Gazi Tıp Dergisi / Gazi Medical Journal

ARAŞTIRMA - RESEARCH ARTICLE

2007: Cilt 18: Sayı 3: 117-120

İNSAN EPİDERMOİD LARİNKS KARSİNOM (HEp-2) HÜCRE SERİSİNDE RESVERATROL'ÜN APOPTOTİK ETKİSİ

Dilek TÜRKMEN[1], Erkan YURTÇU[2], M. Ali ERGUN[3], Adnan MENEVŞE[4]

Amaç: Resveratrol (trans-3,4'-trihidroxystilbene) polifenolik doğal bir bileşik olarak, üzüm, fındık, kırmızı şarap ve çeşitli yiyeceklerde çok bulunmaktadır. Resveratrol, antiinflamatör, antioksidan ve antikanser özellikleri vardır. Bu çalışmada İnsan Epidermoid Larinks HEp-2 hücre serisinde, resveratrolün apoptotik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: İnsan Epidermoid Larinks kanseri HEp-2 hücre serileri üretildi ve sonra farklı doz ve sürelerde resveratrolün etkisine maruz bırakıldı. Daha sonra apoptotik hücre ölümleri, yapısal değişiklikler DNA fragmantasyon metotları ile belirlendi.

Bulgular: Resveratrolün doz ve süreye bağımlı olarak HEp-2 hücre dizilerinde hücre ölümünü uyardığı, morfolojik ve internükleosomal DNA fragmantasyon deneyleri ile gösterildi.

Sonuç: Resveratrolün HEp-2 hücre dizilerinde apoptotik etkisi, belirli kanser türlerindeki tedavilerde yardımcı olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Resveratrol, Apoptoz, HEp-2.

THE APOPTOTIC EFFECT OF RESVERATROL ON HUMAN EPIDERMOID LARYNX CARCINOMA CELL LINE HEp-2

Purpose: Resveratrol (trans-3,4',5-trihydroxystilbene) is a naturally occurring polyphenolic compound highly enriched in grapes, nuts, red wine, and a wide variety of food sources. Resveratrol has anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer properties. In this study, Human Epidermoid Larynx HEp-2 cell lines were used to examine the apoptotic effect of resveratrol.

Materials and Methods: Human Epidermoid Larynx HEp-2 cell lines were cultured and then exposed to different concentrations of resveratrol for various periods. After treatments, apoptotic cell deaths were determined using morphological changes and DNA fragmentation methods.

Results: Our data show that resveratrol induces dose- and time-dependent death of HEp-2 cells, as measured morphologically and by internucleosomal DNA fragmentation assay.

Conclusion: Our data suggest that the apoptotic effect of resveratrol on HEp-2 cell lines may be useful for the treatment of certain types of cancer.

Key Words: Resveratrol, Apoptosis, HEp-2.

[1] Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbni Sina Hastanesi, Merkez Laboratuvarı
[2] Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD
[3] Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD
[4] Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD
* Bu çalışma 24-27 Kasım 2005 Tarihinde gerçekleşen 9. Ulusal Tıbbi Biyoloji kongresinde poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Resveratrol, Çin ve Japon geleneksel ilaçları arasında bulunmaktadır. Çok eskiden beri, inflamasyon, allerji ve hiperlipidemi gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olan bu bileşik, ilk kez 1963 yılında Polygonum cuspidatum (Polygonaceae, Japon knotweed) bitkisinin köklerinin aktif bileşeni olarak belirlenmiştir. Pek çok bitki türünde yaralanma, ultraviole ve mantar enfeksiyonlarına yanıt vermek üzere sentezlenen bu polifenolün, fındık, üzüm ve dutun da içinde bulunduğu günlük olarak tüketilen 72 bitki türünde ve şarapta bulunduğu gösterilmiştir (1,2).

Resveratrolün, antioksidan, antiproliferatif özelliklerine ek olarak kanser önleyici etkisi olduğu bildirilmiştir (3). Özellikle karsinogenezin üç ana basamağını bloke edici bir etkisi olduğu gösterilmiştir (2). Bununla birlikte, antikarsinojenik etkisine ilişkin moleküler mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemektedir (2).

Programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz, organizma gelişiminde, dokuların homeostasisinin korunmasında ve çok hücreli organizmalarda istenmeyen ya da hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasında önemli bir moleküler mekanizmadır (4). Apoptozun başlangıç evresinde hücre küçülmesi, çekirdekte kromatinin yoğunlaşması ve hücre zarında kabarmalar (blebbing) meydana gelmektedir. Apoptozun geç fazında ise çekirdek birkaç parçaya ayrılarak dağılmaktadır. İnternükleozomal DNA parçalanmasının gösterilmesi, apoptozun saptanmasında kullanılan temel metodlardan biridir (5). Bu uygulamada izole edilmiş DNA parçalarının agaroz jelinde tipik merdiven basamağı görüntüsü oluşturması, DNA fragmantasyonları anlamında değer kazanmaktadır (6).

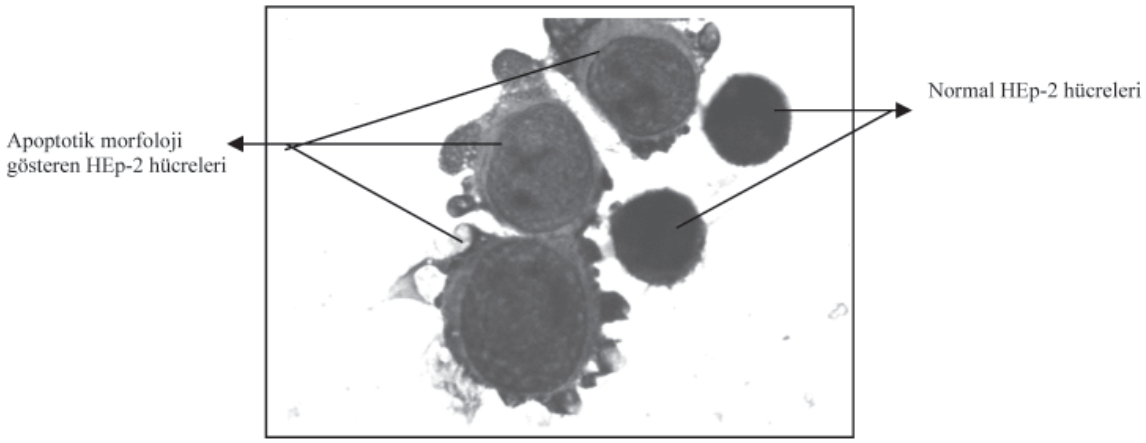
Resveratrolün apoptozu uyardığı, JB6 epidermal hücreleri, promiyelosit lösemi hücreleri (HL60), çeşitli kolon kanseri hücre serileri, meme kanseri hücre serileri ve prostat kanser hücrelerinin de dahil olduğu hücre gruplarında gösterilmiştir (7,8).

Bu çalışmamızda, insan epidermal larinks karsinoma hücre serisinde (HEp-2) resveratrolün apoptozu uyarma etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü

Hücre kültür besiyeri olarak, ısı ile inaktive edilmiş %10'luk fetal dana serumu (FCS), 200 mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin eklenmiş RPMI 1640 kullanılmıştır. Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü Viroloji Laboratuvarı'ndan temin edilen HEp-2 hücreleri 6'lı kültür kaplarında, her bir kuyu için hücre sayısı 1×10^6'ya ulaşıncaya kadar 37 °C'de %5 CO_2'li nemlendirilmiş etüv içerisinde inkübe edilmiştir. Resveratrol (R 5010, Sigma) son konsantrasyonu 25, 50, 75, 100 ve 150 µM olacak şe-



Resim 1: 100 µM resveratrol konsantrasyonunda gözlenen HEp-2 hücreleri, (büyütme 10×100)

kilde kültür ortamına eklenmiş ve hücreler 6, 12, 24 saatlik sürelerle inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak, resveratrolün çözünmesinde kullanılan %80'lik etanol kültür kaplarına eklenmiştir.

