

5-FLOROURACİL VE RESVERATROL KOMBİNASYONUNUN İNSAN AKCIĞER KANSERİ A549 HÜCRE HATTINDA APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ

The Effect of 5-Florouracil and Resveratrol Combination on Apoptosis in A549 Human Lung Cancer Cell Line

Can Ali AĞCA¹, Mahinur KIRICI², Abdurrahman CAN³, Yeşim YUMAK⁴

^{1,3,4}Bingöl Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, BİNGÖL, TÜRKİYE
²Bingöl Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, BİNGÖL, TÜRKİYE

ÖZ

ABSTRACT

Amaç: 5-Florourasil (5-FU), göğüs, mide, özofagus ve pankreas kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde kullanılan bir kemoterapi ilacıdır. Resveratrol (RES), flavon olmayan polifenolik bir bileşiktir ve çeşitli kanser türlerinde kemoterapötik etkisi bulunmaktadır. 5-FU ve RES'in etkilerinin tek başına kapsamlı bir şekilde araştırılmasına rağmen, RES ile kombine edilen 5-FU'nun A549 hücre hattı üzerine etkisi hala bilinmemektedir. Bu çalışmada, A549 akciğer kanseri hücre hattında 5-FU ve RES kombinasyonunun apoptotik yolak üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntemler: 5-FU ve RES kombinasyonunun A549 akciğer kanseri hücreleri üzerindeki etkisini belirlemek için, Water Soluble Tetrazolium-1 (WST-1) deneyi ile hücre canlılığı, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) kiti ile ROS seviyesi, klonojenik deney ile hücrelerin koloni oluşturma kabiliyeti, Western blot ile pro-apoptotik Bax ve TP53 kaynaklı glikoliz ve apoptozis düzenleyicisi (TIGAR) proteinlerin ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir.

Bulgular: 5-FU ve RES kombinasyonu, A549 hücre hattının hücre canlılığını ve koloni oluşturma potansiyelini önemli ölçüde azaltmıştır. Dahası, Western Blot analizi, 5-FU ve RES kombinasyonunun pro-apoptotik Bax proteininin artmasına neden olduğunu, TIGAR protein ekspresyon seviyesinin ise konsantrasyona bağlı bir şekilde azaldığını göstermiştir.

Sonuç: Sonuçlarımız, Resveratrolün A549 hücre dizisinde 5-FU'nun anti-tümör etkisini artırabileceğini göstermiştir.

Objective: 5-Fluorouracil (5-FU) is a chemotherapy drug used in various cancers including breast, stomach, esophageal and pancreatic cancer. Resveratrol (RES) is a well known non-flavon polyphenolic compound that has chemotherapeutic effect in various types of cancer. Despite the fact that effects of 5-FU and RES alone have been extensively studied in the past few years, the effect of 5-FU combined with RES in the A549 cell line remains unknown. In this study, we investigated the effect of combination of RES and 5-FU on apoptotic pathway in A549 lung cancer cell line.

Material and Methods: The effect of 5-FU and RES combination on A549 lung cancer cells was examined by cell viability using Water Soluble Tetrazolium-1 (WST-1) assays, by ROS level using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay and by the ability of cells to form colonies by clonogenic assay, pro-apoptotic Bax and TIGAR protein expression using Western Blotting analysis.

Results: Combination of 5-FU and RES significantly decreased cell viability and clonogenic potential of A549 cell line. Furthermore, Western Blotting analysis showed that 5-FU and RES combination caused pro-apoptotic Bax protein to increase, while TIGAR protein expression level decreased in concentration-dependent manner.

Conclusion: Our results suggested that resveratrol can increase the anti-tumor effect of 5-FU in A549 cell line.

Anahtar Kelimeler: 5-Florourasil, resveratrol, A549, TIGAR

Keywords: 5-Florouracil, Resveratrol, A549, TIGAR



Yazışma Adresi / Correspondence:

