi AMPK fosforilasyonunu arttırmasıyla ilişkilendirilmiştir. Resveratrolün yararlı etkilerinin AMPK aktivasyonuna bağlı olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca Sirt1' in resveratrol ve kalori kısıtlaması ile aktive edilen bir sirtuin olduğu ve sağlık, uzun ömür açısından yararlı etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Hu vd., 2011). Sirt1 ifadesinin farelerde % 100 kalori kısıtlamasıyla (Rodgers vd., 2005), ratlarda % 40 kalori kısıtlamasıyla (Cohen vd., 2004) insanlarda % 25 kalori kısıtlamasıyla (Civitarese vd., 2007) indüklendiği rapor edilmiştir.

Yuan vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada, 1, 5, 20 µM resveratrol eklenen mezenkimal kök hücrelerinde 8 gün sonunda hücre proliferasyonunda azalma olduğu yapılan BrdU analizi ile belirlenmiştir. 100 µM resveratrol eklenen hücrelerde Sirt1 ifadesi susturulduktan sonra hücreler 40 gün boyunca kültüre alınmış ve her gün Saß-gal aktivitesi takip edilmiştir. Hücrelerin Sirt1 ifadesinin susturulduğu 17. ve 18. pasajlarda Saß-gal aktivitesinde artış gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada resveratrolün Sirt1, 3, 4, 7' yi aktive ederek oksidatif stres indüklü apoptozisten kardiyomiyositleri koruduğu ve bu hücrelerin sağ kalımında önemli rol oynadığı bildirilmiştir.

Nakayama vd. (2010) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, 10, 50, 100, 200 µM resveratrol ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilen romatoid artrit sinoviyal hücrelerinde resveratrolün hücre canlılığını azalttığı yapılan MTT analizi ile belirlenmiştir. Bahse konu çalışmada resveratrolün TUNEL-pozitif hücre sayısını arttırdığı ve 100 µM resveratrol ile 20-60 dk. muamele edilen hücrelerde Sirt1' in ifadesinde artış olduğu bildirilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada resveratrolün caspase-3 ve caspase-9 aktivitesini de arttırdığı bildirilmiştir.

Wang vd. (2008) tarafından yapılan çalışmada, Sirt1 ekspresyonunun normal hücrelerle karşılaştırıldıklarında glioblastom, mesane kanseri, prostat kanseri, meme kanseri, karaciğer kanseri ve ovaryum kanserinde azaldığı bildirilmiştir. Yine aynı çalışmaya göre verilen bu dokularda Sirt1' in tümör baskılayıcısı olarak rol aldığı öne sürülmüştür. Sirt1 proteininin farklı deri kanserlerinde immünohistokimyasal analizleri de yapılmıştır. Yapılan bu analizlere göre Sirt1 ifadesinde aşırı artış gözlenmiştir. Bu veriye göre Sirt1' in tümörü teşvik edici

olarak rol oynadığı gösterilmiştir (Hida vd., 2007). Sirt1' in tümör baskılayıcı mı yoksa tümör teşvik edici mi olduğu halen tartışılan bir konudur. Sirt1 aktivasyonunun tümör baskılayıcı bir gen olan p53' ün ve diğer tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna neden olarak kanser riskini arttırdığı bildirilmiştir (Kim vd., 2008). P53 hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Birçok organizmada kanseri baskılayan çok önemli bir proteindir. Kanser önleyici birçok işlevi vardır; DNA zarar gördüğünde DNA tamir proteinlerini harekete geçirir. DNA tamir edilemeyecek kadar zarar gördüğünde "apoptoz"u başlatır. Deng (2009) tarafından yapılan çalışmada p53' ün Sirt1 transkripsiyonunu regüle ettiği ve Sirt1 indüksiyonunu azalttığı bildirilmiştir.

İnsan endotel hücrelerinde sirtüinler ve hücre yaşlanma arasındaki bağlantının açığa çıkarılması amacıyla yapılan bir çalışmada siRNA ile Sirt1 ifadesi susturulduktan 10 gün sonra Saß-Gal aktivitesinde artış gözlenmiştir (Ota vd., 2007). Aynı şekilde bu işlem aynı çalışmada Sirt2 için de yapılmış ve aynı sonuç elde edilmiştir.

Furukawa vd. (2007) tarafından TIG-3 fibroblastları kullanılarak yapılan çalışmada 15 dk. 150 µM H₂O₂ ile muamele edilen hücrelerde Sirt1 deasetilaz aktivitesi için gerekli olan NAD⁺ seviyesinin % 50 oranında azaldığı ve 1 saat sonunda azalmaya devam ettiği gözlenmiştir. 48 saat sonunda Saß-gal aktivitesinde ve p21 ifadesinde artış gözlenmiştir. Sonuç olarak 150 µM H₂O₂, NAD⁺ seviyesinde azalmaya ve böylece Sirt1 deasetilasyonunda da azalmaya neden olduğu ve sirtüin ekspresyonunun hücre yaşlanma sırasında azaldığı bildirilmiştir (Furukawa vd., 2007). Yamashita (2012) tarafından yapılan bir çalışmada insan göbek bağı fibroblastları (HUC-F2) 5 µM resveratrol ile 12 saat boyunca inkübe edildikten sonra Saß-Gal aktivitesinde azalma meydana gelmiştir. Sirt1 aktivasyonunda ise artış gözlenmiştir. Bu sonuç ise insan göbek bağı fibroblastlarında Sirt1' in hücre yaşlanma önlediğini göstermektedir (Yamashita vd., 2012)

Glukokortikoidlerle yapılan bir çalışmada glukokortikoidlerin sirtüinlerin inhibisyonu aracılığıyla hücre yaşlanma indüklediği p53/p21 yolunun aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Poulsen vd., 2013).

Özet olarak, yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi resveratrolün sirtüinler üzerindeki etkisi hücre tipine, zamana ve doza bağlı olarak değişmektedir.

Ancak hücrel senesens meydana geldiği anda resveratrolün Sirt1, Sirt2, Sirt3, Sirt6 ile olan ilişkisini insan normal dermal fibroblastlarında ortaya çıkarmayı hedefleyen herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışma, bu alandaki önemli bir boşluğu doldurmayı ve literatüre katkı sağlamayı hedeflemektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Acrylamide-bis 29:1 % 30	Amresco
Agaroz	Sigma
Albümin bovin serum (BSA)	Amresco
Amonyum persülfat (APS)	Sigma
B-Merkaptoetanol	Sigma
Bromphenol Blue sodium salt	Sigma-Aldrich
CAPS	Sigma
Completed mini EDTA-free	Roche
DAPI (4' 6-diamidin-2' -fenilindol dihidroklorid)	Roche
EDTA	Sigma-Aldrich
Etanol	Riedel-de Haen
Etidyum bromit	Sigma
Glisin	Sigma-Aldrich
Gliserol	Riedel-de Haen
Glutaraldehit	Sigma-Aldrich
HEPES	Biological Ind.
Hidroklorik asit	Sigma
İzopropil alkol	Sigma
Magnezyum klorid heksahidrat	Fluka
2-Merkaptoetanol	Sigma
Metanol	Sigma-Aldrich
Nonidet p40 substitute	Sigma
N,N,N',N' -tetramethylethylene-diamine	Sigma

Paraformaldehit	Sigma-Aldrich
PMSF (Fenilmetilsülfonilflorit)	Sigma
Potasyum bikarbonat	Sigma
Potasyum klorit	Sigma-Aldrich
Potasyum heksasiyanoferrat (III) $K_3Fe(CN)_6$	Sigma
Potasyum heksasiyanoferrat (II) trihidrat $K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$	Sigma
Propidyum iyodid	Sigma
Roti ®-Mount Aqua	Roth
Roti ®-Mount FluorCare	Roth
Süt Tozu	Fluka
Sodyum ortovanadat	Sigma
Sodyum klorit	Sigma-Aldrich
Sodyum dodesil sülfat	Sigma
Sodyum fosfat	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma
Trisma-Base	Sigma
Triton-X 100	Sigma
Tween-20	Sigma-Aldrich
Fenilmetansülfonilflorid (PMSF)	Sigma
X-β-gal	Roth
5-bromo-4-kloro-3-indolil β-D-galaktofranosid	Sigma-Aldrich
Yeast extract	FLuka

3.1.2. Cam ve Plastik Malzemeler

6 kuyucuklu hücre kültürü plakları, 100 adet/paket	Corning-Costar
12 kuyucuklu hücre kültürü plakları, 100 adet/paket	Corning-Costar
24 kuyucuklu hücre kültürü plakları, 100 adet/paket	Corning-Costar

96 kuyucuklu hücre kültürü plakları, 100adet/paket	Corning-Costar
5 ml' lik serolojik pipetler, 200adet/paket	Corning-Costar
10 ml' lik serolojik pipetler, 200adet/paket	Corning-Costar
Steril, 0,5-1 µl filtrelı pipet uçları	Costar
Steril, 1-200 µL filtrelı pipet uçları	Costar
Steril, 100-1000 µl filtrelı pipet uçları	Costar
Hücre kültürü için 75 cm ² lik flasklar 100adet/paket	Corning
15 ml' lik hücre kültürü tüpleri 500 adet/paket	Corning
50 ml' lik hücre kültürü tüpleri 500 adet/paket	Corning
1.5 ml' lik santrifüj tüpleri 1000 adet/paket	Corning-Costar
Petri kabı, 60 mm, 600 adet/paket	Corning
Petri kabı, 100 mm, 420 adet/paket	Corning
Hücre kazıyıcı, 25 cm	Fisher Scientific
Yuvarlak lamel	Nunc
Lamel 20 x 26 mm	Thermo
Microskop lamları 76 x 26x 1mm	Marienfeld
Blotlama kağıdı 100 adet/paket	Thermo
CLxPosure film, 18 x 24 cm	Prizma
Nitrosellüloz transfer membranı, 0.45 µm, 30 cm x 3m	Amersham
3.1.3. Hücre Kültürü Malzemeleri	
FBS (Fetal bovine serum)	Biochrom
L-glutamin 200 mM 100 X	Biochrom
Tripsin-EDTA	Biochrom
Tripan Mavisi	Sigma
Dulbecco´s modified eagle medium 500 ml	Gibco
Phosphate-buffered saline 10 X	Biological Industries

Penisilin streptomisin	Biochrom
Dimetil sülfoksit $\geq 99.9\%$	Sigma

3.1.4. Kitler

BCA Protein Assay Kit	Thermo
Cell Proliferation ELISA BrdU	Roch
ECL Chemiluminescent Reagent Kit	Cell Signaling
In Situ Cell Death Detection Kit	Roche
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche

3.1.5. Antikorlar

3.1.5.1. Primer antikorlar

Anti- β actin	Sigma
Anti-Sirt1	Sigma
Anti-Sirt2	Sigma
Anti-Sirt3	Millipore
Anti-Sirt6	Sigma
Anti-Sirt7	Sigma

3.1.5.2. Sekonder antikorlar

Anti-Rabbit IgG	Santa Cruz
Anti-Mouse IgG	Santa Cruz
Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG1	Invitrogen
Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG1	Invitrogen

3.1.6. Markerler

Multicolor High Range Protein Ladder	Spectra
Broad Range Protein Ladder	Spectra

3.2. Yöntem

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan hücre tipi ve hücrenin özellikleri

Hücre: BJ
ATCC Kodu: CRL-2522™
Büyüme Özelliği: Adherent (Yapışan)
Organizma: <i>Homo sapiens</i>
Hücre Tipi: Fibroblast
Organ: Deri
Hastalık: Normal

3.2.1. Hücre Kültürü

Bu çalışmada kullanılan BJ hücresi (Çizelge 3.1) ticari olarak elde edilmiş olup DMEM besiyeri kullanılarak hücrelerin canlılıklarını sürdürmesi sağlanmıştır. DMEM besi yerinin içeriği aşağıda verilmiştir.

DMEM Besi Yeri

% 10 FBS

100 µg/ml penisilin streptomisin

2 mM L-glutamin

Hücreler 37 °C' de ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücreler yeterli sayıya ulaştıklarında 1:4, 1:5 oranında pasajlanmaları yapılarak kültürün devam etmesi sağlanmıştır (Kültür için 75 cm² lik flasklar ve petri kapları kullanılmıştır). Hücreler pasajlanırken 1xPBS ile yıkayıp besiyerinin hücre yüzeyinden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Flaska yapışan hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılması için 1 ml tripsin kullanılmıştır.

3.2.2. Hücrelerin Dondurulması

Dondurma Besiyeri

% 10 DMSO

% 90 FBS

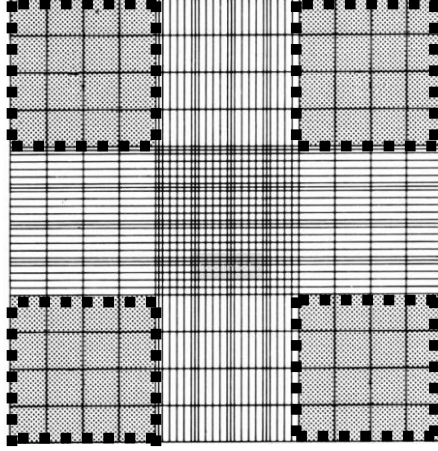
Hücreler pasajlama işlemi sırasında tripsin ile kaldırılıp 15 ml' lik falkon içerisine alınmıştır ve 1250 rpm' de, 4°C' de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım atıldıktan sonra falkon içerisine dondurma besiyeri eklenip pelet homojen hale getirilmiş ve hücre içeriği dondurma tüplerine alınmıştır. Tüpler -80°C' de bir gece muhafaza edildikten sonra likit nitrojen tankında -196 °C' de saklanmıştır.

3.2.3. Hücrelerin Çözülmesi

Hücreler -196°C' den alınıp su banyosu' nda (37 °C) çözüldükten sonra hücre süspansiyonu 15 ml' lik falkon içerisine alınmıştır. Hücre süspansiyonu üzerine DMEM besiyeri ilave edilerek hücreler seyreltilmiştir ve 1250 rpm' de 5 dk. santrifüj edilerek yıkanması sağlanmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım atılıp elde edilen pelet üzerine DMEM besiyeri eklenerek pelet homojen hale getirilmiştir ve hücreler toplam volüm 13 ml olacak şekilde flaskalara alınıp kültürün devamı sağlanmıştır.

3.2.4. Hücre Sayımı

Hücre kültürü testlerinde her kuyucukta eşit sayıda hücre olmalıdır. Bu amaçla yapılan WST-1, BrdU testleri ve Saß-gal, TUNEL, Ki-67 boyama yöntemleri için belirli sayıda hücrelerin alınmasını sağlamak amacıyla tripan mavisi testi kullanılarak canlı ve ölü hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı için Neubauer lamı kullanılmıştır. Neubauer lamı kalın, düz, sayım odacıklıdır. Neubauer lamı üzerinde 16' şar kareden oluşan, hacmi 0,1 µl olan toplam dört alan bulunmaktadır. Toplam dört alandaki Şekil 3.1' de gösterildiği gibi seçili kare çizgisi içindeki hücreler sayılır ve ortalamaları alınarak alan başına düşen ortalama hücre sayısı hesaplanır. Hücrelerin çok yoğun olduğu zamanlarda süspansiyon dilüe edilir ve yapılan hesaplama dilüsyon faktörü de dahil edilir.



Şekil 3.1. Hücre sayımı için kullanılan Neubauer lamı

Şekil 3.1' de gösterildiği gibi bu lam üzerinde bulunan 4 büyük kare içerisinde sayılan canlı hücre sayısının ortalaması alınarak 1 ml' deki hücre sayısı;

$$\text{Ortalama canlı hücre sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4$$

formülü ile hesaplanmıştır.

Hücre süspansiyonu tripan blue ile dilüe edildiğinde canlı hücreler küçük, yuvarlak ve refraktil olarak görünürler. Ölü hücreler şiş, büyük ve koyu mavi hale gelirler. Canlı hücrelerde membran intakt durumda olduğundan dolayı herhangi bir boyanma söz konusu değildir. Bu metodun temel prensibi, canlı hücreler boyayı almaz iken ölü hücreler yani membranı hasar görmüş hücrelerin boyayı alarak maviye boyanmasıdır.

3.2.5. Resveratrol Stoğunun Hazırlanması

Resveratrol, konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Stok solüsyon steril ortamda 0,22 µm'lık steril filtrelerden geçirilmiştir. Hazırlanan stok solüsyon -20°C' de saklanmıştır.

3.2.6. Deney Grupları

Çalışmada kontrol grubu (resveratrol eklenmeyen BJ fibroblast hücresi), çözücü olarak kullandığımız DMSO grubu ve sekiz farklı konsantrasyonda gruplar olmak üzere toplam grup sayısı on olarak belirlenmiştir. Resveratrol, Çizelge 3.2' de gösterilen konsantrasyonlarda uygulanmıştır.

Çizelge 3.2. Çalışmada uygulanan resveratrol konsantrasyonları

Kontrol
DMSO
2,5 µM
5 µM
10 µM
25 µM
50 µM
100 µM
200 µM
300 µM

Uygulama süresi daha önceki yıllarda bu konu ile ilgili yapılan çalışmalar baz alınarak 24, 48 ve 72 saat olarak belirlenmiştir. Kontrol grubundaki hücreler resveratrol uygulanmadan aynı sürelerde kültürde bekletilmiştir.

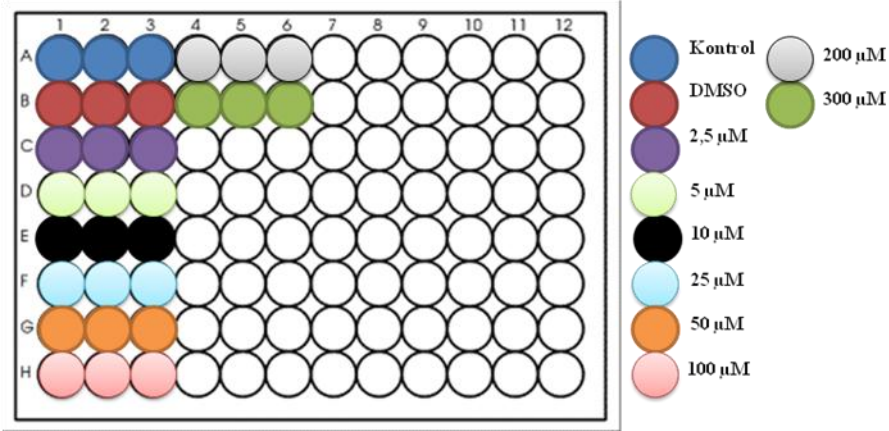
3.2.7. WST-1 Testi

Sitotoksik etki ve metabolik aktivitenin belirlenmesi için yapılan WST-1 testi canlı hücrelerden tetrazolium tuzlarının ayrıştırılmasına dayanan non-radyoaktif, spektrofotometrik, kolorimetrik bir testtir. Tetrazolium tuzları hücresel enzimler tarafından formazan tuzlarına dönüştürülmektedir. Canlı hücre sayısındaki artış

örneklerdeki mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesinde artmaya yol açmaktadır. Enzim aktivitesinin güçlenmesiyle birlikte kültürdeki hücrelerde metabolik olarak aktif halde bulunan hücrelerin miktarı ile doğrudan korele olarak formazan ile boyanan hücre formunda artış olmaktadır. Formazan boya metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından üretilmekte olup, spektrofotometre ile belirtilen dalga boyunda boyanan hücrelerin absorbansı ölçülmektedir (Doyle ve Griffiths, 1998).

Yapılan bu test ile BJ hücreleri üzerine eklenen resveratrolün sitotoksik etkisinin olup olmadığı belirlenmiştir.

