

Resveratrolün HL-60 Lösemi ve Raji Lenfoma Hücrelerinde Apoptozla Bağlantılı mikroRNA Profili Üzerindeki Etkisi

Effect of Resveratrol on microRNA Profile and Apoptosis in HL-60 Leukemia and Raji Lymphoma Cells

Kemal Ergin¹, Gökay Bozkurt², Cankut Çubuk³, Safiye Aktaş⁴

¹Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

²Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

³Prince Felipe Araştırma Merkezi, Biyoformatik Kliniği, Valencia, İspanya

⁴Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye



Anahtar Kelimeler

Resveratrol, mikroRNA, apoptoz, lösemi, lenfoma

Keywords

Resveratrol, microRNA, apoptosis, leukemia, lymphoma

Geliş Tarihi/Received : 07.07.2015

Kabul Tarihi/Accepted : 20.07.2015

doi:10.4274/meandros.2369

Yazışma Adresi/Address for Correspondence:

Dr. Kemal Ergin,
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Aydın,
Türkiye
E-posta : kemalergin@hotmail.com

©Meandros Medical And Dental Journal, published by Galenos Publishing.

©Meandros Medical And Dental Journal, Galenos Yayınevi tarafından basılmıştır.

Öz

Amaç: Bu çalışmanın amacı; HL-60 (promyelositik lösemi) ve Raji (Burkitt lenfoma) hücrelerinde, resveratrol uygulaması sonrası mikroRNA (miRNA) profillerinin belirlenmesi ve apoptoz oranlarının immünohistokimyasal metodlarla belirlenmesidir.

Gereç ve Yöntemler: Deney dizaynı dört hücre kültürü grubu üzerinden yapılmıştır; 1. grup: HL-60 (Kontrol), 2. grup: HL-60 + resveratrol, 3. grup: Raji ve 4. grup: Raji + resveratrol. Ardından iki tekrarlı mikroarray analizi yapılmış, biyoformatik analiz ile farklı miRNA ekspresyonları saptanmış ve sonrasında eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (EZ-PZR) ile validasyon yapılmıştır. Ayrıca TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) yöntemi ve immünohistokimyasal belirteçler ile apoptoz oranı belirlenmiştir.

Bulgular: Mikroarray analizi sonrasında HL-60 (kontrol) ve HL-60 + resveratrol grupları arasında farklı eksprese olan sekiz adet miRNA (hsa-miR18a, hsa-let-7d, hsa-let-7b, hsa-miR-1246, hsa-miR-320b, hsa-miR-92a, hsa-miR-609 ve hsa-miR-337-3p) saptanmıştır. Resveratrol verilen Raji grubunda kontrol grubuna kıyasla bir tane farklı miRNA (hsa-miR-378) eksprese olmuştur. Validasyon amacıyla yapılan EZ-PZR'de dört adet miRNA (miR-18a, miR-92a, miR-320a, miR-378) ile confirmasyon gösterilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla resveratrol verilen HL-60 grubunda apoptoz (TUNEL) oranı 2 kat daha yüksek olarak saptandı. Raji grubu ile resveratrol verilen Raji grubu arasında anlamlı bir fark saptanmamış olmakla birlikte resveratrol verilen grupta apoptoz oranında bir artma eğilimi saptandı. Bununla birlikte gruplar arasında immünohistokimyasal analizde özellikle Fas ve kaspaz belirteçleri daha belirgin olarak eksprese oldu.

Sonuç: Bu çalışmada doğal bir biyoaktif madde olan resveratrolün HL-60 ve Raji hücrelerindeki etkisine bakılmış ve farklı miRNA ekspresyonları saptanmıştır. Ayrıca hücre ölümünün de özellikle kaspaz ve Fas mekanizması üzerinden olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte lösemi ve lenfomadaki olası terapötik potansiyelleri sebebiyle ileri fonksiyonel ve organizma çalışmalarının da yapılması gerekmektedir.

Abstract

Objective: The purpose of this study was to determine the microRNA (miRNA) profiles and the apoptosis rates in the HL-60 (promyelocytic leukemia) and Raji (Burkitt's lymphoma) cell lines after resveratrol administration.

Materials and Methods: The experimental design included four cell culture groups: group 1: HL-60 (control), group 2: HL-60 + resveratrol, group 3: Raji, and group 4: Raji + resveratrol. Then, two repeated microarray analyses were performed. The different miRNA expressions were identified by bioinformatic analysis and after that, validation was performed by simultaneous polymerase chain reaction. Besides, apoptosis ratio was determined with terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay and immunohistochemical markers.

Results: By microarray analysis, eight miRNAs (hsa-mir18 to, hsa-let-7d, hsa-let-7b, hsa-mir-1246, hsa-miR-320b, hsa-miR-92a, hsa-miR-609 and hsa-miR-337-3p) which have different expression levels between the HL-60 (control) and HL60 + resveratrol groups were detected. There was one miRNA (hsa-miR-378) which was differently expressed between Raji (control) and Raji + resveratrol groups. Four miRNAs (miR-18a, miR-92a, miR-320a, miR-378) expression levels were confirmed with simultaneous polymerase chain reaction for validation. The apoptosis (TUNEL) rate of HL-60 + resveratrol group was two times higher compared to the HL-60 control group. There was no significant difference in apoptosis (TUNEL) rate between the groups of Raji control and Raji + resveratrol. However, it showed a tendency to increase in resveratrol-administrated Raji cells. However, in the immunohistochemical analysis, especially Fas and caspase markers were more prominently expressed.