Bingöl Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, BİNGÖL, TÜRKİYE

Tel / Phone: +905306808828

Geliş Tarihi / Received: 28.09.2018

ORCID NO: ¹0000-0002-0244-3767, ²0000-0003-4642-7387

Dr. Can Ali AĞCA

E-posta / E-mail: caagca@bingol.edu.tr

Kabul Tarihi / Accepted: 15.09.2019

³0000-0002-5652-1740, ⁴0000-0001-5227-0932

GİRİŞ

Kanser tedavisinde, tek ajan kullanımında oluşan yanıtlar nispeten kısa süreli olup normal dokularda toksik etkiye neden olmaktadır. Bununla birlikte, başarılı kanser kemoterapisinin önündeki en büyük engellerden biri tek ajan tedavisi olarak görülmektedir. Çeşitli kemoterapi ilaçlarıyla yapılan kombine ya da çoklu bileşen tedavileri, sadece ilaçların etkilerini arttırmak için değil, aynı zamanda bu ilaçların neden olduğu toksisiteyi azaltmak için de kullanılmaktadır (1-3). Anti-metabolik ilaçlar sınıfına dahil olan 5-Florourasil (5-FU), DNA ve RNA makro moleküllerini inhibe ederek etkisini göstermektedir. Anti-kanser ve anti-metabolik etkinliği yüksek kemoterapötik bir ajan olan 5-FU baş, deri, meme, bağırsak ve boyun kanserleri gibi bir dizi kanser türü üzerinde kullanılmaktadır (4). Akciğer kanseri vakalarının %80-85'ini oluşturan adenokarsinomik insan alveolar bazal epiteliyal hücre hattı A549, çeşitli biyoaktif bileşiklerin potansiyel etkilerini incelemek için önemli bir modeldir. Küçük hücreli-dışı akciğer kanseri (KHDAK) hastalarında, 5-FU'ya karşı yanıtın %14-18 arasında olduğu, bir diğer kemoterapi ajanı cisplatin ile kombine edildiğinde ise bu yanıtın %33-58 olduğu bildirilmiştir (5). Resveratrol (3,5,4-trihidroksi-stilben) üzüm, fıstık ve bazı dut türleri gibi yiyeceklerde bulunan non-flavon polifenolik bir antioksidandır. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* birçok çalışma resveratrolün, kemopreventif ve kemoterapötik etkiye sahip olduğunu göstermektedir (6-8). Tip I programlanmış hücre ölümü olan apoptozisin, hücre yapısının ve organellerin hızlı bir biçimde yıkılmasına neden olan katabolik enzimleri aktive ettiği bildirilmiştir (9,10). Apoptozisi hedef alan ajanlar, kanser hücresi sağkalım mekanizmalarını tamamen ortadan kaldıramadığından dolayı amacını yerine getirememektedir. TP53 kaynaklı glikoliz ve apoptozis düzenleyicisi olan TIGAR'ın (*C12orf5 geni*), pentoz fosfat yolu ile glikolizin bloke edilmesi ve hücre metabolizmasının sürdürülmesinde görev aldığı rapor

edilmiştir (11). TIGAR'ın glikolizin inhibisyonuna neden olan hücrel fruktoz-2,6-bisfosfat (*Fru-2,6-P2*) düzeyini azalttığı, pentoz fosfat yolağı vasıtasıyla NADPH (Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat) düzeyini ise arttırarak ROS seviyesini kontrol ettiği ve oksidatif fosforilasyon kaynaklı apoptozisi engellediği bildirilmiştir (12,13). Won ve arkadaşları, TIGAR ekspresyonunun, invazif kanser hücrelerinde önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir (14). Bu noktadaki temel sorulardan biri "Kanser hücrelerinin sağkalımı bu denli glikolize bağlı iken neden daha fazla TIGAR'a ihtiyaç duyulmaktadır?" olmalıdır. Bensaad ve arkadaşları, TIGAR'ın ROS ile indüklenen apoptotik hücre ölümüne karşı hücreyi koruduğunu rapor etmişlerdir (13). Bu durum kanser hücrelerinin neden yüksek düzeyde TIGAR'a ihtiyaç duyduklarını bize açıklamaktadır. TIGAR, NADPH üretiminin artışı ile hücre içi ROS seviyesini azaltma fonksiyonuna sahiptir (13,15). Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri bulunan Bcl-2 (B-cell lymphoma gene-2) protein ailesi programlı hücre ölümü olan apoptozisin önemli düzenleyicileridir. Pro- apoptotik bir protein olan (Bcl-2 associated x) Bax, hücre içi ölüm sinyalinin artışı ile beraber sitoplazmadan mitokondri membranına translokale olarak mitokondriyal yolağın aktivasyonuna neden olmaktadır (16). Bu çalışmada, A549 hücre hattında 5-FU ve RES kombinasyonunun TIGAR ve Bax proteinlerinin ekspresyonuna olan etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar resveratrolün 5-FU'nun A549 hücreleri üzerindeki anti-tümör etkilerini apoptozu indükleyerek kuvvetlendirdiğini göstermektedir.

MATERYAL VE METOD

Hücre Kültürü

Bu çalışmada, ATCC'den (American type cell culturing) temin edilen akciğer kanseri hücreleri olan A549 hücre hattı kullanılmıştır. Hücrelerin çoğalması, %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS), 64

$\mu\text{g/ml}$ penisilin ve $100 \mu\text{g/ml}$ streptomisin ile desteklenen RPMI-1640 besiyerinde %5'lik CO_2 içeren 37°C 'lik nemli hücre kültür inkübatöründe (ESCO, CCL-170B-8, 2015-104540) inkübe edilerek sağlanmıştır.