- ✓ 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyucukta 4×10^3 hücre olacak şekilde toplam hacmi 100 μ l olan hücre süspansiyonu eklenmiştir.



Şekil 3.2. WST-1 testi plak planı

- ✓ Hücreler 37° C, % 5 CO₂ içeren inkübatörde 1 gün inkübe edildikten sonra bölüm 3.2.6' da belirtilen konsantrasyonlarda resveratrol eklenmiştir. Her bir grup için 3 kuyucuk planlanmıştır. Hücre kültürü plak planı Şekil 3.2' de gösterilmiştir.
- ✓ 24, 48 ve 72 saat sonunda her bir kuyucuk için 10 μ l WST-1 solüsyonu eklenmiştir.
- ✓ Plaklar 1-2 saat 37°C ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildikten sonra spektrofotometre ile 450 nm' de ölçüm yapılmıştır.
- ✓ Yapılan WST-1 testi 3 kere tekrar edilmiştir. Elde edilen veriler Origin 8 programında grafik haline getirilerek değerlendirilmiştir.

- ✓ Metabolik aktivitenin belirlenmesinde aşağıdaki formülasyon uygulanmıştır. Resveratrol ile muamele edilen hücrelerin absorbands değerleri kontrol değeri ile normalize edilerek grafiğe aktarılmıştır.

$$\% \text{ Metabolik aktivite: } \frac{\text{Ares.}}{\text{Akontrol}} \times 100$$

Ares: Resveratrol uygulanan grubun absorbands değeri

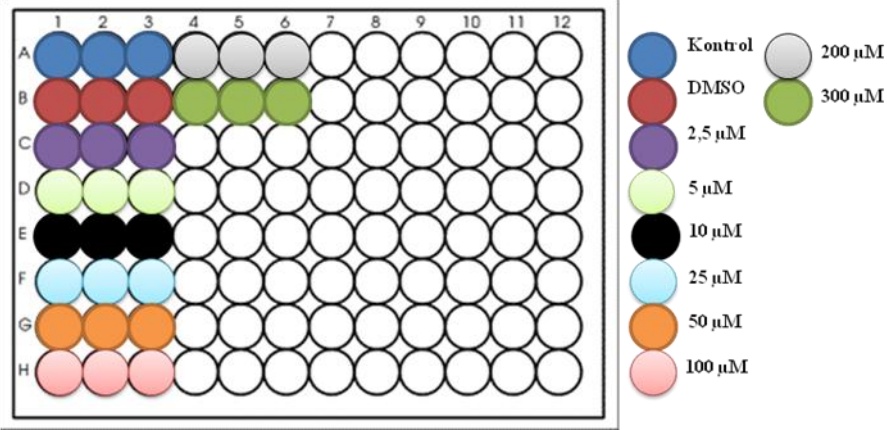
Akontrol: Kontrol grubunun absorbands değeri

3.2.8. BrdU Testi

Hücre proliferasyonu genomik DNA replikasyonu ile belirlenebilir. DNA sentezi hücre proliferasyonunda indirekt bir parametredir. Hücre proliferasyonunu değerlendirmek için yapmayı planladığımız BrdU (5-bromodeoksiüridin) testi, proliferasyon gösteren hücrelerdeki DNA'ya BrdU bağlanmasını saptayan bir testtir. Klor, brom ve iyot atomlarının bağlanma özellikleri metil grubunun (CH₃) bağlanma özellikleri ile büyük benzerlik gösterir. Bunun sonucu olarak, halojenli pirimidinler grubunda yer alan BrdU, yapısında bulunan halojen grupları yüzünden, DNA molekülünün normal yapı taşı olan timidine yapısında bulunan metil grubu ile çok benzemektedir. Bu halojenli pirimidinler, DNA sentezi sırasında timidin molekülünün yerini alarak DNA zincirinin yapısına girebilirler. Bu nedenle bu maddelere 'timidin analogu' adı verilir. Proliferasyon olan hücrelerin DNA'ındaki timidinle BrdU yer değiştirmektedir. Bu yöntem, sadece S fazındaki hücrelerin BrdU ile işaretlenmesi ve bu işaretli hücre grubunun hücre siklusundaki ilerlemesinin izlenmesine dayanır. Nonradyoaktif timidin analogu olan bromodeoksiüridin S fazındaki hücrelerin DNA'ına bağlanması sonucunda anti-BrdU antikorlarının kullanımı ile S fazındaki hücrelerin ortaya çıkarılması sağlanır. Anti-BrdU-peroksidaz antikor ekledikten sonra oluşan immün kompleksler spektrofotometrede ölçülerek değerlendirilmektedir.

Bu test ile farklı dozlarda hücreler üzerine eklenen resveratrolün proliferasyonu ne derece etkilediği belirlenmiştir.

- ✓ Bu test için 96' lık plaklara kuyucuk başına toplam hacim 100 µl olacak şekilde 4×10^3 hücre ekilmiştir.
- ✓ Hücreler 37°C ve % 5 CO_2 içeren inkübatörde 1 gün inkübe edildikten sonra bölüm 3.2.6' da belirtilen konsantrasyonlarında resveratrol eklenmiştir. Her bir grup için 3 kuyucuk planlanmıştır. Plak planı Şekil 3.3' de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. BrdU testi plak planı

- ✓ 24, 48 ve 72 saat sonunda her bir kuyucuğa 10 µl işaretleme solüsyonu eklenerek 2 saat 37°C ve % 5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edilmiştir.
- ✓ Eklenen işaretleme solüsyonu hücrelerin üzerinden çekilip atılarak 200 µl fixdenat solüsyonu eklenip 30 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- ✓ Fixdenat uzaklaştırıldıktan sonra 100 µl anti-BrdU-POD çalışma solüsyonu eklenerek 90 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- ✓ Anti-BrdU-POD çalışma solüsyonu hücre yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra 200-300 µl yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkama yapılmıştır.
- ✓ Daha sonra 100 µl substrat solüsyonu eklenip 5-30 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- ✓ Spektrofotometrede 370 nm' de absorbans ölçülmüştür.
- ✓ Daha sonra 25 µl 1 M H_2SO_4 (stop solüsyonu) eklenip 450 nm' de ölçüm yapılmıştır.
- ✓ Yapılan BrdU testi 3 kere tekrar edilmiştir. Elde edilen veriler Origin 8 programında grafik haline getirilerek değerlendirme yapılmıştır.

- ✓ % BrdU inkorporasyonu aşağıda verilen formülle hesaplanmıştır. Resveratrol ile muamele edilen hücrelerin absorbans değerleri kontrol değeri ile normalize edilerek grafiğe aktarılmıştır.

$$\% \text{ BrdU inkorporasyonu} = \frac{\text{Ares.}}{\text{Akontrol}} \times 100$$

Ares: Resveratrol uygulanan grubun absorbans değeri

Akontrol: Kontrol grubunun absorbans değeri

3.2.9. Ki-67 İmmün Boyama Yöntemi

Fiksasyon Solüsyonu

% 3.7 Formaldehit (PBS içerisinde)

Permeabilizasyon Solüsyonu

% 0.1 Triton X-100

Bloklama Solüsyonu

% 3 FBS (PBS içerisinde)

Bölüm 3.2.6’ da belirtilen konsantrasyonlarda resveratrol ile inkübe edilen hücrelerin 24, 48 ve 72 saat boyunca kültür ortamındaki değişimleri izlenmiştir. Proliferasyondaki azalmanın en iyi görüldüğü 72 saat baz alınarak hücrelerin proliferasyon yetenekleri Ki-67’ deki artışın immün boyama yöntemi yardımıyla test edilmesiyle belirlenmiştir. Bu test için 3 tekrar yapılmıştır.

- ✓ Ki-67 boyama yöntemi için 6’ lık plaklara her bir kuyucuk içerisinde 75×10^3 hücre olacak şekilde toplam 2 ml hücre süspansiyonu eklenmiştir.

- ✓ Daha sonra bölüm 3.2.6' da belirtilen dozlarda resveratrol eklenmiştir.
- ✓ Hücreler üzerinde resveratrolün etkisinin maksimum düzeyde gözleendiği 72 saat sonunda 100 µl fiksasyon solüsyonu eklenip 10 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- ✓ Fiksasyon solüsyonu hücre yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra 100 µl permeabilizasyon solüsyonu eklenip 5 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- ✓ Permeabilizasyon solüsyonu hücre yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra 1xPBS ile 2 kere yıkanmıştır.
- ✓ PBS hücre yüzeyinden uzaklaştırılıp bloklama solüsyonu ile 30 dk. bloklama yapılmıştır.
- ✓ 30 dk. sonunda Ki-67 antikoruna bloklama solüsyonun içinde 1:10 oranında dilüe edilerek kuyucuklara eklenmiştir.
- ✓ Hücreler antikorla 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- ✓ Antikor hücre yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra 1xPBS ile 3 yıkama yapıp 1:1000 oranında 1x PBS ile dilüe edilen DAPI (çekirdek boyaması için) eklenmiştir.
- ✓ 5 dk. oda sıcaklığında karanlık ortamda DAPI ile inkübe edilen hücreler 1xPBS ile yıkayıp floresan mikroskopunda görüntüleme yapılmıştır.
- ✓ Ki-67 ile boyanan hücreler yeşil renkte, DAPI ile boyananlar mavi renkte gözlenmiştir.

3.2.10. SA- β -Galaktozidaz Boyama

Yıkama Solüsyonu

1 mM MgCl₂ içeren PBS ph:6.0

Fiksatif Solüsyonu

% 0.25 glutaraldehyde

% 2 paraformaldehyde

(ph:6.0 olan PBS içerisinde)

20 x Potassium cyanide (KC) Stoğu

820 mg K₃Fe(CN)₆

1,05 g K₄Fe(CN)₆ x 3 H₂O

(25 ml PBS içerisinde)

1 x X-Gal Solüsyonu (10 ml)

9.3 ml PBS/MgCl₂

0.5 ml 20 x KC solüsyonu

0.25 ml 40 x X-Gal solüsyonu

Senesensin test edilmesinde standart protokollerde yer alan SA- β -gal (senescence associated β -galaktozidaz) aktivitesi hücrelere verilen X-gal substratının parçalanması yöntemi ile ölçülmüştür. Bu boyama yöntemi ile yaşlanan ve proliferasyona devam eden hücreler belirlenmiştir.

- ✓ Bu boyama yöntemi için 6 kuyucuklu plaklara her kuyucukta toplam hacmi 2 ml olacak şekilde 75×10^3 hücre alınmıştır.
- ✓ Hücreler inkübatörde muhafaza edilerek kültürün devam etmesi sağlanmıştır.
- ✓ Hücrelerin yapışması sağlandıktan sonra Bölüm 3.2.6' da belirtilen konsantrasyonlarda resveratrol eklenmiştir.
- ✓ Etkinin en iyi gözleendiği 72 saat sonunda plaklarda bulunan hücreler üzerinden besi yeri uzaklaştırılıp 2 kez 1xPBS ile yıkanmıştır.

- ✓ PBS hücre yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 10-15 dk. glutaraldehit solüsyonu ile fiske edilmiştir.
- ✓ Glutaraldehit solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 2 kez PBS/MgCl₂ ile yıkanmıştır.
- ✓ Hücreler üzerine 1 x X-Gal solüsyonu eklenip gece boyunca 37°C' de inkübe edilmiştir.
- ✓ Daha sonra 3 kez PBS/MgCl₂ ile yıkanan hücreler ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Senesense uğrayan hücreler ışık mikroskobu altında mavi boyanmış olarak tespit edilmiştir. Yapılan Saß-Gal boyaması en az 3 kere tekrar edilmiştir.

3.2.11. TUNEL Testi

Fiksasyon Solüsyonu

% 2 Paraformaldehit

% 0.25 Glutaraldehit

Permeabilizasyon Solüsyonu

% 1 Triton X-100

% 0.1 Sodyum Sitrat

TUNEL Reaksiyon Karışımı

5 µl enzim solüsyonu

45 µl işaretleme solüsyonu

Hücre ölümünün iki farklı hali olan apoptozis ve nekroz, ölen hücrelerin moleküler, biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerine dayanarak birbirinden ayrılabilir. Programlanmış hücre ölümü veya apoptozis, ökaryotik hücre ölümünün en sık rastlanan şeklidir. Bu, homeostazı koruyan bir fizyolojik intihar mekanizmasıdır. Hücre ölümü homeostaz içindeki normal doku döngüsünde olur.

Genelde, apoptozise giden hücreler, plazma zarının hızlı bozulması ve çekirdeğin parçalanması da dahil olmak üzere, çekirdek ve sitoplazmada belirgin örnek

oluşturacak şekilde yapısal değişiklikler gösterirler. Çekirdeğin yapısının bozulması, kromatinin ağır hasarı ve kalsiyuma bağlı endojen nükleazların etkin hale gelmesinden sonra DNA' nın parçalara ayrılması ile ilişkilidir. Çekirdek DNA' sının oligonükleozom boyutunda parçalanması ile sonuçlanan endonükleolizis, apoptozisin önemli biyokimyasal olgusu olarak kabul edilir. Böylece bu olgu sıklıkla, elektroforez sırasında agaroz jeller üzerinde tipik "DNA merdiveni" ile değerlendirilmesi için kullanılır. Ancak bu yöntem tek tek hücrelerdeki apoptozisi veya apoptozisin histolojik yerleşimini veya hücre farklılaşmasındaki ilişkisi ile ilgili bilgi sağlamaz. Bu, apoptozis ile uyarılmış DNA dizi kırılmasının enzimatik in situ işaretlenmesi ile yapılır.

TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) apoptozise uğrayan hücreleri tespit etmek için yapılan bir testtir. Bu test ile apoptozisin ileri evrelerinde belirleyici olarak rol alan apoptotik hücrelerdeki nükleer kromatin fragmentasyonu saptanmaktadır. TUNEL testi metod olarak DNA kırıklarının sonuna polimeraz terminal deoksinükleotidil transferaz eklenerek işaretlenmesi prensibine dayanan bir testtir. Bu yöntem temelinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarını, serbest 3'-OH uçlarında enzimatik bir reaksiyon ile tespit etmeye dayanarak apoptozise giden hücrelerin görüntülenmesini sağlamaktadır.

Kullanılan TUNEL boyama yöntemi ile hücreler boyanarak apoptozise uğrayıp uğramadıkları belirlenmiştir. 3 tekrar yapılan bu test için In Situ Cell Death Detection Kit (Roche) kullanılmıştır.

- TUNEL testi için 6 kuyucuklu plaklara her kuyucukta toplam hacim 2 ml olacak şekilde 75×10^3 hücre alınmıştır.
- Hücreler inkübatörde muhafaza edilerek kültürün devam etmesi sağlanmıştır.
- Hücrelerin yapışması sağlandıktan sonra Bölüm 3.2.6' da belirtilen konsantrasyonlarda resveratrol eklenmiştir.
- Etkinin en iyi gözleendiği 72 saat sonunda hücre yüzeyinden besiyeri uzaklaştırılıp 2 kez 1xPBS ile yıkanmıştır.
- Fiksasyon solüsyonu eklenerek 15 dk. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

- Fiksasyon solüsyonu hücre yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 2 kez 1xPBS ile yıkanmıştır.
- Permeabilizasyon solüsyonu eklenerek plaklar 5 dk. buz üzerinde inkübe edilmiştir.
- Permeabilizasyon solüsyonu hücre yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra 1xPBS ile 2 kez yıkama yapılmıştır.
- Kontrol için işaretleme solüsyonu, diğer dozlar için 50 µl TUNEL reaksiyon karışımı eklenip 1 saat 37°C' de karanlıkta inkübasyon yapılmıştır.
- İnkübasyon sonrasında 1xPBS ile 2 kez yıkama yapılmıştır.
- Yıkama sonrasında 1:1000 oranında 1xPBS ile dilüe edilen DAPI eklenerek 5-10 dk. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Son olarak 1xPBS ile 2 kez yıkanan hücreler floresan mikroskop altında incelenmiştir.

3.2.12. Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Lysis Buffer (1,5 ml)

300 µl % 10 SDS

15 µl 0.1 M Na₃VO₄

3 µl 0.5 M EDTA

230,5 µl 7xComplete Mix-EDTA

951,5 µl 50 mM Tris ph:6,7

- Bölüm 3.2.6' da belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanan hücreler 72 saat inkübe edilmiştir. Hücre yüzeyinden besiyeri uzaklaştırılarak iki kez 1xPBS ile yıkanmıştır.
- 50-100 µl Lysis Buffer ile 5 dk. shaker (çalkalayıcı) üzerinde çalkalanmaya bırakılmıştır.

- Liziz edilen hücreler kültür kaplarından ependorf içerisinde alınarak 95°C' de 10 dk. bekletilmiştir.
- Daha sonra 10 dk. 20.000 g' de (25°C) santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant kısım yeni ependorf içerisine alınmıştır.

3.2.13. Sitozolik ve Nükleer Ekstraksiyon

Buffer A

10 mM Hepes pH=7.8
1.5 mM MgCl₂
10 mM KCl
0.1 mM EDTA
0.1 mM EGTA
1 mM NAVO₄

Buffer B

20 mM Hepes
0.4 M NaCl
1.5 mM MgCl₂
0.1 mM EDTA
0.1 mM EGTA
1 mM NAVO₄

- Kültür kaplarında bulunan hücrelerin üzerinden besi yeri uzaklaştırılarak iki kez 1xPBS ile yıkanmıştır.
- Hücrelere 1xPBS eklenerek kültür kaplarından scraper yardımıyla kazınıp ependorf içerisine alınmıştır.
- Hücre süspansiyonu 4000 g' de santrifüj edilmiştir.

- Süpernatant kısım atılarak pelet elde edilmiştir. Elde edilen peletler -80°C ' de muhafaza edilmiştir.
- Her örnekten elde edilen peletler üzerine 100-200 μl Buffer A eklenmiştir (Peletin büyüklüğüne göre eklenecek olan Buffer A miktarı belirlenmiştir). Karışımın homojen hale gelmesi sağlanmıştır.
- Buffer A eklenen hücreler 10-15 dk. buz üzerinde bekletilmiştir.
- 10-25 μl % 10' luk Np-40 eklenmiştir ve vortekste 30 saniye karışması sağlanmıştır (Peletin büyüklüğüne göre eklenecek olan Np-40 miktarı belirlenmiştir).
- 14000 rpm' de 2 dk. santrifüj edilmiştir.
- Her örnek için pelet üzerinde kalan süpernatant kısım çekilip yeni ependorflara alınmıştır. (Süpernatant kısım=sitozolik ekstrakt)
- Daha sonra pelet üzerine 50-100 μl Buffer B eklenmiştir (Peletin büyüklüğüne göre eklenecek olan Buffer B miktarı belirlenmiştir). Karışımın homojen hale gelmesi sağlanmıştır.
- Homojen hale getirilen karışım 20 dk. buz üzerinde çalkalayıcıda bırakılmıştır.
- 5 dk. 15300 rpm 4°C ' de santrifüj edilmiştir.
- Her örnek için süpernatant kısım yeni ependorflara alınmıştır. (Süpernatant kısım=nükleer ekstrakt)

3.2.14. BCA Protein Assay Testi

Örneklerden elde edilen lizatların ve ekstraktların protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla BCA Protein Assay Kit kullanılarak yapılmış olan bir testtir.

- Protein miktar tayini için kitin içerisinde hazır halde bulunan BSA stoğu kitte belirtilen oranlara göre dilüsyon yapılarak çalışma için uygun standartlar hazırlanmıştır. Hazırlanan 9 standart 96' lık plaklara sırayla her biri 25 μl olacak şekilde eklenmiştir.