Conclusion: In this study; effects of resveratrol, natural bioactive substances, on HL-60 and Raji cells were evaluated and different miRNA expression levels were detected. In addition, cell death was thought to be especially through the caspase and Fas mechanism. However, considering their therapeutic potential in leukemia and lymphoma further functional and organism studies are needed.

Giriş

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene), polifenolik bir bileşik olup üzüm, kırmızı şarap, fıstık ve bazı dut türleri gibi çeşitli yiyeceklerde bulunmaktadır (1). Resveratrol keşfinin ardından yapılan çalışmalar ile, bu bileşiğin anti-enflamatuvar, anti-tümorojenik, anti-oksidan etkilerinin olduğu ve memelilerde genel sağlığı iyileştirdiği yönünde sonuçlar bulunmuştur (2). Resveratrol, endojen bir anti-oksidan kapasitesine sahip olduğu gibi, pek çok antioksidanın ekspresyonunu uyararak genel bir antioksidan etkisi gösterir (3). Resveratrolün antioksidan aktivitesi ile ilişkili olan anti-tümorojenik etkisi de hem *in vivo* hem de *in vitro* deneylerle gösterilmiştir (4-6). Bu antikanser etkinin hücre döngüsünün durdurulması ve/veya apoptozdan kaynaklı olabileceği düşünülmüştür (7). Yapılan çalışmalar ile resveratrolün siklooksijenazı, hidroksiperoksidazı, protein kinaz-C'yi, bcl-2 (B-cell lymphoma gen-2) fosforilasyonunu, fokal adezyon kinazı, matriks metalloproteaz-9'u ve hücre döngüsü düzenleyicilerini inhibe ettiği gösterilmiştir (8). İnsan promyelositik lösemi hücreleri olan HL-60 hücreleri ile yapılan çalışmalarda, resveratrolün bu hücrelerin canlılığını ve DNA (deoksiribonükleik asit) sentezini azalttığı gösterilmiştir (9-11). Resveratrolün, büyüme engelleyici ve antiproliferatif etkisinin, apoptotik hücre ölümünün uyarılmasının sonucu olduğu düşünülmüştür (9-11). Ayrıca Raji (Burkitt lenfoma) hücre hatları ile yapılan bir çalışmada, resveratrolün bu

hücrelerde hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak kaspaz-bağımlı apoptoz yaptığı gösterilmiştir (12).

MikroRNA'lar (miRNA), yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, küçük, kodlama yapmayan RNA molekülleridir (13). Pek çok protein kodlayan transkripti hedef alarak post-trankripsiyonel gen düzenlenmesinde görev alırlar. miRNA'lar pek çok gelişimsel ve patolojik süreçte fonksiyon göstermektedirler (13). miRNA'lar, hücre kaderinin belirlenmesinde, proliferasyonda, hücre ölümünde, immün cevapta, insülin salgılanmasında, nörotransmitter sentezi, sirkadiyen ritm ve viral replikasyon gibi pek çok biyolojik süreçte görev almaktadır (14). Önemli görevleri nedeniyle, miRNA biyogenezi oldukça sıkı bir denetim altındadır ve bu denetimin hatalı düzenlenmesi çeşitli hastalıklar ile ilişkilidir (13). Bunlar arasında; HIV-1 gibi viral hastalıkları (15), multipl skleroz (16) ve tip 2 diyabet (17) gibi immün-ilişkili hastalıkları, Parkinson (18) ve Alzheimer (19) gibi nörodejeneratif hastalıkları ve çeşitli kanser tiplerini (20-22) saymak mümkündür. miRNA'ların kanser üzerindeki etkileri arasında, proliferasyon değişiklikleri, hücre döngüsü kontrolü, apoptozisin, farklılaşmanın, migrasyonun ve metabolizmanın düzenlenmesi sayılabilir (23,24). Hedef miRNA'ya bağlı olarak; miRNA'lar, tümör süpresör veya onkogenik olabilmektedir (24). Yapılan çalışmalar ile resveratrol uygulamasının, farklı kanser türlerinde farklı miRNA'ların artışına veya azalışına

(up veya down regüle) sebep olduğu gösterilmiştir (25). Bu çalışmanın da amacı; HL-60 ve Raji hücre hatlarında, resveratrol uygulaması sonrası miRNA profillerinin saptanması ve apoptoz oranlarının immünohistokimyasal metodlarla belirlenmesidir.

Gereç ve Yöntemler

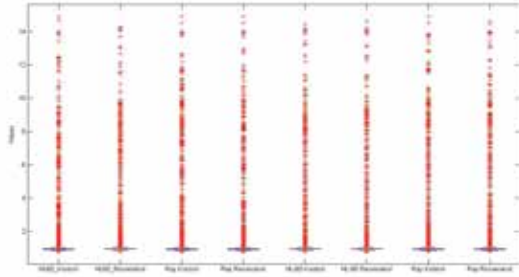
Hücre Kültürü

Bu çalışmada HL-60 (pasaj=13, alt kültür=1/3-1/6) ve Raji (pasaj=12, alt kültür=1/3-1/6) hücre hatları kullanılarak gruplara ayrıldı; 1. grup: HL-60 (kontrol), 2. grup: HL-60 + resveratrol, 3. grup: Raji ve 4. grup: Raji + resveratrol. Rutin hücre kültürü teknikleri uygulandı; hücreler RPMI-1640, %10'luk FBS içeren flasklar içinde ve 37 °C'deki %5'lik karbondioksit inkübatörde tutuldu. Öncelikle letal doz (LD20) çalışması yapıldı. Bunun için hücreler flask içinde konfluent olduktan sonra 24 saat boyunca 96'lık well'lerde (5000 hücre/well, 100 µl/well) inkübe edildi. Sonrasında resveratrol 0.1, 1, 5, 10, 20, 40, 50, 100 µmolar/ml serilik dozlarda kuyucuklara kondu ve 24 saat sonrasında da tripan mavisi ile hücre canlılığına bakıldı. Hücrelerin %80'inin yaşayabildiği doz 20 µmolar/ml olarak belirlendi ve bu dozda resveratrol deney aşaması için kullanıldı. Bundan 24 saat sonra flasklardaki hücreler tripsinizasyon ve santrifüj işlemlerinden sonra toplanarak ileri deneyler için kriyotüpler içinde -80 °C buzdolabında saklandı.