Hücre Canlılık Testi

Hücreler, 96 kuyucuklu plakalara, her bir kuyucukta 1×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir. İlgili kültür plakaları ekimin ardından hücrelerin yüzeye adezyonunu sağlaması için nemli CO_2 inkübatöründe 24 saat inkübe edilmiştir. Hücreler, 24 saat süre ile $25 \mu\text{M}$ (RES25), $50 \mu\text{M}$ resveratrol (RES50) ve $5 \mu\text{M}$ 5-FU ile ayrı ayrı ve kombinasyon ((RES25/5-FU) ve (RES50/5-FU)) halinde tedavi edilmiştir. Tedavi sonrasında, besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve üretici firmanın geliştirdiği protokol uyarınca, her kuyucuğa $10 \mu\text{l}$ WST-1 (Boster Biological Technology Co., Ltd.) solüsyonu ve RPMI-1640 besiyeri ile $100 \mu\text{l}$ tamamlanarak kuyucuklara aktarılmıştır. Plakalar ışık almayacak şekilde muhafaza edilerek 120 dk süre ile 37°C 'lik CO_2 (%5) inkübatöründe inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında ELISA okuyucu ile 490 nm 'de absorbansları kaydedilmiştir (referans dalga boyu: 630 nm).

Koloni Formasyonu Deneyi

Koloni formasyon deneyi için izlenen protokol; 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen hücreler ilgili tedavilerin ardından 12 gün boyunca %5 CO_2 içeren nemli 37°C 'de inkübe edilmiştir. Her 3 günde bir besiyeri değiştirilmiş ve mikroskop altında incelenmiştir. Her bir koloninin minimum 50 hücreye ulaşması ve birbirlerine yakın temasta bulunmamları göz önünde bulundurularak deney 12. gününde durdurulmuştur. Hücrelerin bulunduğu ortamdaki besiyeri aspiratör ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücreler 1X PBS ile yıkanmış ve bu işlem 3 kez tekrar edilmiştir. Akabinde fiksasyon için metanol-asetik asit solüsyonu ile 5 dk muamele edilen hücreler, %0.5 kristal violet ile 15 dk boyunca oda sıcaklığında

inkübe edilmiştir. Yapılan bu işlemde sonra kuyucuklar su ile dikkatli bir şekilde yıkanıp koloniler mikroskop altında sayıma alınmıştır. Minimum elli hücreden oluşan gruplar koloni olarak kabul edilmiştir.

Hücre İçi ROS Düzeylerinin Belirlenmesi

Hücrelerdeki ROS düzeylerini belirlemek amacıyla 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) kiti (ABCAM, DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit, ab113851) kullanılmıştır. Tedarikçi firmanın geliştirmiş olduğu protokol takip edilmiştir. Resveratrol ve 5-FU tedavilerinin ardından hücrelerin bulunduğu ortama $25 \mu\text{M}$ DCFDA solüsyonundan eklenmiş ve 45 dk boyunca 37°C CO_2 inkübatöründe bekletilmiştir. İnkübasyon süresinin bitiminde besi yeri kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 1X yıkama solüsyonundan eklenmiştir. Ardından ELISA okuyucu ile absorbansı Ex 485 nm /Em 535 nm de okutulmuştur.

Western Blot

Hücrelerdeki proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin gösterilebilmesi için total protein içerikleri özütlenerek, hedef proteinlerin ifade düzeyleri western blot ile belirlenmiştir. Kazıyıcı yardımı ile toplanan hücreler, RIPA parçalama tamponu ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyonun ardından hücreler buz üzerinde 60dk süre ile inkübe edilmiştir. Ardından örnekler 14000 rpm 'de 4°C 'de 10dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kısım yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Total protein içerikleri Bradford metodu ile belirlenen örnekler Laemmli Sample Buffer ile karıştırıldıktan sonra 5 dk süre ile 96°C 'de bekletilmiştir. Örnekler, denatüre şartlar altında SDS-PAGE (%12) (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) jeli kullanılarak ayrılmıştır. Ardından, jelde ayrılan proteinlerin Polyvinilidenedifluoride (PVDF) membrana transferi sağlanmıştır. Transfer sonrasında 1X TBS-T (Tris-Buffered Saline and Tween 20) solüsyonunda çözülmüş %5'lik BSA (Bovine Serum Albumin) ile

60dk süre ile oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Membran ilgili primer antikor ile gece boyunca +4°C’de çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. TIGAR, B-actin ve Anti-mouse antikorları Santa Cruz Biotechnology (SantaCruz, CA) firmasından Bax ve Anti-rabbit antikorları (Abcam, UK) firmasından temin edilmiştir. Ertesi gün, membran 1X TBS-T ile 5dk/5 kez yıkandıktan sonra sekonder antikor ile 60 dk süre ile oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Membran 1X TBS-T ile 5dk/5 kez yıkandıktan sonra kemilüminesans yöntemi ile görüntüler elde edilmiştir. Bant yoğunlukları Image-j programı kullanılarak dansitometrik olarak değerlendirilmiştir (Image J; National Institute of Health, Bethesda, MD). Her banttaki yoğunluk değeri, karşılık gelen B-actin bandının yoğunluğuna göre normalize edilmiştir.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz “One-way ANOVA” metodunda çoklu karşılaştırma Post-Hoc Testlerine göre Graph Pad Prism 5.01 programı ile analiz edilmiştir. Analizlerde p <0.05 önemli olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Resveratrol ve 5-FU’nun hücre canlılığı ve koloni formasyonuna olan etkisi