Hücre Morfolojilerinin Değerlendirilmesi

Resveratrol ile inkübasyon sonrası hücreler lama yayılarak, %70'lik etanolde fikse edilmiştir. Ardından %2'lik giemsa boyama sonrasında hücreler ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme yapılırken membran kabarmaları, yoğun ve piknotik çekirdek apoptozun morfolojik belirleyicileri olarak kabul edilmiştir. Değerlendirmeler, her doz ve süre için en az 100 hücre sayılması ve bunlar arasında apoptotik morfoloji gösteren hücrelerin normal morfoloji gösteren hücreler oranları şeklinde hesaplanmıştır. Hücre canlılığı tripan mavisi ile boyanarak belirlenmiştir (9).

DNA İzolasyonu ve Agaroz Jel Elektroforezi

Kontrol hücreleri ve resveratrol uygulanmış HEp-2 hücreleri, 40 µl PC tamponu (192 kısım 0.2M Na_2HPO_4 ve 8 kısım 0.1M sitrik asit, pH=7.8) eklenerek 30 dk oda ısısında bekletilmiştir. 1600 rpm'de 5 dk santrifüj işleminden sonra süpernatan alınmış ve 3 µl NP-40 (% 0,25 Nonidet, Sigma)) ve 3 µl RNaz A eklenerek 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Ardından 3 µl proteinaz K eklenerek karışım tekrar 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiş ve eşit hacimlerdeki örnekler alınarak %2'lik agaroz jele yüklenmiştir. 100 bç'lik DNA belirteci eşliğinde 75 V'ta 90 dk süresince yürütülmüştür. UV transilüminatör ile fotoğraflar çekilmiştir (9) (Resim 2).

İstatiksel Hesaplamalarda Kullanılan Yöntemler

Tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA) ve t testi (Paired Sample t Test) yöntemleri kullanılmıştır.

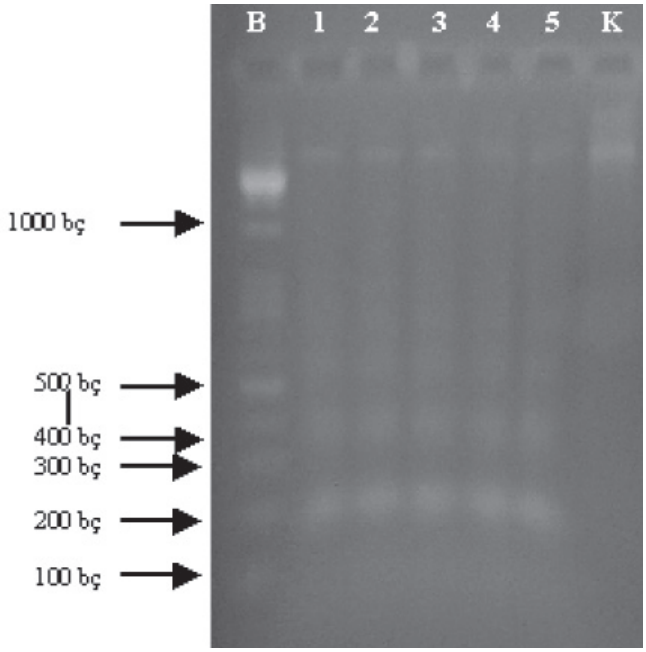
BULGULAR

Hücre Morfolojilerinin Değerlendirilmesi

Uygulanan tüm resveratrol konsantrasyonları ile 6, 12 ve 24 saat süre ile inkübe edilmiş Hep-2 hücreleri, kontrol hücreleri ile kıyaslandıklarında; hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması ve zar kabarmaları ve sitoplazmik granülleşme göstermişlerdir (Resim 1).

Konsantrasyon ve süre değişkenlerine göre apoptoz oranları

Çalışma kapsamına 6 kuyulu kaplarda çoğaltılan hücreler arasından canlılığı %90 ve üzerinde olanlar alınmıştır. Çalışma sonucunda tüm konsantrasyonlar ve zaman dilimlerindeki resveratrol uygulamalarının apoptoz oranlarını artırdığı belirlenmiştir. Uygulama süreleri göz önüne alındığında süre artışına paralel olarak apoptotik hücre sayısının arttığı gözlenmiştir. Uygulanan tüm konsantrasyonlar karşılaştırıldığında 100 µM resveratrol konsantrasyonunun apoptozu en çok uyaran doz olduğu saptanmıştır. Bu bulgulara paralel olarak 100 µM ve 24 saat uygulama süresi tüm deney sistemindeki en yüksek