Mikroarray Analizi

Mikroarray analizi için 4 örnek, her biri iki kez tekrar edilerek (toplamda 8 örnek) kullanıldı. miRNA izolasyonu Qiagen miRNeasy mini kit (cat. no=217004) ile yapıldı ve miRNA miktarı ve kalitesi Nanodrop spektrofotometresi ile ölçüldü. miRNA mikroarrayi Affymetrix GeneChip System ile dizayn edildi ve çipler GeneSphere FlashTag RNA (ribonükleik asit) işaretleme kiti (cat. No=FT10AFYB) ile işaretlendi.

Her bir mikroarray çipi 7789 adet miRNA içermekteydi. Örneklerdeki normalizasyon için Affymetrix RMA (Robust multiarray average) metodu kullanıldı (Resim 1) ve biyoenformatik analizler için de R istatistik programı (versiyon 3, GNU general public license, serbest software, Auckland-Yeni Zelanda) ile t-testi yapıldı ve sonrasında Volkan grafiği çıkartıldı. Kontrol grupları ile resveratrol verilen gruplar miRNA profili açısından kıyaslandı ve küme analizleri yapıldı. Bununla birlikte p değeri <0,05 olanlar ve 2 kat değişim gösterenler anlamlı olarak değerlendirildi. Bunun sonrasında da bu değişimlere ait ısı grafikleri (Heat-map) çıkarıldı (R istatistik programı).



Resim 1. Mikroarray analizine başlamadan önce RMA (Robust multiarray average) metodu ile tüm örneklerin normalize olduğu görülmektedir

Mikroarray sonuçlarının doğruluğunu kontrol etmek (valide etmek) amacıyla eş zamanlı polimeraz zinciri reaksiyonu (EZ-PZR) analizi yapıldı. Bunun için çalışmamızda farklı eksprese olan dört adet miRNA kullanıldı; miR-18a, miR-92a, miR-320a ve miR-378. İzole miRNA'lar cDNA sentez kit ile cDNA'ya çevrildi ve bunlar Syber Green master miks ile karıştırılarak Roche LightCycler 480II PZR cihazı ile yürütüldü. Örnekler housekeeping gen (Snord48) ve cDNA kontrolü spike-in primerleri ile kontrol edildi.

Apoptag (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling) Deneyi

Hücreler poli-lizini lamlara aktararak paraformaldehit (%1, 10 dk) ile fikse edildi, 3 kez PBS ile yıkandı, %3 peroksidaz (%3 H₂O₂, 10 dk) eklendi, distile su ile yıkandı, Equilibration solüsyonu (75 µl, 10 sn) eklendi, TdT enzimi (55 µl, 1 saat) ile inkübe edildi, durdurma/yıkama solüsyonu (10 dk) ile yıkandı, 3 kez PBS ile yıkandı, Anti Digoxygenin peroksidaz konjugatı (65 µl, 30 min, in humidified chamber) ile inkübe edildi, 3 kez PBS ile yıkandı, DAB (147/3) (peroksidaz substrat) uygulandı, distile su ile yıkandı, hematoksilen zıt boyası ile boyandı, entellan ile kapatılarak Olympus ışık mikroskobu (BX51) altında incelendi.

İmmünohistokimya

Hücreler poli-lizini lamlara aktararak etanol (%30, 10 dk) ile fikse edildi, 3 kez PBS ile yıkandı, serum blok solüsyonuna (Reagent A, 10 dk) tabi tutuldu, primer antikorlar (Fas (CD95, apoptoz antijeni 1), Bax (bcl-2-associated X protein), kaspaz-3 (cysteine-aspartic protease-3), kaspaz-8 (cysteine-aspartic protease-8) ve p53 (tümör protein 53); 60 dk) inkübe edildi, 3 kez PBS ile yıkandı, sekonder antikor ile inkübe edildi (Reagent B, 10 dk), 3 kez PBS ile yıkandı, enzim konjugat (Reagent C) uygulandı, 3 kez PBS ile yıkandı,

DAB kromojen uygulandı, entellan ile kapatılarak Olympus ışık mikroskobu (BX51) altında incelendi.

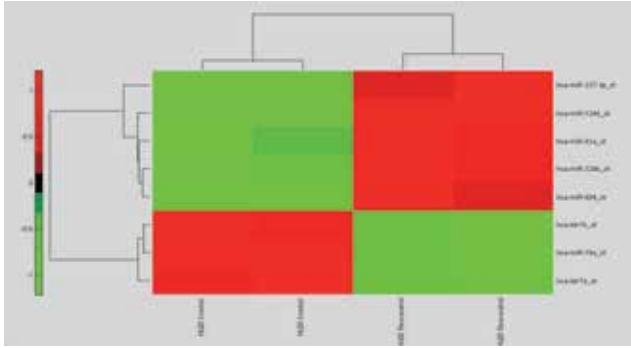
Skor ve oran: Apoptag (TUNEL) oranı ve immünohistokimyasal analiz için her bir slayt başına 5000 hücre sayıldı ve hücre oranı yüzde olarak verildi. İmmünohistokimyasal analiz için tüm slaytlar aynı araştırmacı tarafından gruplara kör olarak incelendi. Boyanma yoğunluğu semi-kantitatif olarak belirlendi: (-) boyanma yok; (+) zayıf; (++) orta; (+++) kuvvetli; (++++) çok yoğun boyanma.