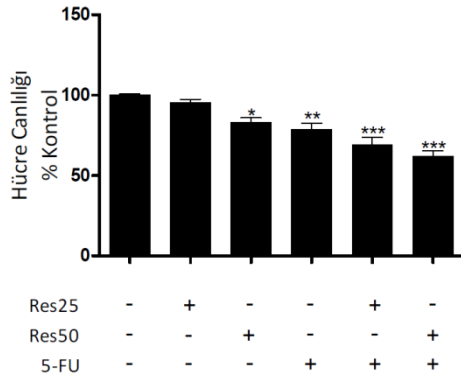
Resveratrol ve 5-FU’nun antiproliferatif aktivite gösterip göstermediğini incelemek için bu çalışmada resveratrol ve 5-FU’nun A549 hücrelerinin büyümesi üzerindeki etkilerini incelemiştir. Hücre canlılığına olan etkileri üretici firmanın geliştirdiği protokol uyarınca WST-1 testi ile belirlenmiştir. A549 hücreleri,

25 ve 50 µM dozlarında resveratrol ve 5 µM 5-FU ile ayrı ayrı ve kombinasyonları halinde 24 saat süre ile tedavi edilmiştir. Şekil 1A’da gösterildiği gibi, 25 µM resveratrol tedavisinin istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı, öte yandan 50 µM resveratrol ve 5 µM 5-FU’nun bireysel inhibisyon etkisinin sırası ile %16.77 ve %21.38 oranında olduğu belirlenmiştir. Kombinasyon gruplarında ise; 25 µM resveratrol/5 µM 5-FU ve 50 µM resveratrol/5 µM 5-FU sırası ile %30.79 ve %38.02 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde arttığı belirlenmiştir (Şekil 1A). Resveratrol ve 5-FU’nun A549 hücre hattında koloni oluşturma kabiliyeti üzerine etkisi olup olmadığını incelemek için; Koloni formasyon deneyi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, resveratrol (25 µM ve 50 µM) ve 5-FU’nun bireysel tedavilerinin, A549 hücrelerinin koloni oluşturmada herhangi bir etkisinin olmadığını ancak resveratrol ve 5-FU’nun kombine edildiği gruplarda koloni formasyonunu istatistiksel olarak azalttığını göstermiştir (Şekil 1B).

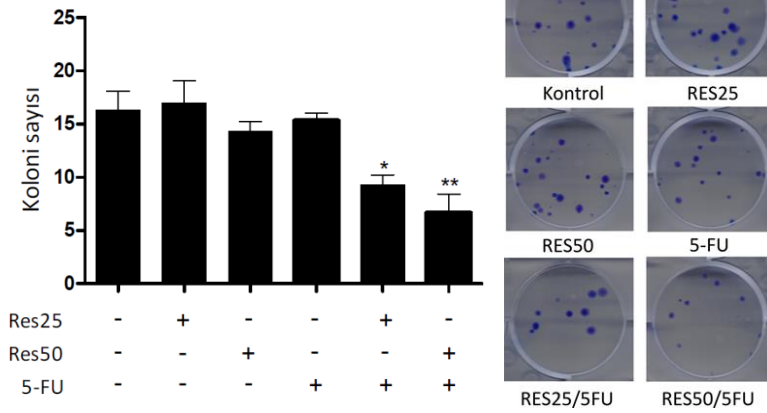
Resveratrol ve 5-FU’nun Hücre İçi ROS Düzeyine Olan Etkisi

Hücre içi ROS düzeyi, üretici firmanın geliştirdiği protokol uyarınca DCFDA kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. A549 hücreleri, 24 saat süre ile resveratrol, 5-FU ve kombinasyonları ile tedavi edildikten sonra hücre içi ROS düzeyleri belirlenmiştir. Kontrol grubuna oranla resveratrol ile tedavi edilen gruplarda doz bağımlı olarak hücre içi ROS düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Kombinasyon gruplarında da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 2).

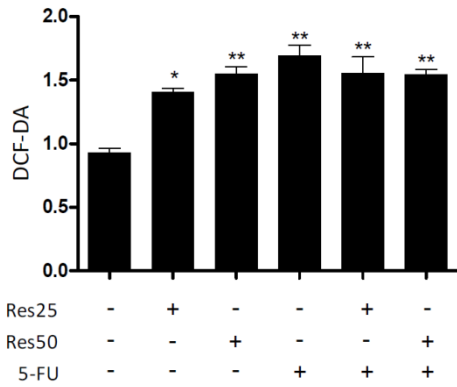
A



B



Şekil 1: Resveratrol ve 5-FU kombinasyonlarının hücre canlılığı ve koloni formasyonuna olan etkisi. A) Hücre canlılık düzeyleri B) Koloni sayıları ve koloni formasyon analizi. (Kontrol grubuna kıyasla, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$).