Resim 2: 24 saat resveratrol uygulaması yapılan HEp-2 ve kontrol hücrelerinin DNA agaroz jel elektroforezi

1. 25 µM, 2. 50 µM, 3. 75 µM, 4. 100 µM, 5. 150 µM, B = 100 bç'lik molekül ağırlık belirteci, K= Negatif kontrol

Tablo 1. Süre ve Konsantrasyon Etkenlerinin Apoptotik Oranlar ile İlişkisi*

Resveratrol'le muamele süresi (saat)	Konsantrasyon (µM)	Apoptotik hücrelerin oranı (%)	Canlılık (%)
6	25	8,59	94,93
	50	10,28	89,27
	75	17,13	80,18
	100	21,26	76,08
	150	13,49	48,09
	Negatif kontrol	2,00	99,50
12	25	8,87	89,64
	50	14,96	90,02
	75	17,61	79,32
	100	24,63	75,11
	150	15,23	43,34
	Negatif kontrol	2,00	99,00
24	25	14,73	88,69
	50	20,64	86,47
	75	28,04	72,92
	100	31,33	70,19
	150	24,52	39,60
	Negatif kontrol	3,00	98,00

*Tabloda verilen tüm değerler kontrol grubuna gore $p<0.05$ aralığındadır

apoptoz etki oranını vermiştir (Tablo 1). Hücre canlılıklarındaki oran, 100 µM konsantrasyonlarda belirgin bir değişiklik vermezken, 150 µM konsantrasyonlarda, hücre canlılık oranları azalmıştır.

İstatiksel olarak tek yönlü varyans analizi tablosu kullanılarak sonuçlar değerlendirildiğinde, deneyin tamamı için % 95 güven aralığında resveratrol konsantrasyonlarının ve uygulama sürelerinin etkili olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Kontrol hücreleri ve resveratrol uygulaması yapılmış HEp-2 hücrelerinde belirlenen apoptoz oranları t-testi ile kıyaslandıklarında, resveratrol uygulamasının 0,05 anlamlılık düzeyinde etkili olduğu bulunmuştur.

Resveratrol etkisi ile uyarılan hücrelerde belirlenen morfolojik değişikliklerin yanı sıra apoptotik yolun aktivasyonu ile ilişkilendirilen internükleosomal DNA parçaları, agoraz jelde belirlenmiştir. Kontrol Hep-2 hücrelerinde düşük molekül ağırlıklı DNA parçaları gözlenmezken, denenmiş olan tüm süre ve konsantrasyon değerlerinde, resveratrol ile muamele edilen Hep-2 hücrelerinde düşük molekül ağırlıklı interkromozomal DNA parçaları agaroz jelde belirlenmiştir (Resim 2).

TARTIŞMA

Resveratrolün birçok kanser hücre serilerinde apoptotik hücre ölümünü başlattığı bildirilmiştir (10). Ancak resveratrolün epidermal kanser olgularındaki etkisi henüz anlaşılamamıştır. Bu çalışma, resveratrolün insan epidermal larinks karsinoma hücre serilerinde etkisini göstermeyi amaçlamaktadır. Sonuçlar, resveratrolün doz ve süreye bağlı olarak HEp-2 hücrelerinde apoptozu uyardığını göstermiştir. Kuşkusuz resveratrol etkisiyle gelişen apoptozda, kaspaz'3 ve 9' un aktivasyonları, sitokrom-C salımı gibi diğer apoptotik göstergelerinde incelenmesi gereklidir. Bu anlamda, yine resveratrolün birçok kanser hücre serilerinde gösterilmiş olan Bcl-2 protein ailesinin ekspresyonundaki değişiklikler ve mitokondri zar potansiyelindeki azalma (10), HEp-2 hücre serilerinde de gösterilmelidir. Bununla birlikte sonuçlarımız, diğer model sistemlerde gösterilmiş olan resveratrol-etkili apoptotik hücre ölüm mekanizmalarıyla uyumlu olup, resveratrol belki de Hep-2 hücrelerini de içeren çok farklı kanser hücre serilerinde ortak apoptotik sinyalleme yollarını kullanmaktadır.