Bulgular

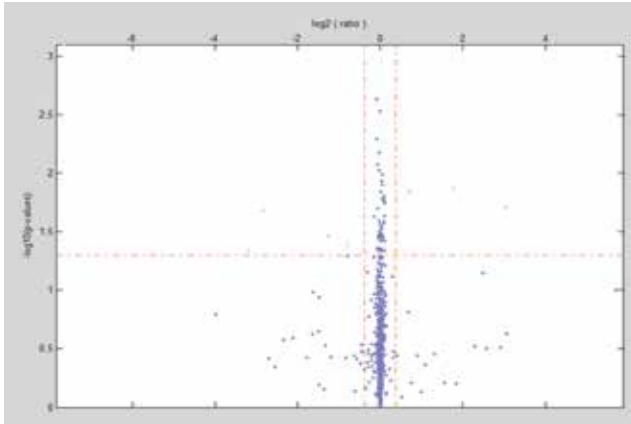
Mikroarray Analizi

Lösemi (HL-60) Hücrelerinde

Biyoenformatik analiz sonrası HL-60 (kontrol) ve HL-60 + resveratrol grupları arasında farklı eksprese olan sekiz adet miRNA kümesi saptanmıştır (Resim 2, 3); resveratrol uygulanan grupta fazla eksprese



Resim 2. Kontrol HL-60 hücreleri ile resveratrol uygulanan HL-60 hücrelerinde farklı eksprese olan miRNA'lara ait ısı (heat-map) grafiği



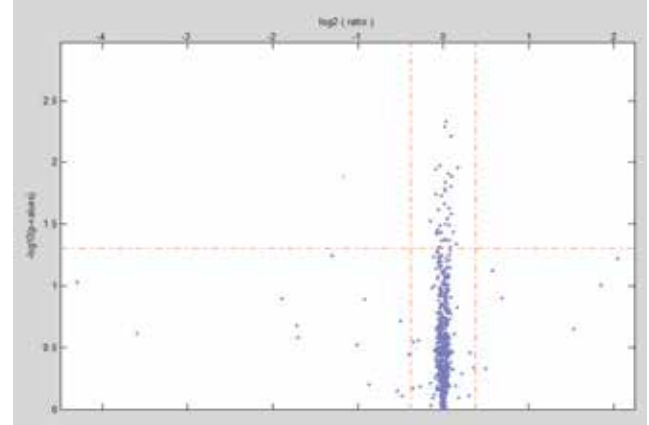
Resim 3. HL-60-kontrol ve HL-60-Resveratrol örnekleri ile gerçekleştirilen t-testi sonucu elde edilen verilerin Volkan grafiği ile gösterimi

(over-eksprese) olan miRNA'lar (prematür ve olgun) hsa-miR18a, hsa-let-7d ve hsa-let- 7b idi. Az eksprese (under-eksprese) olan miRNA'lar ise hsa-miR-1246, hsa-miR-320b, hsa-miR-92a, hsa-miR-609 ve hsa-miR-337-3p idi.

Lenfoma Hücrelerinde

Raji (kontrol) ile resveratrol verilen Raji grubunda bir tane farklı miRNA kümesi (hsa-miR-378) eksprese olmuştur (1 tane olduğundan ısı grafiği gösterilmemiştir) (Resim 4; volkan grafiği). Resveratrol verilen Raji grubunda hsa-miR-378 daha az eksprese olmuştur.

EZ-PZR'ye bakıldığında HL-60 (kontrol) ve resveratrol uygulanmış HL-60 hücrelerinde miR-18a, miR-92a ve miR-320 için kat değişim değerlerinin (delta CT) 2 kat ve üstü olduğu izlendi (Tablo 1). Ayrıca Raji (kontrol) ve resveratrol uygulanmış Raji hücrelerinde miR-378 için kat değişim değeri (delta CT) 2'nin üstünde olduğu görüldü (Tablo 2).



Resim 4. Raji-kontrol ve Raji-Resveratrol örnekleri ile gerçekleştirilen t-testi sonucu elde edilen verilerin Volkan grafiği ile gösterimi

Tablo 1. HL-60 (promiyelositik lösemi hücre hattı) (kontrol) ve resveratrol uygulanmış HL-60 hücrelerinde 3 adet miRNA (miR-18a, miR-92a ve miR-320) için kat değişim değerleri (Delta CT) izlenmektedir. Kat değişimleri 2 ve üstü olan değerler anlamlı olarak kabul edilmektedir

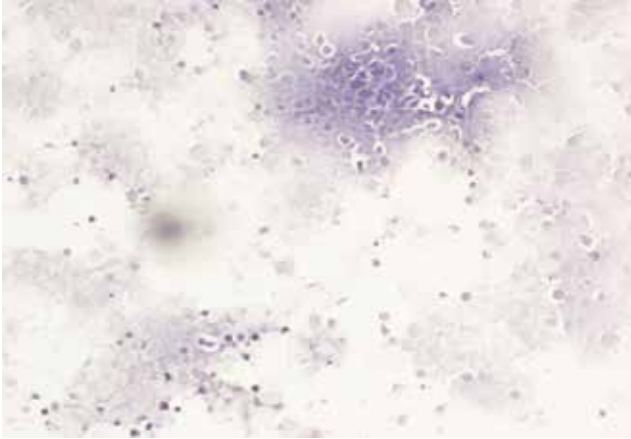
HL-60 ile HL-60 + Resveratrol karşılaştırması	Kat değişimi (Delta CT) değerleri
mir18a	2,95
mir92a	2,84
mir320	5,49
HL-60: Promiyelositik lösemi	