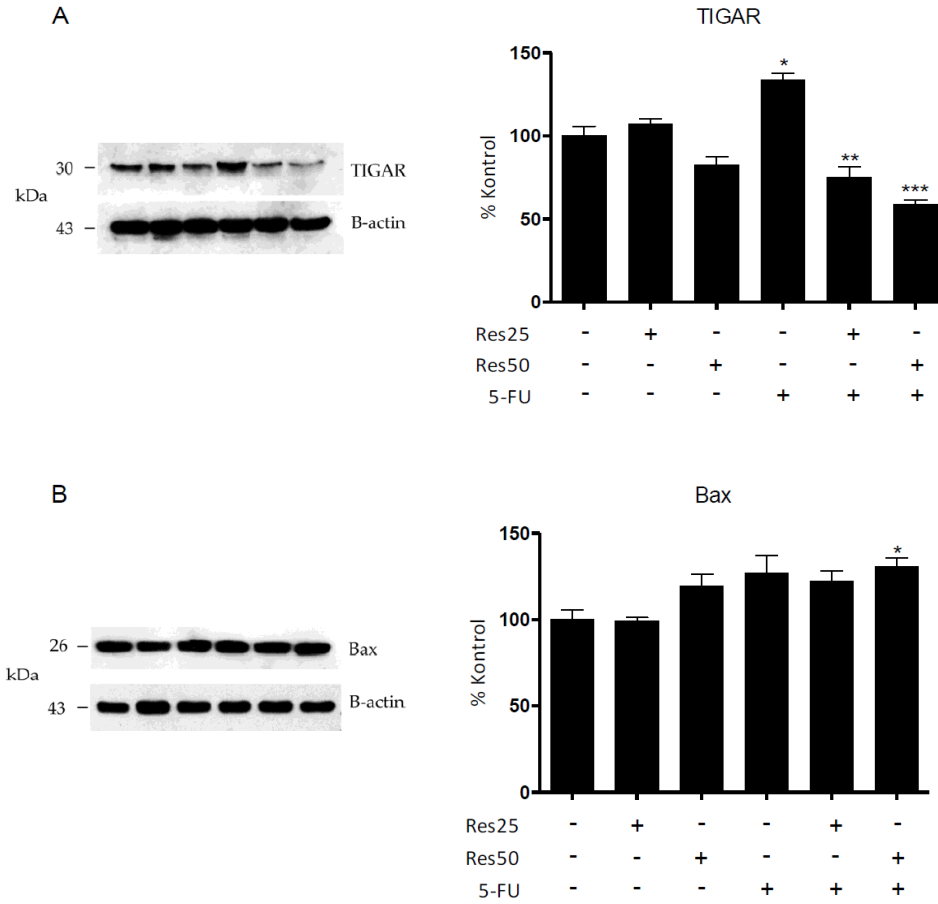


Şekil 2: Resveratrol, 5FU ve RES/5FU kombinasyonlarının hücre içi ROS düzeyine olan etkisi. (Kontrol grubuna kıyasla, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$).

Resveratrol ve 5-Fu Kombinasyonunun Tigar ve Bax Proteinlerinin Ekspresyon Düzeylerine Etkisi

A549 hücreleri, 24 saat süre ile resveratrol, 5-FU ve kombinasyonları ile tedavi edildikten sonra TIGAR ve Bax proteinlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişim Western blot tekniği ile belirlenmiştir. TIGAR protein ekspresyonunda, resveratrol tedavisinin istatistiksel

olarak anlamlı bir değişime neden olmadığı, öte yandan 5-FU tedavisinin ise kontrol grubuna oranla bir artışa neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3A). Pro-apoptotik Bax protein ekspresyonunda ise kontrol grubuna oranla sadece 50 µM resveratrol ve 5 µM 5-FU'nun kombine edildiği grupta istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmuştur (Şekil 3B).



Şekil 3: Resveratrol ve 5-FU kombinasyonlarının TIGAR ve Bax proteinlerinin ekspresyon düzeylerine olan etkisi. A) TIGAR proteini ekspresyon düzeyi B) Bax proteini ekspresyon düzeyi (Kontrol olarak β -actin kullanıldı). (Kontrol grubuna kıyasla, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$).

TARTIŞMA

Kemoterapi, birçok ciddi yan etkisi olmasına rağmen kanser tedavisi için uygulanan en yaygın tedavi yaklaşımlarından biridir. Bu durum, arttırılmış anti-kanser aktivitesi ile daha az yan etkiye sahip olan yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi gerekliliğini zorunlu

kılmaktadır. 5-FU, yüksek anti-metabolik aktivitesi ile DNA ve RNA makro moleküllerini inhibe ederek hücrelere karşı seçici öldürücü etkiye sahip kemoterapötik ajan olarak kabul edilmektedir (4,5). Yakın zamanlı çalışmalarda, 5-FU'nun hücre döngüsünün durdurulması ve hücre ölüm tipi