Resveratrolün apoptozu uyarıcı etki gösterdiği konsantrasyon değerleri, farklı hücre serilerinde farklılık göstermektedir. Bu çalışmada, daha önceki çalışma sonuçları değerlendirilerek hücrelere uygulanacak resveratrol konsantrasyonları, 25-150 µM olarak belirlenmiştir (11,12). Apoptozun biyokimyasal bir özelliği olan, internükleozomal DNA parçalarının agaroz jelde oluşturduğu DNA merdiven basamağı modeli, pekçok çalışmada apoptozu belirlemekte kulllanılan metodlardan biridir. Niles ve arkadaşları, melanoma SK-mel ve A375 hücre serileri için bu modeli kullanarak 48 saat ve 50 µM resveratrol uygulaması ile en yüksek apoptotik etkiyi göstermişlerdir (7).

Çalışmamızda resveratrol, tüm inkübasyon süreleri ve konsantrasyon değerlerine bağlı olarak apoptotik hücre oranlarını artırdığı görülmüştür (Tablo 1). Pozo-Guisado ve arkadaşları meme kanseri hücre serisi MCF 7'de yaptıkları bir çalışmada,

resveratrolün artan konsantrasyonlarının apoptotik hücre oranını arttırdığını göstermişlerdir (13) Çalışmamızda resveratrolün 100 µM konsantrasyonun tüm konsantrasyonlar içinde apoptozu en çok uyaran doz olduğu belirlenmiştir (Tablo 1). Bu sonuç Ferry-Dumazet ve arkadaşlarının sonuçları ile de uygunluk göstermektedir (14). Tüm süreler göz önüne alındığında, yine 100 µM konsantrasyon için 24 saatlik uygulamada apoptotik oranın en yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 1).

Hücre canlılıkları incelendiğinde, 25-100 µM konsantrasyon aralığında resveratrol, canlılıklarda az da olsa bir azaltma göstertmektedir (Tablo 1). Bu düşüş kanser hücreleri kadar normal hücreler için de geçerli olacaktır. Bununla beraber konsantrasyon 150 µM'a ulaştığında canlılıkta görülen belirgin azalmanın apoptotik süreçten farklı, başka bir etkinin sonucu da olabilir. Bu konsantrasyon değerinin hücrelere toksik etki göstererek, apoptozdan çok, nekroza neden olduğu düşünülebilir. Yüz µM resveratrol konsantrasyonunun apoptozu en çok artıran doz olmakla birlikte hücre canlılık oranlarını çok az da olsa düşürmesi etkin doz olduğu konusunda şüphe uyandırmaktadır. Yetmiş beş µM dozun apoptoz ve canlılığa olan etkileri incelendiğinde; apoptozda anlamlı bir artış sağlarken, hücre canlılıklarına olan etkisi 100 µM konsantrasyona göre daha azdır. Deneydeki tüm süreler göz önüne alındığında bu bulgu daha net ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla bu dozun daha sonra planlanacak olan in vivo çalışmalar için etkin doz hesaplaması yapılırken dikkate alınması önerilebilir.

Çalışmamızda öne çıkan bir diğer sonuç, inkübasyon sürelerinin artışına bağlı olarak apoptotik oranlarda da bir artışın gözlenmiş olmasıdır. Bu bulgu Clément ve arkadaşlarının (15) HL60 hücrelerini kullanarak yaptıkları çalışma ile uyumludur. Bu çalışmada 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için, resveratrolün artan konsantrasyonlarına bağlı olarak apoptotik hücre ölüm oranlarının arttığı ve resveratrol uygulama sürelerinin apoptoz oranında etkili olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da resveratrole maruz kalma süresi arttıkça hücrelerin apoptoz oranlarında artış belirlenmiştir. Tüm sonuçlar incelendiğinde 24 saat resveratrol uygulamasının 6 ve 12 saatlik uygulamalara göre daha yüksek apoptoz oranları sağladığı görülmüştür (Tablo 1).

Öte yandan 6-12 saat uygulamalarda, uygulanan konsantrasyonlar için hücre canlılıkları, yaklaşık benzer oranlardadır. Ancak 24 saatlik uygulamada tüm konsantrasyonların hücre canlılıklarını diğer sürelere göre biraz azalttığı da görülmektedir. Resveratrol için hazırlanacak olan *in vivo* deney sistemleri için bu bulgunun da dikkate alınması önerilebir. .