Apoptag (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)

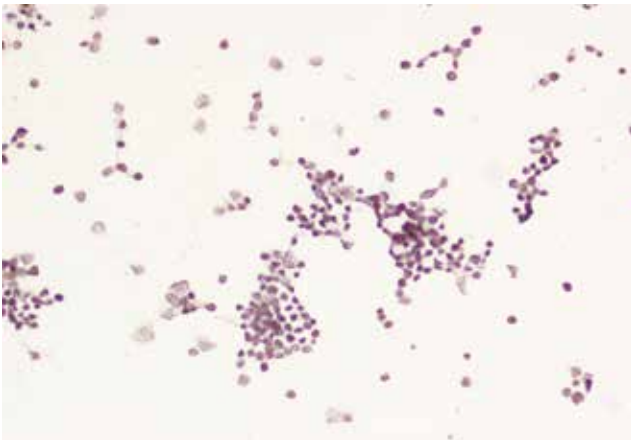
Kontrol grubuna kıyasla resveratrol uygulanan HL-60 grubunda apoptoz (TUNEL) oranı 2 kat daha yüksek olarak saptandı (Tablo 3, Resim 5a, 5b). Diğer taraftan kontrol grubuna kıyasla resveratrol uygulanan Raji grubunda ise daha düşük bir artış saptandı arasında (Tablo 3).

Tablo 2. Raji (Burkitt lenfoma hücre hattı) (kontrol) ve resveratrol uygulanmış Raji hücrelerinde 1 adet miRNA (miR-378) için kat değişim değeri (Delta CT) izlenmektedir. Kat değişimi 2 ve üstü olan değerler anlamlı olarak kabul edilmektedir

Raji ile Raji+ Resveratrol karşılaştırması	Kat değişimi (Delta CT) değeri
mir378	2,07
Raji: Burkitt lenfoma	



Resim 5a. HL-60 lösemi hücrelerinde apoptag (TUNEL) ekspresyonunun çok zayıf olduğu gözlenmektedir



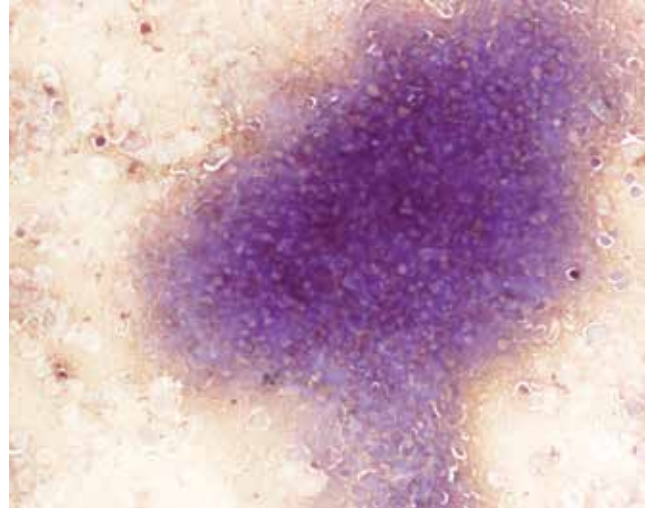
Resim 5b. Resveratrol uygulanan HL-60 hücrelerinde apoptag (TUNEL) ekspresyonunun arttığı izlenmektedir

İmmünohistokimya

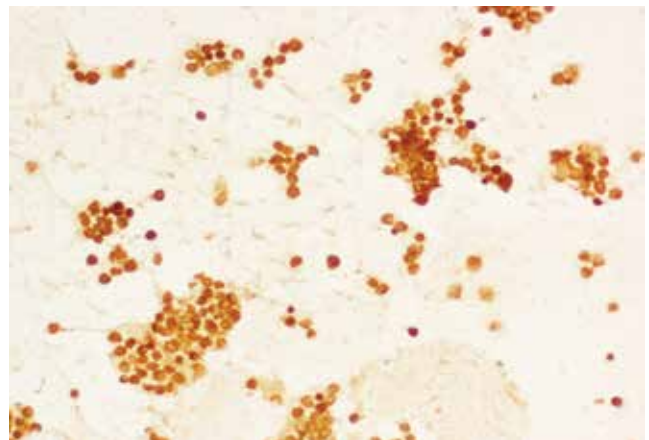
Resveratrol verilen gruplarda apoptoz oranında bir artma eğilimi saptandı. Fas ekspresyon artışı özellikle resveratrol uygulanan Raji grubunda belirgindi (Tablo 3, Resim 5c, 5d). Kaspaz-3 ve kaspaz-8 boyanması resveratrol uygulanan gruplarda daha yoğun olmakla birlikte özellikle resveratrol uygulanan Raji grubunda daha belirgindi (Tablo 3, Resim 5e, 5f). Bax ve p53 boyanması tüm gruplarda zayıf veya orta yoğunlukta idi (Tablo 3).