apoptozisi uyarabildiği gösterilmiştir (17,18). Kolon kanseri dışındaki kanser türlerinde tek başına yüksek etki gösteremediğinden dolayı sisplatin, lökoverin ve oksalpin gibi ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılmaktadır (5). Çoklu ilaç kombinasyonları, uygulanan ajanların etkinliğini artırmakla beraber, kombinasyonların neden olduğu yan etkilerin artmasına da neden olmaktadır. Doğal polifenolik bir bileşik olan resveratrolün, sahip olduğu antioksidan aktivite ile çeşitli kanser türlerinde apoptozisi uyardığı ve anjiogenezisi baskıladığı rapor edilmiştir (19,20). Bu çalışma ile, akciğer kanseri A549 hücre hattında, 5-FU ve resveratrol kombinasyonunun potansiyel etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Önceki çalışmalar, bir izoflavon olan genisteinin 5-FU ile birlikte tedavisinin, kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, sadece genistein veya 5-FU ile karşılaştırıldığında daha etkili bir şekilde azalttığını göstermiştir (21). Yapılan bir başka araştırmanın sonuçlarına göre, resveratrol ve 5-FU ile kolon kanseri hücrelerinin birlikte tedavisi, tek başına resveratrol veya 5-FU ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunu daha etkili bir şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir (22). Yakın zamanlı bir başka çalışmada ise, B16 melenoma hücrelerinin resveratrol ve 5-FU ile kombine tedavisinin doz bağımlı olarak, hücre proliferasyonunu azalttığı, COX-2, VASP ve VEGF ekspresyon seviyelerini düzenleyerek, anjiyogenez üzerindeki sinerjistik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (23). Çalışmamızda, A549 hücreleri, resveratrol (25 µM ve 50 µM) ve 5-FU (5 µM) ile ayrı ayrı ve kombinasyonları halinde 24 saat süre ile tedavi edilmiştir. Tedavi sonrası hücre canlılıkları WST-1 testi ile belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, 25 µM resveratrol tedavisinin hücre canlılığına bir etkisinin olmadığı öte yandan resveratrol (RES50, %16.77) ve 5-FU'nun (5-FU, %21.38) bireysel inhibisyon etkisinin kombinasyon gruplarında (RES25/5-FU, %30.79 ve RES50/5-FU, %38.02) önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir (Şekil 1A). Elde edilen bu sonuçlar, resveratrol ve 5-FU'nun

kombinasyonunun, tek başına resveratrol veya 5-FU ile karşılaştırıldığında hücre büyümesini daha verimli bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir. Dahası, A549 hücresinde, resveratrolün 5-FU'nun, hücre canlılığı üzerine olan etkisini arttırdığını göstermektedir. Ayrıca, resveratrol ve 5-FU ayrı ayrı ve kombinasyon tedavilerinin, A549 hücre hattının koloni oluşturma yeteneğine olan etkisi koloni formasyon deneyi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar kombinasyon gruplarında oluşan koloni sayısının sadece resveratrol ve 5-FU grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde azaldığını ortaya koymuştur (Şekil 1B). Seçilmiş resveratrol ve 5-FU'nun kombinasyon dozunun, hücre çoğalmasını ve A549 akciğer kanseri hücre hattının koloni oluşturma kabiliyetini inhibe etmede daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Hücre hasar, oksidatif stres ve DNA hasarına yol açabilen yüksek ROS seviyeleri, maruz kalmanın şiddetine ve süresine bağlı olarak hücre sağ kalımını veya apoptoz mekanizmalarını ortaya çıkarabilir. p53'ün kontrolü altında TIGAR'ın glikoliz inhibisyonuna neden olan hücre hasarını fruktoz-2,6-bisfosfat (Fru-2,6-P2) düzeyini azalttığı, pentoz fosfat yoluyla vasıtasıyla NADPH düzeyini ise artırarak ROS seviyesini kontrol ettiği ve oksidatif fosforilasyon kaynaklı apoptozisi engellediği bildirilmiştir (12,13). Ayrıca, TIGAR'ın metabolik veya beslenmeye dayalı oluşum gösteren streslere tepki olarak ROS'u modülasyona uğrattığı ve ROS kaynaklı otofajiyi inhibe ettiği rapor edilmiştir (24). ROS'a karşı oluşan yanıt antikanser ajanlarının sitotoksik etkisine karşı korumada kritik rol oynayabilmektedir (15, 25). Ayrıca hücre içi yüksek glutatyon (GSH) konsantrasyonu hücrelerin birçok kemoterapötik ajana karşı direnç kazanmasından sorumlu tutulmuştur (13). Kumar ve arkadaşları resveratrolün ROS aracılı apoptozis ve otofajiyi teşvik etmek için TIGAR'ı inhibe ettiğini ve olası kanser tedavisi için resveratrol ve klorokin kombinasyonunun önemli olduğunu bildirmişlerdir (26). Hücre hattına bağlı olmaksızın resveratrol