Birçok doğal besin maddesinde bulunan resveratrolün umut veren kanser önleyici ve tedavi edici özelliklerinin, daha ileri bilimsel çalışmalarla kanıtlanması gerekmektedir. Sonuçların çeşitli kanserler türleri için korunma ve tedavi stratejilerindeki uygulamalara yardımcı olacağı düşünülmektedir. Hep-2 hücre serilerinde resveratrol-etkili apoptotik hücre ölümlerinden sorumlu sinyal yollarının belirlenmesi ve *in vivo* tümör engelleyici etkisinin daha ileri çalışmalarla kanıtlanması ile bu bileşiğin bilimsel anlamda olumlu etkisi kesinleşecektir.

Yazışma Adresi
Prof. Dr. Adnan Menevşe
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD Beşevler 06510 Ankara
Tel:312 2026932 Faks 312 2124647
e-posta amenevse gazi.edu.tr

KAYNAKLAR

1- Gusman J, Malonne H, Atassi G. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. Carcinogenesis 2001; 22: 1111-1117.

2- Dong Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. Mutat Res 2003; 523-524: 145-150.

3- Latruffe N, Delmas D, Jannin D, Malki MC, Passilly-Degrace P, Berlot JP. Molecular analysis on the chemopreventive proporties of resveratrol, a plant polyphenol microcomponent. Int J Mol Med 2002; 10: 755-760.

4- Park JW, Choi YJ, Suh SI, Baek WK, Suh MH, Jin IN, Min DS, Woo JH, Chang JS, Passaniti A, Lee YH, Kwon TK. Bcl-2 overexpression attenuates resveratrol-induced apoptosis in U937 cells by inhibition of caspase-3 activity. Carcinogenesis 2001; 22: 1633-1639.

5- Bohm I, Schild H. The complex scenario for a silent cell death. Mol Imaging Biol 2003; 5: 2-14.

6- Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. Cardiovasc Res 2000; 45: 528-537.

7- Niles RM, McFarland M, Weimer MB, Redkar A, Fu YM, Meadows GG. Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. Cancer Lett 2003; 190: 157-163.

8- Roy M, Chakraborty S, Siddiqi M, Bhattacharya RK. Induction of apoptosis in tumor cells by natural phenolic compounds. Asian Pac J Cancer Prev 2002; 3: 61-67.

9- Yurtcu E, Ergun MA, Menevse A. Apoptotic effect of gossypol on human lymphocytes. Cell Bio Int 2003; 27: 791-794.

10- Jiang H, Zhang L, Kuo J, Kuo K, Gautam SC, Groc L, Rodriguez AI, Koubi D, Hunter TJ, Corcoran GB, Seidman MD, Levine RA. Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. Mol Cancer Ther. 2005; 4: 554-561.

11- Hsieh TC, Halicka D, Lu X, Kunicki J, Guo J, Darzynkiewicz Z, Wu JM. Effects of resveratrol on the G0-G1 transition and cell cycle progression of mitogenically stimulated human lymphocytes. Biochem Biophys Res Commun 2002; 297: 1311-1317.

12- Joe AK, Liu H, Suzui M, Vural EM, Xiao D, Weinstein IB. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. Clin Cancer Res 2002; 8: 893-903.

13- Pozo-Guisado E, Alvarez-Barrientos A, Mulero-Navarro S, Santiago-Josefat B, Fernandez-Salguero PM. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. Biochem Pharmacol 2002; 64: 1375-1386.

14- Ferry-Dumazet H, Garnier O, Mamani-Matsuda M, Vercauteren J, Belloc F, Billiard C, Dupouy M, Thiolat D, Kolb JP, Marit G, Reiffers J, Mossalayi MD. Resveratrol inhibits the growth and induces the apoptosis of both normal and leukemic hematopoietic cells. Carcinogenesis 2002; 23: 1327-1333.

15- Clément MV, Hirpara JH, Chawdhury SH, Pervaiz S. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signalling-dependent apoptosis in human tumor cells. Blood 1998; 92: 996-1002.