- Örnekler toplam hacim 25 µl olacak şekilde 1:10 oranında UP ile sulandırılmıştır.
- Standart ve örneklerin üzerine 200 µl 1:8 oranında hazırlanan çalışma solüsyonu (A+B) eklenip 37°C' de 30 dk. bekletilmiştir. Daha sonra örnekler spektrofotometrede 562 nm' de ölçülmüştür.

3.2.15. Western Blot Analizi

10xTBST (1lt)

250 ml 1 M Trizma-Base ph:8.0

150 ml 5 M NaCl

42 ml 3 M KCl

Running Buffer (Yürütme solüsyonu) (1lt)

30 g Trizma-Base

144 g Glycine

15 g SDS ph:8,6

Blotting Buffer (1lt)

5,8 g 125 mM Trizma-Base

2,9 g 1,25 M Glycin

3,75 ml % 10 SDS

Loading Buffer (Yükleme Solüsyonu)

2,5 ml 1 M Tris PH 6,7

1 g SDS

2,5 ml Glycerol

1 ml B-Mercaptoethanol

Bromphenolblue

4 ml Millipore-H2O

Western blot elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, destek membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünojenik metodlarla gösterilmesidir (Burnette, 1981; Harlow ve Lane, 1988). Blotlamadan önce çalışılan numunedeki proteinler elektriksel ortamda jel üzerinde göç ettirilmektedir. Proteinlerin elektroforezleri sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jelde (SDS-PAGE) gerçekleştirilmektedir. SDS-PAGE proteinlerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında kullanılan temel biyokimyasal yöntemlerden biridir (Harlow ve Lane, 1988). Çalışılan numunedeki SDS-polipeptit kompleksleri, poliakrilamid jele yüklenip elektrik akımına maruz bırakıldıkları zaman, proteinin moleküler ağırlığıyla orantılı olarak, artı kutuba doğru göç etmekte ve jelde buldukları yerde bantlar halinde yığılım göstermektedir. Yapılan bu işlem elektroforezdir. Western blot tekniği elektroforez işlemi takip eden 4 adımda gerçekleştirilir. Bunlar jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikolarla tepkime ve en son adımda ise proteinlerin görüntülenmesi aşamalarıdır. Proteinlerin membrana transferi için ıslak kapillar metod ve yarı-kuru olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır (Burnette, 1981; Harlow ve Lane, 1988). Bu çalışmada yarı-kuru metod kullanılmıştır.

3.2.15.1. SDS PAGE jelinin hazırlanması

- % 8 ve % 10' luk ayırıcı jel aşağıda verilen Çizelge 3.3 izlenerek hazırlanmıştır.
- Jel yüzeyi isopropanol ile kaplanmıştır. 20-30 dk. polimerize olması için beklenilmiştir.
- Jel yüzeyindeki isopropanol uzaklaştırılmıştır.
- % 3' lük paketleyici jel aşağıda verilen Çizelge 3.3 izlenerek hazırlanmıştır.
- Jel tarafları dikkatli bir biçimde polimerize olmamış karışım içine yerleştirilmiştir.
- Polimerizasyonun tamamlanması için jel 20-30 dk. bekletilmiştir.

Çizelge 3.3. Yüzelere göre ayırıcı ve paketleyici jel içerikleri

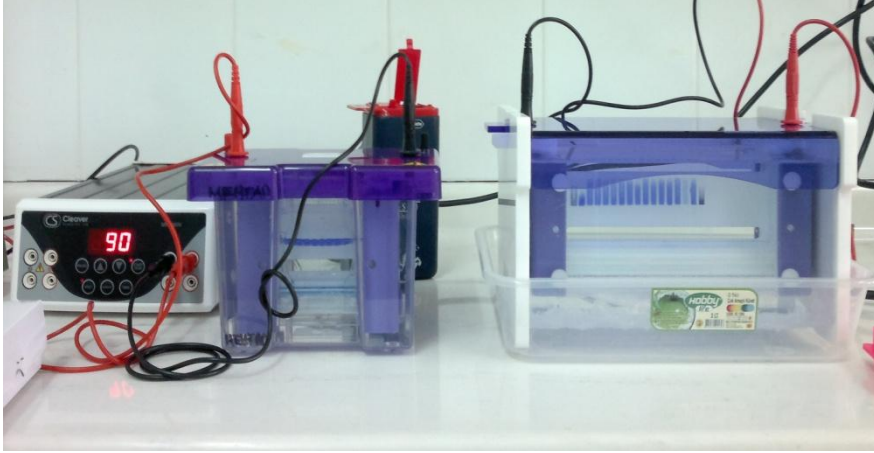
	% 3	% 8	% 10
Acrylamide-bis 29:1 % 30	0.5 ml	4.0 ml	5.0 ml
Lower Buffer	-----	3.8 ml	3.8 ml
Upper Buffer	1.25 ml	-----	-----
H₂O	3.2 ml	4.7 ml	3.7 ml
Glycerin	-----	2.5 ml	2.5 ml
TEMED	6 µl	12 µl	12 µl
% 40 APS	12 µl	18 µl	18 µl
Total	5 ml	15 ml	15 ml

3.2.15.2. Örneklerin hazırlanması

- Western Blot analizi için Bölüm 3.2.6’ da belirtilen konsantrasyonlarda Bölüm 3.2.12 ve Bölüm 3.2.13’ de belirtildiği gibi hazırlanan örnekler kullanılmıştır.
- Örneklerin jele yüklemeye hazır hale getirilmesi için loading buffer kullanılmıştır.
- Protein konsantrasyonları BCA (Protein Assay Kit) ile belirlendikten sonra bu sonuçlara göre her örnekten 45 µg % 8 ve % 10’ luk SDS-poliakrilamid jellere yükleme işlemi yapılmıştır.

3.2.15.3. Elektroforetik yürütme

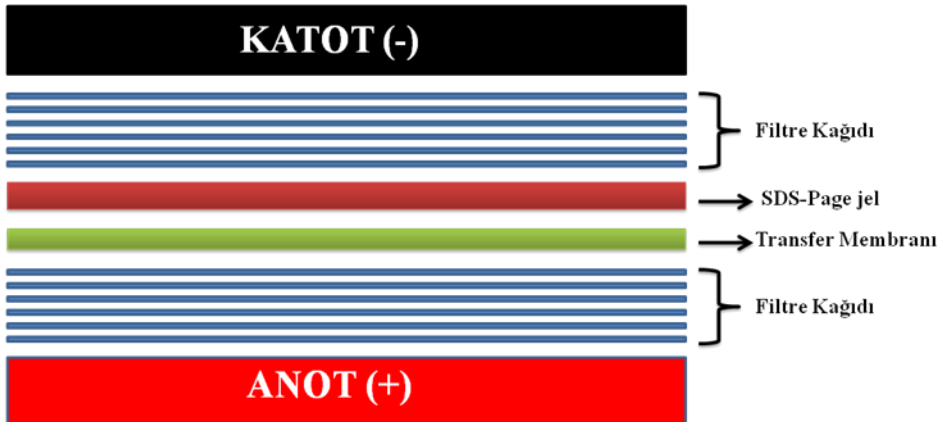
- Örnek yüklendikten hemen sonra sistem kapatılıp elektrotlar bağlanmış ve Şekil 3.4’ te görülen düzenek oluşturulmuştur.
- Örnekler ayırıcı jele girinceye kadar düşük akımda, running buffer içerisinde ilk 70 volta 45 dk. yürütülmüştür.
- Örnek ayırıcı jele geçtikten sonra ise 120 volta 90 dk. yürütülmüştür.



Şekil 3.4. Western Blot elektroforetik yürütme düzeneği

3.2.15.4. Semi-dry transfer

- Transferde kullanılan membran 5 dk. metanol içerisinde bekletilmiştir. 6 whatman filtre kağıdı blotting buffer içerisinde ıslatıldıktan sonra üzerine membran konulmuştur. Membran üzerine jel konulduktan sonra blotting buffer içerisinde ıslatılan 6 whatman filtre kağıdı jel üzerine konulmuştur. Yapılan işlem sırası Şekil 3.5’ te gösterilmiştir. Bu işlemler sırasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmiştir.



Şekil 3.5. Semi-Dry (Yarı-kuru) transfer düzeneği

- 300 miliamper 30 voltta 1 saat 30 dk. membrana transfer yapılmıştır.

3.2.15.5. Bloklama

- Transfer sonrası proteinleri bağlamış olan membran 40 dk. % 5 Süt tozu (1xTBST içerisinde hazırlanan) içerisinde çalkalanmaya bırakılmıştır.
- Bloklama yapıldıktan sonra membran 3 kez 5 dk. 1xTBST ile yıkanmıştır.

3.2.15.6. Birincil ve ikincil antikor ile inkübasyon

- Kullanılan Sirt1, Sirt2, Sirt3, Sirt6 ve Sirt7, β -actin birincil antikorları datasheet' de verilen dilüsyon oranına göre % 5' lik BSA (1xTBST içerisinde hazırlanan) ile dilüe edildikten sonra membranlar gece boyunca 4⁰C de primer antikorlarla inkübe edilmiştir (β -actin kontrol olarak kullanılmıştır).
- İnkübasyon sonunda 3 kez 10 dk. 1xTBST içerisinde yıkama yapıldıktan sonra 1 saat % 5' lik Süt tozu (1xTBST içerisinde hazırlanan) ile hazırlanan sekonder antikor (1:10000 dilüe Anti-Mouse IgG veya Anti-Rabbit IgG) ile 1 saat bekletilmiştir.
- İnkübasyon süresi sonunda 3 kez 5 dk. 1xTBST ile yıkama yapılmıştır.

3.2.15.7. ECL ile görüntüleme

- Yıkama işleminden sonra Enhanced Chemi Luminescence kiti kullanılarak membran lüminol ve parakumar asitle muamele edilmiştir.
- İkincil antikora bağlı bulunan horseradish peroksidaz enzimi, ECL çözeltisi içinde bulunan Lumigen PS-3 substratını katalizler. Bu reaksiyon sonucu açığa çıkan lüminol ışığa yol açar. Bu ışımaya, Western Blot' a özel filmler ile saptanır. Membran üzerine konulan X-ray filmi developer (HQ-450XM x-ray film processor) da banyo edilmiştir ve protein bantlarının görünür hale gelmesi sağlanarak değerlendirme yapılmıştır.

3.2.16. İstatistiksel Analiz

Verilerin grafiğe aktarılmasında Origin Graph 8.0 programı kullanılmıştır. Sayısal değişkenler “ortalama \pm standart sapma” şeklinde grafiğe aktarılmıştır. İstatistiksel analizler SPSS 11.5 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi sırasında gruplar arasındaki anlamlı

farkların belirlenmesinde One-way ANOVA testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1.WST-1 Testi ile Sitotoksik Etki ve Metabolik Aktivitenin Belirlenmesi

Çalışmada öncelikle resveratrolün BJ hücrelerinin canlılığı ve metabolik aktivitesi üzerinde etkisinin olup olmadığını ortaya çıkarmak amacıyla WST-1 testi yapılmıştır. 96 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 4×10^3 hücre olacak şekilde BJ hücreleri alınarak kontrol, DMSO ve 2,5-5-10-25-50-100-200-300 μM olmak üzere farklı resveratrol konsantrasyonlarından oluşan gruplar 24, 48 ve 72 saat süresince 37°C de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edilmiştir. Bölüm 3.2.7' de anlatıldığı gibi WST-1 testi protokolü uygulanmıştır. Yapılan test 3 kez tekrarlanıp resveratrol ile muamele edilen hücrelerin absorbans değerleri kontrol değeri ile normalize edilerek grafiğe aktarılmıştır.

24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında elde edilen değerler Şekil 4.1' de verilmiştir. Çizelge 4.1' de görüldüğü gibi 24, 48 ve 72 saat için kontrol grubu ile DMSO grubu karşılaştırıldığında metabolik aktivite açısından iki grup arasında anlamlı bir farklılık olmadığı p değerlerinden anlaşılmaktadır. Kontrol ve DMSO arasında anlamlı bir farklılığın olmaması resveratrolün içinde çözüldüğü kimyasal olan DMSO' nun hücrelerin metabolik aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Kontrol ve 2.5, 5 ve 10 μM konsantrasyonları 24 ve 48 saatte kontrol ile karşılaştırıldığında p değerinin $p < 0.05$ olduğu görülmektedir. Hücrelerin metabolik aktivitesinin bu zaman aralıklarında %20' lere kadar çıktığı Şekil 4.1' de görülmektedir. Elde edilen bu verilere göre 24 ve 48 saatte resveratrolün BJ hücrelerinin metabolik aktivitesi üzerinde 10 μM ' a kadar herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Şekil 4.1' de 72 saate bakıldığında bu konsantrasyonlarda metabolik aktivitenin her bir konsantrasyon için % 20 (± 4) oranında azaldığı görülmektedir. Bu sonuç ise resveratrolün 72 saatten itibaren metabolik aktivite üzerinde etkisinin olduğunu göstermektedir.

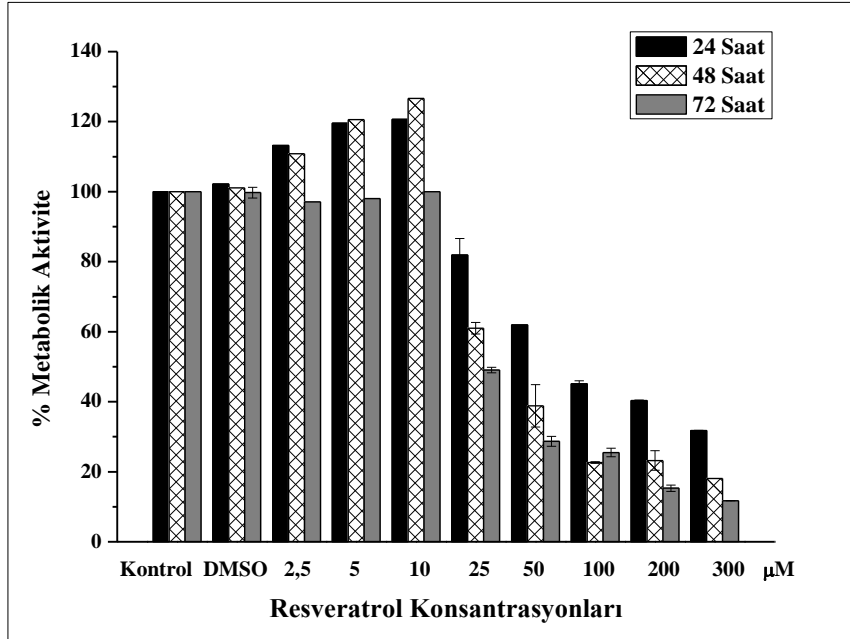
Çizelge 4.1. WST-1 testine göre DMSO ve 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 μM konsantrasyonların kontrolle karşılaştırılması ve p değerleri

	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kontrol-DMSO	p=0.08, p>0.05	p=0.08, p>0.05	p=0.09, p>0.05
Kontrol-2.5 μM	p=0.035, p<0.05	p=0.03, p<0.05	p=0.052, p>0.05
Kontrol-5 μM	p=0.03, p<0.05	p=0.025, p<0.05	p=0.055, p>0.05
Kontrol-10 μM	p=0.025, p<0.05	p=0.023, p<0.05	p=0.057, p>0.05
Kontrol-25 μM	p=0.028, p<0.05	p=0,018, p<0.05	p=0.02, p<0.05
Kontrol-50 μM	p=0.020, p<0.05	p=0,017, p<0.05	p=0.012, p<0.05
Kontrol-100 μM	p=0.017, p<0.05	p=0.015, p<0.05	p=0.011, p<0.05
Kontrol-200 μM	p=0.016, p<0.05	p=0.013, p<0.05	p=0.01 p<0.05
Kontrol-300 μM	p=0.015, p<0.05	p=0.013, p<0.05	p=0.01, p<0.05

Çizelge 4.2' de belirtildiği üzere 24 saatte 25 μM konsantrasyonda kontrol grubuna göre metabolik aktivitenin % 19 (± 4) oranında azaldığı görülürken 300 μM konsantrasyonda bu oranın % 69 olduğu görülmektedir. 72 saatte ise 25 μM konsantrasyonda kontrol grubuna göre metabolik aktivitenin % 50 (± 1) oranında azaldığı, 300 μM konsantrasyonda bu oranın % 89' lara çıktığı görülmektedir. Elde edilen verilere göre 24 saatten itibaren 72 saate kadar resveratrolün BJ hücrelerinin metabolik aktivitesi üzerine 25 μM ' dan itibaren etki gösterdiği bu etkinin 300 μM ' da en fazla görüldüğü belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. WST-1 testine göre 25, 50, 100, 200 ve 300 μM konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat için kontrole göre metabolik aktivitedeki % azalma değerleri

	24 Saat	48 Saat	72 Saat
25 μM	% 19 (± 4)	% 39 (± 2)	% 50 (± 1)
50 μM	% 39	% 62 (± 8)	% 71 (± 2)
100 μM	% 55 (± 1)	% 78	% 75 (± 2)
200 μM	% 60	% 77 (± 4)	% 85 (± 1)
300 μM	% 69	% 82 (± 1)	% 89



Şekil 4.1. BJ hücrelerinin resveratrol ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonrasında ölçülen % metabolik aktivite değerlerinin (ortalama \pm standart sapma) grafiksel olarak değerlendirilmesi

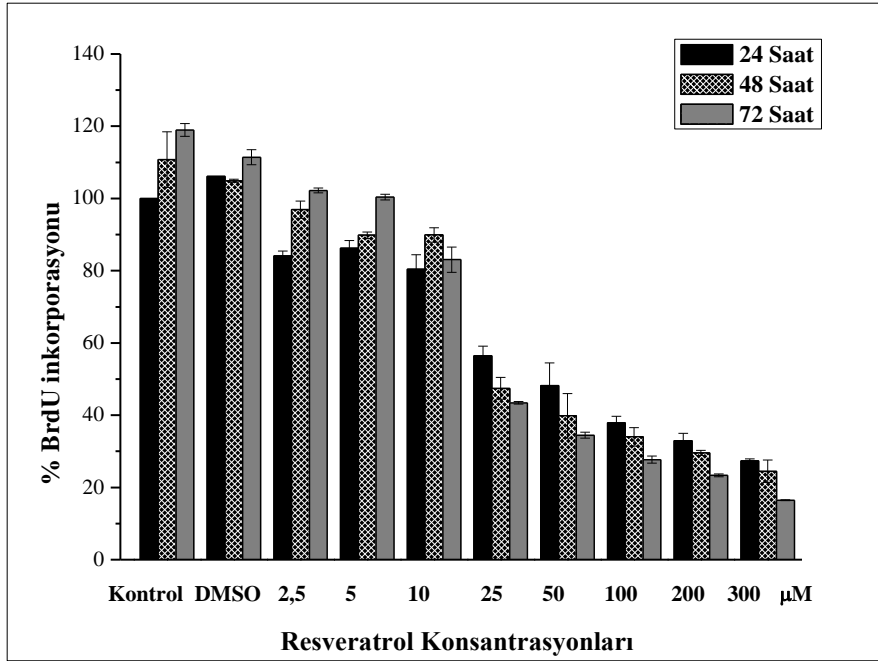
Sonuç olarak kontrol grubuna göre 25, 50, 100, 200 ve 300 μM konsantrasyonlarında % metabolik aktivite değerlerinde zamana bağlı olarak azalma gözlenirken 2,5, 5, 10 μM konsantrasyonlarda herhangi bir etki gözlenmemiştir.