tedavisi uygulanan hastalarda TIGAR protein seviyesinde azalma gözlemlenmiş ve buna bağlı olarak resveratrolün ROS bağımlı anti-tümör aktivitesinde TIGAR proteinin önemli bir yere sahip olduğu belirlenmiştir (27). Farklı kanser hücre hatlarında TIGAR inhibisyonunun apoptotik yolağı aktive ettiği bildirilmiştir (13,28). Resveratrol ve 5-FU kombinasyonlarının hücre içi ROS düzeyine olan etkisini belirlemek amacıyla A549 hücreleri 24 saat süre ile resveratrol (25 µM, 50 µM) ve 5-FU (5 µM) ile ayrı ayrı ve kombinasyonları şeklinde tedavi edilmiştir. Tedavi sonrası A549 hücre içi ROS düzeyi DCFDA kiti kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, hücre içi ROS düzeyinin kontrol grubuna oranla RES25, RES50 ve 5-FU gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde arttığını göstermiştir. Kombinasyon gruplarındaki artışın ise sadece 5-FU ile tedavi edilen grupla kayda değer bir farkı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 2). Ayrıca çalışmamızın odak noktası olan, hücre içi ROS düzeyi ile doğrudan ilişkili TIGAR ve pro-apoptotik Bax proteinlerinin ekspresyon düzeyleri western blot analizi ile belirlenmiştir. Ekspresyon düzeyleri analiz sonuçlarına göre, TIGAR proteininin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında çarpıcı bir biçimde 5-FU grubunda %33.60 oranında arttığı, öte yandan RES25/5-FU kombinasyon grubunda %25.09 ve RES50/5-FU grubunda ise %41.05 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 3A). Elde edilen bu sonuçlar, sadece 5-FU tedavisi ile artan TIGAR ekspresyonunun, 5-FU'nun resveratrol ile kombine edildiği gruplarda azaldığını göstermektedir. Kombinasyon tedavisi ile azalan TIGAR ekspresyonunun, ROS aracılı apoptozisi teşvik edebileceğini ortaya koymaktadır. Programlı hücre ölümü olan apoptoziste, anahtar uygulayıcısı olarak karşımıza Kaspaz-3 çıkarken, anti-apoptotik Bcl-2 ve pro-apoptotik Bax proteinleri apoptozisin mitokondriyal yolağında önemli roller oynamaktadır (29). Bcl-2, mitokondriyal membran depolarizasyonunu önleyerek kaspaz-3 aktivasyonunu

baskılamakta ve apoptozisin inhibe olmasına neden olmaktadır. Öte yandan Bax, mitokondriyal membran depolarizasyonunu indükleyerek apoptozisi teşvik etmektedir (30). Yapılan çalışmalar, ROS'un Bcl-2/Bax bağımlı mitokondriyal yolağı düzenleyerek apoptozisi indükleyebileceğini göstermiştir. Bcl-2'nin fosforilasyonunu düzenleyen hücre içi ROS artışı, azalmış Bcl-2 ve artan pro-apoptotik Bax ekspresyonuna neden olmakta ve bunun sonucu olarak hücreyi apoptozise karşı hassas hale getirmektedir (31-33). Elde ettiğimiz western blot sonucuna göre, Pro-apoptotik Bax proteininin ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece RES50/5-FU kombinasyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir. Bu durum, sadece 5-FU tedavisinin TIGAR proteininin ekspresyonunu arttırdığını ve ROS aracılı apoptotik yolağın baskılanmasına neden olduğunu göstermektedir. Diğer yandan, resveratrol ve 5-FU kombinasyonunun ise doz bağımlı olarak TIGAR'ın ekspresyonunu azalttığı ve pro-apoptotik Bax ekspresyonunu ise arttırdığını ortaya koymuştur.

Elde ettiğimiz bu sonuçlar, A549 hücresinde 5-FU tedavisinin resveratrol ile birlikte kullanılmasının 5-FU'nun kemoterapötik etkisinin artmasına olanak sağlayacağını göstermektedir. Ancak, 5-FU ve resveratrol kombinasyonun, akciğer kanseri üzerindeki etki mekanizmasının tam olarak aydınlatılması için ileri *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Teşekkür: Bu çalışma TÜBİTAK tarafından (proje no:1919B011701166) desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Fitzgerald JB, Schoeberl B, Nielsen UB, Sorger PK. Systems biology and combination therapy in the quest for clinical efficacy. *Nat Chem Biol.* 2006;2(9):458-66.
2. Wang W, Yang SM, Su Y, Xiao ZY, Wang CY, Li XF et al. Enhanced antitumor effect of combined