Tartışma

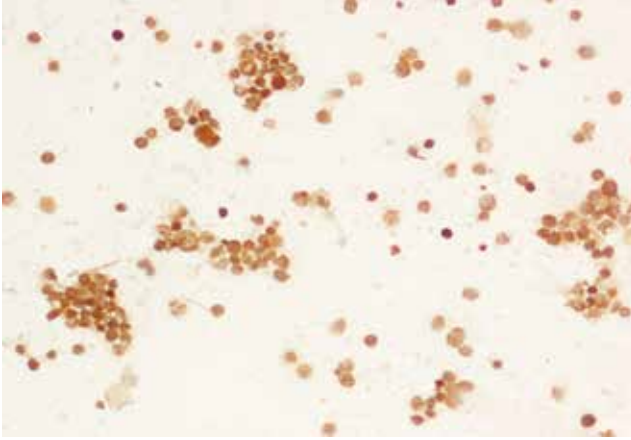
Günümüzde, kanser için kemoterapötik yöntem olarak doğal bileşiklerin kullanımı giderek artan bir ilgiye sahiptir. Bu amaçla pek çok doğal bileşiğin diyetle kullanımının antikanser etkisi *in vivo* ve *in*



Resim 5c. Raji lenfoma hücrelerinde Fas ekspresyonunun zayıf olduğu gözlenmektedir



Resim 5d. Resveratrol uygulanan Raji lenfoma hücrelerinde Fas ekspresyonunun kuvvetli olduğu gözlenmektedir



Resim 5e. Resveratrol uygulanan Raji lenfoma hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonunun kuvvetli olduğu gözlenmektedir

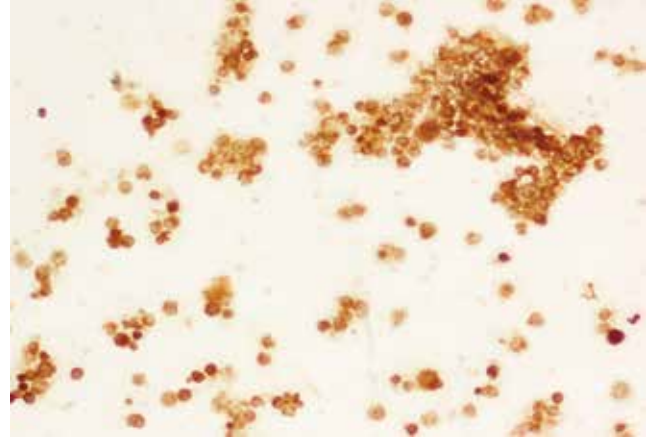


Figure 5f. Resveratrol uygulanan Raji lenfoma hücrelerinde kaspaz-8 ekspresyonunun kuvvetli olduğu gözlenmektedir

Tablo 3. Kontrol grupları (Raji ve HL-60) ile resveratrol verilen gruplara (Raji + Resveratrol ve HL-60 + Resveratrol) ait apoptag (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) yüzdeleri ile apoptoz belirteçlerine ait skorlamalar ve yüzdeler. Yüzde değerleri 5000 hücre içerisindeki pozitif değerleri yansıtmaktadır

	Raji	Raji + Resveratrol	HL-60	HL-60 + Resveratrol
Apoptag (TUNEL)	%20	%25	%10	%20
Fas	+ (%25)	++++ (%100)	-/+ (%20)	+++ (%80)
Bax	- (%0)	++ (%50)	+ (%10)	++ (%50)
Caspase-3	+ (%10)	+++ (%75)	+ (%10)	++ (%60)
Caspase-8	- (%3)	+++ (%80)	+ (%8)	+++ (%80)
p53	+ (%20)	++ (%30)	- (%0)	+ (%0-10)

Raji: Burkitt lenfoma, HL-60: Promyelositik lösemi, TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, Bax: bcl-2-associated X protein, p53: Tümör protein 53

vitro yöntemlerle test edilmiştir. Bu bileşikler arasında kateşinler, likopen, E ve D vitamini ve resveratrol sayılabilir. Resveratrolün karsinogenez sürecinde, tümör oluşumunda, artmasında ve ilerlemesinde tedavi edici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (8). Ayrıca yapılan çalışmalar ile anjiyogenezi ve metastazi engellediği, hücre büyümesi, apoptoz ve enflamasyon üzerine etkileri olduğu da gösterilmiştir (7-11). Tüm bu nedenlerden dolayı resveratrol kullanımı ile kanser dahil olmak üzere pek çok hastalığın önlenmesi ve iyileştirilmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir. Fakat bunun için daha pek çok klinik denemeye ihtiyaç duyulmaktadır (8).

miRNA'lar, küçük ve kodlama yapmayan RNA dizileridir ve post-transkripsiyonel gen düzenlenmesinden sorumludurlar. miRNA biyogenezinde meydana gelecek olan hatalar pek çok farklı hastalığın patogenezinde önem teşkil etmektedir. Değişik hastalık türlerinde bazı miRNA'ların ekspresyonlarında farklılıklar saptanmıştır.

Resveratrolün farklı hastalık ve kanser türleri üzerinde, miRNA ekspresyonu açısından yaptığı değişiklikler gösterilmiştir (26). Yapılan bir çalışmada, SW480 insan kolon kanseri hücrelerinde resveratrol uygulamasının ardından 22 adet miRNA'nın arttığı, 26 adet miRNA'nın ise azaldığı gösterilmiştir.

Resveratrol ile azalan miRNA'ların arasında bir kısmının onko-miR (tümör geliştirici, onkolojik miRNA) fonksiyonun olduğu saptanmıştır (27). Resveratrolün etkisi tüm genel miRNA üzerine olmaktan ziyade kansere spesifik miRNA'lar üzerine olmaktadır. Resveratrol uygulamasının ardından farklı miRNA ekspresyonları prostat kanser hücrelerinde de saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı 23 adet azalan, 28 adet artan miRNA saptanmıştır (28). Ayrıca, PANC-1, CFPAC-1 ve MIA Paca-2 pankreatik kanser hücre hatlarında resveratrol tarafından down-regüle edilen (azaltılan) miR-21'in bcl-2 ekspresyonunun inhibisyonuna neden olduğu saptanmıştır. Böylece hücrelerin apoptoza gittiği

gösterilmiştir (29). Resveratrolün pek çok kritik miRNA seviyesini etkilemesinin ortaya çıkarılması ile, kanser tedavisinde resveratrol kullanımı daha sık gündeme gelmeye başlamıştır.