WST-1 sonucu elde edilen veriler, resveratrolün BJ hücrelerinin metabolik aktivitesinde 25 µM' dan itibaren (zamana ve doza bağlı olarak) azalmaya neden olduğunu göstermektedir.

4.2. Hücre Proliferasyonunun BrdU Testi ile Değerlendirilmesi

BrdU testi, proliferasyon gösteren hücrelerdeki DNA' ya BrdU (5-bromodeoksiüridin) bağlanmasını saptayan bir testtir. Yapılan bu test ile farklı konsantrasyonlarda uygulanan resveratrolünün BJ hücrelerinin hücre proliferasyonu üzerine etkisinin olup olmadığı belirlenmiştir. 96 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde alınan BJ hücreleri kontrol, DMSO ve 2,5-5-10-25-50-100-200-300 µM olmak üzere farklı resveratrol konsantrasyonlarıyla muamele edilerek 24, 48 ve 72 saat süresince 37°C' de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Bölüm 3.2.8' de verilen protokole göre BrdU testi 3 kere tekrar edilmiştir. Resveratrol ile muamele edilen hücrelerin absorbans değerleri kontrol değeri ile normalize edilerek grafiğe aktarılmıştır.

Çizelge 4.3' de gösterildiği gibi 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrasında kontrol ile DMSO karşılaştırıldığında hücre proliferasyonu açısından iki grup arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Kontrol ve DMSO arasında anlamlı bir farklılığın olmaması resveratrolün içinde çözüldüğü kimyasal olan DMSO' nun hücrelerin proliferasyonu üzerine etki etmediğini göstermektedir. Kontrol ve 2.5, 5 ve 10 µM konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saatte kontrol ile karşılaştırıldığında p değerinin $p > 0.05$ olduğu görülmektedir. Şekil 4.2' de de görüldüğü üzere bu konsantrasyonlarda resveratrolün BJ fibroblastları üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı, hücrelerin zamana bağlı olarak çoğalmalarına devam ettikleri belirlenmiştir.



Şekil 4.2. BJ hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat resveratrol ile muamelesi sonrasında BrdU testi ile ölçülen % BrdU inkorporasyonunun (ortalama±standart sapma) grafiği

Çizelge 4.4' de belirtildiği üzere 24 saatte 25 μM konsantrasyonda kontrol grubuna göre metabolik aktivitenin % 44 (± 3) oranında azaldığı görülürken 300 μM konsantrasyonda bu oranın % 73 (± 1) olduğu gösterilmektedir. 72 saatte ise 25 μM konsantrasyonda kontrol grubuna göre metabolik aktivitenin % 75 oranında azaldığı, 300 μM konsantrasyonda bu oranın % 106' lara çıktığı görülmektedir. Elde edilen verilere göre 24 saatten itibaren 72 saate kadar resveratrolün BJ hücrelerinin proliferasyonu üzerine 25 μM ' dan itibaren etki ettiği bu etkinin 300 μM ' da en fazla görüldüğü belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. WST-1 testine göre DMSO ve 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 μM konsantrasyonların kontrole karşılaştırılması ve p değerleri

	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kontrol-DMSO	p=0.08, p>0.05	p=0.07, p>0.05	p=0.065, p>0.05
Kontrol-2.5 μM	p=0.085, p>0.05	p=0.065, p>0.05	p=0.062, p>0.05
Kontrol-5 μM	p=0.09, p>0.05	p=0.07, p>0.05	p=0.062, p>0.05
Kontrol-10 μM	p=0.09, p>0.05	p=0.07, p>0.05	p=0.064, p>0.05
Kontrol-25 μM	p=0.037, p<0.05	p=0,025, p<0.05	p=0.012, p<0.05
Kontrol-50 μM	p=0.038, p<0.05	p=0,024, p<0.05	p=0.012, p<0.05
Kontrol-100 μM	p=0.035, p<0.05	p=0.023, p<0.05	p=0.011, p<0.05
Kontrol-200 μM	p=0.036, p<0.05	p=0.021, p<0.05	p=0.009 p<0.05
Kontrol-300 μM	p=0.039, p<0.05	p=0.02, p<0.05	p=0.009, p<0.05

Çizelge 4.4. BrdU testine göre 25, 50, 100, 200 ve 300 μM konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat için kontrole göre metabolik aktivitedeki % azalma değerleri

	24 Saat	48 Saat	72 Saat
25 μM	% 44 (± 3)	% 63 (± 3)	% 75
50 μM	% 52 (± 6)	% 71 (± 6)	% 84 (± 1)
100 μM	% 63 (± 2)	% 76 (± 3)	% 91 (± 1)
200 μM	% 68 (± 2)	% 81 (± 1)	% 95
300 μM	% 73 (± 1)	% 86 (± 3)	% 106

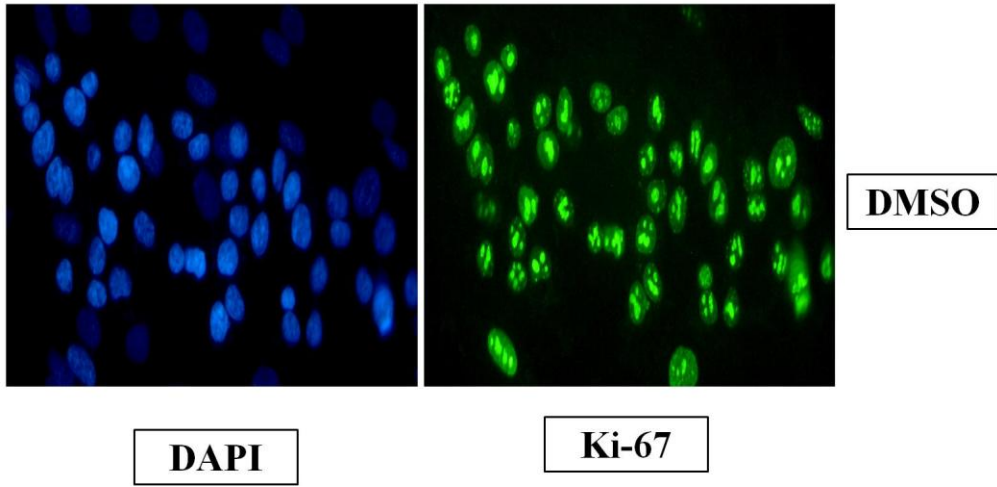
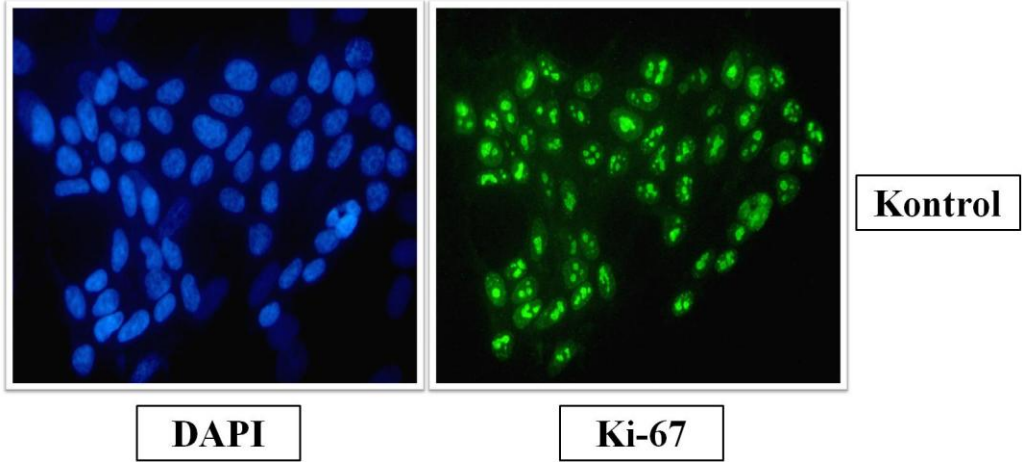
Gözlenen bu artış, resveratrolün düşük konsantrasyonlarında proliferasyona etki etmediği buna bağlı olarak da hücrenin normal proliferasyonuna devam ettiğini göstermektedir.

Sonuç olarak yapılan bu test ile resveratrolün BJ hücrelerinde proliferasyonu 25 μM ' dan itibaren azalttığı belirlenmiştir.

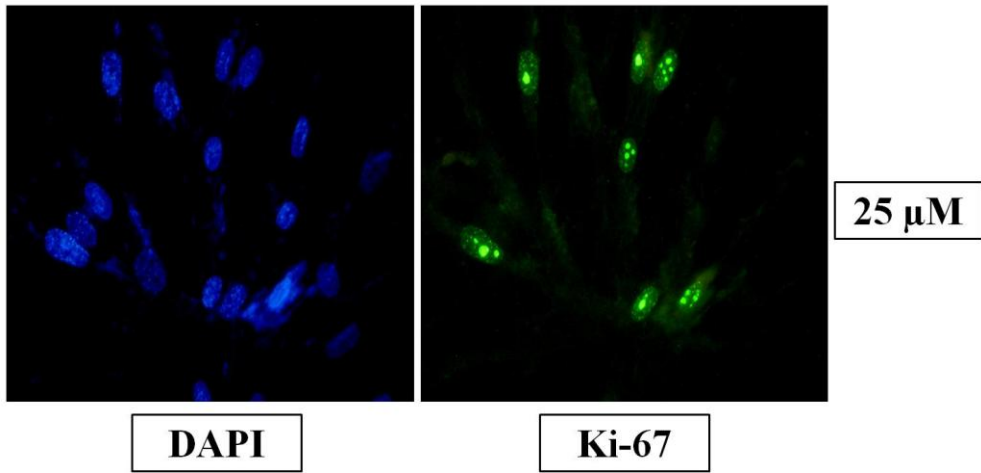
4.3.Hücre Proliferasyonuna Bağlı Olarak Oluşan Ki-67 Ekspresyonunun Belirlenmesi

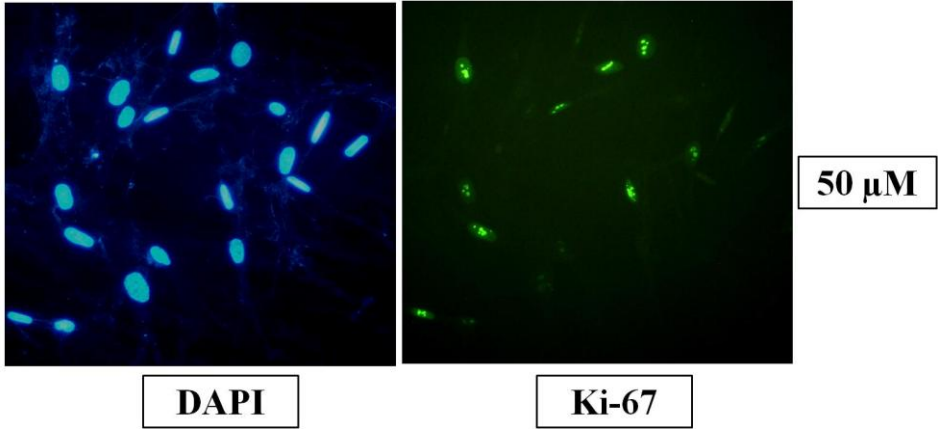
Resveratrolün hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin belirlendiği BrdU testine paralel olarak Ki-67 immün floresan boyama yöntemi ile hücreler boyanmıştır. İnsanda bulunan Ki-67 proteinin ekspresyonu hücre proliferasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Mitozda birçok protein kromozomların yüzeyine yerleşirken Ki-67 interfaz boyunca çekirdek içerisinde tespit edilebilir. Ki-67 proteini hücre döngüsünün bütün aktif fazlarında bulunur (G1,S,G2, mitoz) fakat G0' daki hücrelerde yoktur. Bu da Ki-67' yi verilen hücre popülasyonunun büyüme fraksiyonunu belirlemek için önemli bir marker haline getirmektedir (Scholzen ve Gerdes, 2000).

Hücreler Ki-67 ve DAPI ile boyandıktan sonra floresan mikroskop ve dijital kamera kullanılarak fotoğraflanmıştır. Çekirdek boyaması olan DAPI hücrelerin çekirdeklerinin görünür hale gelmesi için kullanılmıştır. Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5' te kontrol, DMSO ve 25-50-100-200-300 μM konsantrasyonlarda resveratrol ile 72 saat muamele edilen hücrelerin proliferasyona devam edip etmedikleri Ki-67 ile pozitif olarak boyanan (yeşil) hücrelerin varlığı ile görülmektedir. Buna göre Şekil 4.3' te kontrol ve DMSO gruplarında hücrelerin proliferasyona devam ettikleri görülmektedir. Şekil 4.4' te görüldüğü üzere 25 ve 50 μM konsantrasyonlarda resveratrol eklenen BJ hücrelerinde Ki-67 boyaması DAPI ile karşılaştırıldığında Ki-67 ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Şekil 4.3' te gösterilen kontrol grubu ile Şekil 4.4 ve 4.5' te gösterilen 25, 50, 100 μM konsantrasyonlarda hücrelerde Ki-67 ekspresyonunda azalma saptanırken Şekil 4.5' te gösterilen 200 ve 300 μM konsantrasyonlarda ise Ki-67 ekspresyonu hemen hemen hiç görülmemektedir.

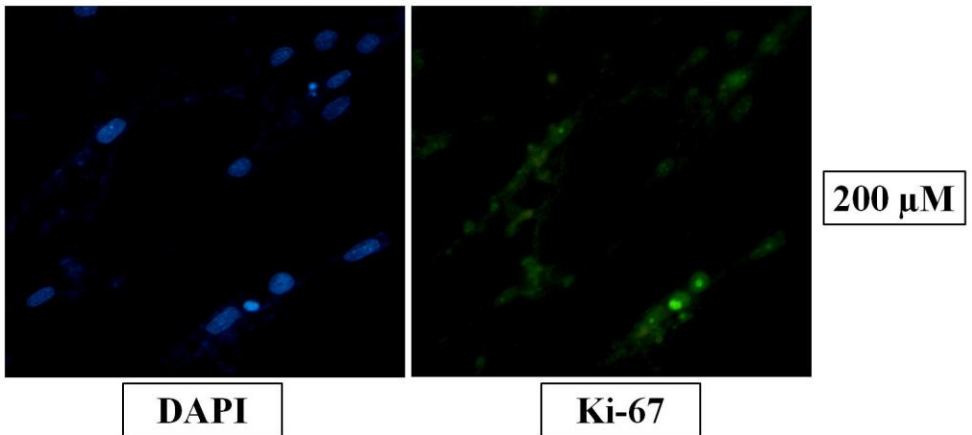
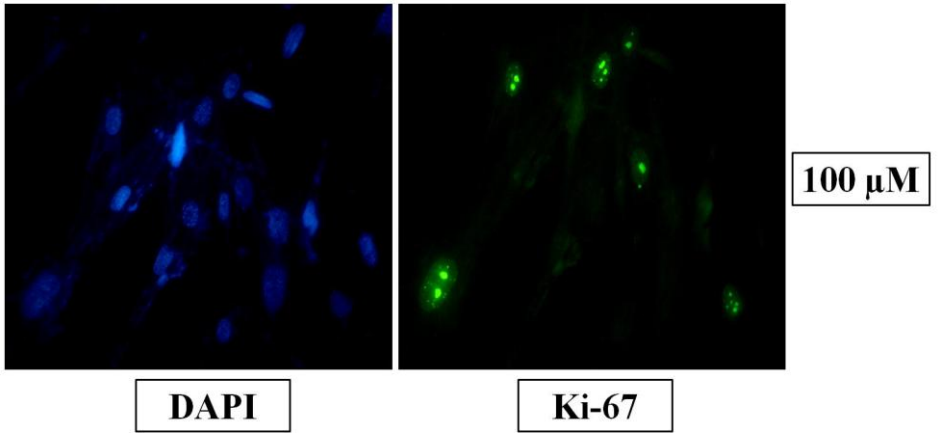


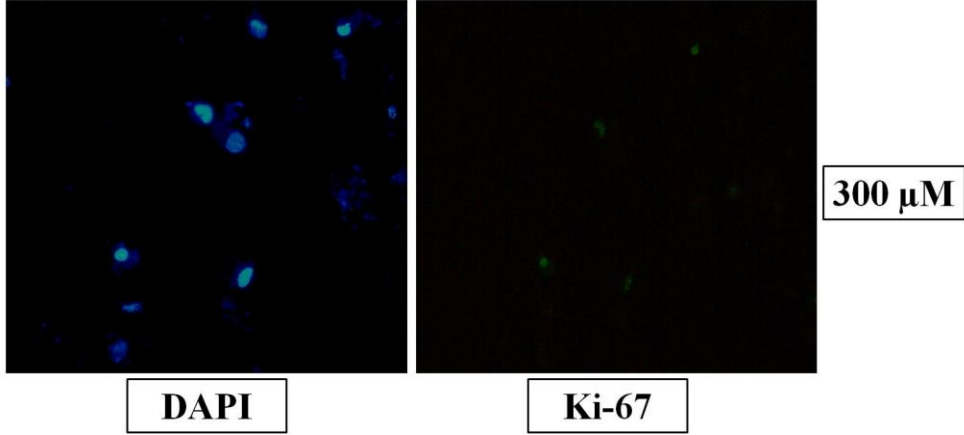
Şekil 4.3. Kontrol ve DMSO gruplarında Ki-67 ve DAPI boyaması (20x)





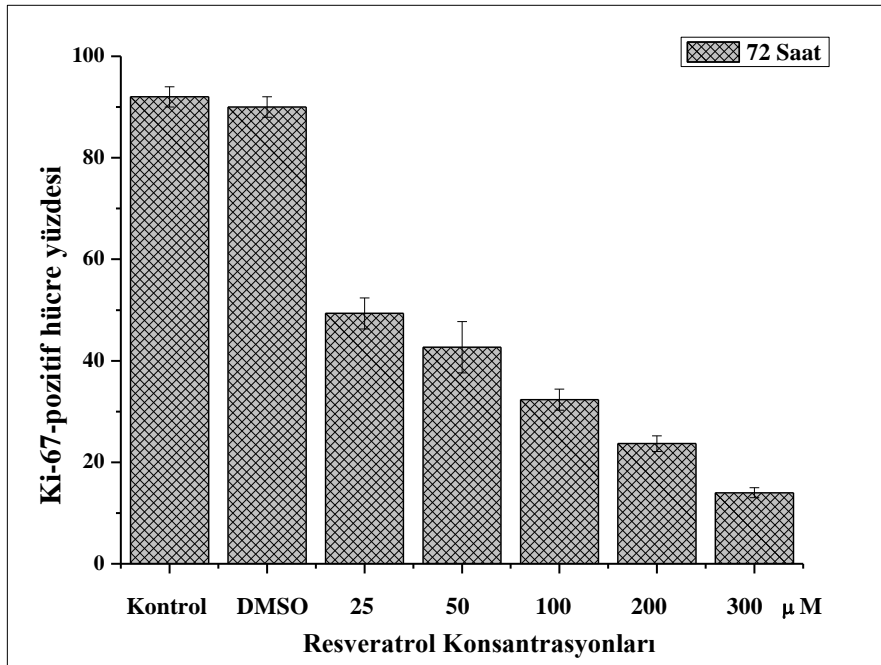
Şekil 4.4. 25 ve 50 μ M resveratrol uygulanan BJ fibroblastlarında Ki-67 ve DAPI boyaması (20x)





Şekil 4.5. 100, 200 ve 300 µM resveratrol uygulanan BJ fibroblastlarında Ki-67 ve DAPI boyaması (20x)

Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5' te DAPI ve Ki-67 boyaması yapılan hücelere ait 3 alan belirlenmiş ve Ki-67 pozitif boyanan hücrelerin %' si alınarak ortalama±standart sapma değerleri hesaplanarak grafik haline getirilmiştir. İstatistiksel olarak Kontrol ve DMSO arasında anlamlı bir fark görülmezken ($p=0.06$, $p>0.05$) 25 µM' dan itibaren diğer konsantrasyonlarda kontrolle aralarında anlamlı bir fark vardır ($p=0.012$, $p<0.05$). İstatistiksel açıdan kontrolle aralarında anlamlı bir fark olması hücre proliferasyonunun 25 µM' dan itibaren azalma gösterdiğine işaret etmektedir. Şekil 4.6' da görüldüğü gibi kontrol grubunda % 90 (±2), DMSO' da % 88 (±2), 25 µM konsantrasyonda % 46 (±3), 50 µM konsantrasyonda % 42 (±5), 100 µM konsantrasyonda % 33 (±2), 200 µM konsantrasyonda % 25 (±1), 300 µM konsantrasyonda % 15 (±1) oranında Ki-67 pozitif boyanmış hücre görülmektedir.