- triptolide and ionizing radiation. *Clin Cancer Res.* 2007;13(16):4891-9.
3. Okon T, Schwartzberg L. Are we winning the war on cancer. *J Oncol Pract.* 2011;7(3):62-4.
 4. Ueda M, Kumagai K, Ueki K, Inoki C, Orino I, Ueki M. Growth inhibition and apoptotic cell death in uterine cervical carcinoma cells induced by 5-fluorouracil. *Int J Cancer.* 1997;71(4):668-74.
 5. Tsai CM, Hsiao SH, Frey CM, Chang KT, Perng RP, Gazdar AF et al. Combination cytotoxic effects of cis-diamminedichloroplatinum (II) and 5-fluorouracil with and without leucovorin against human non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 1993;53(5):1079-84.
 6. Stewart JR, Artime MC, O'Brian CA. Resveratrol: a candidate nutritional substance for prostate cancer prevention. *J Nutr.* 2003;133(7):2440-3.
 7. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2004;24(5A):2783-840.
 8. Patel KR, Brown VA, Jones DJ, Britton RG, Hemingway D, Miller AS et al. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 2010;70(19):7392-9.
 9. Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell.* 2005;121(5):671-4.
 10. Kim DH, Park KW, Chae IG, Kundu J, Kim EH, Kundu JK et al. Carnosic acid inhibits STAT3 signaling and induces apoptosis through generation of ROS in human colon cancer HCT116 cells. *Mol Carcinog.* 2016;55(6):1096-110.
 11. Gottlieb E, Vousden KH. p53 regulation of metabolic pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(4):1-14.
 12. Kondoh H, Leonart ME, Gil J, Wang J, Degan P, Peters G et al. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res.* 2005;65(1):177-85.
 13. Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell.* 2006;126(1):107-20.
 14. Won KY, Lim SJ, Kim GY, Kim YW, Han SA, Song JY et al. Regulatory role of p53 in cancer metabolism via SCO2 and TIGAR in human breast cancer. *Human Pathol.* 2012;43(2):221-8.
 15. Oliva CR, Moellering DR, Gillespie GY, Griguer CE. Acquisition of chemoresistance in gliomas is associated with increased mitochondrial coupling and decreased ROS production. *PLoS ONE.* 2011;6(9):e24665.
 16. Tunç İ, Zergeroğlu S, Daylan B, Aydoğdu T, Mollamahmutoğlu L. Serviks Kanserlerinde BCL-2 ve BAX Protein Expresyonları ve Prognostik Faktörlerle Korelasyonu. *Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi.* 2004;7(4):140-8.
 17. Tseng YS, Tzeng CC, Chiu AWH, Lin CH, Won SJ, Wu IC et al. Ha-ras overexpression mediated cell apoptosis in the presense of 5-fluorouracil. *Exp Cell Res.* 2003;288(2):403-14.
 18. Huang CJ, Yang SH, Huang SM, Lin CM, Chien CC, Chen YC et al. A predicted protein, KIAA0247, is a cell cycle modulator in colorectal cancer cell sunder 5-FU treatment. *J Transl Med.* 2011;9(1):82-9.
 19. Garvin S, Ollinger K, Dabrosin C. Resveratrol induces apoptosis and inhibits angiogenesis in human breast cancer xenografts in vivo. *Cancer Lett.* 2006;231(1):113-22.
 20. Emmett MS, Dewing D, Pritchard-Jones RO. Angiogenesis and melanoma-from basic science to clinical trials. *Am J Cancer Res.* 2011;1(7):852-68.

21. Hwang JT, Ha J, Park, OJ. Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;332(2):434-40.
22. Colin D, Gimazane A, Lizard G, Izard JC, Solary E, Latruffe N et al. Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated protein and 5-fluorouracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *Int J Cancer.* 2009;124(12):2780-8.
23. Lee SH, Koo BS, Park S.Y, Kim YM. Anti-angiogenic effects of resveratrol in combination with 5-fluorouracil on B16 murine melanoma cells. *Mol Med Rep.* 2015;12(2):2777-83.
24. Bensaad K, Cheung E C, Vousden K H. Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy. *EMBO J.* 2009;28(19):3015-26.
25. Landriscina M, Maddalena F, Laudiero G, Esposito F. Adaptation to oxidative stress, chemoresistance, and cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(11):2701-16.
26. Kumar B, Iqbal MA, Singh RK, Bamezai RN. Resveratrol inhibits TIGAR to promote ROS induced apoptosis and autophagy. *Biochimie.* 2015;118:26-35.
27. Yu H, Xie J, Li B, Sun Y, Gao Q, Ding Z et al. TIGAR regulates DNA damage and repair through pentose phosphate pathway and Cdk5-ATM pathway. *Sci Rep.* 2015;5:9853.
28. Zhao M, Fan J, Liu Y, Yu Y, Xu J, Wen Q. Oncogenic role of the TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator in nasopharyngeal carcinoma through NF-κB pathway modulation. *Int J Oncol.* 2016;48(2):756-64.
29. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13:1899-911.
30. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke.* 2009;40(5):331-9.
31. Hildeman DA, Mitchell T, Aronow B, Wojciechowski S, Kappler J, Marrack P. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(25):15035-40.
32. Li D, Ueta E, Kimura T, Yamamoto T, Osaki T. Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer Sci.* 2004;95(8):644-50.
33. Luanpitpong S, Chanvorachote P, Stehlik C, Tse W, Callery PS, Wang L. Regulation of apoptosis by Bcl-2 cysteine oxidation in human lung epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 2013;24(6):858-69.