Biz bu çalışmamızda HL-60 ve Raji hücre hatlarında 20 µmolar/ml resveratrol uygulamasının ardından farklı eksprese olan miRNA'ları saptadık. HL-60 hücre hattının resveratrol ile muamelesi sonucunda 8 adet farklı eksprese olan miRNA saptandı. Bunların 3 tanesinin up-regüle olduğu (artan), 5 tanesinin ise down-regüle olduğu (azalan) görüldü. Bunların içinde farklı eksprese olan hsa-let-7 tümör süpresör miRNA olarak görülmektedir. Bununla birlikte hsa-let-7d ve hsa-let-7b'in, pek çok kanser türünde azaldığı saptanmıştır. Yapılan çalışmalar ile hsa-let-7 ekspresyon artışının kanser tedavisi için etkili bir seçenek olabileceği gösterilmiştir (30). Bizim yaptığımız bu çalışmada da resveratrol uygulanmış olan insan HL-60 hücre hattında hsa-let-7d ve hsa-let-7b artmış bir ekspresyon göstermiştir. Çalışmamızda HL-60 hücre hattında resveratrol uygulamasının ardından azalan miRNA'lardan biri olan hsa-miR-92a aslında miR-17-92 gen kümesi ailesine ait bir miRNA'dır. Bu gen kümesinin fazla ekspresyonu veya amplifikasyonu akut myeloid lösemi, akut lenfoblastik lösemi ve pek çok kanser türünde saptanmıştır (31-37). Yapılan bir çalışmada, miR-92a'nın inhibisyonu sonrası HL-60 hücre hattında, kanser hücrelerinin canlılığının, proliferasyonunun azaldığı ve apoptozun indüklendiği gösterilmiştir (37). Bizim çalışmamızda da resveratrol uygulaması ardından HL-60 hücre hattında hsa-miR-92a ekspresyonu düşmüş olarak saptanmıştır.

TUNEL analizi ve çeşitli apoptoz belirteçleri kullanılarak immünohistokimyasal boyaması gerçekleştirildiğinde, her iki hücre hattı için de apoptoz varlığının söz konusu olduğu gösterilmiştir. TUNEL analizinin sonucuna göre, HL-60 hücre hattında resveratrol uygulanan grupta apoptozda anlamlı bir artış gözlenmiştir. Aynı zamanda bu hücre hattında, apoptoz belirteçleri olan Fas, Bax, kaspaz-3, kaspaz-8 ve p53 belirteçlerinin resveratrol uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla belirgin bir artış gösterdiği saptanmıştır. Bu veri literatürdeki bilgilerle uyumlu olarak, resveratrolün, kanser hücrelerinde apoptozu indüklediğinin göstergesidir. Raji hücre hattı ile Fas, Bax, kaspaz-3, kaspaz-8 ve p53 apoptoz antikorları kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda, bu belirteçlerin resveratrol uygulanan

grupta arttığı yani hücrelerin apoptoza gittiği saptanmıştır. Buna karşın bu hücre hattı ile yapılan TUNEL analizine göre, gruplar arasında apoptoz açısından farklılığın az oranda olduğu görülmüştür. Bu hücrelerin apoptoz yerine diğer hücre ölüm şekillerinden (otofaji gibi) birini seçmiş olabileceği düşünüldü.

Sonuç

Doğal biyoaktif diyet maddeler ile birlikte miRNA'lar arasındaki etkileşimler, pek çok hastalığın potansiyel ve alternatif tedavi yöntemi olabilmesi sebebiyle araştırmaya oldukça açık alanlardır. Bu çalışmada da doğal bir biyoaktif madde olan resveratrolün HL-60 ve Raji hücrelerindeki etkisine bakıldı ve farklı eksprese olan miRNA kümeleri saptandı. Ayrıca apoptotik hücre ölümünün de özellikle kaspaz ve Fas mekanizması üzerinden olduğu düşünüldü. Bununla birlikte miRNA'ların lösemi ve lenfomadaki olası terapötik potansiyelleri sebebiyle ileri fonksiyonel ve organizma çalışmalarının da yapılması gerekmektedir. Özellikle serumdaki miRNA seviyesinin diyet ürünlerine cevap olarak değişimin iyi bir şekilde saptanması, tedavinin etkilerinin monitorize edilmesi için önemli bir araç olacaktır. Bu süreç kişiler arası tedavilerde gözlemlenen farklılıklara da ışık tutabilecek niteliktedir.

Yazarlık Katkıları

Konsept: Kemal Ergin, Gökay Bozkurt, Dizayn: Kemal Ergin, Gökay Bozkurt, Safiye Aktaş, Veri Toplama veya İşleme: Kemal Ergin, Gökay Bozkurt, Cankut Çubuk, Safiye Aktaş, Analiz veya Yorumlama: Kemal Ergin, Gökay Bozkurt, Cankut Çubuk, Safiye Aktaş, Literatür Arama: Kemal Ergin, Yazan: Kemal Ergin, Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir. Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır. Finansal Destek: Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi rektörlüğü tarafından TPF-10032 no'lu Bilimsel Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Tome-Carneiro J, Larrosa M, Gonzalez-Sarrias A, Tomas-Barberan FA, Garcia-Conesa MT, Espin JC. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 6064-93.
2. Smoliga JM, Baur JA, Hausenblas HA. Resveratrol and health--a comprehensive review of human clinical trials. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55: 1129-41.