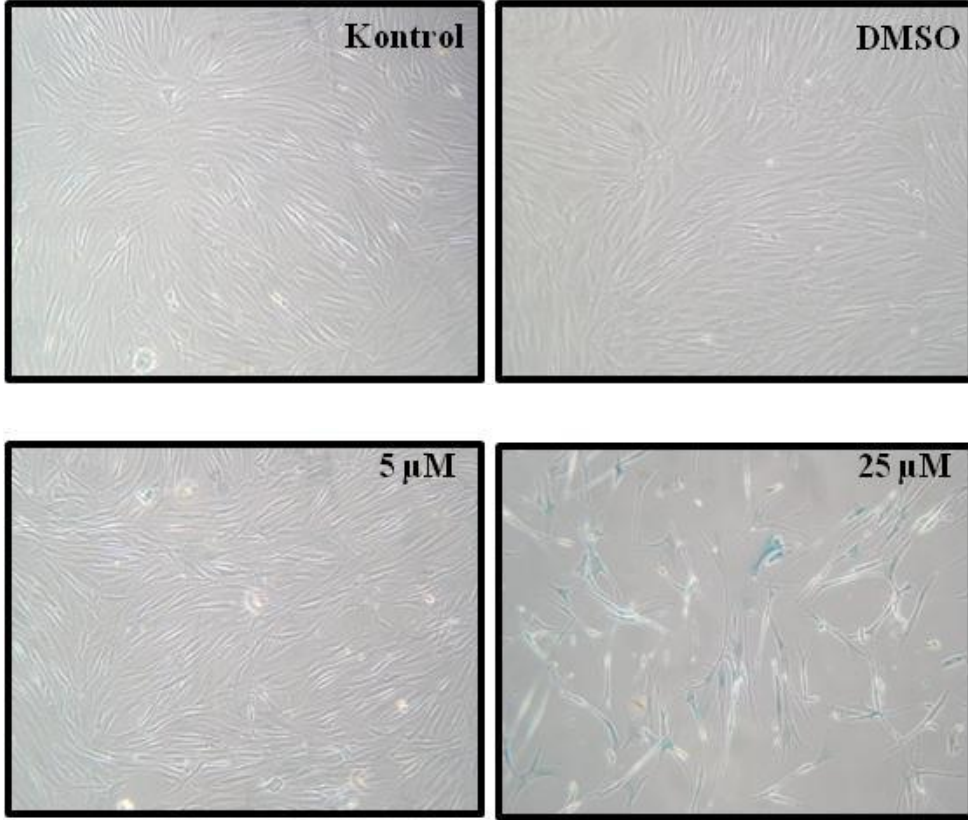
Şekil 4.6. 72 saat resveratrol ile muamele edilen BJ hücrelerindeki Ki-67 ekspresyonun % olarak (ortalama±standart sapma) değerlendirilmesi

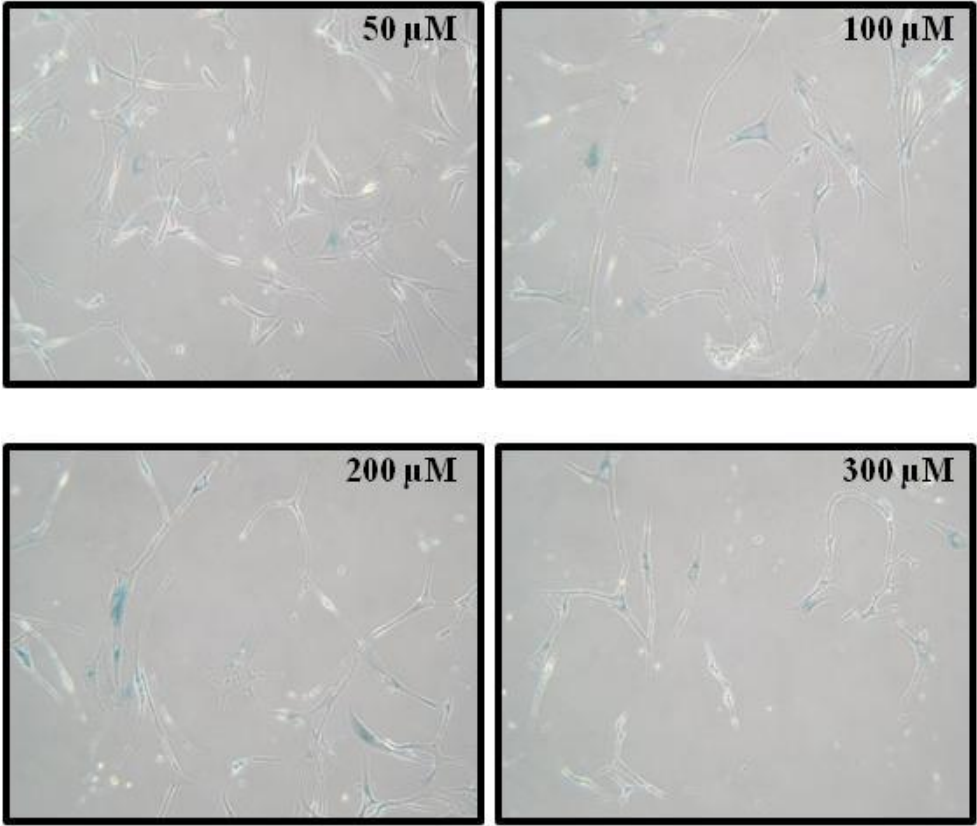
Sonuç olarak 72 saat resveratrol ile muamele edilen hücrelerin Ki-67 ekspresyonunda doza bağlı olarak azalma meydana geldiği saptanmıştır. Ki-67 ekspresyonunda meydana gelen azalma resveratrolün BJ hücrelerinin proliferasyonunu durdurduğunu göstermektedir.

4.4. Senesense Bağlı Olarak Artış Gösteren β -galaktozidaz Aktivitesi

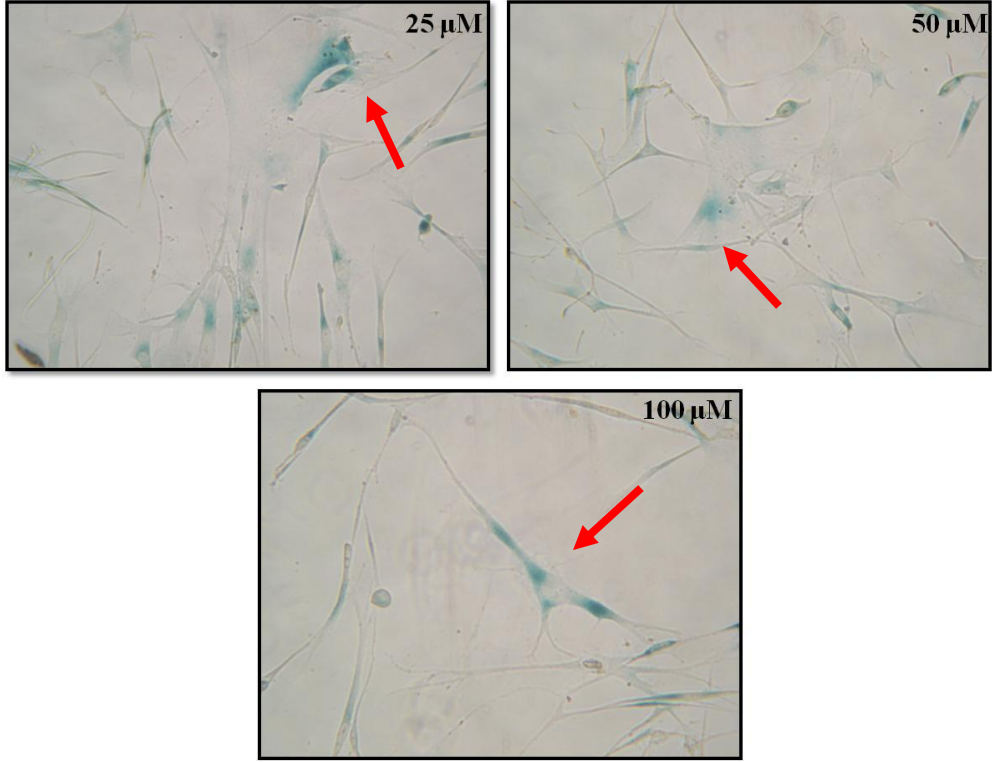
Senesensin bilinen biyokimyasal karakteristiği, SA- β -gal (senescence associated β -galactosidase) yani senesense bağlı olarak ortaya çıkan β -galaktozidaz aktivitesinde görülen aşırı artıştır. Senesensin test edilmesinde standart protokollerde yer alan SA- β -gal aktivitesi BJ hücrelerinin 72 saat resveratrol ile muamelesi sonunda ölçülmüştür. 72 saat sonunda hücreler öncelikle % 2' lik paraformaldehit ile fikse edilmiş ve daha sonra verilen X-gal substratının parçalanması yöntemi ile senesense uğrayan hücreler mavi boyanırken kontrol hücrelerinde, DMSO ve 5 μ M konsantrasyonda herhangi bir boyama tespit

edilmemiştir (Şekil 4.7). 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda hücrelerdeki boyamanın pozitif olduğu Şekil 4.7’ de görülmektedir. Bu konsantrasyonlarda hücrelerin senesense uğradıkları Şekil 4.8’ de kırmızı ok işaretleriyle gösterilmiştir. Bunun yanısıra Şekil 4.7’ de görüldüğü üzere 200 ve 300 μM konsantrasyonlarda resveratrol eklenen hücrelerde ise senesensin yerine hücre ölümünün başladığı, maviye boyanan hücrelerin azalmasından ve hücrelerin morfolojik olarak senesens karakteristiğini kaybedip daha çok büzüşmeye başlamasından anlaşılmaktadır.





Şekil 4.7. Resveratrol ile muamele edilen BJ fibroblastlarında Saβ-Gal boyaması (10x)

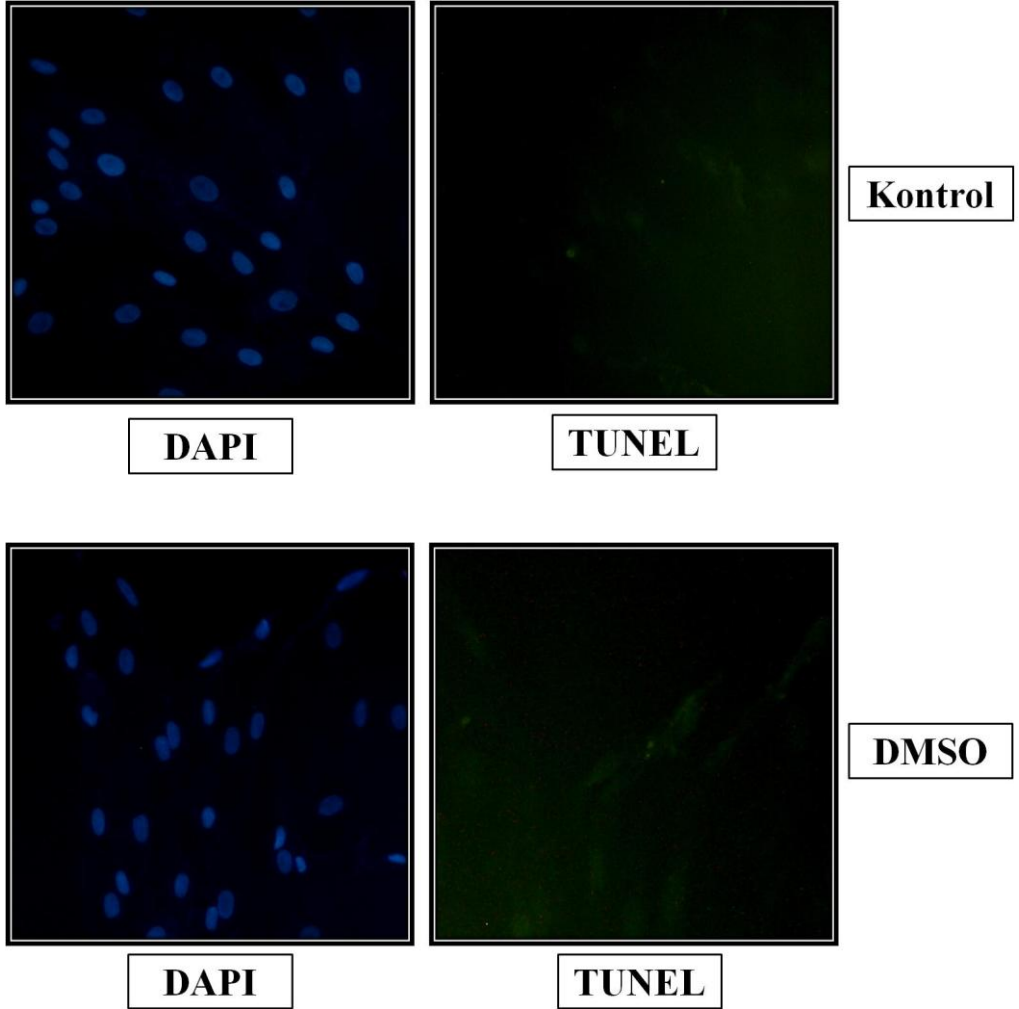


Şekil 4.8. 25, 50, 100 µM resveratrol ile muamele edilen BJ fibroblastlarında Safranin-Gal boyaması (20x)

4.5. TUNEL Testi ile Apoptozisin Değerlendirilmesi

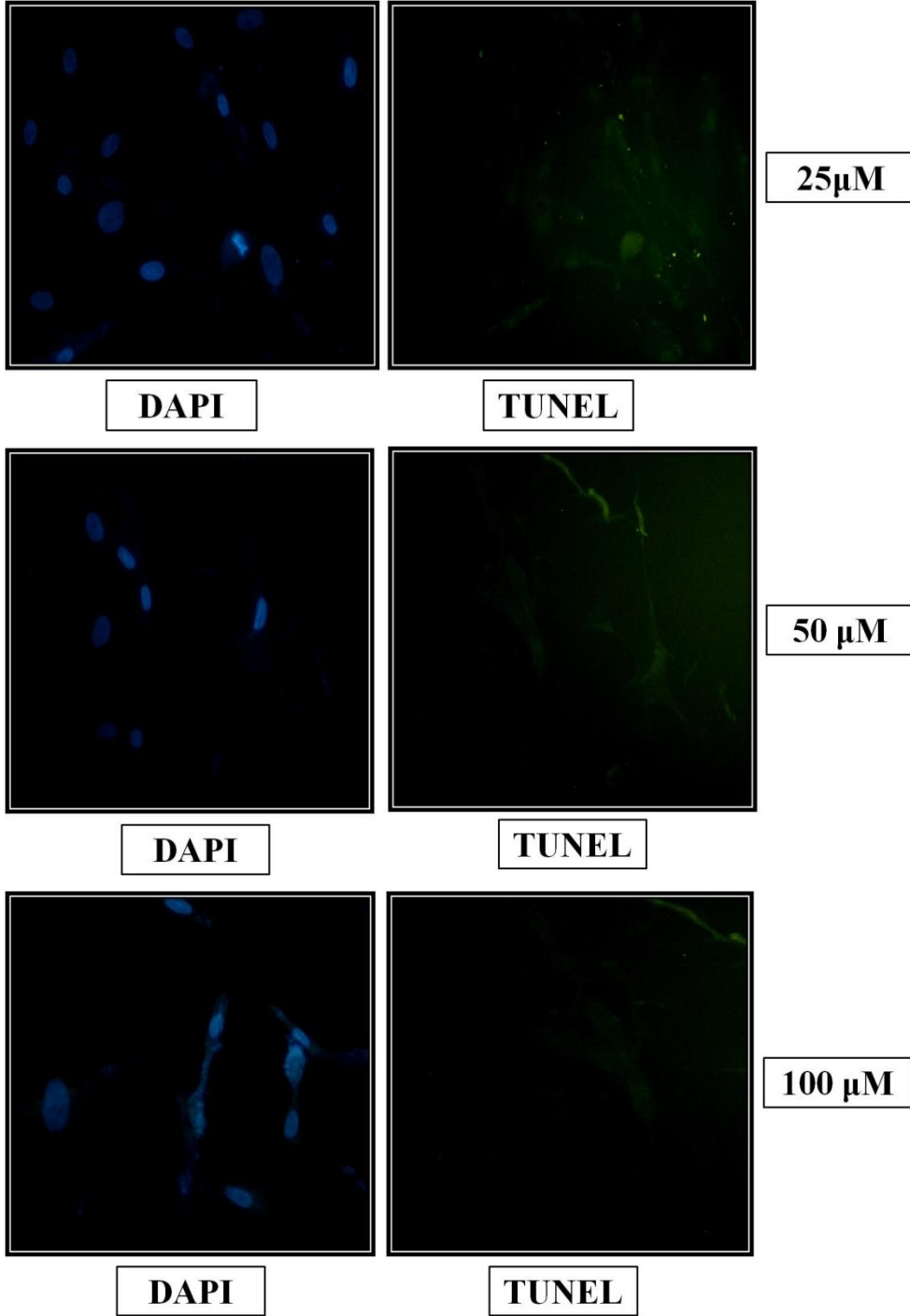
Resveratrol ile muamele edilen BJ hücrelerinde hücre ölümü/apoptozis meydana gelip gelmediği TUNEL testi ile belirlenmiştir.

Şekil 4.9' da görüldüğü gibi TUNEL–negatif olduğu ve kontrol, DMSO gruplarında apoptotik hücre ölümünün olmadığı saptanmıştır.



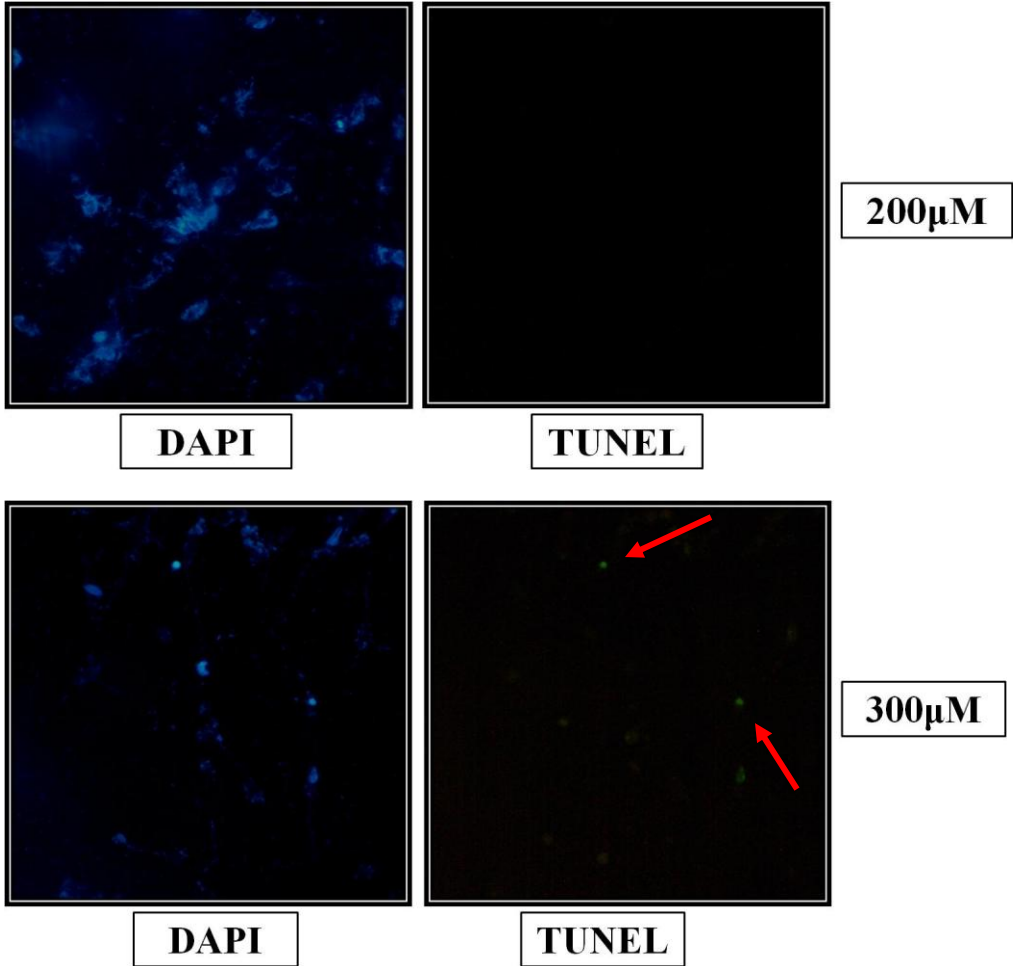
Şekil 4.9. 72 saat inkübasyon sonrasında Kontrol ve DMSO gruplarında TUNEL ve DAPI boyaması (20x)

Şekil 4.10' da görüldüğü üzere 72 saat 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda resveratrol uygulanan hücreler TUNEL negatif olarak boyanmıştır.



Şekil 4.10. 25, 50, 100 µM konsantrasyonlarda resveratrol ile 72 saat muamele sonrasında TUNEL ve DAPI boyaması (20x)

Şekil 4.11' de görüldüğü üzere 200 μM konsantrasyonda hücreler TUNEL negatif boyanırken, 300 μM konsantrasyonun uygulandığı hücrelerde apoptotik cisimciklerin varlığı bu hücrelerin yeşile boyanmasıyla tespit edilmiştir. Yeşile boyanan hücreler ok işaretiyle gösterilmiştir.

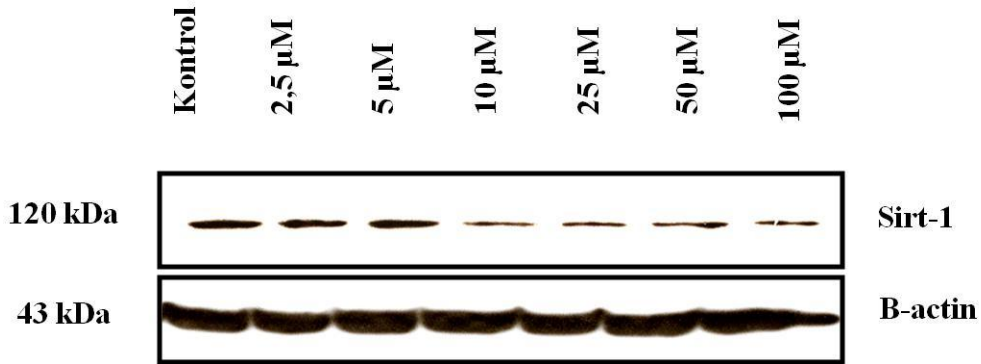


Şekil 4.11. 200, 300 μM konsantrasyonlarda resveratrol ile 72 saat muamele sonrasında TUNEL ve DAPI boyaması (20x)

4.6. Western Blot Analizi ile Sirtüin Aktivasyonunun Değerlendirilmesi

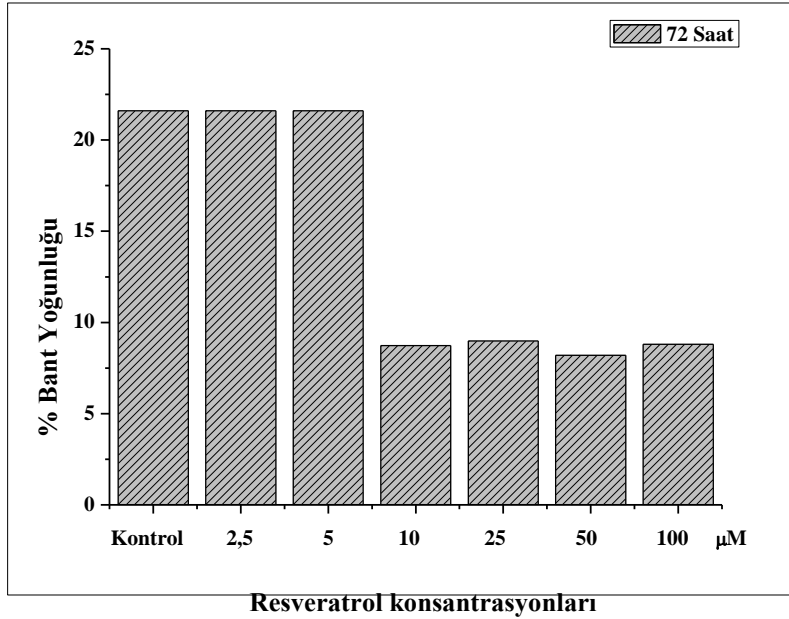
BJ hücreleri Bölüm 3.2.6' da belirtilen dozlarda resveratrolle 37°C' de, % 5 CO₂ içeren ortamda 72 saat inkübe edilmiş ve Bölüm 3.2.12. ve 3.2.13.' te belirtildiği gibi lizat ve ekstrakt yapıp Western Blot analizi için kullanılmıştır. Bu yöntemle sirtüin proteinlerinden Sirt1, 2, 3, 6, 7 ifadesi analiz edilmiştir. Ayrıca bir house-keeping gen (genel olarak zaman ya da koşula bağlı olarak ifade düzeyi değişmez) olarak bilinen B-actin geninin ifadesi de bu analizde yüklenen protein miktarının eşit olduğunu göstermek amacıyla kontrol olarak kullanılmıştır. Western Blot analizi sonucu elde edilen veriler ImageJ programıyla densitometre analizi yapılarak değerlendirilmiştir. Yapılan densitometre analizi sonucu elde edilen bant yoğunlukları β -actin ile normalize edilerek % değerler olarak grafiğe aktarılmıştır.

Şekil 4.12' de resveratrol ile muamele edilen BJ fibroblastlarında Sirt1 proteinin ifade düzeyi 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarda kontrole göre belirgin bir azalma göstermiştir. 2,5 μ M ve 5 μ M konsantrasyonlar kontrole kıyaslandığında herhangi bir değişiklik saptanmamıştır.



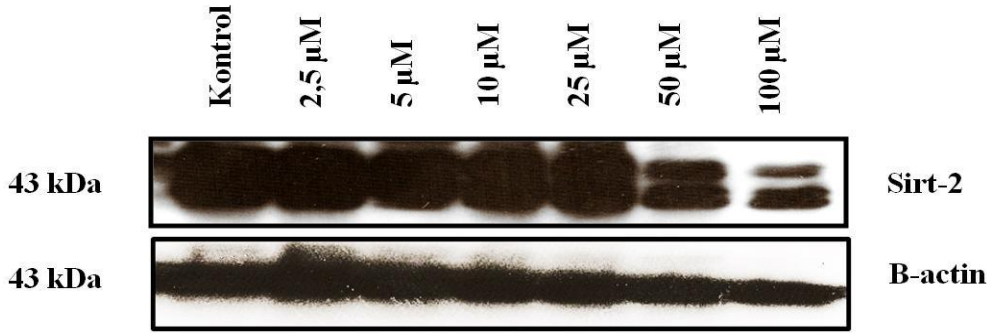
Şekil 4.12. Resveratrol ile 72 saat muamele edilen BJ fibroblastlarında WB analizi ile Sirt1 ifade düzeyi

Şekil 4.13' te Western Blot analizinde görülen bant yoğunluğunun densitometre analizi sonucunda Sirt1'in bant yoğunlu β -actin ile normalize edilerek % olarak verilmiştir. Grafiğe göre 10 μ M' dan itibaren bant yoğunluğunda azalma olduğu görülmektedir. Azalmanın meydana geldiği konsantrasyonların senesensin görüldüğü konsantrasyonlar olduğu da dikkat çekmektedir.

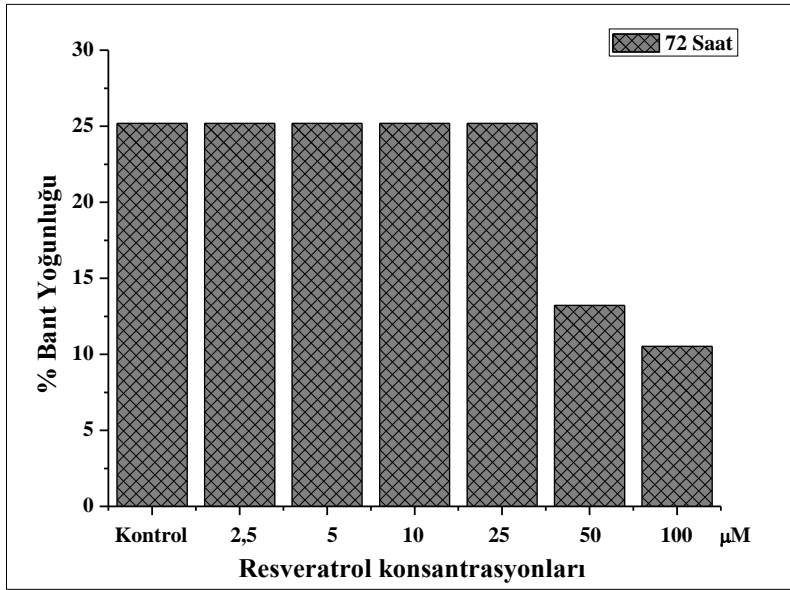


Şekil 4.13. Sirt1 ifadesinin % olarak değerlendirilmesi

Şekil 4.14' te resveratrol ile muamele edilen BJ fibroblastlarında Sirt2 proteinin ifade düzeyinin 50 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarda kontrole göre azalma gösterdiği görülmektedir. 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M ve 25 μ M konsantrasyonlar kontrolle kıyaslandığında herhangi bir değişiklik saptanmamıştır.



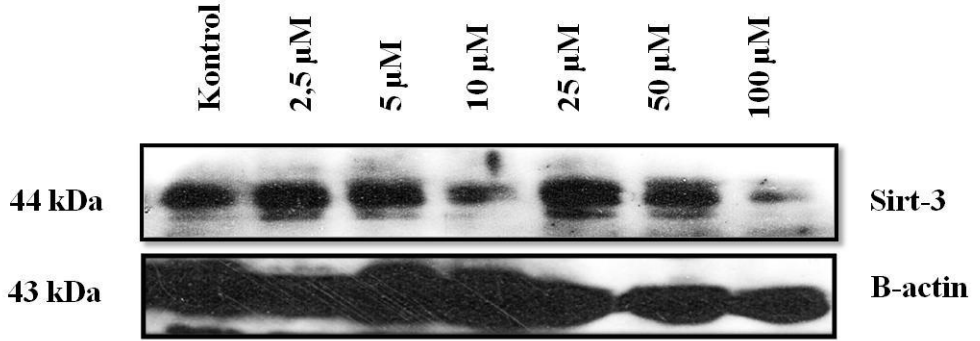
Şekil 4.14. Resveratrol ile 72 saat muamele edilen BJ fibroblastlarında WB analizi ile Sirt2 ifade düzeyi



Şekil 4.15. Sirt2 ifadesinin % olarak değerlendirilmesi

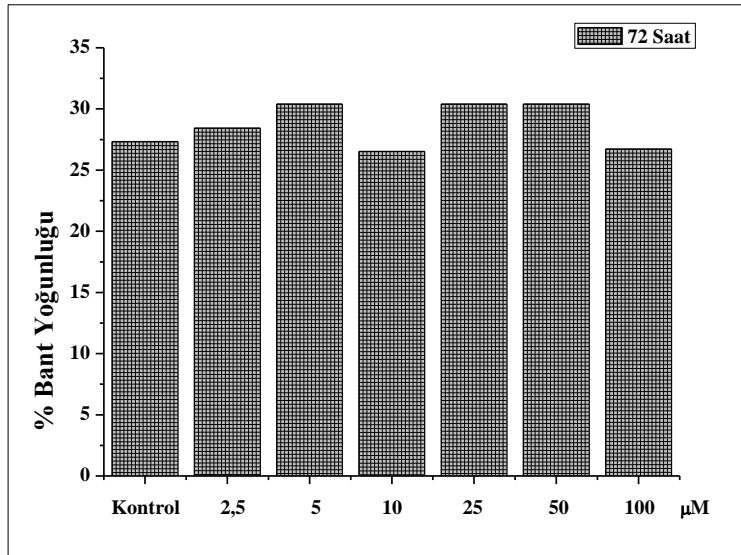
Şekil 4.15' e göre Sirt2 ifadesinin 50 ve 100 µM' da kontrole göre azaldığı görülmektedir. Sirt1' de ifade edildiği gibi bu konsantrasyonlar senesensin meydana geldiği konsantrasyonlarla örtüşmektedir.

Şekil 4. 16' da Sirt3 ifade düzeyinde kontrole göre herhangi bir değişiklik olmadığı görülmektedir.



Şekil 4.16. Resveratrol ile 72 saat muamele edilen BJ fibroblastlarında WB analizi ile Sirt3 ifade düzeyi

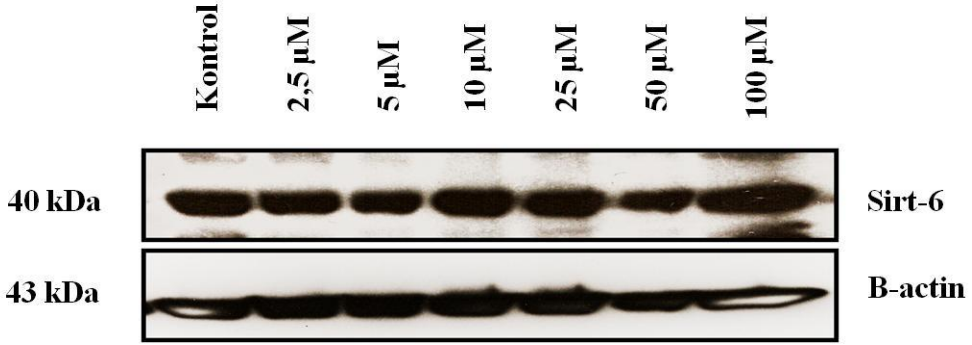
Yapılan densitometre analizi sonucunda Sirt3 ifadesinde herhangi bir değişiklik olmadığı Şekil 4.17' de gösterilmiştir.



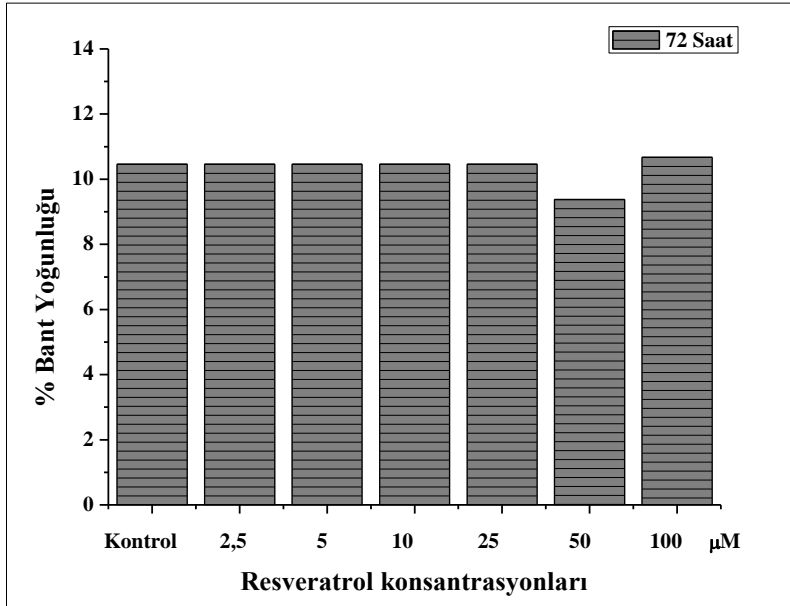
Resveratrol konsantrasyonları

Şekil 4.17. Sirt3 ifadesinin % olarak değerlendirilmesi

Şekil 4. 18' de Sirt6 ifade düzeyinde kontrole göre herhangi bir değişiklik olmadığı görülmektedir. Bant yoğunluğunun daha net görülebilmesi için Şekil 4.19' da verilen bant yüzdeleri verilmiştir. Bant yüzdelerinde de Sirt6 ifadesinin değişmediği gösterilmiştir.

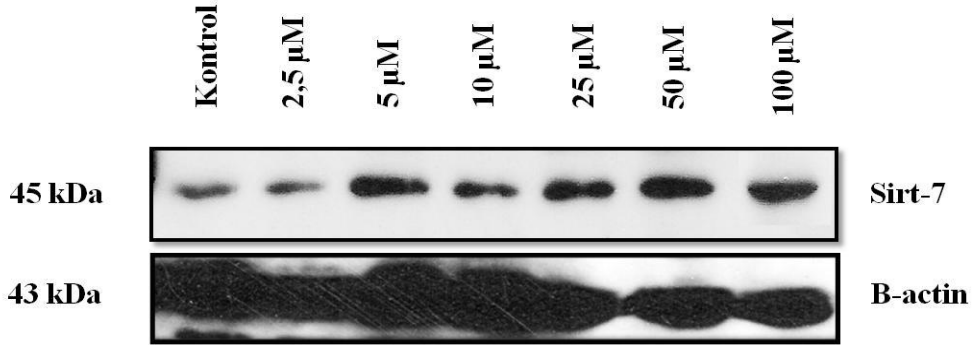


Şekil 4.18. Resveratrol ile 72 saat muamele edilen BJ fibroblastlarında WB analizi ile Sirt6 ifade düzeyi

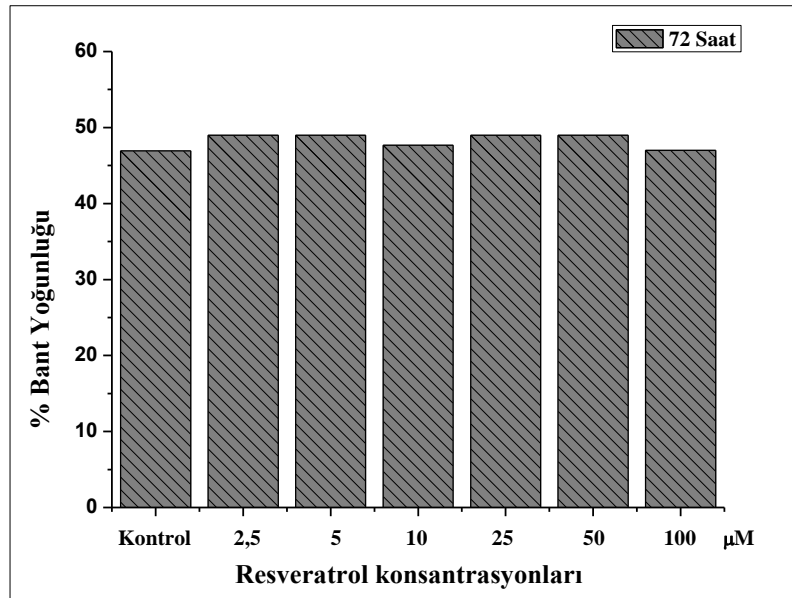


Şekil 4.19. Sirt6 ifadesinin % olarak değerlendirilmesi

Şekil 4. 20' de Sirt7 ifade düzeyi β -actin ile kıyaslandığında kontrole göre herhangi bir değişiklik olmadığı görülmektedir. Bu analizin daha net yapılabilmesi için Şekil 4.21' deki grafik değerlendirilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi Sirt7 ifadesinin kontrole göre değişmediği saptanmıştır.