3. Halliwell B. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc Res* 2007; 73: 341-7.
4. Bishayee A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: From rodent studies to clinical trials. *Cancer Prev Res* 2009; 2: 409-18.
5. Alkhalaf M. Resveratrol-induced growth inhibition in MDA-MB-231 breast cancer cells is associated with mitogen-activated protein kinase signaling and protein translation. *Eur J Cancer Prev* 2007; 16: 334-41.
6. Fulda S, Debatin KM. Sensitization for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Cancer Res* 2004; 64: 337-46.
7. Fukui M, Yamabe N, Kang KS, Zhu BT. Growth-stimulatory effect of resveratrol in human cancer cells. *Mol Carcinog* 2010; 49: 750-9.
8. Athar M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, et al. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 224: 274-83.
9. Stervbo U, Vang O, Bonnesen C. Time- and concentration-dependent effects of resveratrol in HL-60 and HepG2 cells. *Cell Prolif* 2006; 39: 479-93.
10. Kang JH, Park YH, Choi SW, Yang EK, Lee WJ. Resveratrol derivatives potently induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Exp Mol Med* 2003; 35: 467-74.
11. Surh YJ, Hurh YJ, Kang JY, Lee E, Kong G, Lee SJ. Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Lett* 1999; 140: 1-10.
12. De Leo A, Arena G, Stecca C, Raciti M, Mattia E. Resveratrol inhibits proliferation and survival of Epstein Barr virus-infected Burkitt's lymphoma cells depending on viral latency program. *Mol Cancer Res* 2011; 9: 1346-55.
13. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 509-24.
14. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 199-227.
15. Randall G, Panis M, Cooper JD, Tellinghuisen TL, Sukhodolets KE, Pfeffer S, et al. Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 12884-9.
16. Keller A, Leidinger P, Lange J, Borries A, Schroers H, Scheffler M, et al. Multiple sclerosis: microRNA expression profiles accurately differentiate patients with relapsing-remitting disease from healthy controls. *PLoS One* 2009; 4: e7440.
17. Löfgren SE, Frostegård J, Truedsson L, Pons-Estel BA, D'Alfonso S, Witte T, et al. Genes Immun. Genetic association of miRNA-146a with systemic lupus erythematosus in Europeans through decreased expression of the gene. *Genes Immun* 2012; 13: 268-74.
18. Xiao B, Liu Z, Li BS, Tang B, Li W, Guo G, et al. Induction of microRNA-155 during *Helicobacter pylori* infection and its negative regulatory role in the inflammatory response. *J Infect Dis* 2009; 200: 916-25.
19. Nunez-Iglesias J, Liu CC, Morgan TE, Finch CE, Zhou XJ. Joint genome-wide profiling of miRNA and mRNA expression in Alzheimer's disease cortex reveals altered miRNA regulation. *PLoS One* 2010; 5: e8898.
20. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 7065-70.
21. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006; 9: 189-98.
22. Volinia S, Galasso M, Sana ME, Wise TF, Palatini J, Huebner K, et al. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 3024-9.
23. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol* 2012; 6: 590-610.
24. Nelson KM, Weiss GJ. MicroRNAs and cancer: past, present, and potential future. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 3655-60.
25. Phuah NH, Nagoor NH. Regulation of microRNAs by natural agents: new strategies in cancer therapies. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 804510.
26. Tili E, Michaille JJ. Resveratrol, MicroRNAs, Inflammation, and Cancer. *J Nucleic Acids* 2011; 2011: 102431.
27. Tili E, Michaille JJ, Alder H, Volinia S, Delmas D, Latruffe N, et al. Resveratrol modulates the levels of microRNAs targeting genes encoding tumor-suppressors and effectors of TGF β signaling pathway in SW480 cells. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 2057-65.
28. Dhar S, Hicks C, Levenson AS. Resveratrol and prostate cancer: promising role for microRNAs. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55: 1219-29.
29. Liang H, Xia Q, Li P, Kong H, Lei P, Wang S, et al. Resveratrol induces apoptosis of pancreatic cancer cells by inhibiting miR-21 regulation of BCL-2 expression. *Clin Transl Oncol* 2013; 15: 741-6.
30. Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17: F19-36.
31. Li Z, Lu J, Sun M, Mi S, Zhang H, Luo RT, et al. Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105: 15535-40.
32. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 111: 3183-9.
33. Ohyashiki JH, Umezumi T, Kobayashi C, Hamamura RS, Tanaka M, Kuroda M, et al. Impact on cell to plasma ratio of miR-92a in patients with acute leukemia: in vivo assessment of cell to plasma ratio of miR-92a. *BMC Res Notes* 2010; 3: 347.
34. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005; 65: 9628-32.
35. Takakura S, Mitsutake N, Nakashima M, Namba H, Saenko VA, Rogounovitch TI, et al. Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells. *Cancer Sci* 2008; 99: 1147-54.
36. Haug BH, Henriksen JR, Buechner J, Geerts D, Tomte E, Kogner P, et al. MYCN-regulated miRNA-92 inhibits secretion of the tumor suppressor DICKKOPF-3 (DKK3) in neuroblastoma. *Carcinogenesis* 2011; 32: 1005-1012.
37. Sharifi M, Salehi R, Gheisari Y, Kazemi M. Inhibition of microRNA miR-92a induces apoptosis and inhibits cell proliferation in human acute promyelocytic leukemia through modulation of p63 expression. *Mol Biol Rep* 2014; 41: 2799-808.