Şekil 4.20. Resveratrol ile 72 saat muamele edilen BJ fibroblastlarında WB analizi ile Sirt7 ifade düzeyi



Şekil 4.21. Sirt7 ifadesinin % olarak değerlendirilmesi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, resveratrolün hücrel yaşlanmanın indüklenmesi ve sirtuinlerin aktivasyonundaki rolü insan normal dermal fibroblastları (BJ) kullanılarak araştırılmıştır. Yapılan tez çalışmasında öncelikle WST-1 testi ile metabolik aktivite ve hücre canlılığı ölçülmüştür. WST-1 testine göre 24, 48 ve 72 saat resveratrol ile muamele edilen BJ fibroblastlarında üç zaman diliminde de 25 μM ' dan itibaren azalma saptanmıştır. Bu azalma 25 μM ' da 24 saat için % 19 iken 72 saatte % 50' ye yükselmiştir. Verilen en yüksek konsantrasyon olan 300 μM ' da bu oran 72 saatte % 89' a kadar çıkmıştır.

WST-1 testi ile saptanan bulgular BrdU testi ile desteklenmiştir. BrdU testine göre 25 μM ' da 24 saatte % 44 iken 300 μM ' da % 73' lere kadar çıkmıştır. 48 saatte ise 25 μM ' da % 63 iken 300 μM ' da % 86, 72 saatte ise % 75 iken % 106' lara kadar çıkmıştır. Yapılan Ki-67 immün boyaması ile hücrelerin bölünmeye devam edip etmedikleri tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre 72 saatte 25 μM ' dan itibaren BJ fibroblastlarında hücrelerin bölünmesini azalttığı saptanmıştır. Bu çalışmada kullanılan Ki-67 boyama yöntemi benzer şekilde Faragher (2011) tarafından yapılan çalışmada MRCA5 ve HCA2 fibroblast hücrelerinin 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 μM resveratrol ile 48 saat muamele edilmesi sonrasında da kullanılmıştır. 10 μM ve daha düşük konsantrasyonlarda büyüme fraksiyonunda herhangi bir değişiklik gözlenmezken, 25 μM ve üzeri konsantrasyonlarda büyüme fraksiyonunda azalma gözlenmiş ve senesens fraksiyonunda artış olduğu yapılan Sa β -Gal boyaması ile rapor edilmiştir (Faragher vd., 2011). Dolayısıyla elde ettiğimiz sonuçlar literatürle de uyumluluk göstermektedir.

Düz kas hücreleriyle yapılan bir başka çalışmada ise 6.25–12.5 μM resveratrolün yine hücre döngüsünü bloke ettiği ancak bu hücrelerde elde ettiğimiz bulguların aksine 25 μM resveratrolün bile apoptozise neden olduğu bildirilmiştir (Mnjoyan ve Fujise, 2003). Bu durum her iki hücre tipinin farklı olmasından kaynaklanabilir. Resveratrolün kanser hücrelerinde de senesensi indüklediğini gösteren başka çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin osteosarkom ve adenosarkom hücre dizileriyle yapılan bir çalışmada senesensi belirlemek amacıyla hücreler 24, 48, 72 ve 96 saat 0-50 μM resveratrol ile muamele edilmiştir ve Sa β -Gal boyaması kullanılmıştır. Sonuç olarak bu hücrelerde de bizim bulgularımıza benzer şekilde resveratrolün 48 saatten itibaren senesensi indüklediği gösterilmiştir.

Yapılan bu tez çalışmasına benzer şekilde normal insan fibroblastlarının kullanıldığı çalışmalardan biri Giovannelli vd. (2011) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada MRC5 fetal akciğer dokusundan türetilen normal insan fibroblastları kullanılmış ancak ve bizim elde ettiğimiz bulgulara benzer şekilde resveratrolün düşük konsantrasyonlarda (1-5 μM) MRC5 hücrelerinin replikatif kapasitelerini inhibe etmediği gösterilmiştir.

Yukarıdaki çalışmanın aksine yani senesens aktivitesinin 7 günden sonra artış gösterdiğini rapor eden çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalarda endotel hücreleri kullanılmış ve Sa β -Gal aktivitesine bakılarak senesens karakteri belirlenmiştir (Xia vd., 2008; Schilder vd., 2009).

Yapılan tüm bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar ve bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde resveratrolün hücresel düzeyde yaşlanmayı indükleyici etkisinin doza ve zamana bağlı olduğu ve ayrıca hücre veya dokuya göre de farklılık gösterebildiği sonucu ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız TUNEL boyama yöntemiyle resveratrolün sadece çok yüksek konsantrasyonda (300 μM) hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir. Resveratrolün bazı kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklediğine dair yapılan çalışmalar mevcuttur (Kao vd., 2009; Hussain vd., 2011; Whitlock vd., 2011). Kao vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada TUNEL boyaması ile 150 μM resveratrolün kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir. Hussain (2011) tarafından yapılan çalışmada ise 24 saat 50 μM resveratrol ile muamele edilen lenfoma hücrelerinde apoptozis saptanmıştır. LNCaP prostat kanser hücrelerinde (Morris vd., 2002), DU-145 prostat kanser hücrelerinde 72 saat 200 μM ' da (Lin vd., 2002), fare myeloid lösemi hücrelerinde 72 saat 100 μM ' da (Gao vd., 2002), insan kronik lösemi hücrelerinde (Roman vd., 2002) ve MCF7, SW480, HCE7, Seg-1, HL60 (Joe vd., 2002) gibi diğer kanser hücrelerinde 48 saat 300 μM ' da ve U251 glioma hücrelerinde (Jiang vd., 2005) 48 saatte 100 μM ' da apoptozisi indüklediği bildirilmiştir. Dolayısıyla resveratrolün apoptotik etkisiyle ilgili elde edilen bulgularımız BJ hücrelerinde elde edilen ilk bulgular olup farklı hücre dizilerini kapsayan literatür bilgisiyle de paralellik göstermektedir.

Görüldüğü üzere yapılan çalışmalarda resveratrolün hücre bölünmesini durdurucu, senesensi ve apoptozisi indükleyici etkisini gösteren çok sayıda çalışma

bulunmaktadır (Mnjoyan ve Fujise, 2003; Rusin vd., 2009; Kao vd., 2009; Hussain vd., 2011; Whitlock vd., 2011, Luo vd.,2013). Ancak yapılan bu çalışmalardan resveratrolün hücresele düzeyde senesensi indükleyici etkisi olduğu açıkça görülürken sirtüinlerle olan ilişkisi ortaya konmamıştır. Bununla beraber model organizmalarda yapılan çalışmalarda ise resveratrolün Sirt1' i aktive ederek yaşam süresini uzattığı ve resveratrolün yaşlanmayı geciktirici etkisini sirtüinlerin aktivasyonu üzerinden gerçekleştirdiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Brooks ve Gu, 2009; Tang vd., 2012; Kavas vd., 2013). Bundan başka Yamashita vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada insan göbek bağı fibroblastları (HUC-F2) 5 µM resveratrol ile 12 saat boyunca inkübe edildikten sonra Saß-Gal aktivitesinde azalma meydana gelmiştir. Sirt1 aktivasyonunda ise artış gözlenmiştir. Bu sonuç insan göbek bağı fibroblastlarında Sirt1' in hücresele senesensi önlediğini göstermektedir. Çalışmamızda ise resveratrolün düşük konsantrasyonunda Sirt1 ifadesinde herhangi bir değişiklik gözlenmezken hücresele yaşlanma da görülmemiştir. Ancak Sirt1 ifadesi azaldığı andan itibaren hücresele yaşlanma görülmeye başlanmıştır. Bu durum literatür bilgisiyle uyum göstermektedir.

Resveratrolün yaşlanmayı engelleyici etkilerinin insanda araştırılabilmesi ya da görülmesi mümkün olmadığı için *in vitro* da insan hücrelerinde hücresele düzeyde bu durumun, varsa diğer etkilerinin, özellikle de yaşlanmayı geciktirici etkisi sirtüinlerin aktivasyonu üzerinden gerçekleştiğı için sirtüinlerin rolünün ortaya çıkarılması önemlidir. Bu durumu aydınlatmak amacıyla bu çalışmada resveratrolün normal dermal insan fibroblastlarında (BJ) yaşlanma üzerine olası etkileri ve yapılan western blot analizleriyle resveratrolün sirtüinleri aktive edip etmediğı de belirlenmiştir.

Resveratrolün BJ fibroblastlarında zamana ve doza bağılı olarak hücresele senesensi indüklediğı ve ilginç bir şekilde senesensin indüklendiğı konsantrasyonlarda da Sirt3, Sirt6 ve Sirt7' nin ifadesinde herhangi bir değişiklik görülmezken özellikle yaşlanmayı geciktirici rolü olduğu düşünölen Sirt1 ve Sirt2' nin ifadesinde azalma olduğı saptanmıştır. Bu da aslında resveratrol tarafından hücresele yaşlanmanın indüklendiğı durumlarda hücre içerisinde Sirt1 ve 2' nin ifadesini regöle eden programlı mekanizmalar olduğına işaret etmektedir. Ayrıca Sirt3, Sirt6 ve Sirt7' nin de hücresele yaşlanmayla ilişkili herhangi bir rolü olmadığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada;

- 1) BJ hücrelerinde resveratrolün 25 μM ' dan itibaren metabolik aktiviteyi azalttığı yapılan WST-1 testi ile saptanmıştır.
- 2) Resveratrolün hücre büyümesini inhibe ettiği ise yapılan BrdU testi ve Ki-67 boyama yöntemi ile tespit edilmiştir.
- 3) BJ hücrelerinin metabolik aktivitesinde ve proliferasyonlarında meydana gelen azalma nedeniyle hücrelerde erken yaşlanma meydana gelmiştir. Resveratrolün hücre yaşlanmanın indüklenmesinde rolü olduğu yapılan Sa β -Gal boyama yöntemiyle tespit edilmiştir.
- 4) Resveratrolün sirtüinler üzerinde etkisinin belirlenmesi için western blot analizi yapılmış ve sonuçta resveratrolün Sirt1 ve Sirt2' nin ifadesinde azalmaya neden olduğu, Sirt3, Sirt6 ve Sirt7' nin ifadesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır. Hücre yaşlanma meydana geldiği sırada Sirt1 ve Sirt2 düzeylerinde azalma olduğu ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir.
- 5) Resveratrolün sadece yüksek konsantrasyonda (300 μM) apoptozise neden olduğu da bu çalışma da saptanmıştır.

Resveratrol ve hücre yaşlanma üzerine gerçekleştirilen çalışmalara rağmen hala resveratrolün hücre yaşlanmayı nasıl etkilediği, Sirt1 ve Sirt2 ifadesinde azalma meydana getirirken resveratrolün bu etkiyi nasıl ve hangi sinyal yolları aracılığıyla yaptığı, ayrıca resveratrol eklenen farklı hücre dizilerinde sirtüinlerin ifade düzeylerinin araştırılması, aydınlatılmayı bekleyen yeni sorulardan bazılarıdır.

6. KAYNAKLAR

- Abdulla, A., Zhao, X., Yang, F. 2013. Natural Polyphenols Inhibit Lysine-Specific Demethylase-1. **Journal of Biochemical and Pharmacological Research**, 1: 56-63.
- Agarwal, B., Baur, J. A. 2011. Resveratrol and life extension. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1215: 138-143.
- Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., Takada, Y. 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**, 24: 2783-2840.
- Bai, Y., Mao, Q. Q., Qin, J., Zheng, X. Y., Wang, Y. B., Yang, K., Shen, H. F., Xie, L. P. 2010. Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. **Cancer Science**, 101: 488-493.
- Bauer, J. H., Goupil, S., Garber, G. B., Helfand, S. L. 2004. An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101: 12980-12985.
- Bause, A. S., Haigis, M. C. 2012. SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress. **Experimental Gerontology**, 48: 634-639.
- Bhavnani, B. R., Cecutti, A., Gerulath, A., Woolever, A. C., Berco, M. 2001. Comparison of the antioxidant effects of equine estrogens, red wine components, vitamin E, and probucol on low-density lipoprotein oxidation in postmenopausal women. **Menopause**, 8: 408-419.
- Blagosklonny, M. V. 2012. Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging. **Aging (Albany NY)**, 4: 159-165.
- Borra, M. T., Smith, B. C., Denu, J. M. 2005. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. **The Journal of Biological Chemistry**, 280: 17187-17195.
- Brooks, C. L., Gu, W. 2009. How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? **Nature Reviews Cancer**, 9: 123-128.

- Brown, K., Xie, S., Qiu, X., Mohrin, M., Shin, J., Liu, Y., Zhang, D., Scadden, D. T., Chen, D. 2013. SIRT3 reverses aging-associated degeneration. **Cell Reports**, 3: 319-327.
- Burnette, W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, 112: 195-203.
- Can, G., Cakir, Z., Kartal, M., Gunduz, U., Baran, Y. 2012. Apoptotic effects of resveratrol, a grape polyphenol, on imatinib-sensitive and resistant K562 chronic myeloid leukemia cells. **Anticancer Research**, 32: 2673-2678.
- Chakraborty, P. K., Mustafi, S. B., Ganguly, S., Chatterjee, M., Raha, S. 2008. Resveratrol induces apoptosis in K562 (chronic myelogenous leukemia) cells by targeting a key survival protein, heat shock protein 70. **Cancer Science**, 99: 1109-1116.
- Chen, J. H., Hales, C. N., Ozanne, S. E. 2007. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? **Nucleic Acids Research**, 35: 7417-7428.
- Cianciulli, A., Calvello, R., Cavallo, P., Dragone, T., Carofiglio, V., Panaro, M. A. 2012. Modulation of NF-kappaB activation by resveratrol in LPS treated human intestinal cells results in downregulation of PGE2 production and COX-2 expression. **Toxicology in Vitro**, 26: 1122-1128.
- Civitaresse, A. E., Carling, S., Heilbronn, L. K., Hulver, M. H., Ukropcova, B., Deutsch, W. A., Smith, S. R., Ravussin, E. 2007. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. **PLOS Medicine**, 4: 76.
- Cohen, H. Y., Miller, C., Bitterman, K. J., Wall, N. R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K. T., Gorospe, M., de Cabo, R., Sinclair, D. A. 2004. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. **Science**, 305: 390-392.
- De la Lastra, C. A., Villegas, I. 2005. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications. **Molecular Nutrition & Food Research**, 49: 405-430.

- Deng, C. X. 2009. SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? **International Journal of Biological Sciences**, 5: 147-152.
- Di Bernardo, G., Cipollaro, M., Galderisi, U. 2012. Chromatin modification and senescence. **Current Pharmaceutical Design**, 18: 1686-1693.
- Doyle, A., Griffiths, JB. 1998. Cell and Tissue Culture In: Laboratory Procedures in Biotechnology (W. John, Sons), Scientific Consultancy & Publishing, 62-64, Porton, Salisbury, UK.
- Fang, Y., DeMarco, V. G., Nicholl, M. B. 2012. Resveratrol enhances radiation sensitivity in prostate cancer by inhibiting cell proliferation and promoting cell senescence and apoptosis. **Cancer Science**, 103: 1090-1098.
- Faragher, R. G., Burton, D. G., Majecka, P., Fong, N. S., Davis, T., Sheerin, A., Ostler, E. L. 2011. Resveratrol, but not dihydroresveratrol, induces premature senescence in primary human fibroblasts. **Age**, 33: 555-564.
- Feng, Y. H., Zou, J. P., Li, X. Y. 2002. Effects of resveratrol and ethanol on production of pro-inflammatory factors from endotoxin activated murine macrophages. **Acta Pharmacologica Sinica**, 23: 1002-1006.
- Finkel, T., Deng, C. X., Mostoslavsky, R. 2009. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. **Nature**, 460: 587-591.
- Franco, J. G., de Moura, E. G., Koury, J. C., Trotta, P. A., Cordeiro, A., Souza, L. L., Almeida, N. A., Lima Nda, S., Pazos-Moura, C. C., Lisboa, P. C., Passos, M. C. 2010. Resveratrol reduces lipid peroxidation and increases sirtuin 1 expression in adult animals programmed by neonatal protein restriction. **Journal of Endocrinology**, 207: 319-328.
- Fremont, L. 2000. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, 66: 663-673.
- Furukawa, A., Tada-Oikawa, S., Kawanishi, S., Oikawa, S. 2007. H₂O₂ accelerates cellular senescence by accumulation of acetylated p53 via decrease in the function of SIRT1 by NAD⁺ depletion. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 20: 45-54.
- Gao, X., Xu, Y. X., Divine, G., Janakiraman, N., Chapman, R. A., Gautam, S. C. 2002. Disparate in vitro and in vivo antileukemic effects of resveratrol, a natural polyphenolic compound found in grapes. **Journal of Nutrition**, 132: 2076-2081.

- Gatouillat, G., Balasse, E., Joseph-Pietras, D., Morjani, H., Madoulet, C. 2010. Resveratrol induces cell-cycle disruption and apoptosis in chemoresistant B16 melanoma. **Journal of Cellular Biochemistry**, 110: 893-902.
- Giovannelli, L., Pitozzi, V., Jacomelli, M., Mulinacci, N., Laurenzana, A., Dolaro, P., Mocali, A. 2011. Protective effects of resveratrol against senescence-associated changes in cultured human fibroblasts. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, 66: 9-18.
- Giovinazzo, G., Ingrosso, I.,Paradiso, A., De Gara, L., Santino, A. 2012. Resveratrol biosynthesis: plant metabolic engineering for nutritional improvement of food. **Plant Foods for Human Nutrition**, 67: 191-199.
- Guo, Y. S. 2011. Recent anti-aging studies on caloric restriction and resveratrol. **Sheng Li Ke Xue Jin Zhan**, 42: 161-164.
- Gupta, S. C., Kannappan, R., Reuter, S., Kim, J. H., Aggarwal, B. B. 2011. Chemosensitization of tumors by resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1215: 150-160.
- Haigis, M. C., Guarente, L. P. 2009. Mammalian sirtuins-emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. **Genes & Development**, 20: 2913-2921.
- Haigis, M. C., Sinclair, D. A. 2010. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. **Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease**, 5: 253-295.
- Harlow, E., Lane, D. 1988. In:Antibodies Cold Spring Harbor Laboratory Press, 471-504, New York.
- He, X., Andersson, G., Lindgren, U., Li, Y. 2010. Resveratrol prevents RANKL-induced osteoclast differentiation of murine osteoclast progenitor RAW 264.7 cells through inhibition of ROS production. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 401: 356-362.
- Hector, K. L., Lagisz, M., Nakagawa, S. 2012. The effect of resveratrol on longevity across species: a meta-analysis. **Biology Letters**, 8: 790-793.

- Hida, Y., Kubo, Y., Murao, K., Arase, S. 2007. Strong expression of a longevity-related protein, SIRT1, in Bowen's disease. **Archives of Dermatological Research**, 299: 103-106.
- Horio, Y., Hayashi, T., Kuno, A., Kunimoto, R. 2011. Cellular and molecular effects of sirtuins in health and disease. **Clinical Science**, 121: 191-203.
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L. L., Scherer, B., Sinclair, D. A. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**, 425: 191-196.
- Hu, Y., Liu, J., Wang, J., Liu, Q. 2011. The controversial links among calorie restriction, SIRT1, and resveratrol. **Free Radical Biology & Medicine**, 51: 250-256.
- Hussain, A. R., Uddin, S., Bu, R., Khan, O. S., Ahmed, S. O., Ahmed, M., Al-Kuraya, K. S. 2011. Resveratrol suppresses constitutive activation of AKT via generation of ROS and induces apoptosis in diffuse large B cell lymphoma cell lines. **Plos One**, 6: 24703.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., Pezzuto, J. M. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, 275: 218-220.
- Jang, J. H., Surh, Y. J. 2001. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. **Mutation Research**, 496: 181-190.
- Jia, G., Su, L., Singhal, S., Liu, X. 2012. Emerging roles of SIRT6 on telomere maintenance, DNA repair, metabolism and mammalian aging. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 364: 345-350.
- Jiang, H., Zhang, L., Kuo, J., Kuo, K., Gautam, S.C., Groc, L., Rodriguez, A. I., Koubi, D., Hunter, T.J., Corcoran, G.B., Seidman, M.D., Levine, R.A. 2005. Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, 4: 554-561.

- Joe, A. K., Liu, H., Suzui, M., Vural, M.E., Xiao, D., Weinstein, I.B. 2002. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. **Clinical Cancer Research**, 8: 893-903.
- Kaeberlein, M., McVey, M., Guarente, L. 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. **Genes & Development**, 13: 2570-2580.
- Kang, L., Heng, W., Yuan, A., Baolin, L., Fang, H. 2010. Resveratrol modulates adipokine expression and improves insulin sensitivity in adipocytes: Relative to inhibition of inflammatory responses. **Biochimie**, 92: 789-796.
- Kao, C. L., Huang, P. I., Tsai, P. H., Tsai, M. L., Lo, J. F., Lee, Y. Y., Chen, Y. J., Chen, Y.W., Chiou, S.H. 2009. Resveratrol-induced apoptosis and increased radiosensitivity in CD133-positive cells derived from atypical teratoid/rhabdoid tumor. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, 74: 219-228.
- Kao, C. L., Chen, L. K., Chang, Y. L., Yung, M. C., Hsu, C. C., Chen, Y. C., Lo, W. L., Chen, S. J., Ku, H.H., Hwang, S. J. 2010. Resveratrol protects human endothelium from H₂O₂-induced oxidative stress and senescence via Sirt1 activation. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, 17: 970-979.
- Kasiotis, K. M., Pratsinis, H., Kletsas, D.Haroutounian, S. A. 2013. Resveratrol and related stilbenes: Their anti-aging and anti-angiogenic properties. **Food and Chemical Toxicology**, 13: 0278-6915.
- Kavas, G. O., Ayril, P. A., Elhan, A. H. 2013. The effects of resveratrol on oxidant/antioxidant systems and their cofactors in rats. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, 22: 151-155.
- Kılıc Eren, M., 2012. Onkogen İndüklü Prematüre Senesensin Modülasyonunda Hipoksinin Etkileri: HIF-1a ile Mif² in Rollerinin İnsan Diploid Fibroblast Hücrelerinde Araştırılması, Tübitak Proje 108S379 Bitirme Raporu pp. 14.
- Kilic, M., Schmittca. 2008. Beyond Apoptosis: Cellular Outcomes Of Cancer Therapy. Tumor senescence in cancer treatment. Part 6. Chapter III. "Exploiting drug induced senescence in transgenic mouse models" Informa Health Care USA,273,New York.

- Kim, A. L., Zhu, Y., Zhu, H., Han, L., Kopelovich, L., Bickers, D. R., Athar, M. 2006. Resveratrol inhibits proliferation of human epidermoid carcinoma A431 cells by modulating MEK1 and AP-1 signalling pathways. **Experimental Dermatology**, 15: 538-546.
- Kim, J. E., Chen, J., Lou, Z. 2008. DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature*, 451: 583-586.
- Lakshminarasimhan, M., Rauth, D., Schutkowski, M., Steegborn, C. 2013. Sirt1 activation by resveratrol is substrate sequence-selective. **Aging**, 5: 151-154.
- Li, L., Bhatia, R. 2013. The controversial role of Sirtuins in tumorigenesis – SIRT7 joins the debate. **Cell Research**, 23: 10-12.
- Liao, P. C., Ng, L. T., Lin, L. T., Richardson, C. D., Wang, G. H., Lin, C. C. 2010. Resveratrol arrests cell cycle and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma Huh-7 cells. **Journal of Medical Food**, 13: 1415-1423.
- Lin, H. Y., Shih, A., Davis, F. B., Tang, H. Y., Martino, L. J., Bennett, J. A., Davis, P.J. 2002. Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line. **Journal of Urology**, 168: 748-755.
- Lou, Z., Chen, J. 2006. Cellular senescence and DNA repair. **Experimental Cell Research**, 312: 2641-2646.
- Luo, H., Yang, A., Schulte, B.A., Wargovich, M.J., Wang, G.Y. 2013. Resveratrol induces premature senescence in lung cancer cells via ROS-mediated DNA damage. **Plos One**, 8: 600-665.
- Mackenzie Ross, A.D., Cook, M. G., Chong, H., Hossain, M., Pandha, H. S., Bennett, D. C. 2012. Senescence evasion in melanoma progression: uncoupling of DNA-damage signaling from p53 activation and p21 expression. **Pigment Cell & Melanoma Research**, 26: 226-235.
- Malhotra, A., Nair, P., Dhawan, D.K. 2011. Curcumin and resveratrol synergistically stimulate p21 and regulate cox-2 by maintaining adequate zinc levels during lung carcinogenesis. **European Journal of Cancer Prevention**, 20: 411-416.

- Manna, S. K., Mukhopadhyay, A., Aggarwal, B. B. 2000. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. **The Journal of Immunology**, 164: 6509-6519.
- Martinez, J., Moreno, J. J. 2000. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. **Biochemical Pharmacology**, 59: 865-870.
- Martinsson, H. S., Starborg, M., Erlandsson, F., Zetterberg, A. 2005. Single cell analysis of G1 check points-the relationship between the restriction point and phosphorylation of pRb. **Experimental Cell Research**, 305: 383-391.
- Michishita, E., Park, J. Y., Burneskis, J. M., Barrett, J. C., Horikawa, I. 2005. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. **Molecular Biology of the Cell**, 16: 4623-4635.
- Mijovic, Z., Kostov, M., Mihailovic, D., Zivkovic, N., Stojanovic, M., Zdravkovic, M. 2013. Correlation of nuclear morphometry of primary melanoma of the skin with clinicopathological parameters and expression of tumor suppressor proteins (p53 and p16) and bcl-2 oncoprotein. **Journal of BUON**, 18: 471-476.
- Mnjoyan, Z. H., Fujise, K. 2003. Profound negative regulatory effects by resveratrol on vascular smooth muscle cells: a role of p53-p21(WAF1/CIP1) pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 311: 546-552.
- Morris, G. Z., Williams, R. L., Elliott, M. S., Beebe, S. J. 2002. Resveratrol induces apoptosis in LNCaP cells and requires hydroxyl groups to decrease viability in LNCaP and DU 145 cells. **Prostate**, 52: 319-329.
- Nakayama, H., Yaguchi, T., Yoshiya, S., Nishizaki, T. 2010. Resveratrol induces apoptosis MH7A human rheumatoid arthritis synovial cells in a sirtuin 1-dependent manner. **Rheumatology International**, 32: 151-157.
- Orsu, P., Murthy, B. V., Akula, A. 2013. Cerebroprotective potential of resveratrol through anti-oxidant and anti-inflammatory mechanisms in rats. **Journal of Neural Transmission**, 5: 406-425.

- Ota, H., Akishita, M., Eto, M., Iijima, K., Kaneki, M. Ouchi, Y. 2007. Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 43: 571-579.
- Park, H. Y., Kim, G. Y., Hyun, J. W., Kim, N. D., Kim, C. G., Kim, W. J., Yoo, Y. H., Choi, Y. H. 2012. 7,8-dihydroxyflavone induces G1 arrest of the cell cycle in U937 human monocytic leukemia cells via induction of the Cdk inhibitor p27 and downregulation of pRB phosphorylation. **Oncology Reports**, 28: 353-357.
- Poulsen, R. C., Watts, A. C., Murphy, R. J., Snelling, S. J., Carr, A. J., Hulley, P. A. 2013. Glucocorticoids induce senescence in primary human tenocytes by inhibition of sirtuin 1 and activation of the p53/p21 pathway: in vivo and in vitro evidence. **Annals of the Rheumatic Diseases**, 1: 0-9.
- Quideau, S., Deffieux, D., Pouysegu, L. 2012. Resveratrol still has something to say about aging! **Angewandte Chemie International Edition**, 51: 6824-6826.
- Rahman, M. A., Kim, N. H., Kim, S. H., Oh, S. M., Huh, S. O. 2012. Antiproliferative and cytotoxic effects of resveratrol in mitochondria-mediated apoptosis in rat b103 neuroblastoma cells. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, 16: 321-326.
- Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M., Puigserver, P. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. **Nature**, 434: 113-118.
- Roman, V., Billard, C., Kern, C., Ferry-Dumazet, H., Izard, J. C., Mohammad, R., Mossalayi, D. M., Kolb, J. P. 2002. Analysis of resveratrol-induced apoptosis in human B-cell chronic leukaemia. **British Journal of Haematology**, 117: 842-851.
- Rusin, M., Zajkovicz, A., Butkiewicz, D. 2009. Resveratrol induces senescence-like growth inhibition of U-2 OS cells associated with the instability of telomeric DNA and upregulation of BRCA1. **Mechanisms of Ageing and Development**, 130: 528-537.
- Ryan, M.J., Jackson, J.R., Hao, Y., Williamson, C. L., Dabkowski, E. R., Hollander, J. M., Alway, S. E. 2010. Suppression of oxidative stress by resveratrol after isometric contractions in gastrocnemius muscles of aged

- mice. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, 65: 815-831.
- Sato, M., Suzuki, Y., Okuda, T., Yokotsuka, K. 1997. Contents of resveratrol, piceid, and their isomers in commercially available wines made from grapes cultivated in Japan. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 61: 1800-1805.
- Schneider, Y., Vincent, F., Duranton, B., Badolo, L., Gosse, F., Bergmann, C., Seiler, N., Raul, F. 2000. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. **Cancer Letters**, 158: 85-91.
- Schilder, Y. D., Heiss, E. H., Schachner, D., Ziegler, J., Reznicek, G., Sorescu, D., Dirsch, V. M. 2009. NADPH oxidases 1 and 4 mediate cellular senescence induced by resveratrol in human endothelial cells. **Free Radical Biology & Medicine**, 46: 1598-1606.
- Scholzen, T., Gerdes, J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, 182: 311-322.
- Senturk, E. Manfredi, J. J. 2013. p53 and cell cycle effects after DNA damage. **Methods in Molecular Biology**, 962: 49-61.
- Shakibaei, M., Harikumar, K. B., Aggarwal, B. B. 2009. Resveratrol addiction: to die or not to die. **Molecular Nutrition & Food Research**, 53: 115-128.
- Sichuan, Shan B. 2004. [<http://www.asianflora.com/Melanthiaceae/Veratrum-grandiflorum.htm>] Erişim Tarihi:18.08.2013.
- Stojanovic, S., Sprinz, H., Brede, O. 2001. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 391: 79-89.
- Subbaramaiah, K., Chung, W. J., Michaluart, P., Telang, N., Tanabe, T., Inoue, H., Jang, M., Pezzuto, J. M., Dannenberg, A. J. 1998. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, 273: 21875-21882.

- Sun, W., Wang, W., Kim, J., Keng, P., Yang, S., Zhang, H., Liu, C., Okunieff, P., Zhang, L. 2008. Anti-cancer effect of resveratrol is associated with induction of apoptosis via a mitochondrial pathway alignment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 614: 179-186.
- Tang, Y., Xu, J., Qu, W., Peng, X., Xin, P., Yang, X., Ying, C., Sun, X., Hao, L. 2012. Resveratrol reduces vascular cell senescence through attenuation of oxidative stress by SIRT1/NADPH oxidase-dependent mechanisms. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 23: 1410-1416.
- Tasaki, M., Kuroiwa, Y., Inoue, T., Hibi, D., Matsushita, K., Ishii, Y., Maruyama, S., Nohmi, T., Nishikawa, A., Umemura, T. 2012. Oxidative DNA damage and in vivo mutagenicity caused by reactive oxygen species generated in the livers of p53-proficient or -deficient gpt delta mice treated with non-genotoxic hepatocarcinogens. **Journal of Applied Toxicology**, 5: 302-308.
- Tsai, Y. C., Greco, T. M., Boonmee, A., Miteva, Y., Cristea, I. M. 2012. Functional proteomics establishes the interaction of SIRT7 with chromatin remodeling complexes and expands its role in regulation of RNA polymerase I transcription. **Molecular & Cellular Proteomics**, 11: 60-76.
- Walerych, D., Napoli, M., Collavin, L. Del Sal, G. 2012. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. **Carcinogenesis**, 33: 2007-2017.
- Wang, R. H., Sengupta, K., Li, C., Kim, H. S., Cao, L., Xiao, C., Kim, S., Xu, X., Zheng, Y., Chilton, B., Jia, R., Zheng, Z. M., Appella, E., Wang, X. W., Ried, T., Deng, C. X. 2008. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. **Cancer Cell**, 14: 312-323.
- Whitlock, N. C., Bahn, J. H., Lee, S. H., Eling, T. E., Baek, S. J. 2011. Resveratrol-induced apoptosis is mediated by early growth response-1, Kruppel-like factor 4, and activating transcription factor 3. **Cancer Prevention Research**, 4: 116-127.
- Xia, L., Wang, X. X., Hu, X. S., Guo, X. G., Shang, Y. P., Chen, H. J., Zeng, C. L., Zhang, F. R., Chen, J. Z. 2008. Resveratrol reduces endothelial progenitor cells senescence through augmentation of telomerase activity by Akt-dependent mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, 155: 387-394.

- Van der Horst, A., Burgering, B. M. 2007. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 8: 440-450.
- Vetterli, L., Maechler, P. 2011. Resveratrol-activated SIRT1 in liver and pancreatic beta-cells: a Janus head looking to the same direction of metabolic homeostasis. **Aging**, 3: 444-449.
- Yamamoto, H., Schoonjans, K., Auwerx, J. 2007. Sirtuin functions in health and disease. **Molecular Endocrinology**, 21: 1745-1755.
- Yamashita, S., Ogawa, K., Ikei, T., Udono, M., Fujiki, T., Katakura, Y. 2012. SIRT1 prevents replicative senescence of normal human umbilical cord fibroblast through potentiating the transcription of human telomerase reverse transcriptase gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 417: 630-634.
- Yao, J., Wang, J. Y., Liu, L., Li, Y. X., Xun, A. Y., Zeng, W. S., Jia, C. H., Wei, X. X., Feng, J. L., Zhao, L. Wang, L. S. 2010. Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis. **Archives of Medical Research**, 41: 288-294.
- Yu, W., Fu, Y. C., Zhou, X. H., Chen, C. J., Wang, X., Lin, R. B., Wang, W. 2009. Effects of resveratrol on H₂O₂-induced apoptosis and expression of SIRT1 in H9c2 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 107: 741-747.
- Yu, W., Fu, Y. C., Wang, W. 2012. Cellular and molecular effects of resveratrol in health and disease. **Journal of Cellular Biochemistry**, 113: 752-759.
- Yuan, H. F., Zhai, C., Yan, X. L., Zhao, D. D., Wang, J. X., Zeng, Q., Chen, L., Nan, X., He, L. J., Li, S. T., Yue, W., Pei, X. T. 2012. SIRT1 is required for long-term growth of human mesenchymal stem cells. **Journal of Molecular Medicine**, 90: 389-400.
- Zhu, X., Liu, Q., Wang, M., Liang, M., Yang, X., Xu, X., Zou, H. Qiu, J. 2011. Activation of Sirt1 by resveratrol inhibits TNF- α induced inflammation in fibroblasts. **Plos One**, 6: 270-281.
- Zoberi, I., Bradbury, C. M., Curry, H. A., Bisht, K. S., Goswami, P. C., Roti Roti, J. L., Gius, D. 2002. Radiosensitizing and anti-proliferative effects of resveratrol in two human cervical tumor cell lines. **Cancer Letters**, 175: 165-173.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ayten KILINÇLI

Doğum Yeri ve Tarihi : SÖKE-1988

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Makaleler

-SCI

-Diğer

b) Bildiriler

-Uluslar arası

- Kilic-Eren M., Ural M., KILINÇLI A. 2011. Role Of Hypoxia in Modulation Of Oncogene-Induced Senescence In Human Diploid Fibroblasts. The 4th Annual Conference on Cancer and Control of Genomic Integrity (CANGENIN), Amsterdam, HOLLANDA Abstract Book p 45.
- Kilic-Eren M., KILINÇLI A. 2012. Hypoxia Modulates Oncogene-Induces Senescence. The 5th Annual Meeting on Cancer and Control Of Genomic Integrity, Barselona-İSPANYA Abstract Book p 36.
- KILINÇLI A., Eren Ö., Kilic-Eren M. 2012. Resveratrol induced premature senescence associated with attenuated Sirt1 and 2 expressions. The 5th Annual Meeting on Cancer and Control Of Genomic Integrity, Barselona-İSPANYA Abstract Book p 37.

- KILINÇLI A. Eren Ö., Kiliç-Eren M. 2012. Decreased Sirt1 and 2 expression emerges through resveratrol induced premature senescence. Dynamics Of Cell Signal Systems, Oslo, NORVEÇ.

-Ulusal

- KILINÇLI A., Taysı N. 2009. İnsan Sağlığı Açısından Myiasisin Önemi. 16.Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, NİĞDE.
- KILINÇLI A., Kiliç-Eren M. 2011. Resveratrol İndüklü Prematüre Senesensin Azalmış Sirt1 ve Sirt2 Ekspresyonu İle Asosiasyonu. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, ANTALYA, Journal Of Medical Sciences (Tıp Bilimleri Dergisi) , Vol.31, N 6, p 117, Dec.
- Kant H., KILINÇLI A., Eren Ö. 2011 . Botanikte Tıp Kavramı ve Adnan Menderes Üniversitesi Herbaryumundaki Tıp Örneklerinin Tanıtılması. 18.Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, İSTANBUL.

c) Katıldığı Projeler

- Onkogen İndüklü Prematüre Senesensin Modülasyonunda Hipoksinin Etkileri: Hif-1 alfa ile Mif in Rollerinin İnsan Diploid Fibroblastlarında Araştırılması, Tübitak 108S379 (COST-BM703-26), 2011, Bursiyer
- Resveratrolün hücrel yaşlanmanın indüklenmesi ve sirtuinlerin aktivasyonunda rolünün insan dermal fibroblastlarında araştırılması, BAP (FEF-12035), 2012, Araştırmacı

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD (2013-)

İLETİŞİM

E-posta Adresi : a.kilincli@gmail.com

Tarih : 2013